



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN
METALURGIA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES

**Microesferas de Quitosano/Biovidrio 45S5/Acetaminofén por el Método
de Doble Emulsión Sólido/Agua/Aceite (S/W/O) y Evaporación de
Solvente**

Tesis para obtener el Grado de Maestra en Metalurgia y Ciencia de los Materiales
presenta:

ING. CARLA XIMENA PANIAGUA GUERRERO

2330900x@umich.mx

Directora de tesis:

DRA. ENA ATHENEA AGUILAR REYES

ena.aguilar@umich.mx

Morelia, Michoacán, febrero 2026.



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

Of. Núm. IIMM-35-2026

Morelia Mich., 19 de febrero de 2026

ING. CARLA XIMENA PANIAGUA GUERRERO

Presente

Por medio de la presente, esta dirección del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, tiene a bien informarle que para presentar su examen de grado de Maestro en Metalurgia y Ciencias de los Materiales con la tesis titulada "*Microesferas de Quitosano/Biovidrio 45S5/Acetaminofén por el Método de Doble Emulsión Sólido/Agua/Aceite (S/W/O) y Evaporación de Solvente.*", le ha sido asignada la siguiente mesa sinodal:

02001578	Dra. Ena Athenea Aguilar Reyes	Directora
02001616	Dr. Carlos Alberto León Patiño	Vocal
19000251	Dra. Tzarara López Luke	Vocal
97003581	Dr. Juan Zárate Medina	Vocal
CONV0925	Dra. Deisy Ramírez Vinasco	Vocal
15010073	Dra. Noemí Ortiz Lara	Suplente

Agradeciendo de antemano las atenciones que se sirva prestar a la presente, aprovecho para enviarle un cordial saludo.



Dr. Aníbal Medina Flores y Materiales
Dirección

Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Dedicatoria

A Dios, por darme la fortaleza, la fe y la serenidad necesarias para superar cada obstáculo y llegar al final de este camino que marcó profundamente mi formación personal y profesional.

A mis padres, por su amor incondicional, su apoyo constante y por ser mi base en cada etapa de mi vida. Gracias por creer en mí incluso en los momentos en los que yo misma dudé. A mi hermano, por su cariño, compañía y apoyo sincero a lo largo de este proceso. A mi pareja, por su paciencia infinita, su comprensión, su amor y su apoyo incondicional, por acompañarme en los momentos de cansancio, de duda y de logro, y por ser un pilar emocional fundamental durante esta etapa.

Agradecimientos

A mi asesora, la Dra. Ena A. Aguilar Reyes, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su guía, confianza, exigencia académica y por sus valiosas aportaciones científicas, las cuales enriquecieron de manera significativa el desarrollo de este proyecto.

Al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, por proporcionar el espacio, los recursos y el entorno académico necesarios para la realización de esta investigación.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, SECITHI - México, por el apoyo otorgado a través de la beca, el cual hizo posible la realización de mis estudios de posgrado y la culminación de este trabajo.

A mis amigos y compañeros del posgrado, por su compañerismo, solidaridad, apoyo constante y palabras de aliento, así como por hacer más llevadero el camino académico, convirtiendo esta etapa en experiencias compartidas, aprendizajes y memorias que siempre llevaré conmigo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	x
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 <i>Objetivo general</i>	3
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	3
1.2 Justificación	3
1.3 Hipótesis	5
1.4 Metas científicas	5
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Antecedentes de la investigación	7
2.2 Bases teóricas	9
2.2.1 Sistemas de liberación controlada y farmacocinética del acetaminofén	10
2.2.2 Quitosano como matriz polimérica	12
2.2.3 Síntesis y propiedades comparativas del biovidrio 45S5: fusión-temple vs. sol-gel....	14
2.3 Fundamentos fisicoquímicos del procesamiento de microesferas compuestas	17
2.3.1 Ajuste metodológico del sistema: doble emulsión (S/W/O)	20
2.3.2 Estabilización de emulsiones y sistema de tensoactivos	23
2.3.2.1 Tensión superficial en sistemas dispersos	26
2.3.2.2 Teoría del balance hidrofílico-lipofílico (HLB).....	27
2.3.2.3 Selección del sistema Tween 20/Span 80.....	29
2.3.3 Efecto del reticulante en la degradación y formación de microesferas	30
2.4 Evaluación de la cinética de liberación de fármacos	34
2.4.1 Liberación fraccional: índice de disponibilidad relativa (IDR).....	34
CAPITULO 3. METODOLOGÍA	36
3.1 Materiales.....	36
3.2 Definición de formulaciones	38
3.3 Preparación de microesferas control.....	39
3.4 Síntesis de vidrio bioactivo 45S5	41
3.4.1 Método de fusión y temple.....	41

3.4.2 Método por sol-gel	43
3.5 Síntesis de microesferas híbridas.....	44
3.6 Caracterización del biovidrio 45S5.....	46
3.6.1 Análisis estructural por difracción de rayos X (DRX)	47
3.6.2 Análisis morfológico y composicional (SEM-EDS).....	47
3.6.3 Análisis granulométrico y estabilidad coloidal	48
3.7 Caracterización de las microesferas.....	48
3.7.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	49
3.7.2. Difracción de rayos X (DRX)	49
3.7.3. Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	50
3.7.4. Potencial Zeta.....	50
3.8. Procedimientos analíticos y cálculos de eficiencia	50
3.8.1. Rendimiento de producción.....	51
3.8.2. Determinación del contenido de humedad	51
3.8.3. Eficiencia de encapsulación del fármaco	52
3.8.4. Caracterización de la liberación	52
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
4.1 Caracterización fisicoquímica de los biovidrios 45S5 obtenidos por fusión-temple (BG-FT) y sol-gel (BG-SG)	54
4.1.1 Análisis estructural por difracción de rayos X (DRX)	54
4.1.2 Morfología y composición elemental.....	56
4.1.3 Análisis FT-IR.....	60
4.1.4 Distribución granulométrica y estabilidad coloidal.....	63
4.2 Evaluación del biovidrio obtenido por fusión-temple (BG-FT) en la formación de microesferas	67
4.2.1. Análisis morfológico (MEB): evidencia de inestabilidad de la emulsión	67
4.2.2 Efecto de la carga de biovidrio en la morfología (Sistema sin reticulante).....	70
4.3 Caracterización estructural de microesferas con biovidrio sol-gel (BG-SG).....	72
4.3.1 Análisis morfológico y distribución elemental (MEB-EDS)	73
4.3.2 Confirmación cristalográfica (DRX) e integridad química (FT-IR)	76
4.3.3 Caracterización de tamaño de partícula y potencial Zeta de las microesferas control (CS-Control) y las microesferas híbridas (CS-BG%-SG)	79
4.3.4 Evaluación de la eficiencia del proceso y propiedades fisicoquímicas	84
4.3.4.1 Rendimiento de producción.....	84

4.3.4.2 Determinación del contenido de humedad residual.....	85
4.3.5 Análisis de la carga y comportamiento de liberación del fármaco.....	87
4.3.5.1 Evaluación de la eficiencia de encapsulación y limitaciones instrumentales.....	88
4.3.5.2 Cinética de liberación: índice de disponibilidad relativa (IDR).....	89
CAPITULO 5. CONCLUSIONES.....	92
5.1 Evaluación de los objetivos experimentales	92
5.1.1 Tamaño de partícula de las microesferas	92
5.1.2 Eficiencia de encapsulación del acetaminofén	93
5.1.3 Rendimiento del proceso de microencapsulación	93
5.2 Efecto de la ruta de síntesis del biovidrio 45S5.....	94
5.3 Estabilidad del sistema de microencapsulación.....	94
5.4 Comportamiento de liberación del acetaminofén.....	95
RECOMENDACIONES.....	96
TRABAJO FUTURO.....	98
REFERENCIAS	101
ANEXOS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Estructura química del quitosano [11].	13
Figura 2.2.	Morfología del vidrio bioactivo obtenido mediante (a) síntesis por fusión-temple y posterior molienda y (b) síntesis por sol-gel [31].	15
Figura 2.3.	Microesferas de etilcelulosa (EC)/allopurinol a diferentes velocidades de agitación y número de aspas: (a) 300 rpm, 4 aspas; (b) 300 rpm, 6 aspas; (c) 800 rpm, 4 aspas; (d) 800 rpm, 6 aspas). Recuperado [15].	18
Figura 2.4.	Imágenes MEB de microesferas de alginato/eritropoyetina con: F1 (0.5 M), F2 (0.75 M) y F3 (1 M) de CaCl_2 con un aumento de 20.000x. Recuperado [16].	19
Figura 2.5.	Micrografías SEM de polvos secados por aspersión que muestran una vista general (izquierda) y una ampliación mayor (derecha) para las diferentes formulaciones: (a) NC1% + S1.5% (barras de escala: izquierda 5 μm , derecha 1 μm); (b) NC1% + S3% (barras de escala: izquierda 10 μm , derecha 1 μm); (c) NC4% + S1.5% (barras de escala: izquierda 10 μm , derecha 5 μm); (d) NC4% + S3% (barras de escala: izquierda 5 μm , derecha 2 μm). Recuperado [40].	25
Figura 2.6.	Efecto del volumen del agente reticulante y del tiempo de reticulación en la liberación del fármaco, a) glutaraldehído (25% p/p) y b) formaldehído (37% p/p). Recuperado [48].	33
Figura 3.1.	Síntesis de microesferas de quitosano (CS-Control).	41
Figura 3.2.	Ciclo térmico para la fabricación de biovidrio 45S5 por Fusión y Temple.	42
Figura 3.3.	Síntesis de biovidrio 45S5 por ruta sol-gel basada en nitratos.	44
Figura 3.4.	Síntesis de microesferas compuestas (Cs-(BG-FT/BG-SG)).	46
Figura 4.1.	Patrones de difracción de rayos X de los biovidrios 45S5 obtenidos por fusión-temple (BG-FT) y sol-gel (BG-SG).	55
Figura 4.2.	Micrografía SEM y mapeo elemental EDS de BG-FT Nota: fósforo (P, azul), calcio (Ca, magenta), sodio (Na, celeste), silicio (Si, verde).	57

Figura 4.3.	Micrografía SEM y mapeo elemental EDS de BG-SG Nota: fosforo (P, verde), calcio (Ca, rojo), sodio (Na, magenta), silicio (Si, azul).	58
Figura 4.4.	Espectros FT-IR de los biovidrios BG-FT y BG-SG. Las líneas punteadas verticales indican las posiciones de las principales bandas vibracionales asociadas a la red de silicato, enlaces fosfato y especies carbonatadas.	61
Figura 4.5.	Distribución volumétrica de tamaño de partícula del biovidrio BG-FT.	63
Figura 4.6.	Distribución de tamaño hidrodinámico obtenida por DLS para el biovidrio BG-SG.	65
Figura 4.7.	Distribución de Potencial Zeta para la dispersión de BG-SG en medio acuoso.	66
Figura 4.8.	Micrografías SEM comparativas del efecto del reticulante en el sistema con 25% de Biovidrio (Fusión-Temple): (A) Sistema con glutaraldehído (CS-BG25-FT-C/GTA) (B) Sistema sin reticulante (CS-BG25-FT-SN/GTA).	68
Figura 4.9.	Evolución morfológica de las microesferas de Cs-BG-FT (sin reticulante) en función del porcentaje de carga cerámica: (A) 25% BG, (B) 50% BG y (C) 75% BG.	70
Figura 4.10.	Caracterización morfológica y elemental de microesferas de Quitosano/Biovidrio Sol-Gel (CS-BG-SG) reticuladas con GTA (2% v/v) con diferentes porcentajes de carga cerámica: (A) 25%, (B) 50% y (C) 75%. silicio (Si), calcio (Ca), Sodio (Na), fósforo (P) y carbón (C).	74
Figura 4.11.	Patrones de difracción de rayos X (DRX) comparativos del biovidrio sol-gel y las microesferas sintetizadas con cargas del 25% y 50% en peso de BG, mostrando la correspondencia de las fases cristalinas.	77
Figura 4.12.	Espectros FT-IR del quitosano (CS), del biovidrio sol-gel (BG-SG) y de las microesferas compuestas CS-BG25-SG y CS-BG50-SG. Las líneas punteadas resaltan las bandas relevantes asociadas a la interacción polímero-cerámico.	78

Figura 4.13.	Distribución de tamaño y potencial Zeta de las microesferas de quitosano (CS).	81
Figura 4.14.	Distribución de tamaño y potencial Zeta de las microesferas CS-BG25-SG.	82
Figura 4.15.	Distribución de tamaño y potencial Zeta de las microesferas CS-BG50-SG.	83
Figura 4.16.	Perfil de liberación relativa (IDR) del acetaminofén en PBS a 37 °C.	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.	Comparación de propiedades del Biovidrio 45S5 según su ruta de síntesis.	16
Tabla 2.2.	Métodos de síntesis de microesferas.	20
Tabla 2.3.	Comparativa del uso y función de estabilizantes empleados con base en el HLB, en sistemas compuestos.	27
Tabla 2.4.	Efecto comparativo de agentes reticulantes sobre las propiedades fisicoquímicas de microesferas.	31
Tabla 2.5.	Efecto del volumen de glutaraldehído (GA) o formaldehído (FA) y de la duración de la reticulación en la eficiencia de captura y el tamaño de partícula. Recuperado [48].	32
Tabla 3.1.	Formulación experimental.	38
Tabla 4.1.	Composición química comparativa (wt.% de óxidos) entre el valor teórico del Bioglass® 45S5 y los valores experimentales calculados para los biovidrios obtenidos por fusión (BG-FT) y sol-gel (BG-SG).	59
Tabla 4.2.	Datos del rendimiento de producción de las microesferas control (CS) y compuestas (CS-BG%-SG).	84
Tabla 4.3.	Contenido de humedad residual de las microesferas tras secado.	86

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Abreviatura/Término	Concepto
CS	Quitano, polisacárido natural derivado de la desacetilación de la quitina, utilizado como matriz polimérica en sistemas de liberación de fármacos.
BG	Biovidrio, material bioactivo a base de silicatos con capacidad de inducir la formación de apatita en contacto con fluidos fisiológicos.
45S5	Composición clásica de biovidrio (45 % SiO ₂ , 24.5 % CaO, 24.5 % Na ₂ O y 6 % P ₂ O ₅ en peso), ampliamente utilizada en aplicaciones biomédicas.
FT	Ruta de síntesis por fusión y temple, caracterizada por altas temperaturas y partículas de mayor tamaño.
SG	Ruta de síntesis por sol-gel, que permite obtener biovidrios con mayor área superficial y reactividad química.
CS-BG	Sistema compuesto de quitano y biovidrio empleado para la formación de microesferas híbridas.
CS-BG25/50/75	Formulaciones con 25, 50 y 75 % p/p de biovidrio respecto al contenido total del sistema compuesto.
S/W/O	Sistema de doble emulsión sólido/agua/aceite utilizado para la síntesis de microesferas mediante evaporación de solvente.
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Solución tampón salina de fosfatos utilizada para mantener un pH fisiológico (~7.4). Se emplea comúnmente como medio de liberación y en ensayos in vitro por su similitud con condiciones biológicas.
DCM	Diclorometano, solvente orgánico empleado como fase oleosa en el proceso de emulsificación.
Tween®	Tensoactivo no iónico hidrofílico utilizado para estabilizar la fase acuosa de la emulsión.
Span®	Tensoactivo no iónico lipofílico empleado para estabilizar la fase oleosa del sistema de emulsión.
Reticulación	Proceso de formación de enlaces entre cadenas poliméricas que incrementa la estabilidad estructural del quitano.
Glutaraldehído (GTA)	Agente reticulante sintético que reacciona con los grupos amino del quitano, proporcionando rigidez estructural.

Genipina	Agente reticulante de origen natural, de menor toxicidad, utilizado como alternativa al glutaraldehído.
Potencial Zeta	Parámetro electrocinético que describe la carga superficial de partículas dispersas y su estabilidad coloidal en suspensión.
Silanol (Si-OH)	Grupo funcional presente en la superficie del biovidrio, responsable de su reactividad y carga superficial en medio acuoso.
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, utilizada para identificar grupos funcionales e interacciones químicas.
DRX	Difracción de rayos X, técnica empleada para analizar la estructura cristalina o amorfa de los materiales.
MEB (SEM)	Microscopía electrónica de barrido, utilizada para la evaluación morfológica y topográfica de las microesferas.
IDR (%)	Índice de disponibilidad relativa, parámetro utilizado para comparar la cinética de liberación del fármaco a partir de datos normalizados.
UV-Vis	Espectrofotometría ultravioleta-visible, técnica empleada para la cuantificación del acetaminofén.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia, técnica analítica utilizada para la cuantificación selectiva de fármacos y productos de degradación.
Efecto <i>burst</i>	Liberación inicial rápida del fármaco asociada a moléculas ubicadas en la superficie o en regiones poco tortuosas del sistema.
Efecto tortuoso (Tortuosidad)	Fenómeno asociado a la complejidad de los caminos de difusión dentro de una matriz porosa; una mayor tortuosidad incrementa la longitud efectiva de difusión y puede retardar la liberación del fármaco.
Liberación controlada	Mecanismo mediante el cual un fármaco es liberado de forma modulada en el tiempo a partir de un sistema portador.
Bioactividad	Capacidad de un material para inducir respuestas biológicas específicas, como la formación de una capa de apatita.
Hidrogel	Red polimérica tridimensional con alta capacidad de retención de agua, característica del quitosano en medio acuoso.

Swelling (hinchamiento)	Incremento de volumen de una matriz polimérica al absorber solvente sin disolverse. Afecta la difusión y liberación del fármaco.
Rubbery state (estado gomoso)	Estado del polímero por encima de su temperatura de transición vítrea (T_g), donde presenta mayor movilidad de cadenas y comportamiento elástico.

RESUMEN

El presente trabajo se enfocó en el desarrollo y caracterización de microesferas compuestas de quitosano y biovidrio 45S5 cargadas con acetaminofén, con la finalidad de emplearlas como sistemas para liberación local de fármacos. En una primera etapa, el biovidrio fue sintetizado mediante dos rutas distintas: fusión-temple (BG-FT) y sol-gel (BG-SG). La caracterización por DRX, FT-IR y MEB evidenció que la ruta sol-gel conduce a partículas de tamaño micrométrico (2-3 μm), con presencia de fases cristalinas tipo silicorhenanita y una superficie rica en grupos silanol, lo que se traduce en una mayor reactividad y mejor procesabilidad en comparación con el biovidrio obtenido por fusión.

Posteriormente, se evaluó la obtención de microesferas mediante doble emulsión sólido/aceite/agua (S/O/W) y reticulación con glutaraldehído. Los resultados mostraron que el biovidrio obtenido por fusión no es adecuado para este método debido a la inestabilidad de la emulsión. En comparación, el biovidrio sintetizado por sol-gel permitió la formación de microesferas esféricas y relativamente homogéneas, identificándose la formulación con 50% de carga inorgánica (CS-BG50-SG) como la más estable, con un rendimiento de producción del 74.73%.

Finalmente, los estudios de liberación *in vitro* en PBS indicaron que el compuesto presenta una alta capacidad de carga de acetaminofén y un perfil de liberación inicial rápida (efecto *burst*), asociado a la porosidad y a la naturaleza hidrofílica de la fase inorgánica. En conjunto, los resultados sugieren que las microesferas CS-BG-SG constituyen un biomaterial viable, con propiedades físicoquímicas y funcionales adecuadas para aplicaciones potenciales en ingeniería de tejido óseo.

Palabras clave: Biovidrio 45S5, método sol-gel, quitosano, microesferas compuestas, liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejido óseo.

ABSTRACT

This study focused on the development and characterization of composite microspheres based on chitosan and 45S5 bioglass loaded with acetaminophen, intended for use as local drug delivery systems for bone-related applications. Initially, bioglasses were synthesized using two different routes: melt-quenching (BG-FT) and sol-gel (BG-SG). Characterization by XRD, FT-IR, and SEM demonstrated that the sol-gel route produces micrometric particles (2-3 μm) with crystalline phases such as silicorhenanite and a surface enriched with silanol groups, resulting in higher reactivity and improved processability compared to melt-derived bioglass.

Subsequently, microsphere formation was evaluated using the solid-in-oil-in-water (S/O/W) double emulsion method followed by glutaraldehyde crosslinking. The results indicated that melt-derived bioglass is unsuitable for this process due to emulsion instability. In contrast, sol-gel bioglass enabled the successful formation of spherical and relatively homogeneous microspheres, with the formulation containing 50 wt.% inorganic loading (CS-BG50-SG) exhibiting the best performance and achieving a production yield of 74.73%.

Finally, *in vitro* release studies conducted in PBS revealed that the hybrid system exhibits a high acetaminophen loading capacity and a rapid initial release profile (burst effect), mainly associated with the porosity and hydrophilic nature of the inorganic phase. Overall, these findings indicate that CS-BG-SG microspheres represent a viable biomaterial with suitable physicochemical and functional properties for potential applications in bone tissue engineering.

Keywords: 45S5 bioglass, sol-gel method, chitosan, composite microspheres, controlled drug delivery, bone tissue engineering.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Las microesferas, definidas como partículas con tamaños que abarcan desde la escala nanométrica hasta la micrométrica, constituyen sistemas versátiles dentro del ámbito biomédico, particularmente en aplicaciones relacionadas con la liberación controlada de fármacos, la bioimagen y el transporte de agentes terapéuticos [1, 2]. En este contexto, la combinación de quitosano, biovidrio 45S5 y acetaminofén mediante el método de doble emulsión representa una aproximación de interés, al integrar un biopolímero de origen natural, una fase inorgánica bioactiva y un fármaco de uso ampliamente documentado, con el propósito de obtener sistemas compuestos funcionales [1, 3].

El quitosano, derivado de la desacetilación de la quitina, destaca por su biodegradabilidad, baja toxicidad y buena biocompatibilidad, lo que ha motivado su uso frecuente como matriz en sistemas de encapsulación y liberación controlada de fármacos [1, 4]. Por su parte, el biovidrio 45S5 presenta una elevada reactividad superficial y propiedades fisicoquímicas que lo convierten en un componente relevante en el diseño de materiales híbridos con potencial aplicación biomédica [5, 6]. El acetaminofén, al ser encapsulado en microesferas poliméricas, permite explorar esquemas de liberación más controlados en comparación con las formas farmacéuticas convencionales, con el objetivo de modular su disponibilidad y reducir picos de concentración no deseados [7].

Un elemento central de este trabajo es el empleo del método de doble emulsión (S/O/W) seguido de evaporación de solvente, el cual consta de una primera emulsión interna que permite la incorporación del fármaco y una segunda emulsión externa responsable de la formación de la matriz polimérica [2, 8]. Durante este proceso, el quitosano actúa como fase continua, envolviendo al biovidrio y al acetaminofén, lo que favorece la obtención de microesferas con una estructura definida y una composición relativamente homogénea [8]. Este enfoque permite no solo controlar la morfología de las partículas, sino también ajustar propiedades relevantes del sistema, como la estabilidad de la emulsión y el comportamiento de liberación del principio activo.

El objetivo principal de esta investigación es desarrollar y optimizar microesferas de quitosano con biovidrio 45S5 y acetaminofén mediante el método de doble emulsión y

evaporación de solvente, evaluando el efecto de las concentraciones relativas de los componentes y las proporciones entre las fases involucradas en el proceso. Asimismo, se analiza cómo estas variables influyen en la eficiencia del proceso de microencapsulación y en el perfil de liberación del fármaco, en comparación con sistemas de liberación inmediata [7]. De manera complementaria, se considera la capacidad de las microesferas para proteger al fármaco frente a condiciones que podrían favorecer su degradación prematura, lo que representa una ventaja adicional de este tipo de sistemas [8]. En conjunto, este estudio pretende sentar bases experimentales para el diseño de microesferas compuestas con potencial aplicación en sistemas avanzados de liberación controlada, sin extrapolar los resultados a evaluaciones biológicas no abordadas en el presente trabajo.

El presente trabajo se organiza de manera progresiva, permitiendo avanzar desde los fundamentos teóricos hasta el análisis experimental y la discusión crítica del biomaterial desarrollado. Los capítulos se estructuran según una lógica temática que facilita la comprensión del enfoque general del estudio y de los resultados obtenidos.

En el Capítulo 1 se establece el contexto general de la investigación, abordando el uso de microesferas como sistemas para la liberación controlada de fármacos y la combinación de quitosano, biovidrio 45S5 y acetaminofén como un sistema compuesto orgánico-inorgánico de interés. En este capítulo se presentan los objetivos, la justificación, la hipótesis y las metas científicas que guían el desarrollo experimental, y se delimita el alcance del trabajo dentro de un marco estrictamente fisicoquímico. El Capítulo 2 desarrolla el marco teórico, donde se revisan las propiedades de los materiales empleados, los fundamentos del método de doble emulsión y los modelos teóricos de liberación de fármacos considerados para el posterior tratamiento e interpretación de los datos. El Capítulo 3 describe la metodología experimental, incluyendo la síntesis del biovidrio, la preparación de las microesferas con distintas cargas inorgánicas y las técnicas de caracterización utilizadas. El Capítulo 4 presenta y discute los resultados experimentales, analizando la influencia de la ruta de síntesis del biovidrio en la estabilidad del sistema y el desempeño de las microesferas, así como su capacidad de carga y el perfil de liberación del acetaminofén. Finalmente, el Capítulo 5, integra las conclusiones generales del estudio, evalúa el cumplimiento de los objetivos planteados y propone

recomendaciones y líneas de trabajo futuro orientadas a la optimización y nuevas aplicaciones del sistema desarrollado.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar microesferas compuestas de quitosano y biovidrio 45S5 mediante la técnica de doble emulsión y evaporación de solvente, evaluando su capacidad para la encapsulación y liberación controlada de acetaminofén.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar microesferas de quitosano y biovidrio 45S5 mediante el método de doble emulsión y evaporación de solvente, con capacidad de encapsular un fármaco modelo.
2. Determinar las propiedades estructurales y morfológicas de las microesferas mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB), difracción de rayos X (DRX) y espectroscopía infrarroja (FT-IR), con el fin de verificar la incorporación efectiva del biovidrio en la matriz polimérica.
3. Analizar la estabilidad coloidal y la carga superficial de las microesferas en suspensión mediante la medición del potencial Zeta en solución tampón.
4. Evaluar la eficiencia de encapsulación y el perfil de liberación del acetaminofén mediante espectroscopía UV-Vis, determinando la cinética de liberación a través del ajuste a modelos matemáticos.

1.2 Justificación

En el ámbito del desarrollo farmacéutico actual, la optimización de los sistemas de administración de fármacos es fundamental para mejorar la eficacia terapéutica y reducir los efectos adversos asociados a la dosificación convencional [9, 10]. El acetaminofén, uno de

los analgésicos y antipiréticos más utilizados a nivel mundial, presenta limitaciones relevantes debido a su rápida absorción y corta vida media. Esta farmacocinética requiere administraciones frecuentes que, especialmente en tratamientos prolongados o a dosis elevadas, pueden aumentar el riesgo de hepatotoxicidad [7]. En este contexto, el desarrollo de sistemas que permitan una liberación controlada del fármaco representa una necesidad clínica significativa.

Las microesferas poliméricas basadas en quitosano constituyen una alternativa atractiva como sistemas de liberación, debido a su biocompatibilidad, carácter mucoadhesivo y capacidad para encapsular principios activos [1, 11]. Sin embargo, el quitosano en su forma pura presenta ciertas limitaciones, entre ellas una resistencia mecánica moderada y una marcada tendencia al hinchamiento en medios acuosos, lo que puede favorecer una liberación inicial rápida del fármaco, conocida como efecto *burst* [1, 12].

La incorporación de un componente inorgánico, como el biovidrio 45S5, se plantea como una estrategia para superar estas limitaciones y obtener un sistema compuesto orgánico-inorgánico. Este biovidrio no solo aporta estabilidad química, sino que puede interactuar con la matriz de quitosano y modificar su estructura interna, dando lugar a microesferas más estables y con una red polimérica reforzada. Dichas modificaciones estructurales pueden influir directamente en la distribución y difusión del fármaco dentro de la matriz, favoreciendo perfiles de liberación más controlados [13, 14].

El estudio de este sistema mediante el método de doble emulsión (S/W/O) y evaporación de solvente permite controlar parámetros clave del proceso de síntesis, como el tamaño de partícula, la morfología superficial y el potencial Zeta de las microesferas [3, 8]. Analizar la relación entre estas variables, la estructura resultante de las microesferas y su comportamiento de liberación permitirá generar información relevante para el desarrollo de sistemas híbridos basados en quitosano y biovidrio con potencial aplicación en liberación controlada de fármacos.

1.3 Hipótesis

La incorporación de biovidrio 45S5 en microesferas de quitosano obtenidas mediante el método de doble emulsión (S/W/O) y evaporación de solvente modifica las propiedades fisicoquímicas y estructurales del sistema, lo que se refleja en cambios en la morfología superficial, la organización estructural y el potencial Zeta de las microesferas.

Se plantea que la presencia del biovidrio favorece interacciones fisicoquímicas entre la fase inorgánica y la matriz de quitosano, principalmente mediante enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas, dando lugar a una estructura interna más compacta. Como consecuencia, se espera que la liberación del acetaminofén sea más lenta y sostenida en comparación con microesferas de quitosano puro.

1.4 Metas científicas

- Obtener microesferas con un tamaño de partícula promedio entre 50 y 100 μm

Se plantea como meta la obtención de microesferas con un diámetro promedio en el rango de 50 a 100 μm , considerado adecuado para sistemas de administración oral. Partículas con tamaños menores a 10 μm pueden presentar una liberación demasiado rápida debido a su elevada área superficial, mientras que tamaños excesivamente grandes pueden dificultar su manejo y administración [1, 7]. Mantener una distribución homogénea dentro de este intervalo permite obtener perfiles de liberación reproducibles y minimizar variaciones entre lotes que puedan afectar la biodisponibilidad del fármaco [2, 11].

- Alcanzar una eficacia de encapsulación entre 50 y 70%

La eficiencia de encapsulación es un parámetro clave para evaluar la viabilidad terapéutica y del proceso de síntesis. Considerando la solubilidad del acetaminofén en agua, existe el riesgo de pérdida del fármaco hacia la fase acuosa externa durante la doble emulsión [8, 12]. Por ello, se establece como meta alcanzar una encapsulación entre 50 y 70%, lo que indicaría una adecuada retención del principio activo dentro de la matriz quitosano/biovidrio y un uso eficiente del fármaco durante el proceso de fabricación [7].

- Obtener un rendimiento de producción entre 60 y 80%

El rendimiento de producción permite evaluar la eficiencia global del método de doble emulsión y evaporación de solvente, al relacionar la masa final recuperada con la cantidad inicial de materiales empleados [15]. Alcanzar un rendimiento entre 60 y 80% indicaría que las pérdidas de material durante las etapas de emulsificación, lavado y recuperación son limitadas, lo que respalda la reproducibilidad y la posible escalabilidad del proceso para la obtención de microesferas de quitosano/biovidrio con carga farmacéutica [15, 16].

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

El marco teórico reúne los conceptos necesarios para comprender el comportamiento del sistema quitosano/biovidrio, abordando las propiedades estructurales y químicas del quitosano, así como las características del biovidrio 45S5 obtenido por distintas rutas de síntesis. Se analizan las diferencias entre los métodos de fusión-temple y sol-gel en términos de tamaño de partícula, reactividad superficial y presencia de grupos silanol, aspectos que influyen directamente en la interacción entre ambas fases. Asimismo, se describen los fundamentos de los sistemas de liberación controlada de fármacos, cuyo objetivo es mantener concentraciones terapéuticas adecuadas durante periodos prolongados y reducir efectos adversos asociados a liberaciones no controladas.

En este contexto, se introducen las microesferas poliméricas compuestas como una alternativa versátil, junto con los principios del método de doble emulsión empleado para su obtención y los modelos cinéticos más utilizados para describir la liberación del principio activo, proporcionando así el soporte teórico necesario para la interpretación de los resultados experimentales.

2.1 Antecedentes de la investigación

El desarrollo de los vehículos farmacéuticos ha pasado de formulaciones de liberación inmediata a sistemas más complejos, diseñados para liberar el principio activo de forma sostenida o incluso en respuesta a estímulos del entorno fisiológico. De acuerdo con lo señalado por Singh y Kim [17], los sistemas de liberación controlada adquieren especial importancia en el caso de fármacos con ventanas terapéuticas estrechas o vidas medias cortas, ya que el control de la velocidad de liberación influye directamente en su eficacia clínica.

Entre los polímeros naturales, el quitosano ha recibido particular atención debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y facilidad de procesamiento. Diversos estudios han mostrado la versatilidad de las microesferas de quitosano como sistemas de liberación, destacando su capacidad para proteger fármacos sensibles y regular su salida mediante procesos de hinchamiento y erosión de la matriz. Sin embargo, también se ha reportado que

las matrices formadas únicamente por quitosano pueden presentar baja resistencia mecánica y una liberación inicial rápida (efecto *burst*), especialmente en medios ácidos.

Para atender estas limitaciones, el desarrollo de materiales compuestos ha cobrado relevancia. Boccaccini y col. [14] establecieron que los compuestos de polímero biodegradable y vidrio bioactivo no solo explotan la flexibilidad del polímero y la rigidez del vidrio para mejorar la resistencia mecánica, sino que también aceleran la bioactividad; se ha reportado que estos sistemas compuestos inducen la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA) en la superficie tras periodos cortos de inmersión en fluido corporal simulado (SBF), validando su potencial regenerativo.

Por su parte, Ravarian y col. [18] profundizaron en la interacción física y química entre los componentes. Sus resultados mostraron que aumentar el contenido de biovidrio al 40% en volumen incrementó el módulo de Young hasta 12 veces en comparación con matrices de menor concentración. Además, demostraron que la funcionalización mediante enlaces covalentes (híbridos) es crucial para la estabilidad en medio húmedo, logrando reducir la relación de hinchamiento y evitar la degradación no uniforme que suele llevar al fallo prematuro del material.

En una aplicación más específica, Biernat y col. [19] desarrollaron compuestos porosos de quitosano con biovidrio dopado con ZnO. Sus hallazgos reportaron una estructura de poros abiertos interconectados en el rango de 40-120 μm , ideal para la migración celular y el transporte de nutrientes. Adicionalmente, confirmaron una actividad bactericida efectiva contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, advirtieron que la incorporación de péptidos bioactivos en estos andamios mediante adsorción simple resultó en una liberación rápida del 100 % del agente en los primeros minutos, lo que subraya la necesidad de optimizar las estrategias de encapsulación para lograr perfiles de liberación sostenida.

Los antecedentes revisados indican que, aunque la combinación de quitosano con biovidrios contribuye a mejorar tanto las propiedades mecánicas como biológicas del material, aún se presentan dificultades asociadas al control de la liberación inicial del fármaco y a la estabilidad estructural con el paso del tiempo. Para abordar estos aspectos, es necesario

entender los procesos fisicoquímicos involucrados en la interacción entre la fase orgánica y la inorgánica, así como los fenómenos de degradación y difusión que ocurren dentro de las matrices poliméricas. Con base en ello, en los siguientes apartados se describen los fundamentos teóricos que sustentan el diseño, la síntesis y el comportamiento de estos sistemas compuestos.

2.2 Bases teóricas

La liberación controlada de fármacos tiene como propósito mantener las concentraciones plasmáticas dentro del intervalo terapéutico durante periodos prolongados, buscando mejorar la eficacia clínica y reducir los efectos adversos asociados a las variaciones bruscas de concentración que se presentan en las formas de dosificación convencionales [1, 17]. A diferencia de éstas, los sistemas de liberación modificada pretenden regular la velocidad con la que el fármaco es liberado desde una matriz portadora, a partir de principios fisicoquímicos que pueden ser ajustados y, en cierta medida, predecibles [20].

Desde el punto de vista teórico, la liberación de un fármaco encapsulado en una matriz polimérica depende de múltiples factores, entre ellos la naturaleza del polímero, la estructura interna del sistema y las interacciones moleculares entre el fármaco y la matriz. En matrices hidrofílicas, como las basadas en quitosano o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), el transporte del fármaco no responde a un solo mecanismo. Inicialmente ocurre la penetración del disolvente en la matriz, seguida del hinchamiento (*swelling*) del polímero y la transición del estado vítreo al estado gomoso (*rubbery state*) [1, 20]. De acuerdo con el modelo de Korsmeyer-Peppas [21], ampliamente empleado para describir estos sistemas, la liberación puede estar gobernada por difusión Fickiana, por la relajación de las cadenas poliméricas (transporte Caso II) o por una combinación de ambos procesos (transporte anómalo). En el caso de polímeros biodegradables, la erosión de la matriz ya sea superficial o en masa, actúa además como un mecanismo adicional que contribuye a la salida del principio activo [1, 20].

Las microesferas poliméricas constituyen una de las configuraciones más adecuadas para este tipo de aplicaciones. Su capacidad de encapsulación permite proteger moléculas sensibles, como proteínas o péptidos, frente a la degradación enzimática y a las condiciones del entorno fisiológico antes de alcanzar su sitio de acción [2, 16]. La geometría esférica aporta una ventaja importante: una relación superficie-volumen relativamente predecible que facilita el modelado matemático del perfil de liberación, lo que permite ajustar parámetros como el tamaño de partícula y el grado de entrecruzamiento para obtener cinéticas más reproducibles [1, 3, 21].

2.2.1 Sistemas de liberación controlada y farmacocinética del acetaminofén

El acetaminofén (paracetamol) es un analgésico y antipirético de uso extendido debido a su eficacia y a su adecuado perfil de seguridad. No obstante, su comportamiento farmacocinético presenta limitaciones para el tratamiento del dolor crónico, ya que se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, alcanzando concentraciones máximas aproximadamente a los 90 minutos, y posee una vida media de eliminación corta, entre 2 y 2.5 horas en adultos sanos [22].

Aunque es seguro a dosis terapéuticas, su metabolismo hepático genera el metabolito tóxico N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) a través de la vía del citocromo P450 del hígado (CYP2E1). En casos de sobredosis aguda (ingestas >7.5 g en adultos) o por acumulación tras administraciones repetidas, las reservas de glutatión pueden agotarse, provocando necrosis hepatocelular grave. Por ello, resulta pertinente el desarrollo de sistemas de liberación controlada que eviten picos plasmáticos supraterapéuticos y disminuyan la frecuencia de administración, reduciendo así el riesgo de hepatotoxicidad asociado a la saturación de las rutas metabólicas [22].

La encapsulación del acetaminofén en microesferas poliméricas, particularmente de quitosano, se ha propuesto como una estrategia para modificar su perfil farmacocinético. Diversos estudios experimentales han mostrado que la liberación del fármaco no sigue un comportamiento lineal y depende principalmente de la densidad de la matriz y del grado de entrecruzamiento.

Desai y Park [7] reportaron que la liberación de acetaminofén desde microesferas de quitosano reticuladas con tripolifosfato (TPP) obedece a una cinética de difusión descrita por la ecuación de Higuchi ($Q = k_H t^{1/2}$), con coeficientes de correlación (R^2) superiores a 0.98. Esto indica que, después de la hidratación inicial, la matriz tipo hidrogel regula la salida del fármaco principalmente por difusión a través de la red polimérica hinchada.

Asimismo, se ha descrito el denominado efecto *burst*, donde entre el 50% y el 60% del acetaminofén encapsulado puede liberarse durante los primeros 30 minutos [7]. Este comportamiento no se atribuye únicamente a la difusión, sino también a la presencia de cristales de fármaco adsorbidos en la superficie de la microesfera o a la migración del principio activo hacia la superficie durante el secado. Aunque esta liberación inicial puede proporcionar una dosis de carga útil para el alivio inmediato del dolor, cuando no se controla limita la duración del efecto sostenido y puede acercar transitoriamente las concentraciones a niveles no deseables.

La literatura también indica que incrementar la concentración de quitosano (de 0.5 % a 1 % p/v) y el peso molecular del polímero disminuye la velocidad de liberación. Esto se asocia con una mayor densidad de la matriz y mayor viscosidad, lo que dificulta la difusión del fármaco y retrasa la erosión del polímero. De igual manera, un mayor volumen del agente entrecruzante (TPP) aumenta la densidad de reticulación, reduce el hinchamiento y, en consecuencia, ralentiza la liberación [7].

Considerando las limitaciones del quitosano puro frente al hinchamiento excesivo en medios ácidos y la liberación tipo *burst*, la incorporación de biovidrio 45S5 aporta ventajas estructurales y funcionales. Ravarian y col. [18] demostraron que la formación de híbridos químicos entre quitosano y biovidrio mediante funcionalización con g-glicidiloxipropil trimetoxisilano (GPTMS) reduce significativamente la tasa de hinchamiento (de ~300% a 23%) y la degradación enzimática (del 80% al 32% de pérdida de masa en 4 semanas) en comparación con el quitosano puro. Esto sugiere que la fase inorgánica estabiliza la red polimérica y favorece el mantenimiento de una liberación sostenida, evitando el colapso prematuro de la matriz.

Además, el biovidrio confiere bioactividad. Li y col. [23] observaron que las membranas compuestas de quitosano y biovidrio 45S5 promueven mayor adhesión y proliferación de células osteoblásticas (MG-63), así como un incremento en la actividad de fosfatasa alcalina respecto al quitosano sin refuerzo.

En conjunto, la combinación de una matriz de quitosano, responsable de la carga del fármaco y la mucoadhesión, con biovidrio 45S5, que aporta estabilidad mecánica y control del hinchamiento, puede considerarse una alternativa adecuada para este tipo de sistemas. La presencia de la fase inorgánica favorece una red más densa y menos susceptible a la hidratación rápida, lo que contribuye a disminuir el efecto *burst* y a prolongar la liberación del acetaminofén, permitiendo un perfil de salida más gradual del fármaco.

2.2.2 Quitosano como matriz polimérica

El diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos requiere materiales que, además de ser compatibles con el principio activo, permitan ajustar su salida de manera predecible. En este sentido, el quitosano se ha empleado con frecuencia como matriz polimérica en la preparación de microesferas, debido a su origen natural y a las distintas respuestas fisicoquímicas que puede presentar dependiendo de las condiciones del medio.

El quitosano es un polisacárido natural semicristalino obtenido a partir de la desacetilación parcial de la quitina. Su estructura está formada por unidades repetidas de β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (Figura 2.1) [1, 4, 24]. Se trata de un polímero lineal, biodegradable y biocompatible, con capacidad para formar películas y matrices continuas, características que han favorecido su empleo en la formulación de sistemas de liberación de fármacos [1].

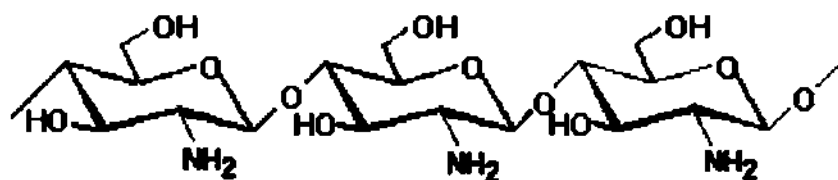


Figura 2.1. Estructura química del quitosano [11].

Una de las propiedades más relevantes del quitosano es su carácter policationico. En medios ácidos, los grupos amino ($-NH_2$) se protonan ($-NH_3^+$), lo que permite el establecimiento de interacciones electrostáticas con especies cargadas negativamente y con otros componentes de la formulación [7, 11]. Esta característica resulta determinante durante la formación de microesferas, ya que influye tanto en la estabilidad de la matriz como en la interacción del polímero con el fármaco encapsulado.

No obstante, el comportamiento del quitosano en medios acuosos puede representar una limitación. Se ha reportado que un hinchamiento excesivo favorece la pérdida de integridad estructural de la microesfera, lo que puede traducirse en una liberación acelerada del fármaco [1, 4]. Este efecto pone de manifiesto la importancia de controlar la permeabilidad de la matriz cuando se busca un perfil de liberación más estable.

Por esta razón, la modificación física del quitosano mediante la incorporación de una segunda fase se ha convertido en una alternativa recurrente. La adición de materiales inorgánicos, como el biovidrio, permite reforzar la estructura de la matriz y limitar su hinchamiento, sin modificar de forma sustancial la naturaleza química del polímero [18]. Este enfoque resulta particularmente útil en el desarrollo de microesferas compuestas destinadas a sistemas de liberación controlada.

2.2.3 Síntesis y propiedades comparativas del biovidrio 45S5: fusión-temple vs. sol-gel

La bioactividad y el comportamiento del biovidrio 45S5 dentro de una matriz polimérica dependen directamente de la forma en que el material fue obtenido, ya que el método de síntesis determina la morfología de las partículas, su textura y la cantidad de grupos funcionales disponibles en la superficie. El método de fusión-temple (*melt-quenching*), descrito originalmente por Hench [6, 25], corresponde a la ruta clásica: los óxidos y carbonatos precursores se funden a temperaturas superiores a 1300 °C y posteriormente se enfrían de manera brusca para evitar la cristalización, conservando así la estructura amorfa del vidrio.

El material producido por esta vía es esencialmente denso, con porosidad intrínseca prácticamente nula y una superficie específica baja. Diversos estudios reportan valores cercanos a 0.4 m²/g para el vidrio fundido [26, 27]. Después de la molienda, las partículas presentan formas irregulares, angulosas y superficies lisas, descritas como estructuras tipo esquirla (*shard-like*). Borden y col. [28] observaron que esta morfología favorece empaquetamientos más compactos, pero reduce el espacio interpartícula disponible para el crecimiento óseo, lo cual también se refleja en una liberación inicial más lenta de iones silicato.

En la Figura 2.2a, la micrografía correspondiente al material fundido coincide con estas observaciones, ya que se distinguen partículas densas, con bordes definidos y prácticamente sin poros visibles. La superficie continua sugiere un contacto inicial limitado con el medio, lo que ayuda a explicar su menor velocidad de interacción durante las primeras etapas.

En contraste, el método sol-gel representa una ruta química que se realiza a temperaturas considerablemente menores y permite un mayor control estructural a escala molecular. El proceso se basa en la hidrólisis y policondensación de alcóxidos metálicos; sin embargo, variantes recientes de “química suave” han logrado síntesis efectivas sin alcóxidos empleando precursores más económicos [29]. Los biovidrios obtenidos por esta vía (Figura 2.2b), suelen formar aglomerados de nanopartículas con superficies rugosas y una estructura mesoporosa bien desarrollada [30].

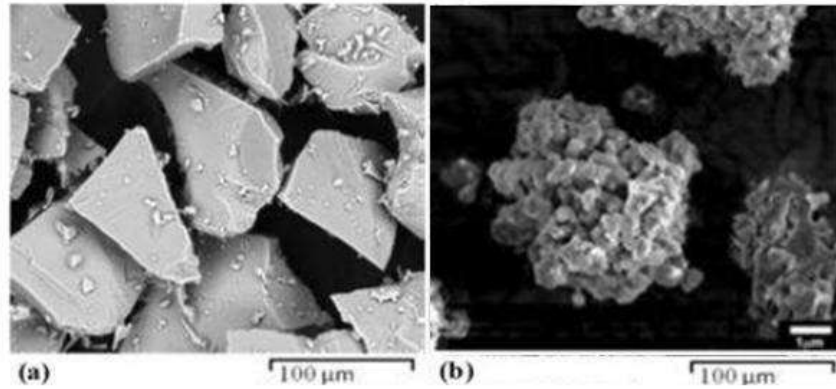


Figura 2.2. Morfología del vidrio bioactivo obtenido mediante (a) síntesis por fusión-temple y posterior molienda y (b) síntesis por sol-gel [31].

En la micrografía del material sol-gel se observan partículas menos compactas y con cavidades superficiales interconectadas. Esta textura favorece la penetración del fluido y aumenta la zona de contacto con el medio. Como consecuencia directa del proceso, el área superficial es mucho mayor, situándose entre 100 y 200 m²/g, es decir, varios órdenes de magnitud por encima del vidrio fundido [27, 31]. Además, la superficie presenta una alta densidad de grupos silanol (Si-OH) residuales, identificados mediante FTIR y Raman [32], los cuales actúan como sitios activos para la nucleación de hidroxiapatita y aceleran su formación.

No obstante, la síntesis del 45S5 por sol-gel también implica ciertas dificultades. El tratamiento térmico necesario para estabilizar el material (~700 °C) suele inducir la cristalización de la fase combeita (Na₂Ca₂Si₃O₉). Lefebvre y col. [33] y Massera y col. [34] demostraron mediante DSC/TGA y XRD que esta cristalización ocurre tanto en la superficie como en el interior, estabilizando parcialmente la red vítrea y disminuyendo ligeramente la bioactividad a largo plazo. Aun así, Zheng y col. [35] y Fauré y col. [26] reportaron que la ventaja textural asociada a la nanoporosidad compensa este efecto, ya que el material sol-gel forma apatita más rápidamente que el vidrio fundido amorfo en medios fisiológicos.

Las diferencias derivadas del procesamiento también se reflejan en la interacción dentro de materiales compuestos, como se resume en la Tabla 2.1, que muestra una comparativa de

condiciones de síntesis. Mientras las partículas obtenidas por fusión se comportan principalmente como rellenos rígidos, la mayor reactividad superficial del material sol-gel favorece una interacción más íntima con polímeros como el quitosano. Sin embargo, este mismo carácter reactivo obliga a controlar cuidadosamente el pH del sistema para evitar gelificación prematura [13, 14].

Tabla 2.1. Comparación de propiedades del Biovidrio 45S5 según su ruta de síntesis

	Método Fusión-Temple	Método Sol-Gel
Ref.	Hench [25]; Jones [36]	Li y col. [37]; Chen y col. [38]
Precursores	Óxidos y carbonatos (SiO_2 , Na_2CO_3 , CaCO_3 , P_2O_5)	Alcóxidos (TEOS, TEP) y nitratos o silicatos (ruta libre de alcóxidos).
Temperatura de proceso	Fusión $> 1300^\circ\text{C}$. Requiere alto consumo energético.	Gelificación a T amb.; Estabilización $600\text{-}700^\circ\text{C}$.
Morfología (SEM)	Irregular, angular, superficie lisa (tipo <i>shard-like</i>).	Aglomerados de nanopartículas, superficie rugosa y porosa.
Estructura de fase	Totalmente amorfa (vidrio). Cristaliza si se sinteriza $> 600^\circ\text{C}$.	Vitrocerámico (parcialmente cristalino). Fase principal: Combeita ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$).
Área superficial (BET)	Muy baja ($< 2.7\text{ m}^2/\text{g}$). Material denso.	Alta ($50\text{-}200\text{ m}^2/\text{g}$) debido a la mesoporosidad inherente.
Química superficial	Menor densidad de grupos silanol.	Alta densidad de grupos Si-OH y anillos de sílice tensos.
Homogeneidad	Alta homogeneidad química garantizada por la fusión.	Alta pureza, pero riesgo de segregación de fases durante el secado si no se controla el pH.

Finalmente, el método de síntesis también influye en la interacción dentro de materiales compuestos. Las partículas obtenidas por fusión tienden a comportarse principalmente como rellenos rígidos, mientras que la mayor reactividad superficial de las partículas sol-gel favorece una interacción más cercana con polímeros como el quitosano; sin embargo, esta misma reactividad hace necesario controlar el pH del sistema para evitar una gelificación prematura [13, 19].

2.3 Fundamentos fisicoquímicos del procesamiento de microesferas compuestas

En sistemas compuestos basados en quitosano y biovidrio, la arquitectura final de las microesferas no depende únicamente de la estequiometría de los materiales, sino también de las condiciones del proceso. Freitas y col. [2] y Sáez y col. [39] señalan que etapas como la emulsificación, la elección del sistema de tensoactivos y la velocidad de evaporación del disolvente influyen directamente en la distribución de tamaños y en la morfología superficial.

En particular, la estabilidad de la interfaz aceite-agua (O/W) resulta determinante para la integridad de la partícula. Aunque los tensoactivos de bajo peso molecular disminuyen la tensión interfacial, Iqbal y col. [8] advierten que en emulsiones complejas presentan limitaciones termodinámicas: la formación de una gran área interfacial implica un cambio de energía libre positivo ($\Delta G > 0$), por lo que, a largo plazo, los surfactantes tradicionales no logran impedir la difusión molecular y la emulsión termina coalesciendo o rompiéndose bajo cizallamiento si no existe una barrera mecánica adicional. En este contexto, la fase inorgánica adquiere un papel activo en la estabilización. Tewa-Tagne y col. [40] demostraron mediante análisis reológicos y morfológicos que la adición de sílice coloidal (3% p/v) incrementa drásticamente la viscosidad al generar una red estructurada por puentes de hidrógeno alrededor de las gotas, modificando la composición superficial y formando una barrera física más eficaz que la proporcionada solo por surfactantes; las micrografías electrónicas confirmaron que, sin esta concentración crítica, se obtenían aglomerados irregulares, mientras que su presencia permitió microesferas esféricas individuales y protegió el núcleo polimérico durante el secado.

De manera complementaria, la reticulación física o química aporta cohesión a la red polimérica al controlar su empaquetamiento y estabilidad en medio acuoso. Berger y col. [4] y Xiangxiang y col. [41] indican que el grado de entrecruzamiento define la distancia promedio entre enlaces de entrecruzamiento consecutivos de la red polimérica del hidrogel (hinchamiento en relación con el entrecruzamiento), restringiendo la movilidad de las cadenas y modulando la difusión del disolvente. Tomando en cuenta ambos factores, las diferencias observadas en la morfología y en el perfil de liberación pueden entenderse mejor, ya que el sistema deja de ajustarse a una difusión simple e involucra procesos simultáneos de difusión, erosión y relajación macromolecular. La literatura también muestra que los

parámetros de síntesis pueden utilizarse como herramientas de diseño del vehículo. Badis y col. [15] demostraron una relación inversa entre la velocidad de cizallamiento y el tamaño de partícula: al aumentar la agitación de 300 a 800 rpm en microesferas con alopurinol, el diámetro medio de Sauter (d_{32}) disminuyó de 151.01 μm a 47.71 μm . Bajo las mismas condiciones operativas, observaron que el incremento de la velocidad de agitación y del número de aspas modificó directamente las características de las microesferas, particularmente su tamaño y el contenido de fármaco. En las micrografías correspondientes a las Figuras 2.3c y 2.3d se aprecian partículas perfectamente individualizadas, de morfología esférica y con dimensiones menores en comparación con las obtenidas en las Figuras 2.3a y 2.3b. Asimismo, observaron que una mayor viscosidad de la fase dispersa, asociada a polímeros de mayor peso molecular o mayor concentración, favorece la formación de partículas más grandes por la resistencia de la gota a su ruptura durante la emulsificación. Estos resultados concuerdan con Freitas y col. [2], quienes indican que gotas más viscosas requieren mayores fuerzas de cizallamiento y que regímenes de agitación más intensos generan distribuciones de tamaño más estrechas (Fig. 2.3).

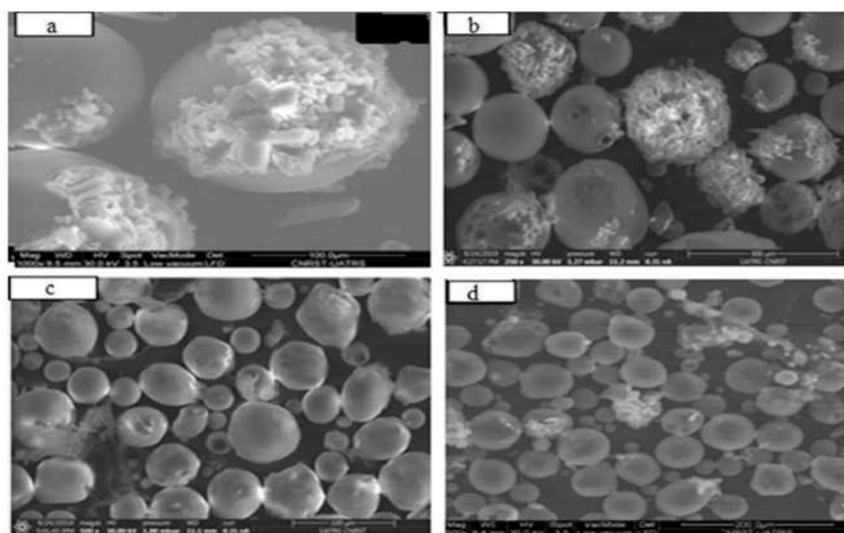


Figura 2.3. Microesferas de etilcelulosa (EC)/allopurinol a diferentes velocidades de agitación y número de aspas: (a) 300 rpm, 4 aspas; (b) 300 rpm, 6 aspas; (c) 800 rpm, 4 aspas; (d) 800 rpm, 6 aspas) [15].

La densidad de reticulación también influye en la estabilidad dimensional y en el hinchamiento. Hariyadi y col. [16] reportaron que al incrementar la concentración de CaCl_2 de 0.5 M a 1.0 M en alginato, el tamaño de partícula disminuyó de $3.23 \mu\text{m}$ a $2.86 \mu\text{m}$ y el índice de hinchamiento (*swelling*) se redujo, lo que se atribuye a una red más compacta que limita la penetración de agua. Para quitosano, Agnihotri y col. [1] confirmaron que los agentes covalentes como el glutaraldehído generan redes más rígidas y liberaciones más lentas que la reticulación iónica con TPP o la térmica, debido a la formación de enlaces base de Schiff irreversibles que restringen la relajación de la cadena.

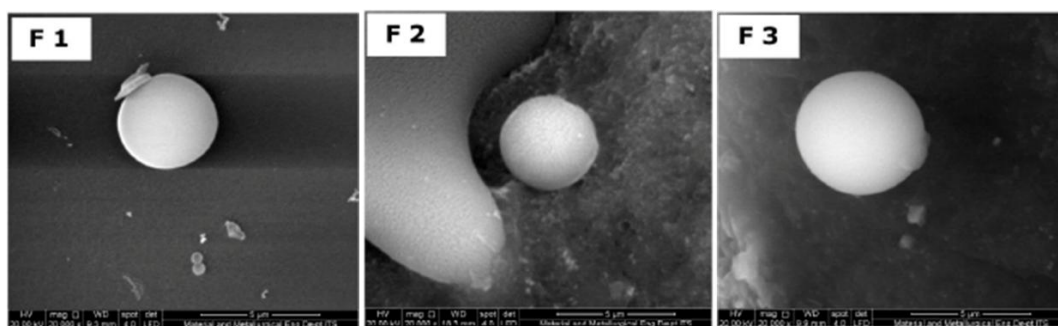


Figura 2.4. Imágenes MEB de microesferas de alginato/eritropoyetina con: F1 (0.5 M), F2 (0.75 M) y F3 (1 M) de CaCl_2 con un aumento de 20.000x [16].

En los sistemas compuestos, la fase inorgánica tampoco actúa como un relleno pasivo. Ravarian y col. [18] observaron que la interacción a nanoescala entre quitosano y biovidrio, especialmente cuando se favorece mediante funcionalización, reduce la relación de hinchamiento de aproximadamente $\sim 300\%$ en el quitosano puro a valores menores al $\sim 25\%$ en los híbridos. Esto sugiere que las partículas de biovidrio funcionan como puntos de anclaje físicos (*physical cross-links*) que estabilizan la matriz frente a la degradación hidrolítica rápida, lo cual contribuye a disminuir el efecto *burst* y a prolongar la liberación del fármaco, en concordancia con los modelos propuestos por Siepmann y Siepmann [20].

2.3.1 Ajuste metodológico del sistema: doble emulsión (S/W/O)

Existen distintos métodos para la fabricación de microesferas, y cada uno conduce a estructuras y características morfológicas particulares, lo que a su vez condiciona su posible aplicación (Tabla 2.2.). Por ello, la selección de la técnica de preparación depende tanto del tipo de fármaco como de los materiales empleados y del perfil de liberación que se pretende obtener. Bajo este enfoque, se han desarrollado microesferas utilizando polímeros naturales y sintéticos, así como sistemas más complejos mediante la combinación de fases poliméricas o la síntesis de copolímeros, buscando aprovechar efectos sinérgicos que mejoren el desempeño del sistema.

Tabla 2.2. Métodos de síntesis de microesferas

Referencia	Objetivo	Método de Síntesis	Resultados Principales
Luz y Mano [30]	Desarrollar nanopartículas de vidrio bioactivo (BG-NPs) y membranas compuestas con quitosano para aplicaciones osteoconductoras.	Sol-gel optimizado para BG-NPs (sistemas binarios y ternarios). Las membranas compuestas se hicieron por solvent casting mezclando quitosano (0.7%) con BG-NPs (0.3%).	Las BG-NPs ternarias (pH 11.5, calcinadas a 700°C) mostraron la mayor bioactividad. La membrana compuesta generó una capa densa de apatita tras 7 días en SBF, mientras que el quitosano puro no lo hizo. Se confirmó la no citotoxicidad con células L929.
Ravarian y col. [18]	Mejorar la actividad biológica y controlar la degradación del quitosano mediante la interacción a nanoescala con biovidrio.	Sol-gel híbrido utilizando GPTMS (agente de acoplamiento) para crear enlaces covalentes entre el quitosano y la red de sílice del biovidrio.	La interacción covalente redujo el hinchamiento del ~300% al 23% y la degradación enzimática del 80% al 32% (en 4 semanas). Se mejoró significativamente el módulo de Young y la bioactividad en comparación con la mezcla física.
Desai y Park [7]	Preparar microesferas de quitosano cargadas con fármaco y evaluar su liberación.	Secado por aspersión (Spray drying) usando tripolifosfato (TPP) como agente entrecruzante añadido al medio de aspersión.	Se obtuvieron microesferas esféricas con una carga eficiente. Se observó un efecto <i>burst</i> inicial seguido de una liberación sostenida. El entrecruzamiento con TPP fue crucial para modular la liberación.
Biernat y col. [19]	Evaluar compósitos porosos de quitosano y biovidrio dopado con ZnO como portadores de péptidos bioactivos.	Liofilización de dispersiones líquidas de quitosano (2%) mezclado con biovidrio dopado (1:1 en peso).	Se obtuvieron andamios con poros abiertos interconectados (40-120 µm). El material mostró bioactividad y propiedades bactericidas contra <i>S. aureus</i> . La liberación del péptido fue rápida, indicando la necesidad de mejorar la retención.

Li y col. [13]	Desarrollar microesferas compuestas multifuncionales para regeneración ósea y liberación de fármacos.	Emulsificación y evaporación de solvente para microesferas de PHBV, incorporadas luego en una matriz de quitosano/biovidrio 45S5.	La combinación de microesferas en la matriz compuesta mejoró la osteoconductividad y permitió una liberación dual controlada. El biovidrio aceleró la formación de apatita en la superficie del compósito.
Dias y col. [42]	Producir y caracterizar microesferas de alginato (análogo al quitosano) con biovidrio bioactivo.	Gelificación ionotrópica por extrusión (goteo) de la suspensión de polímero/vidrio en una solución de CaCl ₂ .	La adición de biovidrio redujo el tamaño de partícula y aumentó la contracción volumétrica. Se observó una distribución homogénea de la fase inorgánica y la presencia de Si, Ca y P tras la inmersión en SBF, confirmando su potencial bioactivo.
Iqbal y col. [8] / Shah y col. [43]	Revisión y aplicación para encapsular antibióticos hidrofílicos (ej. vancomicina) y fármacos anticancerígenos.	Doble emulsión (W/O/W) con evaporación de solvente.	Se justifica el uso de W/O/W para fármacos altamente solubles en agua que se perderían en una emulsión simple. Shah y col. lograron eficiencias de carga >80% para antibióticos hidrofílicos, demostrando que la fase oleosa actúa como barrera efectiva durante la solidificación.

GPTMS: glicidoxipropiltrimetoxisilano (C₉H₂₀O₅Si); PHBV: Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato).

A partir de los trabajos reportados en la literatura, se observa que la incorporación de biovidrio, particularmente el 45S5 y sus variantes dopadas, dentro de matrices de quitosano permite mejorar varias de las limitaciones mecánicas y estructurales propias de los polímeros naturales puros. Trabajos como los de Luz y Mano [30] y Ravarian y col. [18] indican que una simple mezcla física no garantiza estabilidad a largo plazo; en cambio, una interacción más estrecha a escala nanométrica o la formación de enlaces covalentes mediante agentes de acoplamiento resulta determinante. Esta unión incrementa el módulo de Young y la resistencia a la compresión, además de reducir de forma importante el hinchamiento del quitosano en medios acuosos, disminuyendo el *swelling* de aproximadamente ~300% a 23% en sistemas híbridos. Este comportamiento es relevante porque ayuda a evitar la liberación prematura del fármaco y a conservar la integridad estructural de la matriz durante el proceso de liberación.

La bioactividad suele considerarse una característica distintiva de estos sistemas híbridos, ya que la presencia de biovidrio favorece la formación de hidroxiapatita carbonatada en la superficie del polímero al contacto con fluidos fisiológicos [30, 44]. Se ha observado que los vidrios obtenidos por sol-gel, debido a su mayor área superficial y porosidad, inducen una mineralización más rápida que los obtenidos por fusión [27, 35]. No obstante, el principal reto para aplicaciones farmacéuticas continúa siendo el control de la liberación de fármacos hidrofílicos desde matrices porosas. Los resultados reportados por Agnihotri y col. [1] y Yeo y Park [12] muestran que parámetros como la densidad de entrecruzamiento y la morfología de la partícula permiten modular el perfil de liberación y reducir el efecto *burst*.

Con base en estos antecedentes, la selección del método de doble emulsión con evaporación de solvente (W/O/W) responde a la necesidad de encapsular de manera eficiente principios activos hidrofílicos como el acetaminofén. Iqbal y col. [8] y O'Donnell & McGinity [3] señalan que las emulsiones simples (O/W) suelen ser inadecuadas para moléculas solubles en agua, ya que estas difunden rápidamente hacia la fase externa durante el proceso y disminuyen la eficiencia de carga.

El sistema de doble emulsión genera un reservorio acuoso interno protegido por una fase oleosa intermedia que contiene el polímero, lo que limita la migración temprana del fármaco antes de la solidificación. Además, a diferencia del secado por aspersión (*spray drying*) empleado por Desai y Park [7], donde el fármaco se expone a estrés térmico, la evaporación de solvente permite la precipitación controlada del polímero a temperatura ambiente. De esta manera se consolida la matriz de quitosano y biovidrio, reteniendo el fármaco en el núcleo y favoreciendo la estabilidad del sistema durante la liberación.

En este trabajo, el sistema trifásico empleado corresponde a una dispersión compleja integrada por tres componentes:

- i. Una fase sólida dispersa, constituida por partículas de biovidrio 45S5, cuya insolubilidad requiere estabilización para evitar sedimentación.
- ii. Una fase acuosa intermedia formada por una solución acidificada de quitosano que contiene el acetaminofén disuelto y el biovidrio en suspensión

- iii. Una fase oleosa continua, que actúa como medio de dispersión y permite la formación de gotas durante la agitación, así como la posterior evaporación del solvente para el endurecimiento de las microesferas.

La presencia de partículas sólidas en la fase acuosa incrementa la viscosidad efectiva de las gotas formadas, lo que puede aumentar su resistencia frente a la coalescencia mediante mecanismos de estabilización interfacial o por la formación de estructuras internas [40, 45]. Sin embargo, debido a la inestabilidad termodinámica propia de estas interfaces, es necesario controlar la hidrodinámica del proceso y la acción de los tensoactivos. En particular, el ajuste adecuado del equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) permite disminuir la tensión interfacial y conservar la integridad de las gotas ante los esfuerzos de cizalla durante la síntesis [15, 46].

2.3.2 Estabilización de emulsiones y sistema de tensoactivos

En la obtención de microesferas a partir de sistemas poliméricos complejos, como los basados en quitosano y biovidrio, la estabilidad termodinámica y cinética de la dispersión define en gran medida la calidad final del material. Más allá de la estequiometría de las fases, factores asociados al procesamiento (especialmente la emulsificación y la estabilización de las interfaces inmiscibles) influyen directamente en la morfología, la distribución de tamaño y la homogeneidad de las partículas obtenidas. De acuerdo con Iqbal y col. [8] y Freitas y col. [2], una emulsión inestable favorece fenómenos de coalescencia, floculación o sedimentación de la fase dispersa antes de la solidificación, lo que compromete la reproducibilidad del proceso.

El uso de agentes anfífilos resulta esencial al reducir la tensión interfacial. Hema y col. [46] destacan que, en emulsiones dobles (W1/O/W2), la estabilidad depende de una estrategia dual basada en el balance hidrófilo-lipófilo (HLB): un surfactante lipofílico de bajo HLB estabiliza la emulsión primaria, mientras que uno hidrofílico de alto HLB protege la fase externa, evitando la inversión de fases durante el proceso. Además, la concentración del estabilizante influye directamente en la granulometría final. Pérez-Pacheco y col. [47] indican que al incrementar la cantidad de polímero o surfactante aumenta la viscosidad de la fase continua, mejorando la transmisión de las fuerzas de cizallamiento y evitando la

reconexión de las gotas. Este efecto ya había sido cuantificado por Thakkar y Murthy [48] en sistemas de microesferas poliméricas: al aumentar la concentración de gelatina del 15% al 25% se modificó la viscosidad del medio y se logró un control más estricto tanto de la eficiencia de encapsulación como de la distribución de tamaño, debido a la formación de una barrera estérica más densa alrededor de las gotas dispersas.

Cuando el sistema incorpora biovidrio, aparece un mecanismo adicional de estabilización conocido como efecto Pickering. Chen y col. [49] demostraron en emulsiones W1/O/W2 que las partículas sólidas se adsorben prácticamente de forma irreversible en la interfaz aceite-agua, formando una “armadura” mecánica. A diferencia de los tensoactivos moleculares, cuya adsorción-desorción es dinámica, esta capa rígida bloquea físicamente la coalescencia y disminuye la permeabilidad interfacial, protegiendo los compuestos bioactivos frente a estrés térmico y mecánico. Este comportamiento se relaciona también con la reología del sistema: Tewa-Tagne y colaboradores [40], al estudiar suspensiones de sílice con nanocápsulas de policaprolactona, observaron que el sistema pasa de un comportamiento newtoniano a uno pseudoplástico debido a la formación de una red tridimensional entre partículas sólidas y cápsulas poliméricas. Esta red incrementa la viscosidad del medio, disminuye la movilidad de las gotas y evita la sedimentación durante el secado.

Sin embargo, cuando la fracción de sólidos es elevada o el sistema tensoactivo no logra estabilizar adecuadamente la interfaz, predominan las interacciones sólido-sólido sobre las interacciones interfaciales. En estas condiciones las gotas de emulsión dejan de comportarse como unidades independientes y tienden a coalescer o a unirse por puentes particulados, originando agregados irregulares en lugar de microesferas discretas.

El análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) reportado por dichos autores (Figura 2.5) muestra claramente este efecto: formulaciones con adecuada relación matriz-soporte generan partículas esféricas con superficie porosa y una cubierta externa densa formada por la fijación periférica de nanocápsulas. En contraste, al incrementar la carga de fase dispersa (4%) y disminuir el contenido de soporte (1.5% sílice), se pierde la individualidad de las gotas emulsificadas y aparecen grandes aglomerados de partículas.

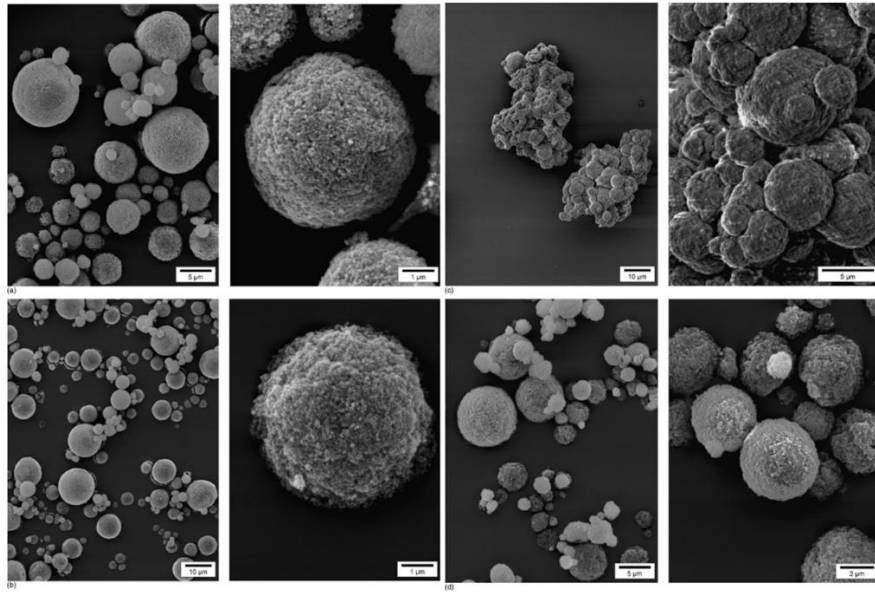


Figura 2.5. Micrografías SEM de polvos secados por aspersión que muestran una vista general (izquierda) y una ampliación mayor (derecha) para las diferentes formulaciones: (a) NC1% + S1.5% (barras de escala: izquierda 5 μm , derecha 1 μm); (b) NC1% + S3% (barras de escala: izquierda 10 μm , derecha 1 μm); (c) NC4% + S1.5% (barras de escala: izquierda 10 μm , derecha 5 μm); (d) NC4% + S3% (barras de escala: izquierda 5 μm , derecha 2 μm) [40].

Este comportamiento evidencia que la esfericidad de las microesferas no depende únicamente del proceso de secado, sino principalmente de la estabilidad interfacial proporcionada por el sistema de tensoactivos. Por ello, mantener un equilibrio adecuado entre viscosidad, concentración de sólidos y cobertura superficial del surfactante resulta esencial para preservar la integridad estructural de las microesferas en sistemas compuestos como los desarrollados en la presente investigación. Complementando, que la estabilidad de la emulsión depende de la interacción entre la reducción de la tensión interfacial por los tensoactivos (controlada por el HLB y la concentración) y la barrera mecánica generada por las partículas de biovidrio mediante el efecto Pickering, todo ello bajo un régimen de agitación que permita la ruptura de gotas sin inducir coalescencia por colisión.

2.3.2.1 Tensión superficial en sistemas dispersos

La formación de microesferas mediante emulsificación implica un aumento considerable del área interfacial (A), lo que introduce una inestabilidad termodinámica inherente al sistema. No obstante, la tensión superficial no es un parámetro fijo. Chernyshev y Skliar [50] demostraron que la presencia de fases dispersas, incluso en estado vapor, modifica dinámicamente la tensión superficial del medio continuo; por ello, en emulsiones dobles complejas la interfase responde a la composición química del entorno inmediato y no debe considerarse una barrera pasiva.

Para contrarrestar esta inestabilidad termodinámica intervienen varios mecanismos de estabilización de manera simultánea. En primer lugar, la propia matriz polimérica participa activamente: polímeros como el quitosano pueden disminuir la tensión superficial del agua (de ~ 64 mN/m a ~ 41 mN/m) al adsorberse en la interfase, comportándose como tensioactivos moderados que facilitan la ruptura de gotas bajo cizalla [24].

La incorporación de fases sólidas, como el biovidrio, añade una estabilización mecánica más robusta mediante el mecanismo Pickering. A diferencia de los surfactantes moleculares, que presentan adsorción y desorción rápida, las partículas sólidas con humectabilidad intermedia quedan prácticamente atrapadas en la interfaz porque su energía de desorción (ΔE) es varios órdenes de magnitud mayor que la energía térmica ($k_B T$). Diversos estudios en sistemas compuestos muestran que esta barrera física puede impedir la coalescencia incluso con coberturas parciales, alcanzándose la máxima estabilidad cuando el empaquetamiento superficial se aproxima al hexagonal [14, 46].

Desde el punto de vista electrocinético, la estabilidad también se refuerza por repulsión de cargas. El análisis de potencial zeta en suspensiones de óxidos indica que valores absolutos mayores a 25-30 mV permiten superar las fuerzas atractivas de Van der Waals; en biovidrios dispersos, el ajuste de pH o el empleo de dispersantes (por ejemplo, ácidos carboxílicos) incrementa la carga superficial negativa y reduce la aglomeración previa a la interacción con la matriz polimérica [51].

Finalmente, el tamaño de las microesferas resulta del equilibrio entre la tensión interfacial y la energía mecánica aplicada: los sistemas de emulsión por evaporación de solvente muestran

una relación no lineal entre la velocidad de cizallamiento y el diámetro de partícula, donde la estabilidad interfacial determina hasta qué punto la energía de agitación puede fragmentar las gotas sin provocar su coalescencia.

2.3.2.2 Teoría del balance hidrofílico-lipofílico (HLB)

El comportamiento de un agente estabilizante dentro de un sistema disperso depende del equilibrio termodinámico entre sus fracciones hidrofílicas y lipofílicas. Esta relación, descrita originalmente para tensoactivos moleculares mediante la escala HLB de Griffin, permite estimar la afinidad del anfífilo por cada fase: valores bajos (< 10) indican carácter lipofílico, típico de emulsiones W/O, mientras que valores altos (> 10) corresponden a sistemas más hidrofílicos, propios de emulsiones O/W [8].

En sistemas de mayor complejidad, como emulsiones dobles (W/O/W) o variantes de emulsión múltiple, la estabilización requiere una estrategia combinada. Hema y col. [46] y Chen y col. [49] muestran que es necesario emplear agentes con valores de HLB complementarios: un surfactante lipofílico para estabilizar la interfaz interna y uno hidrofílico (o partículas hidrofílicas) para la externa.

Este balance permite controlar simultáneamente las distintas interfaces y evitar la inversión de fases o la coalescencia durante el procesamiento. Por tanto, se presenta una tabla comparativa (Tabla 2.3.) que incluye tanto tensoactivos moleculares tradicionales como estabilizantes particulados utilizados recientemente.

Tabla 2.3. Comparativa del uso y función de estabilizantes empleados con base en el HLB, en sistemas compuestos

Referencia	Agente Estabilizante	HLB Aprox.	Función en el Sistema	Resultados Obtenidos
Chen y col. [49]	Span 80	4.3 (Lipofílico)	Interfaz Interna (W1/O): Previene la coalescencia de las gotas de agua internas dentro de la fase oleosa.	Permitió la retención de <i>L. casei</i> en el núcleo con una eficiencia de encapsulación $>90\%$.

Hema y col. [46]	Tween 20/80	15.0 - 16.7 (Hidrofílico)	Interfaz Externa (O/W): Dispersa las gotas de aceite en el medio continuo acuoso.	Facilitó la formación de gotas secundarias estables sin romper la emulsión primaria preformada.
Chen y col. [49]	Complejos OSA-Almidón	Variable (Partícula)	Interfaz Externa (Pickering): Estabilización física mediante barrera sólida.	Generó una "coraza" densa y rugosa visible en SEM que protegió la carga interna contra el estrés de congelación.
Niroula y col. [45]	PGPR	~3.0 (Muy lipofílico)	Interfaz Interna (W1/O): Estándar de oro para alta estabilidad en emulsiones inversas.	Esencial para mantener la integridad de la fase interna frente a la presión osmótica en sistemas W/O/W.

OSA: anhídrido octenil succínico (aditivo alimentario) PGPR: polirricinoleato de poliglicerol (empleado como tensoactivo lipofílico).

El análisis cuantitativo de estudios recientes permite comprender con mayor claridad la influencia del equilibrio hidrófilo-lipófilo en la arquitectura de las emulsiones. Hema y col. [46] mostraron que la selección secuencial de surfactantes con valores de HLB crecientes (Span 80, HLB 4.3 → Tween 20, HLB 16.7 → Triton X-100, HLB 13.5) posibilita la formación de emulsiones múltiples complejas (O1/W + W1/O2/W/W) con tamaños hidrodinámicos controlados. Durante su experimento, la transición desde una emulsión simple O/W (radio medio aproximado de 10.8 nm) hasta la emulsión final incrementó el tamaño a cerca de 2208 nm, manteniendo la integridad de las fases internas. Esto se atribuyó a que el surfactante de alto HLB presente en la fase externa no perturbó la interfaz previamente estabilizada con un agente de bajo HLB, condición necesaria para evitar la coalescencia inmediata del sistema.

La literatura reciente también describe sistemas híbridos en los que coexisten surfactantes moleculares y estabilización particulada. Chen y col. [49] reportaron una eficiencia de encapsulación del 94.33% y una supervivencia bacteriana del 90.63% en yogur empleando un sistema donde la fase interna se estabilizó con Span 80 (HLB bajo) y la externa con complejos particulados de almidón OSA/goma arábiga. La sustitución parcial de surfactantes hidrofílicos por biopolímeros permitió la formación de una capa interfacial densa y rugosa, observable mediante microscopía SEM, que protegió la fase interna frente a condiciones de

estrés como la congelación, evidenciando que la estabilidad estructural del sistema no depende únicamente del HLB químico sino también de la naturaleza mecánica de la interfaz.

En conclusión, la estabilidad de las emulsiones dobles precursoras de microesferas requiere una estabilización en dos niveles: una barrera lipofílica que confine la fase interna y un sistema hidrofílico que mantenga la dispersión externa. Esta combinación disminuye la pérdida del principio activo y evita la coalescencia durante la emulsificación. Por ello, la selección de los tensoactivos no debe basarse solo en el valor de HLB, sino en su compatibilidad funcional dentro de cada interfaz.

2.3.2.3 Selección del sistema Tween 20/Span 80

Para la síntesis de las microesferas compuestas se empleó un sistema de emulsión inversa cargado con sólidos (S/W)/O, utilizando tensoactivos distribuidos en ambas fases: Tween 20 en la fase acuosa dispersa (S/W) y Span 80 en la fase oleosa continua (O). Esta elección responde a la necesidad de estabilizar simultáneamente interfaces con afinidades opuestas y así preservar la morfología esférica del material.

El Span 80 (HLB 4.3), presente en la fase oleosa, actúa como el principal agente de confinamiento. Su carácter lipofílico permite formar una barrera estérica alrededor de las gotas acuosas de quitosano, evitando su coalescencia antes de la gelificación. Trabajos como los de Chen y col. [49] muestran que este tipo de tensoactivo favorece la retención de compuestos hidrofílicos y la obtención de partículas con distribución de tamaño estrecha y alta eficiencia de encapsulación, lo que respalda su selección para mantener la geometría esférica frente a los esfuerzos de cizalla.

Por su parte, el Tween 20 (HLB 16.7), incorporado en la fase acuosa, reduce la tensión superficial y mejora la humectabilidad del biovidrio dentro de la matriz polimérica. Hema y col. [46] observaron mediante DLS que este surfactante genera dispersiones iniciales de tamaño muy fino y baja polidispersidad, condición necesaria para lograr una distribución homogénea de las partículas cerámicas en el quitosano y evitar la formación de aglomerados que comprometan la estabilidad estructural.

La combinación de ambos tensoactivos genera una interfase suficientemente resistente como para influir en la granulometría final más allá del efecto puramente mecánico de la agitación. Thakkar y Murthy [48] demostraron que el tamaño de partícula depende directamente de la reducción de la tensión interfacial: al incrementar la concentración del agente lipofílico (análogo al Span), observaron una disminución del diámetro aun manteniendo constantes las rpm, ya que una menor tensión requiere menos energía para fragmentar las gotas y la mayor cobertura superficial del surfactante estabiliza rápidamente la nueva área formada.

Para comprobarlo, aislaron la variable química preparando lotes con igual velocidad de agitación y concentración de polímero, pero variando el Span 85 del 2 % al 5 % p/p en la fase externa. Registraron una reducción del tamaño de partícula de $20.51 \pm 0.96 \mu\text{m}$ a $17.94 \pm 2.11 \mu\text{m}$, tendencia que se repitió en todos los sistemas evaluados. Los autores atribuyen este comportamiento a la disminución de la tensión interfacial aceite-agua: al requerirse menor energía para crear nueva superficie, la misma agitación forma gotas más finas y evita su coalescencia antes de la reticulación.

En conjunto, estos resultados confirman que el sistema Tween 20/Span 80 no solo estabiliza la emulsión, sino que funciona como mecanismo de control del tamaño de partícula, incluso sin modificar las condiciones hidrodinámicas del proceso. Concluyendo que el sistema aporta la estabilidad temporal necesaria para que el agente reticulante actúe y se fije la estructura esférica compuesta estudiada.

2.3.3 Efecto del reticulante en la degradación y formación de microesferas

La transformación de una gota de emulsión líquida en una microesfera sólida y estable depende en gran medida del proceso de reticulación (*cross-linking*). Este consiste en la formación de una red tridimensional mediante uniones químicas o físicas entre las cadenas poliméricas, lo que limita su movilidad y reduce el volumen libre disponible para la difusión del solvente. De esta manera, el agente reticulante se vuelve el factor que define la densidad de la malla, influyendo directamente en el tamaño de partícula, el grado de hinchamiento (*swelling*) y la cinética de degradación de la matriz en medios fisiológicos [4]. En sistemas basados en quitosano y biopolímeros similares, un mayor grado de entrecruzamiento conduce

a estructuras más compactas, con mayor resistencia mecánica y menor permeabilidad. La Tabla 2.4 resume el efecto de distintos agentes y condiciones de reticulación reportados en la literatura consultada.

Tabla 2.4. Efecto comparativo de agentes reticulantes sobre las propiedades fisicoquímicas de microesferas

Referencia	Agente Reticulante	Metodología y Condiciones	Resultados Obtenidos
Hariyadi y col. [16]	Cloruro de calcio (CaCl ₂) (Iónico)	Gelificación ionotrópica. Variación de concentración de 0.5 M a 1.0 M.	El aumento de concentración redujo el tamaño de partícula de 3.23 0.05 μm (0.5 M) a 2.86 0.03 μm (1.0 M). El índice de hinchamiento a 24 h bajó de 1.25 a 1.11.
Ravarian y col. [18]	GPTMS (Silano - Covalente)	Sol-gel híbrido. Enlace covalente entre quitosano y biovidrio vs. mezcla física.	La reticulación covalente redujo drásticamente el ratio de hinchamiento de ~300% (físico) a ~23% (híbrido). El Módulo de Young aumentó de 0.2 MPa a 2.41 MPa (con 40% biovidrio).
Thakkar y Murthy [48]	Glutaraldehído (GTA) vs. Formaldehído (FA)	Emulsificación y reticulación química. Comparación de volumen y tipo de aldehído.	Las microesferas con GTA presentaron menor tamaño (20.5 μm) que con FA (27.6 μm). La velocidad de liberación fue significativamente menor ($p < 0.5$) con GA debido a una red más densa.
Agnihotri y col. [1]	Glutaraldehído vs. Calor	Coacervación y entrecruzamiento térmico vs. químico.	El GTA generó las tasas de liberación más lentas. El exponente difusional (n) disminuyó de 0.61 a 0.47 al aumentar la densidad de reticulación, indicando una mayor restricción difusional.

El análisis de los datos experimentales muestra que la reticulación no funciona como un fenómeno binario, sino una variable que modifica gradualmente la densidad de la red polimérica y, por consecuencia, la estructura final del material. Cuando aumenta la eficiencia del agente reticulante, la microesfera tiende a compactarse. Thakkar y Murthy [48] han reportado un comportamiento similar en sistemas covalentes; por ejemplo, se ha observado que el glutaraldehído forma redes más rígidas y densas que el formaldehído. Esta mayor

densidad de entrecruzamiento permite que la matriz soporte mejor las fuerzas de coalescencia durante la emulsificación y que la contracción durante el secado sea más uniforme, obteniéndose partículas de menor tamaño y con una distribución más homogénea.

Los resultados obtenidos en este trabajo siguen esa misma tendencia. Aunque el glutaraldehído (GTA) y el formaldehído (FA) presentaron eficiencias de encapsulación similares (>82%), el GA produjo microesferas de menor diámetro, lo que sugiere la formación de una red más compacta (Tabla 2.).

Tabla 2.5 Efecto del volumen de glutaraldehído (GA) o formaldehído (FA) y de la duración de la reticulación en la eficiencia de captura y el tamaño de partícula. Recuperado [48]

Código de Lote	Volumen de la solución de agente reticulante * (ml)	Duración de la reticulación (horas)	Eficacia de captura %	Tamaño de partícula μm
H	GA-0.5	1	84.78 $\pm$ 1.80	22.62 $\pm$ 1.72
I	GA-0.5	3	82.60 $\pm$ 1.57	21.58 $\pm$ 1.37
J	GA-1.0	1	84.80 $\pm$ 2.58	22.62 $\pm$ 1.09
E	GA-1.0	3	86.82 $\pm$ 2.39	20.51 $\pm$ 0.96
K	FA-0.5	1	85.30 $\pm$ 1.74	28.94 $\pm$ 1.40
L	FA-0.5	3	83.74 $\pm$ 1.82	27.32 $\pm$ 2.33
M	FA-1.0	1	86.77 $\pm$ 1.91	27.60 $\pm$ 1.15
N	FA-1.0	3	87.53 $\pm$ 1.30	28.85 $\pm$ 1.11

*GA= solución de glutaraldehído al 25 % p/p. solution.

*FA=solución de formaldehído al 37 % p/p.

*Cada uno de los valores se expresa como media $\pm$ D.E. ($n = 3$)

De forma consistente, las curvas de liberación (Figura 2.5a y b) muestran que las microesferas reticuladas con GTA presentan una liberación del fármaco más lenta, mientras que las tratadas con FA liberan el acetaminofén con mayor rapidez. Se observó además que el volumen de reticulante fue la variable con mayor influencia en la liberación acumulada, mientras que el tiempo de reacción tuvo un efecto menor. En conjunto, estos resultados

indican que al aumentar la densidad de entrecruzamiento disminuye la porosidad de la matriz polimérica y se dificulta la difusión del fármaco a través de la red.

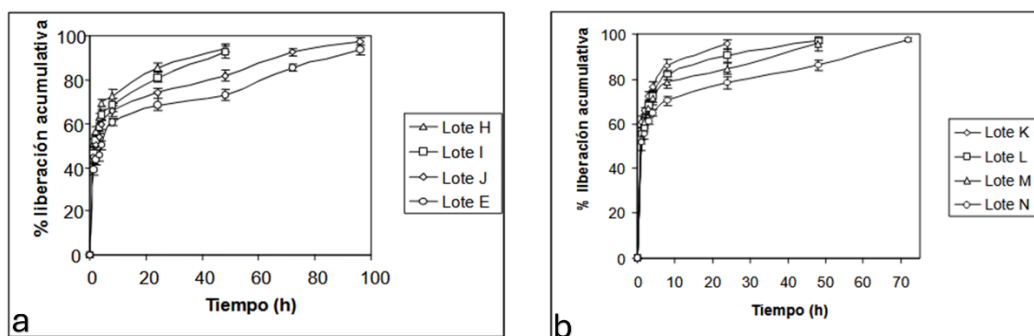


Figura 2.6. Efecto del volumen del agente reticulante y del tiempo de reticulación en la liberación del fármaco, a) glutaraldehído (25 % p/p) y b) formaldehído (37 % p/p) [48].

La restricción en la movilidad de las cadenas poliméricas también impacta la estabilidad en medio acuoso. Ravarian y col. [18] y Berger y col. [4] explican que, al aumentar la densidad de puntos de anclaje (ya sea mediante enlaces covalentes con silanos como el GPTMS o por interacciones iónicas) disminuye el volumen libre hidrodinámico disponible para la penetración del solvente. Como consecuencia, el índice de hinchamiento se reduce notablemente: las mezclas físicas forman estructuras altamente hidratadas, mientras que los sistemas reticulados originan redes compactas. Esta menor entrada de agua no solo preserva la integridad estructural, sino que retrasa la degradación hidrolítica al limitar el acceso del medio a los enlaces susceptibles de ruptura.

Finalmente, la modificación de la microarquitectura se refleja en la cinética de liberación del fármaco. Agnihotri y col. observaron que, al aumentar el grado de reticulación, el transporte se desvía de la difusión Fickiana ideal, disminuyendo el exponente n (de 0.61 a 0.47) y reduciendo los coeficientes de difusión. En conjunto, el tipo y la concentración del reticulante se comportan como un parámetro de ajuste capaz de atenuar el efecto burst y modular la velocidad de liberación a largo plazo.

2.4 Evaluación de la cinética de liberación de fármacos

La evaluación de la cinética de liberación es esencial para identificar el mecanismo de transporte del fármaco desde la matriz polimérica. De forma convencional, este análisis se basa en cuantificar la masa liberada (M_t) a lo largo del tiempo y ajustar los resultados a modelos matemáticos como la ecuación de Higuchi, asociada a difusión predominante, o la ley de potencia de Korsmeyer-Peppas [20].

Sin embargo, la aplicación rigurosa de estos modelos exige el cumplimiento de ciertas condiciones experimentales. En particular, deben mantenerse condiciones de *sink*, es decir, que la concentración del fármaco en el medio de liberación permanezca por debajo de aproximadamente 10-20 % de su solubilidad de saturación, y además conservarse la linealidad instrumental establecida por la ley de Beer-Lambert. En sistemas con alta carga de fármaco o con una liberación inicial rápida (efecto *burst*), estas condiciones pueden no mantenerse, ya que pueden generarse estados de sobresaturación en el medio o incluso saturación del detector. Como consecuencia, la cuantificación absoluta directa de la cantidad liberada pierde precisión y los datos deben interpretarse con cautela al ajustar los modelos cinéticos [52, 53].

2.4.1 Liberación fraccional: índice de disponibilidad relativa (IDR)

El fundamento de la liberación fraccional y del Índice de Disponibilidad Relativa (IDR) surge cuando las limitaciones experimentales (por ejemplo, la pérdida de linealidad en espectrofotometría UV a concentraciones elevadas) impiden calcular con precisión la masa liberada. En estos casos, la interpretación cinética puede realizarse mediante parámetros normalizados. De acuerdo con el planteamiento de Ritger y Peppas, la cinética no depende de la masa absoluta liberada, sino de la fracción liberada en función del tiempo, representado en la Ecuación 2.1:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2.1)$$

Donde M_t/M_∞ representa la fracción del fármaco liberado respecto al máximo alcanzable en equilibrio.

Bajo esta lógica, el Índice de Disponibilidad Relativa (IDR) puede emplearse como un parámetro adimensional equivalente a la fracción liberada, útil para comparar formulaciones cuando la cuantificación absoluta no es confiable. El IDR se obtiene normalizando la señal instrumental (absorbancia) respecto al valor máximo observado, Ecuación 2.2:

$$IDR (\%) = \frac{A_t}{A_{max}} \times 100 \quad (2.2)$$

donde A_t es la absorbancia medida en el tiempo t y A_{max} la absorbancia máxima registrada durante el ensayo.

Este enfoque es consistente con estudios recientes de Niederquell y col. [52] que observaron que, en sistemas complejos cercanos a la saturación, el análisis termodinámico y el empleo de indicadores de desempeño relativo (como las pendientes iniciales y las áreas bajo la curva) resultan más informativos que la cuantificación directa de la masa liberada, donde emplean parámetros relativos cuando el sistema excede su rango de solubilidad. En particular, se ha propuesto el uso del “razón de supersaturación” (C/C_{sat}), que compara la concentración medida con la concentración de saturación para describir el desempeño de formulaciones mesoporosas bajo condiciones no ideales. De forma análoga, el IDR no busca cuantificar la dosis absoluta, sino describir la disponibilidad relativa del fármaco en el medio.

Al expresar los resultados entre 0 y 100 %, la normalización permite comparar la velocidad relativa de liberación entre formulaciones, identificar perfiles de liberación rápida (tipo *burst*), sostenida o sigmoideal, y disminuir el error derivado de desviaciones de la ley de Beer-Lambert. Así, aunque el IDR no proporciona la cantidad liberada en mg, sí permite caracterizar de manera consistente el comportamiento cinético y discriminar el efecto de variables como el grado de reticulación o la incorporación de biovidrio en la matriz.

CAPITULO 3. METODOLOGÍA

En este capítulo se describe el procedimiento experimental seguido para la síntesis de los biovidrios y la obtención de microesferas compuestas. Se detallan las condiciones de síntesis del biovidrio por fusión y temple y por sol-gel, así como el proceso de microencapsulación mediante emulsificación S/O/W y reticulación con glutaraldehído. Se incluye la variación controlada del contenido de biovidrio en las formulaciones y los métodos de recuperación y secado de las microesferas. Finalmente, se presentan las técnicas de caracterización empleadas para evaluar estructura cristalina, morfología, composición elemental, tamaño de partícula, potencial Zeta y comportamiento de liberación del acetaminofén.

3.1 Materiales

Microesferas de quitosano (CS-Control)

Se empleó quitosano de bajo peso molecular (poli-(D-glucosamina), Sigma-Aldrich, 99 %) como matriz polimérica formadora de la red estructural. El ácido acético glacial al 5 % (v/v) (CH_3COOH , J. T. Baker, PM 60.05) se utilizó para protonar los grupos amino ($-\text{NH}_2$) del quitosano y permitir su solubilización en medio acuoso. El acetaminofén (Sigma-Aldrich, $\geq 99.0\%$) se empleó como fármaco modelo para encapsulación.

El aceite mineral actuó como fase continua en el sistema W/O. El Span 80 (Sigma-Aldrich, ácido oleico $>60\%$) se utilizó como surfactante lipofílico para estabilizar la emulsión. El glutaraldehído (GTA, J. T. Baker, grado I, 25 % en H_2O) funcionó como agente reticulante, promoviendo enlaces covalentes entre cadenas de quitosano. El hexano (C_6H_{14} , J. T. Baker, PM 86.18) se empleó para eliminar residuos de aceite y surfactante durante el lavado.

Biovidrio 45S5 por fusión y temple (BG-FT)

Se utilizaron reactivos de grado analítico (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$): óxido de silicio (SiO_2) como formador principal de la red vítrea, óxido de calcio (CaO), pentóxido de fósforo P_2O_5 y carbonato de sodio (Na_2CO_3) como precursor del óxido de sodio (Na_2O).

El SiO₂ constituyó la estructura base del vidrio, mientras que CaO y Na₂O actuaron como modificadores de red. El P₂O₅ participó en la formación de unidades fosfato dentro de la matriz vítrea.

Biovidrio 45S5 por sol-gel (BG-SG)

Se empleó tetraetilortosilicato (TEOS, Sigma-Aldrich, 98%) como precursor de SiO₂, responsable de la formación de la red inorgánica mediante hidrólisis y condensación. El ácido nítrico (HNO₃, 2 M) se utilizó como catalizador de la hidrólisis y el agua desionizada participó en la reacción estequiométrica.

El fosfato de amonio dibásico ((NH₄)₂HPO₄, MEYER, 98%) actuó como fuente de P₂O₅. El nitrato de calcio tetrahidratado (Ca(NO₃)₂·4H₂O, MEYER, 99-103%) y el nitrato de sodio (NaNO₃, MEYER, 99%) se emplearon como precursores de CaO y Na₂O, respectivamente, facilitando la incorporación homogénea de los modificadores de red antes del tratamiento térmico.

Microesferas compuestas (CS-BG%-FT/SG)

Las microesferas compuestas se sintetizaron siguiendo el mismo sistema empleado para las CS-Control, incorporando modificaciones en la fase continua. Se añadió biovidrio 45S5, obtenido por las rutas de fusión y temple y sol-gel, en forma de polvo (25-75 % p/p respecto al polímero), el cual actuó como fase inorgánica de refuerzo.

Para favorecer su dispersión en la fase acuosa se utilizó Tween 20 (Sigma-Aldrich, ácido láurico ≥ 60 %) al 0.5% v/v como surfactante hidrofílico. Además, la fase continua se ajustó a una mezcla de diclorometano (60 % v/v) y aceite mineral (40 % v/v), manteniéndose Span 80 (3 % v/v) como estabilizante de la emulsión S/W/O. El resto de los reactivos y condiciones de reticulación y lavado fueron los mismos descritos para las microesferas CS-Control.

3.2 Definición de formulaciones

La definición de las formulaciones se llevó a cabo considerando la relación entre la matriz polimérica y la carga inorgánica, tomando como referencia el enfoque propuesto por Días y col. [42], quienes plantean un diseño experimental basado en la variación sistemática del contenido cerámico. Este criterio permite analizar de manera detallada cómo los cambios en la fracción de biovidrio afectan la interacción interfacial con el quitosano y, en consecuencia, la cohesión y estabilidad de la matriz.

Con base en este planteamiento, se seleccionaron las composiciones porcentuales presentadas en la Tabla 3.1, en las que se varía la concentración de biovidrio (BG) manteniendo constante la fase polimérica. Estas formulaciones no solo permiten evaluar la influencia del contenido cerámico sobre la morfología y la eficiencia de encapsulación del fármaco, sino también analizar su impacto en la degradación del sistema y en la liberación de especies iónicas como Ca^{2+} y PO_4^{3-} .

Tabla 3.1. Formulación experimental

Formulación	Quitosano (% p/v)	Ácido acético (%)	Biovidrio (% p/p respecto al quitosano)	Método de obtención del biovidrio	Fármaco (% p/p respecto al quitosano)	Velocidad (rpm)
CS-Control	2.0	5	-	-	40	3000
CS-BG25-FT	2.0	5	25	fusión-temple	40	3000
CS-BG50-FT	2.0	5	50	fusión-temple	40	3000
CS-BG75-FT	2.0	5	75	fusión-temple	40	3000
CS-BG25-SG	2.0	5	25	sol-gel	40	3000
CS-BG50-SG	2.0	5	50	sol-gel	40	3000
CS-BG75-SG	2.0	5	75	sol-gel	40	3000

El diseño experimental se planteó manteniendo constantes los parámetros asociados a la matriz polimérica y a las condiciones de operación, con el fin de evaluar de forma aislada el efecto del refuerzo cerámico sobre las propiedades finales del sistema. La fase polimérica consistió en una solución de quitosano de peso molecular medio al 2 % (p/v), preparada en ácido acético al 5 % (v/v), concentración que proporciona una viscosidad adecuada para la formación de gotas estables durante la emulsificación.

Para analizar la capacidad de encapsulación se fijó una relación fármaco/polímero constante del 40 % (p/p), nivel de carga que permite evaluar la eficiencia de retención del acetaminofén sin comprometer la integridad estructural de la matriz. De igual manera, la energía de mezclado se mantuvo constante mediante una velocidad de homogeneización de 3000 rpm durante la etapa de emulsificación, parámetro crítico para el control de la distribución de tamaño de partícula y la homogeneidad del sistema.

La variable independiente del estudio fue la incorporación de biovidrio 45S5 como fase sólida dispersa. Se consideraron dos factores experimentales: el método de obtención del biovidrio, comparando partículas sintetizadas por fusión-temple y sol-gel, y la carga de refuerzo, evaluada en proporciones del 25, 50 y 75 % (p/p) respecto a la masa del polímero. Esta variación permitió analizar su influencia sobre la estabilidad de la matriz, la morfología de las microesferas y el perfil de liberación del acetaminofén, así como identificar el límite de incorporación del refuerzo sin afectar la formación adecuada de las partículas.

3.3 Preparación de microesferas control

Las microesferas control se sintetizaron mediante la técnica de emulsificación y evaporación de solvente en un sistema agua/aceite (W/O), empleando un protocolo modificado basado en estabilización interfacial y reticulación química (Figura 3.1.). El procedimiento se dividió en las siguientes etapas:

Preparación de las fases

- Fase acuosa (W): Se disolvió acetaminofén en agua destilada (relación de carga del 40 % p/p respecto al polímero). El medio se acidificó con ácido acético glacial al 5% v/v. Posteriormente, se añadió quitosano de bajo peso molecular hasta una concentración final del 2 % p/v. La mezcla se mantuvo en agitación magnética a 300 rpm durante 12 h (IKA C-MAG HS 7) para asegurar la homogeneidad.

- Fase oleosa (O): Consistió en aceite mineral con la adición de Span 80 al 2% v/v como agente tensoactivo. Se homogeneizó mediante agitación magnética a 300 rpm por 15 min.

Formación de la emulsión

La formación de la emulsión y la estructura de las microesferas se realizó bajo las siguientes condiciones de cizalladura y control térmico:

1. Formación de la emulsión: La fase acuosa se incorporó gota a gota sobre la fase oleosa utilizando un homogeneizador de alta cizalladura (IKA T18 ULTRA-TURRAX) a 3000 rpm durante 20 min.
2. Reticulación química: A la emulsión resultante se le añadió glutaraldehído al 5% v/v respecto al volumen total.
3. Evaporación de solvente: El sistema se mantuvo a 40 °C y 200 rpm durante 4 h para favorecer la reticulación del quitosano y la eliminación del solvente.

Obtención de microesferas

Para la obtención de las microesferas, se siguió el siguiente método para purificación:

1. Separación: Centrifugación a 2500 rpm por 5 min (Thermo Scientific ST16).
2. Lavado: Se realizaron cuatro ciclos de lavado con hexano para eliminar trazas de aceite y surfactante.
3. Secado: El material se llevó a una estufa de vacío (Thermo Scientific Lindberg Blue M) a 40 °C durante 24 h para eliminar solventes residuales.

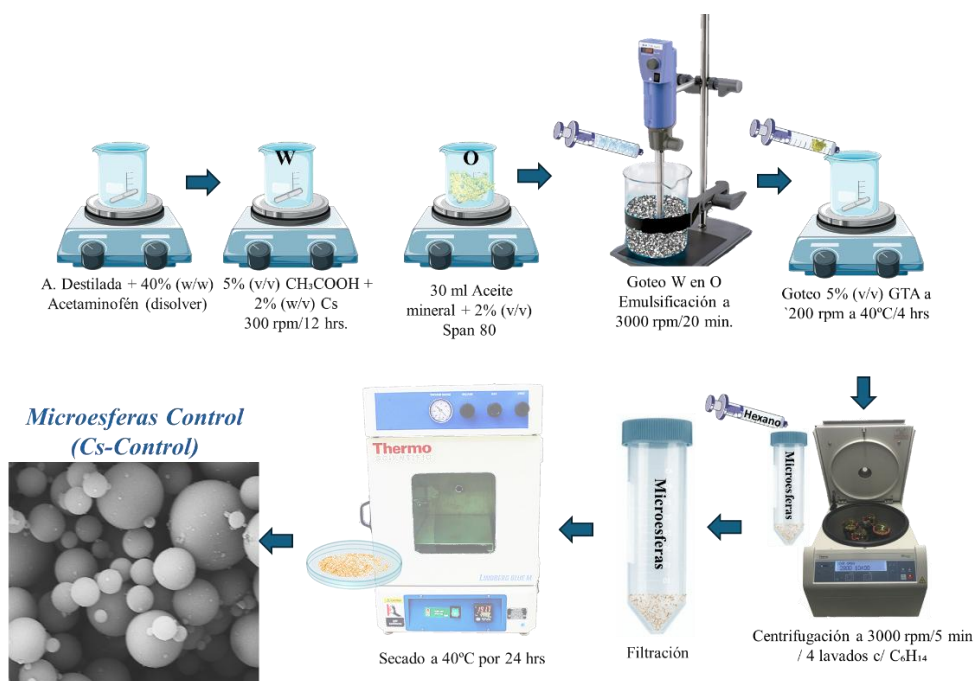


Figura 3.1. Síntesis de microesferas de quitosano (CS-Control).

3.4 Síntesis de vidrio bioactivo 45S5

3.4.1 Método de fusión y temple

El vidrio bioactivo 45S5 se sintetizó mediante la ruta convencional de fusión y temple, siguiendo la formulación original reportada por Hench [6, 25], La composición nominal en porcentaje en peso fue: 45% SiO_2 , 24.5% CaO , 24.5% Na_2O y 6.0% P_2O_5 .

Preparación de precursores y mezcla

Los polvos grado analítico de óxido de silicio (SiO_2), óxido de calcio (CaO), carbonato de sodio (Na_2CO_3) y pentóxido de fósforo (P_2O_5) se mezclaron hasta obtener una fase homogénea y se transfirieron a un crisol de sílice fundida para el tratamiento térmico (Figura 3.2.).

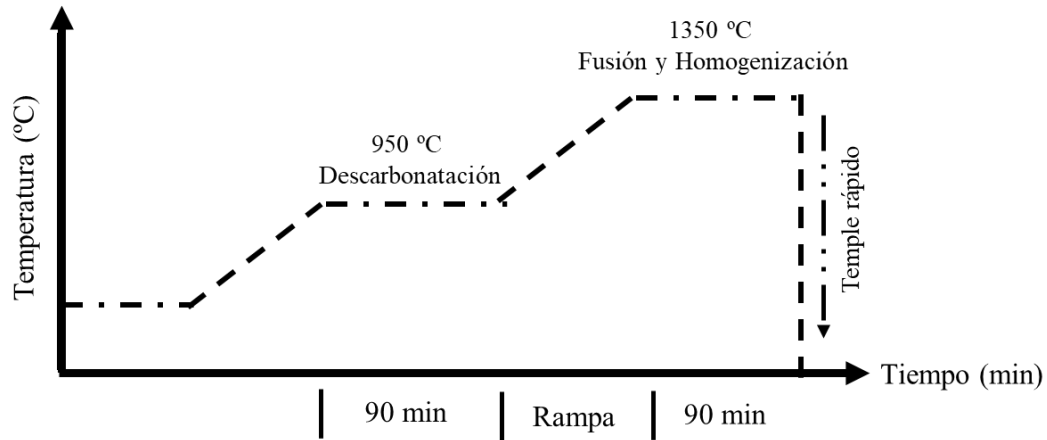


Figura 3.2. Ciclo térmico para la fabricación de biovidrio 45S5 por fusión-temple.

La fusión se realizó en un horno de alta temperatura (CARBOLITE HTF 1700) mediante un ciclo térmico de dos etapas diseñado para asegurar la estabilidad de la masa fundida:

1. Descarbonatación: Calentamiento a 950 °C durante 90 min para permitir la descomposición de los carbonatos y la liberación de gases.
2. Fusión y homogeneización: Incremento de temperatura hasta 1350 °C, manteniendo la isoterma por 90 min para lograr una fase líquida homogénea.

Finalizado el ciclo, el material fundido se vertió inmediatamente en agua desionizada a temperatura ambiente para formar una frita. Este enfriamiento abrupto (temple) evitó la cristalización, induciendo la formación de una estructura vítrea amorfa característica del biovidrio 45S5.

Procesamiento mecánico y granulometría

Para la adecuación del material en sistemas compuestos, se realizó el siguiente post-procesamiento:

1. Secado: En estufa (Thermo Scientific Lindberg Blue M) a 120 °C por 3 h.

2. Molienda: Utilizando un molino vibratorio de discos (RETSCH RS 200) durante 1 min.
3. Tamizado: El polvo se pasó por una malla 230 para garantizar un tamaño de partícula final 63 μm .
4. Pulverización: Utilizando un molino planetario de bolas (RETSCH PM 400) en contenedores de 50 mL y bolas de 9 mm de diámetro, ambos de zirconia, con una relación en peso bolas/polvo de 10:1, a 400 rpm durante 1 hora. Este proceso permitió alcanzar un tamaño de partícula final cercano a 1 μm .

3.4.2 Método por sol-gel

El biovidrio con composición nominal 45S5 (46.1% SiO_2 , 24.4% Na_2O , 26.9% CaO y 2.6% P_2O_5 en% mol) se sintetizó mediante una ruta sol-gel basada en nitratos (Figura 3.3.), adaptada del método descrito por Ben-Arfa y Pullar [27]. Los cálculos estequiométricos se realizaron considerando la composición molar objetivo y la relación molar correspondiente entre óxidos y precursores.

El proceso se inició con la hidrólisis del precursor de sílice:

1. Mezcla inicial: El TEOS se combinó con agua desionizada y 2 M, manteniendo una relación molar de 8:1.
2. Agitación: La mezcla se mantuvo a 400 rpm durante 60 min a temperatura ambiente (IKA C-MAG HS 7) hasta obtener un sol homogéneo.
3. Adición de precursores: Se añadió gradualmente la solución de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Posteriormente, se incorporaron de forma secuencial el $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y el NaNO_3 , con agitación constante de 45 min entre cada adición.

El sol resultante se transfirió a recipientes cerrados para su procesamiento térmico:

- Envejecimiento: 72 h a 60 $^{\circ}\text{C}$ para promover la formación de la red polimérica.

- Secado escalonado: Se utilizó una estufa (Thermo Scientific Lindberg Blue M) con el siguiente programa para obtener el xerogel: 60 °C por 24 h, 90 °C por 24 h y 130 °C por 40 h.

El xerogel seco se molió y se sometió a una rampa de calentamiento en un horno CARBOLITE HTF 1700 para eliminar especies orgánicas y descomponer los nitratos:

- Etapa 1: Calentamiento a 2 °C/min hasta 300 °C (2 h).
- Etapa 2: Calentamiento a 5 °C/min hasta 700 °C (3 h).

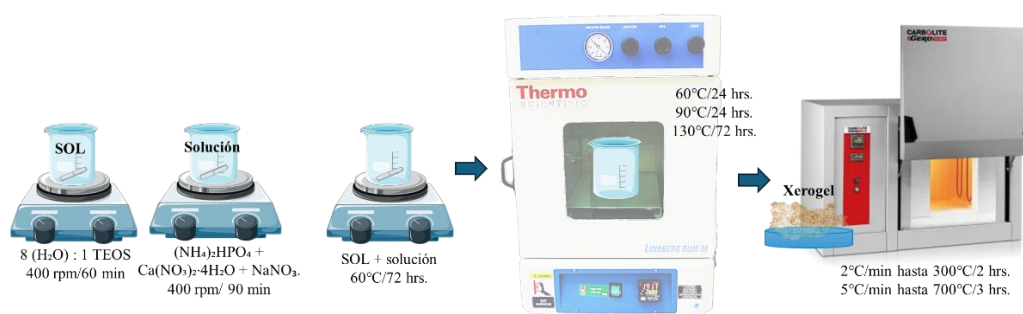


Figura 3.3. Síntesis de biovidrio 45S5 por ruta sol-gel basada en nitratos.

3.5 Síntesis de microesferas híbridas

Las microesferas compuestas se sintetizaron mediante una variante del método de emulsificación y evaporación de solvente, adaptada para sistemas heterogéneos sólido/agua/aceite (S/W/O). Esta metodología permitió la incorporación de partículas inorgánicas de biovidrio dentro de la matriz de quitosano (Figura 3.4.).

El proceso se realizó en dos etapas para asegurar la homogeneidad del refuerzo cerámico, para la fase dispersa

1. Matriz polimérica: Se preparó una solución de quitosano de bajo peso molecular al 2% p/v en ácido acético glacial al 5 % v/v. La mezcla se homogeneizó a 300 rpm durante 12 h (IKA C-MAG HS 7).

2. Incorporación del biovidrio: El polvo de vidrio bioactivo 45S5 (obtenido tanto por fusión-temple como por sol-gel) se añadió a la solución de quitosano en relaciones másicas del 25, 50 y 75 % (respecto al polímero).
3. Estabilización: Se adicionó Tween 20, al 0.5% v/v como agente dispersante para evitar la aglomeración de las partículas cerámicas, manteniendo la agitación a 300 rpm.

La fase continua se diseñó para controlar la tensión interfacial del sistema:

- Composición: Mezcla de diclorometano al 60 % v/v y aceite mineral al 40 % v/v.
- Surfactante: Se añadió Span 80, surfactante lipofílico al 3% v/v.
- Condiciones: Agitación magnética a 300 rpm por 10 min para garantizar la distribución uniforme del tensoactivo.

Emulsificación y reticulación

La formación de las microesferas y la consolidación de la red polimérica se llevó a cabo bajo los siguientes parámetros críticos:

1. Emulsificación: La fase dispersa (S/W) se incorporó gradualmente a la fase continua mediante un homogeneizador de alta cizalladura (IKA T18 ULTRA-TURRAX) a 3000 rpm durante 20 min.
2. Reticulación Química: Se añadió glutaraldehído al 2% v/v respecto al volumen de la fase acuosa.
3. Consolidación: El sistema se mantuvo a 40 °C y 200 rpm durante 2 h, promoviendo simultáneamente la reticulación del quitosano y la evaporación del diclorometano.

Recuperación y purificación

1. Separación: Centrifugación a 2500 rpm por 5 min (Thermo Scientific ST16).
2. Lavado: Cuatro ciclos con hexano para eliminar restos de la fase orgánica y surfactantes.
3. Secado final: En estufa de vacío (Thermo Scientific Lindberg Blue M) a 40 °C por 24 h.

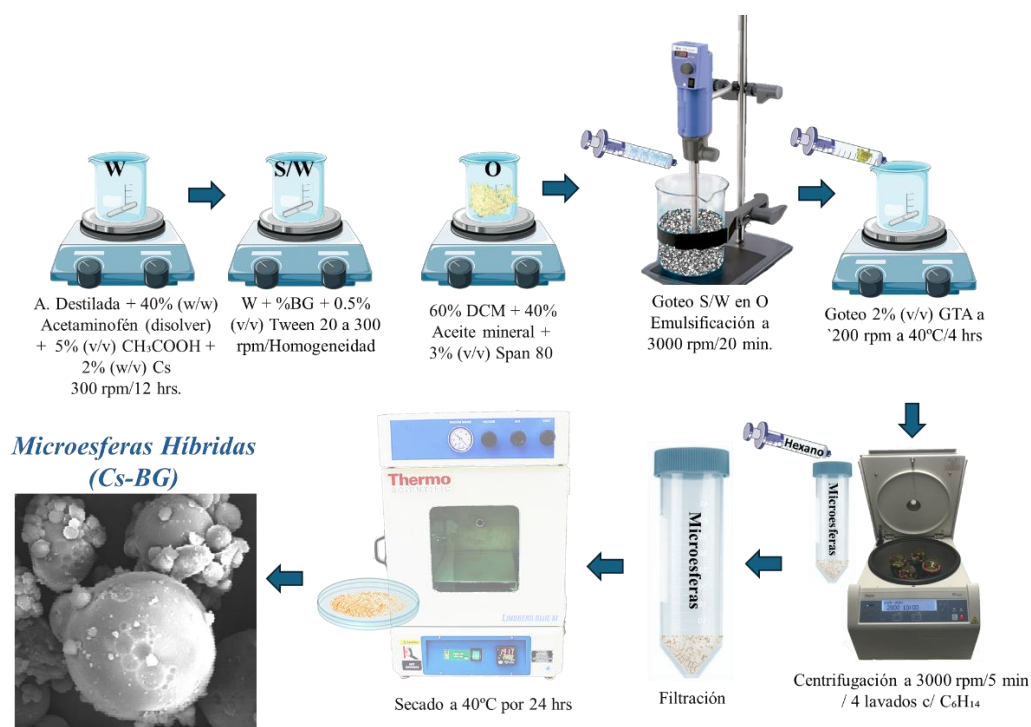


Figura 3.4. Síntesis de microesferas compuestas (Cs-(BG-FT/BG-SG)).

3.6 Caracterización del biovidrio 45S5

La caracterización del vidrio bioactivo 45S5 se llevó a cabo con el fin de evaluar su morfología, tamaño de partícula, estructura y composición elemental, considerando las diferencias asociadas a las rutas de síntesis empleadas (fusión-temple y sol-gel). Los

resultados obtenidos permitieron comparar las características fisicoquímicas de ambos materiales y su posible influencia en aplicaciones biomédicas.

3.6.1 Análisis estructural por difracción de rayos X (DRX)

La estructura cristalina de los biovidrios se analizó mediante difracción de rayos X (DRX), empleando un difractómetro Rigaku, modelo Ultima IV con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). Los difractogramas se registraron en un intervalo de 2θ de 10° a 70° , con un paso de 0.02° y un tiempo de integración de 1 s por paso.

3.6.2 Análisis morfológico y composicional (SEM-EDS)

La morfología superficial y la composición elemental de los biovidrios se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, JEOL JSM-7600F), acoplada a un detector de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS, Bruker Xflash 6130). Las muestras en polvo se montaron sobre cinta de carbono conductora y se recubrieron con una capa delgada de iones de Cu, debido a la no conducción de las muestras.

El análisis por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) permitió identificar los elementos constituyentes del biovidrio 45S5 (Si, Ca, Na y P) y verificar de manera semicuantitativa la composición del material, así como la ausencia de contaminantes asociados a los procesos de síntesis o molienda. Dado que esta técnica proporciona la composición elemental en porcentaje en peso, y que el biovidrio 45S5 se define convencionalmente en términos de óxidos, fue necesario realizar una conversión estequiométrica para permitir una comparación directa con la composición nominal del material.

Para este análisis se asumió que los elementos detectados (Si, Na, Ca y P) se encuentran completamente oxidados, formando los óxidos característicos del sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$. El oxígeno cuantificado por EDS no se utilizó de manera directa en los cálculos, debido a las limitaciones inherentes de la técnica para la cuantificación precisa de elementos ligeros;

en su lugar, su contribución se estimó de forma indirecta a partir de la estequiometría de los óxidos correspondientes.

3.6.3 Análisis granulométrico y estabilidad coloidal

Debido a las diferencias en la escala de tamaño propias de cada método de síntesis, fue necesario emplear técnicas complementarias para la evaluación granulométrica de los biovidrios. En el caso del material obtenido por fusión-temple, la distribución de tamaño de partícula se determinó mediante difracción láser, utilizando un analizador Beckman Coulter LS 13 320. Las mediciones se realizaron en modo líquido, dispersando el polvo en agua desionizada bajo las condiciones estándar de operación del equipo, lo que permitió obtener los parámetros característicos de la distribución de tamaños y establecer su relación con el área superficial disponible.

Para el biovidrio sintetizado por la ruta sol-gel, el tamaño de partícula hidrodinámico y la estabilidad de la dispersión se evaluaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y medición de potencial Zeta, respectivamente, empleando un analizador Anton Paar Litesizer 500. Antes del análisis, las muestras se redispersaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*). El potencial Zeta se utilizó como un indicador del comportamiento coloidal del material en suspensión, parámetro clave para anticipar su interacción electrostática con la matriz de quitosano y reducir la formación de agregados durante la obtención de las microesferas. Esta evaluación resulta especialmente relevante, ya que la carga superficial de las partículas de biovidrio influye de manera directa en su reactividad y en la estabilidad final del sistema compuesto.

3.7 Caracterización de las microesferas

La evaluación de las propiedades fisicoquímicas de las microesferas se llevó a cabo mediante un conjunto de técnicas instrumentales complementarias, con el fin de confirmar la reticulación de la matriz polimérica, verificar la incorporación del refuerzo cerámico y analizar su efecto sobre la estructura final del sistema microparticulado.

3.7.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La caracterización química se llevó a cabo mediante espectroscopía FT-IR para identificar los grupos funcionales presentes en las microesferas y analizar las interacciones químicas inducidas por el proceso de reticulación. Los espectros se registraron en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27 empleando modo ATR o transmitancia, con 20 barridos por muestra en el intervalo de 500-4000 cm^{-1} .

El análisis comparativo entre el quitosano puro, las microesferas control y las microesferas compuestas permitió evidenciar la formación de enlaces tipo imina ($\text{C}=\text{N}$), característicos de la reacción de bases de Schiff entre los grupos amino del quitosano y el glutaraldehído. Asimismo, se observaron variaciones en las bandas asociadas a los grupos amida y silanol, las cuales se atribuyen a interacciones intermoleculares entre la matriz polimérica y el biovidrio incorporado, reflejando cambios en la organización química del sistema tras el proceso de microencapsulación.

3.7.2. Difracción de rayos X (DRX)

La estructura y el grado de cristalinidad de las microesferas se evaluaron mediante difracción de rayos X, analizando microesferas de quitosano puro y microesferas compuestas. Las mediciones se realizaron en un difractómetro Rigaku, modelo Ultima IV, con geometría Bragg-Brentano y radiación CuK_α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), en un rango de 2θ de 10° a 70° , con paso de 0.02° , tiempo de conteo de 2 s y condiciones de operación de 40 kV y 40 mA.

Se evaluó particularmente la atenuación del pico característico del quitosano alrededor de $2\theta \approx 20^\circ$, como indicativo de la disminución de su cristalinidad original. Este comportamiento se asocia a la reticulación química y a la incorporación del refuerzo cerámico, procesos que interfieren con el empaquetamiento regular de las cadenas poliméricas.

3.7.3. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La morfología, topografía superficial e integridad estructural de las microesferas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido, utilizando un microscopio JEOL JSM-7600F operado a 15 kV. Previo al análisis, las muestras se recubrieron con una capa conductora de iones de Cu.

Las micrografías obtenidas permitieron evaluar la esfericidad, homogeneidad y presencia de porosidad superficial, características directamente relacionadas con el mecanismo de liberación del fármaco.

3.7.4. Potencial Zeta

La carga superficial y la estabilidad electrostática de las microesferas se evaluaron mediante la medición del potencial Zeta. Las muestras se dispersaron en agua desionizada a pH neutro y se analizaron utilizando un equipo Litesizer™ 500 (Anton Paar), el cual permite la determinación simultánea del potencial Zeta y del tamaño hidrodinámico por dispersión de luz dinámica (DLS).

La medición del potencial Zeta se empleó como un indicador de la estabilidad coloidal de las microesferas en suspensión, así como para evaluar el efecto de la incorporación del biovidrio sobre la carga superficial del sistema [54, 55]. La conservación de valores positivos de potencial Zeta resulta particularmente relevante debido al carácter policationico del quitosano, favoreciendo la interacción electrostática con superficies biológicas cargadas negativamente y respaldando su potencial aplicación en sistemas de liberación controlada [1, 11].

3.8. Procedimientos analíticos y cálculos de eficiencia

Con el fin de evaluar la eficiencia global del proceso de síntesis, así como la capacidad de carga del sistema microparticulado, se realizaron cálculos gravimétricos y

espectrofotométricos siguiendo metodologías ampliamente reportadas para sistemas poliméricos de liberación controlada de fármacos.

3.8.1. Rendimiento de producción

De acuerdo con lo descrito en la sección anterior, el rendimiento del proceso se determinó de manera gravimétrica a partir de la relación entre la masa de microesferas recuperadas tras las etapas de purificación y secado y la masa total teórica de los componentes sólidos incorporados inicialmente a la formulación, según la Ecuación 3.1.

$$R(\%) = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad (3.1)$$

Donde R corresponde al porcentaje de rendimiento, M_f es la masa final de microesferas secas obtenidas y M_i representa la masa total inicial de los componentes sólidos (quitosano, fármaco y biovidrio).

Este parámetro permite evaluar las pérdidas de material asociadas a la emulsificación, reticulación y procesos de lavado [15, 16].

3.8.2. Determinación del contenido de humedad

Considerando el carácter hidrofílico del quitosano, se determinó el contenido de humedad residual presente en las microesferas. Para este análisis, una masa conocida de muestra previamente purificada se pesó inicialmente (W_i) y posteriormente se sometió a secado en estufa de vacío o en desecador a 37 °C durante 24 h, o hasta alcanzar peso constante (W_f). El porcentaje de humedad residual (H) se calculó de acuerdo con la Ecuación 3.2.

$$H(\%) = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad (3.2)$$

Este análisis permitió asegurar la reproducibilidad de los ensayos posteriores y descartar variaciones asociadas a agua retenida en la matriz polimérica [4, 11].

3.8.3. Eficiencia de encapsulación del fármaco

La eficiencia de encapsulación se determinó como la fracción de fármaco retenido dentro de la matriz de las microesferas en relación con la cantidad teórica incorporada durante el proceso de síntesis.

Para la extracción del fármaco, se dispersaron 10 mg de microesferas cargadas en 10 mL de buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4). La suspensión se mantuvo bajo agitación constante a 37 °C, con el fin de favorecer la liberación del acetaminofén hacia el medio.

El sobrenadante obtenido se analizó mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando un equipo NanoDrop One C, determinando la concentración del fármaco a su longitud de onda máxima de absorción ($\lambda_{\text{máx.}} = 243 \text{ nm}$) a partir de una curva de calibración previamente construida [7, 48].

La eficiencia de encapsulación se calculó de acuerdo con la Ecuación 3.3 correspondiente.

$$EE(\%) = \frac{M_{\text{encapsulada}}}{M_{\text{teórica}}} \times 100 \quad (3.3)$$

Donde $M_{\text{encapsulada}}$ corresponde a la masa de fármaco determinada experimentalmente y $M_{\text{teórica}}$ a la masa inicial de acetaminofén incorporada a la formulación.

3.8.4. Caracterización de la liberación

La cuantificación del acetaminofén liberado se monitoreó mediante espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 248 nm. Aunque los métodos convencionales se basan en la determinación de la concentración absoluta mediante curvas de calibración lineales, en sistemas con alta carga o liberación rápida (efecto *burst*) las concentraciones en el medio receptor pueden superar el rango lineal del detector y desviarse de la ley de Beer-Lambert.

Para evitar errores asociados a diluciones excesivas, se empleó un análisis normalizado basado en la fracción de liberación (M_t/M_∞), enfoque común para describir mecanismos de transporte difusional o anómalo. En estas condiciones, la comparación entre formulaciones

resulta más confiable utilizando parámetros relativos (como pendientes iniciales o indicadores de supersaturación) en lugar de la masa absoluta liberada.

Bajo este criterio se definió el Índice de Disponibilidad Relativa (IDR) como parámetro de caracterización cinética. El IDR se obtiene normalizando la señal instrumental (absorbancia) respecto a su valor máximo registrado, asumiendo una respuesta monótona del sistema:

$$IDR(\%) = \frac{A_t}{A_{max}} \times 100 \quad (2.2)$$

donde A_t corresponde a la absorbancia medida en el tiempo t y A_{max} al valor máximo registrado durante todo el periodo de evaluación (asíntota de liberación).

Este parámetro adimensional permite comparar la velocidad relativa de liberación entre las distintas formulaciones de microesferas y analizar la estabilidad del perfil de liberación sin depender de la cuantificación absoluta de masa.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización de los biovidrios y de las microesferas compuestas de quitosano/biovidrio obtenidas mediante el método de doble emulsión (S/W/O) y evaporación de solvente. El análisis se estructura de acuerdo con la secuencia experimental seguida durante el desarrollo del trabajo. En primer lugar, se discuten los resultados correspondientes a la obtención de microesferas constituidas únicamente por quitosano, las cuales se utilizaron como sistema base para establecer las condiciones de emulsificación, reticulación y purificación más adecuadas.

Posteriormente, se evalúa el efecto de la incorporación del biovidrio 45S5 sintetizado por dos rutas diferentes, fusión-temple y sol-gel, sobre la formación y estabilidad de las microesferas. Los resultados muestran que el biovidrio obtenido por fusión-temple, caracterizado por un mayor tamaño de partícula, dificultó la estabilidad del sistema de emulsión, limitando la formación de microesferas definidas, incluso cuando se emplearon agentes reticulantes. En contraste, el biovidrio sintetizado por la ruta sol-gel permitió una mejor integración de la fase inorgánica dentro de la matriz polimérica, favoreciendo la obtención de microesferas con morfología más regular y distribución más homogénea del refuerzo cerámico.

Finalmente, se analiza la influencia de la fracción de biovidrio incorporada, del uso de reticulante y de la combinación de tensoactivos empleados sobre la estabilidad del sistema y las propiedades finales de las microesferas. A partir de estos resultados, se discuten las relaciones entre las condiciones de procesamiento, la estructura del sistema y el comportamiento de liberación del acetaminofén, con el fin de identificar las formulaciones que presentan un mejor desempeño dentro del marco del estudio realizado.

4.1 Caracterización fisicoquímica de los biovidrios 45S5 obtenidos por fusión-temple (BG-FT) y sol-gel (BG-SG)

4.1.1 Análisis estructural por difracción de rayos X (DRX)

El análisis de difracción de rayos X (DRX) reveló diferencias estructurales significativas dependientes de la ruta de síntesis y el historial térmico de las muestras (Figura 4.1.).

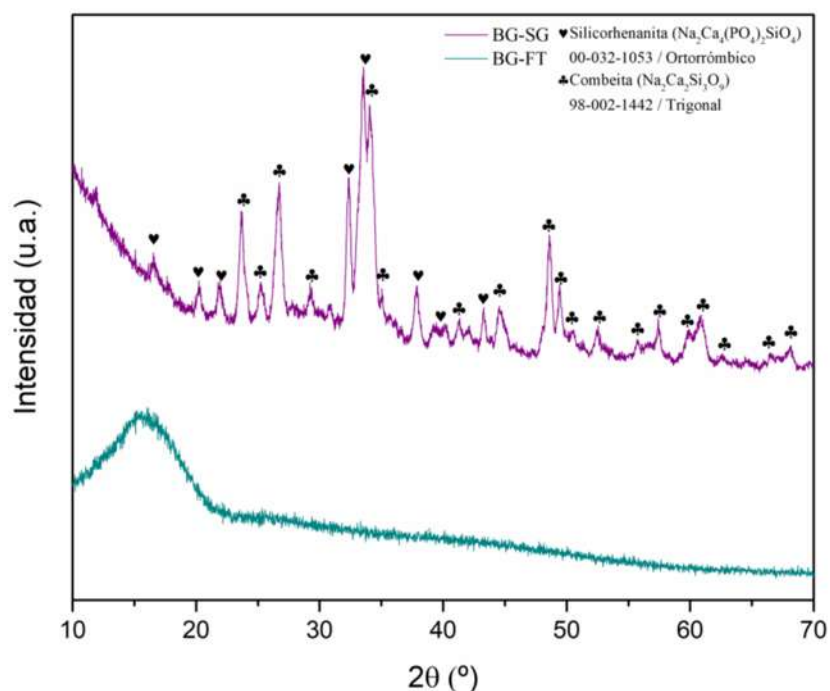


Figura 4.1. Patrones de difracción de rayos X de los biovidrios 45S5 obtenidos por fusión-temple (BG-FT) y sol-gel (BG-SG).

El biovidrio obtenido por fusión y temple (BG-FT) presentó el comportamiento típico de un material amorfo. En el difractograma no aparecieron picos definidos, sino un halo ancho localizado aproximadamente entre $2\theta \approx 15^\circ$ a 30° . Este comportamiento confirma la ausencia de ordenamiento atómico de largo alcance y es consistente con lo reportado por Borden y col. [28], quienes describen este halo como la huella dactilar característica de la red de silicato desordenada del biovidrio 45S5 cuando la velocidad de enfriamiento es suficiente para inhibir la cristalización. La ausencia de fases cristalinas valida la eficacia del temple rápido empleado para "congelar" la estructura líquida desordenada [33].

En contraste, el material sintetizado por la ruta sol-gel y tratado térmicamente a 700°C (BG-SG) mostró un carácter vitrocerámico semicristalino. Sobre el fondo amorfo ($15\text{-}30^\circ$) aparecieron reflexiones agudas (mayor intensidad $32\text{-}34^\circ$), indicando que el tratamiento térmico necesario para eliminar nitratos y residuos orgánicos también aportó la energía requerida para la formación de fases cristalinas. Este fenómeno concuerda con los hallazgos

de Zheng y col. [33] y Cacciotti y col. [5], quienes demostraron que los vidrios derivados de sol-gel poseen una mayor tendencia a la cristalización a temperaturas más bajas (entre 600 y 700 °C) en comparación con sus análogos de fusión, debido a su mayor energía superficial y porosidad intrínseca.

El análisis de fases realizado con el software X'Pert HighScore Plus permitió identificar principalmente fosfosilicatos de sodio y calcio, indexados como silicorhenanita ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$) y combeita ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$), con las tarjetas PDF 00-032-1053 y 98-002-1442, respectivamente. Nawaz y col. [56] confirmaron, mediante difracción de rayos X y refinamiento Rietveld, que la fase mayoritaria corresponde a combeita con estructura cristalina trigonal (grupo espacial $R - 3m$, ICSD #60502); Sugumarán, y Subramaniano [57] determinaron que la fase silicorhenanita, tiene una estructura cristalina ortorrómbica mediante el refinamiento Rietveld, ya que el modelo estructural basado en el grupo espacial minimizó los residuos del ajuste permitiendo indexar con precisión las reflexiones observadas en el rango de 30-35°, obteniendo parámetros de red que son consistentes con la estequiometría de la silicorhenanita reportada en la literatura reciente.

Aunque en la literatura clásica la cristalización del 45S5 suele asociarse con la formación de combeita ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$) o su isomorfo $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ [5, 58], en este caso la presencia predominante de silicorhenanita en este análisis se explica mediante el mecanismo de separación de fases vítreas descrito por Lefèbvre y col. [33]. Según este modelo, durante el calentamiento del sistema 45S5, ocurre una separación espinodal en dos fases inmiscibles amorfas antes de la cristalización principal: una fase rica en sílice y otra rica en fosfato.

4.1.2 Morfología y composición elemental

El análisis conjunto mediante difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido (MEB) permitió establecer que la ruta de síntesis influye directamente tanto en la organización estructural como en la microestructura del biovidrio, diferenciando claramente el estado vítreo obtenido por fusión del estado vitrocerámico derivado del proceso sol-gel.

El carácter del BG-FT mostrado en el difractograma de la Figura 4.1 se confirmó también a nivel morfológico; las micrografías de MEB revelaron partículas compactas, de superficies lisas y con fracturas concoideas, morfología propia de materiales densos obtenidos por fusión. Esta topografía contrasta con la alta rugosidad de los materiales sol-gel y concuerda con las observaciones de Fauré y col. [26], quienes asocian esta textura lisa al proceso de fusión-temple que minimiza la porosidad superficial. El mapeo EDS confirmó una distribución elemental homogénea de Si, Ca, Na y P, validando que la alta temperatura de fusión (1350 °C) permitió la integración completa de los óxidos en una sola fase líquida antes del enfriamiento rápido.

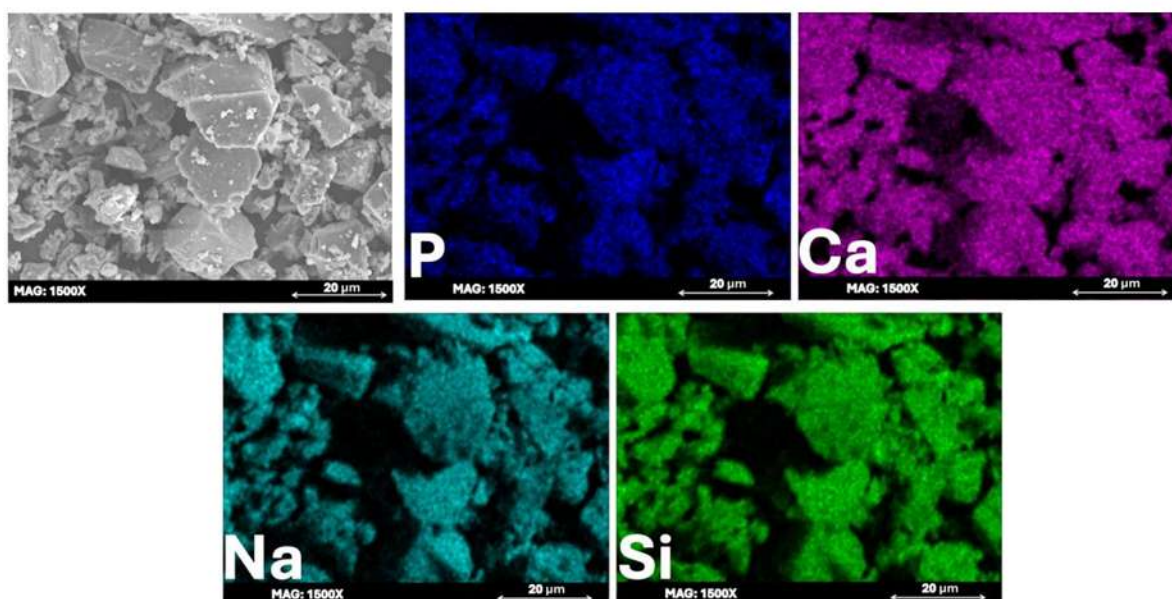


Figura 4.2. Micrografía MEB y mapeo elemental EDS de BG-FT: fósforo (P, azul), calcio (Ca, magenta), sodio (Na, celeste), silicio (Si, verde).

La microestructura observada por MEB respalda el mecanismo de cristalización principal, donde el vidrio experimenta una separación espinodal en dos fases inmiscibles: una rica en sílice y otra rica en fosfato, expuesta por el análisis DRX [33]. A diferencia del material obtenido por fusión, las partículas del BG-SG presentan superficies rugosas y una textura

heterogénea, con regiones enriquecidas en Ca y P detectadas por EDS. Esta morfología es característica de los sistemas sol-gel, donde la eliminación de solventes y la posterior cristalización generan porosidad intrínseca y rugosidad a escala nanométrica. Estas características incrementan el área superficial específica y, en consecuencia, pueden favorecer la bioactividad del material a pesar de su carácter parcialmente cristalino [26, 35].

Bajo esta perspectiva, la formación de un material vitrocerámico con fases de fosfosilicato no debe interpretarse como un defecto de síntesis, sino como una consecuencia termodinámica del tratamiento térmico aplicado, que potencialmente podría contribuir a una mayor solubilidad selectiva del fósforo y, por ende, a una respuesta biológica más activa.

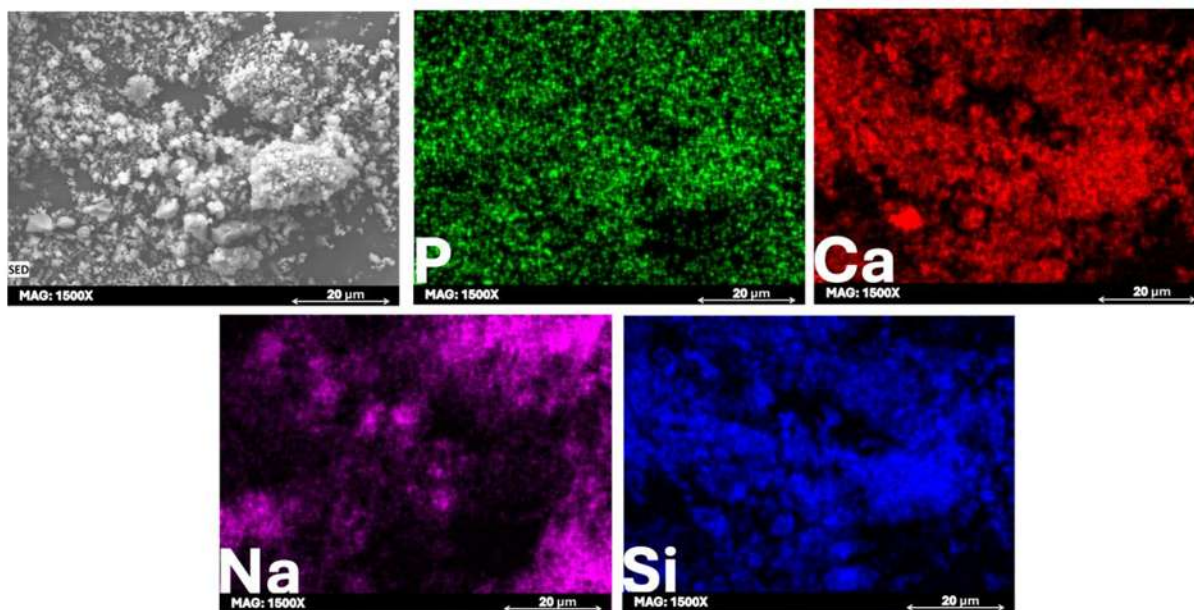


Figura 4.3. Micrografía MEB y mapeo elemental EDS de BG-SG: fósforo (P, verde), calcio (Ca, rojo), sodio (Na, magenta), silicio (Si, azul).

Integrado al análisis de las micrografías, la composición química elemental de los biovidrios sintetizados, expresada en porcentaje en peso de óxidos (Tabla 4.1), fue comparada con la estequiometría teórica del Bioglass® 45S5 estándar (45% SiO_2 , 24.5% CaO , 24.5% Na_2O , 6% P_2O_5), mediante análisis EDS. Los resultados confirman que ambas rutas metodológicas

permitieron la obtención exitosa del sistema cuaternario $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ dentro de rangos composicionales comparables al estándar reportado.

Tabla 4.1. Composición química comparativa (% en peso) entre el valor teórico del Bioglass® 45S5 y los valores experimentales calculados para los biovidrios obtenidos por fusión (BG-FT) y sol-gel (BG-SG).

Óxido	45S5 teórico	BG-FT experimental	BG-SG experimental
SiO₂	45.0	44.21	43.52
Na₂O	24.5	24.12	23.37
CaO	24.5	25.42	27.46
P₂O₅	6.0	6.25	5.65
Total	100.0	100.0	100.0

El material obtenido por fusión y temple (BG-FT) mostró una composición química muy cercana a la fórmula nominal, con desviaciones menores al 4 % para todos los óxidos mayoritarios. La concentración de sílice (44.21 %) y sodio (24.12 %) se mantuvo estable, lo que indica que el protocolo de fusión a 1350 °C permitió integrar adecuadamente los modificadores de red dentro de la matriz de silicato sin pérdidas apreciables por volatilización, fenómeno común en vidrios con alto contenido de álcalis [59]. Esta uniformidad composicional es coherente con la microestructura lisa y densa observada por MEB y respalda la eficacia del enfriamiento rápido para “congelar” la distribución iónica aleatoria del estado fundido, tal como se describe para vidrios comerciales de 45S5 [28].

En cambio, el biovidrio sintetizado por la ruta sol-gel (BG-SG) presentó variaciones composicionales asociadas a la química propia de soluciones y al tratamiento térmico de estabilización. Se observó una ligera disminución en el contenido de Na_2O (23.37 %) respecto al teórico, comportamiento característico de los procesos sol-gel que incluyen etapas de lavado. Durante la formación del gel, los iones Na^+ y Ca^{2+} no se incorporan inicialmente a la red polimérica de sílice y permanecen en el licor de poros como especies solubles, por lo que pueden lixiviarse durante el envejecimiento o eliminarse parcialmente durante la calcinación [30, 38].

De forma simultánea, se detectó un incremento relativo de CaO (27.46 %) y una variabilidad en el contenido de P_2O_5 en los análisis puntuales. Este comportamiento no sugiere un error de síntesis, sino la presencia de heterogeneidad química a escala microscópica. El tratamiento térmico induce una separación de fases previa a la cristalización, generando dominios ricos en sílice y otros enriquecidos en fosfato de calcio [33]. Debido a que el análisis EDS es local, la detección de zonas enriquecidas en Ca y P corresponde a regiones donde se establecen núcleos de cristalización de silicorhenanita dispersos dentro de la matriz vítrea, lo cual concuerda con los resultados de DRX discutidos anteriormente.

En consecuencia, mientras la ruta de fusión conduce a un vidrio químicamente homogéneo a escala global, la ruta sol-gel produce un material heterogéneo a escala microscópica. Esta heterogeneidad no necesariamente representa una desventaja; por el contrario, las regiones ricas en fosfato de calcio pueden actuar como sitios preferenciales para la nucleación de hidroxiapatita en contacto con fluido fisiológico, lo que potencialmente favorece la bioactividad del material.

4.1.3 Análisis FT-IR

La caracterización mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) permitió comprender la conectividad de la red vítrea y confirmar las diferencias estructurales entre el estado amorfo y el estado parcialmente cristalino de los biovidrios obtenidos. La Figura 4.4 compara los espectros del biovidrio obtenido por fusión (BG-FT) y por sol-gel (BG-SG).

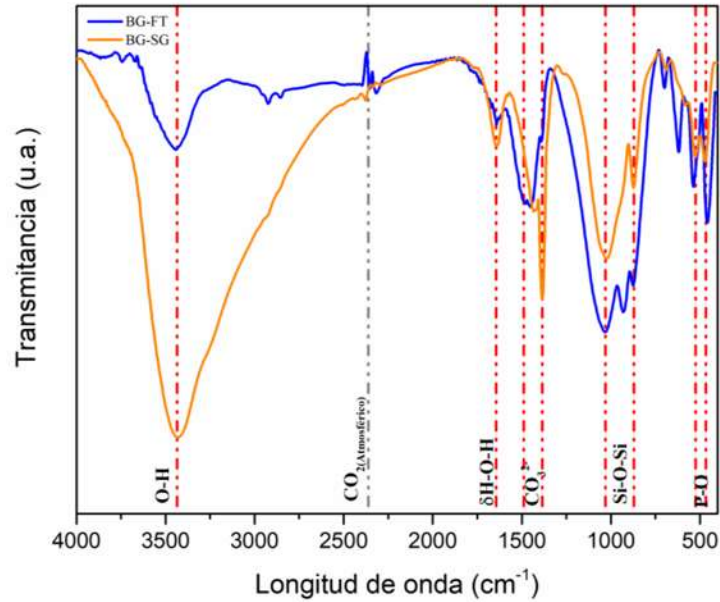


Figura 4.4. Espectros FT-IR de los biovidrios BG-FT y BG-SG. Las líneas punteadas verticales indican las posiciones de las principales bandas vibracionales asociadas a la red de silicato, enlaces fosfato y especies carbonatadas.

De manera general, ambos materiales exhiben el perfil espectral característico de vidrios de fosfosilicato. En la región de alta energía ($3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$) aparece una banda ancha atribuida a las vibraciones de estiramiento de grupos hidroxilo (O–H), tanto libres como interactuando mediante puentes de hidrógeno, acompañada por una banda de deformación alrededor de $1630\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ asociada a moléculas de agua físicamente adsorbidas. La presencia de estas señales confirma la naturaleza hidrofílica de la superficie del biovidrio y su capacidad para interactuar con la humedad ambiental [32].

La estructura del material está dominada por las vibraciones propias de la red de sílice. La banda más intensa, localizada en el intervalo de $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$, corresponde al estiramiento asimétrico de los enlaces Si–O–Si (ν_{as}). Aguiar y col. [33] describen que esta señal resulta de la superposición de modos ópticos transversales (TO) y longitudinales (LO), siendo común observar un hombro hacia $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ asociado al modo TO2.

Un rasgo particularmente relevante para la bioactividad es la presencia de una inflexión en la región de $900\text{-}960\text{ cm}^{-1}$, atribuida al estiramiento de enlaces Si–O con oxígenos no puenteantes (NBO, por sus siglas en inglés *Non-Bridging Oxygens*), es decir, grupos Si–O⁻ compensados por cationes modificadores como Ca²⁺ y Na⁺. Fauré y col. [26] y Zheng y col. [35] señalan que la intensidad de esta banda refleja la interrupción de la red de sílice por dichos cationes, condición esencial para la disolución del vidrio y la posterior liberación iónica. Complementariamente, se observan bandas alrededor de $\sim 800\text{ cm}^{-1}$ (estiramiento simétrico Si–O–Si) y $\sim 460\text{-}480\text{ cm}^{-1}$ (modo de balanceo o *rocking* Si–O–Si), características de la estructura tetraédrica del silicato amorfo.

Aunque ambos materiales comparten la misma red base de silicato, el análisis detallado revela diferencias claras asociadas a la ruta de síntesis.

En el biovidrio obtenido por fusión (BG-FT), el espectro presenta bandas amplias y poco definidas, especialmente en la región de $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$. Este ensanchamiento es típico de un estado vítreo amorfo, donde existe una amplia distribución de longitudes de enlace y ángulos estructurales. Asimismo, en la región de $500\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ no se observa desdoblamiento de señales, sino únicamente una banda ancha difusa. Esto indica que los grupos fosfato (PO₄³⁻) se encuentran en forma de ortofosfatos aislados dispersos homogéneamente dentro de la matriz de silicato, sin organización cristalina, en concordancia con la ausencia de picos en los difractogramas de DRX.

En contraste, el material sol-gel calcinado a $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BG-SG) presenta rasgos propios de un material vitrocerámico. El cambio más evidente es la aparición de un doblete bien definido entre $560\text{ y }605\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la vibración de flexión O–P–O en fosfatos cristalinos. Zheng y col. [35] y Cacciotti y col. [5] asocian inequívocamente este desdoblamiento con la formación de fases ricas en fósforo, como silicorhenanita o apatitas, lo cual respalda los resultados obtenidos por DRX.

Este comportamiento puede explicarse mediante el mecanismo de separación de fases descrito por Lefèvre y col. [33]. Durante el tratamiento térmico, el sistema 45S5 experimenta una separación espinodal en regiones ricas en sílice y regiones ricas en fosfato. La fase fosfatada cristaliza de manera independiente, generando modos vibracionales más

ordenados detectables en el infrarrojo, mientras que la matriz de silicato conserva su carácter mayoritariamente vítreo.

Adicionalmente, el espectro del BG-SG presenta bandas intensas entre 1400 y 1550 cm^{-1} y una señal definida alrededor de 875 cm^{-1} , correspondientes a modos de estiramiento y flexión de grupos carbonato (CO_3^{2-}). Chen y col. [38] y Cacciotti y col. [5] reportan que los vidrios obtenidos por sol-gel son especialmente susceptibles a la carbonatación atmosférica debido a su alta área superficial y porosidad residual. En estas condiciones, los iones Ca^{2+} y Na^{+} superficiales reaccionan con el CO_2 ambiental formando carbonatos, fenómeno mucho menos evidente en el vidrio fundido (BG-FT), cuya superficie es más lisa y densa.

4.1.4 Distribución granulométrica y estabilidad coloidal

El tamaño de partícula y la carga superficial influyen directamente en el comportamiento de los vidrios bioactivos, ya que condicionan tanto su velocidad de disolución como la estabilidad de la dispersión. Como señalan Jones [36] y Doostmohammadi y col. [54], la disminución del tamaño de partícula aumenta el área superficial disponible y, con ello, la reactividad del material al exponer un mayor número de grupos funcionales al medio. A su vez, la carga superficial desempeña un papel importante en las interacciones electrostáticas con la matriz polimérica, ayudando a evitar la aglomeración de las partículas y favoreciendo una distribución más homogénea dentro del sistema compuesto [30, 54].

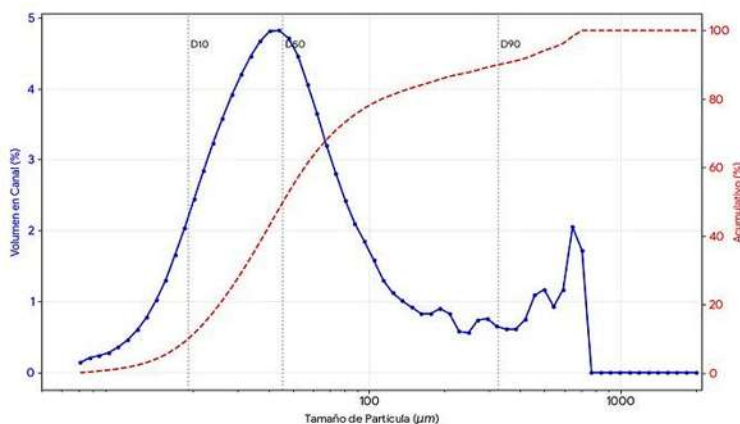


Figura 4.5. Distribución volumétrica de tamaño de partícula del biovidrio BG-FT.

El diámetro medio ($D_{50} = 45.61 \mu\text{m}$) se encuentra dentro del rango micrométrico esperado para este tipo de materiales. No obstante, se identificó una fracción de partículas de mayor tamaño, reflejada en un valor de $D_{90} = 327.4 \mu\text{m}$, así como una población minoritaria con tamaños superiores a $500 \mu\text{m}$. Esta distribución sugiere la presencia de fragmentos vítreos que no se fracturaron completamente durante la molienda, un comportamiento común en vidrios de silicato debido a su fractura concoidea.

De acuerdo con Borden y col. [28] y Luz y Mano [30], la fractura mecánica del vidrio fundido ocurre de manera esencialmente aleatoria, originando partículas de morfología irregular, tipo astilla, caracterizadas por superficies planas y bordes angulares. La marcada polidispersidad observada en la Figura 4.5, donde coexisten fracciones finas y gruesas, es propia de este enfoque *top-down*, en el que el control de la uniformidad dimensional resulta limitado sin la aplicación de etapas exhaustivas de clasificación granulométrica.

Esta heterogeneidad implica además un comportamiento químico no uniforme: las partículas de menor tamaño presentan mayor área superficial específica y reaccionan con mayor rapidez, pudiendo generar incrementos iniciales de pH, mientras que las fracciones más gruesas se degradan de forma más lenta y sostenida. En conjunto, el sistema tiende a mostrar una respuesta reactiva escalonada asociada a la distribución de tamaños de partícula.

En contraste con el material obtenido por fusión, la muestra BG-SG presentó una distribución monomodal centrada en el intervalo de 2 a $3 \mu\text{m}$ según el análisis por DLS (Figura 4.6). Aunque este tamaño es menor al observado tras la molienda del BG-FT, el carácter micrométrico no implica partículas individuales, sino la presencia de aglomerados secundarios formados por unidades primarias de escala nanométrica. Este comportamiento es coherente con lo reportado por Chen y col. [38], que observaron un comportamiento similar en biovidrios 45S5 derivados de sol-gel, donde las partículas primarias submicrónicas tienden a formar clústeres de entre 4.5 y $5.8 \mu\text{m}$ debido a la elevada energía superficial y la presencia de grupos silanol interactuantes.

Así, aun cuando existe aglomeración, ésta no elimina la principal característica del método sol-gel: la formación del material a partir de precursores moleculares. Como consecuencia, los aglomerados mantienen una estructura interna porosa y un área superficial específica

mayor que la de los polvos densos obtenidos por fusión, lo cual resulta determinante para su mayor reactividad [36].

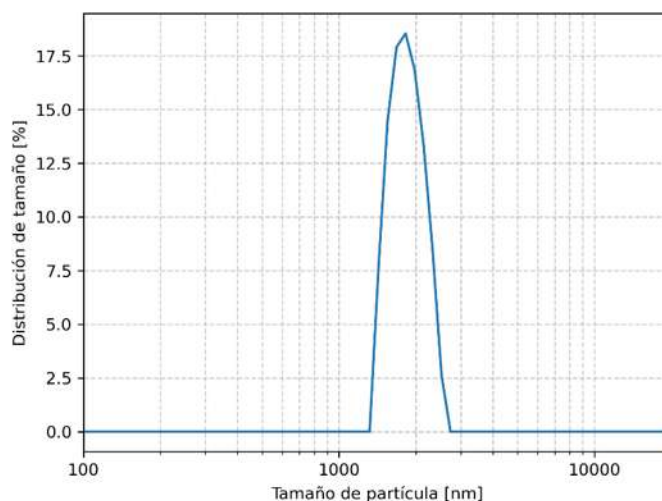


Figura 4.6. Distribución de tamaño hidrodinámico obtenida por DLS para el biovidrio BG-SG.

La reducción en el tamaño de partícula sugiere un aumento del área superficial específica del material, lo cual puede favorecer su interacción inicial con medios acuosos, en comparación con el biovidrio obtenido por fusión.

La medición del potencial Zeta del biovidrio BG-SG (Figura 4.7) mostró un valor medio de -16.1 mV a pH neutro. Este resultado permite interpretar directamente el comportamiento del material en suspensión.

De acuerdo con la clasificación de estabilidad coloidal propuesta por Hanaor y col. [51] y Doostmohammadi y col. [54], valores de entre -10 y -30 mV corresponden a una zona de estabilidad moderada o incipiente. En este intervalo, la repulsión electrostática entre partículas no logra contrarrestar por completo las fuerzas atractivas de Van der Waals. Esto explica que el tamaño obtenido por DLS (2-3 μm) sea mayor que el observado individualmente por MEB: las partículas no permanecen totalmente dispersas, sino que tienden a asociarse formando flóculos blandos o aglomerados reversibles en medio acuoso.

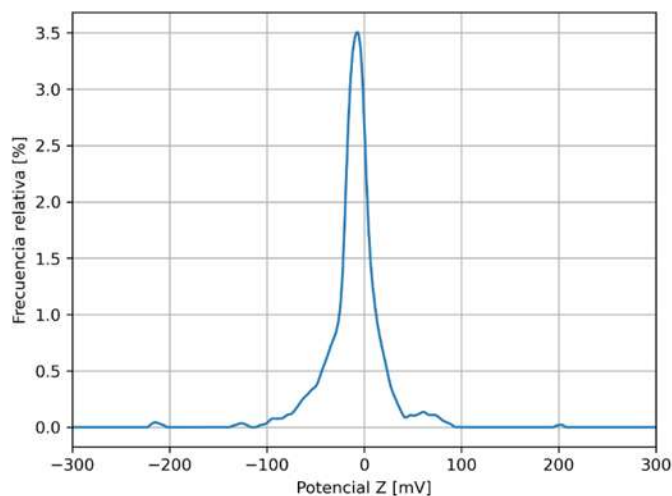
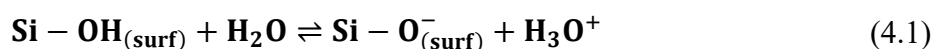


Figura 4.7. Distribución de Potencial Zeta para la dispersión de BG-SG en medio acuoso.

El carácter negativo del potencial Zeta se asocia a la desprotonación de los grupos silanol (Si-OH) presentes en la superficie del biovidrio cuando este se encuentra en medio acuoso. En medio acuoso a $\text{pH} > 2$ (punto isoeléctrico de la sílice), ocurre la desprotonación de estos grupos, dando lugar a especies cargadas negativamente (Si-O^-) y a la formación de iones hidronio [51], de acuerdo con el equilibrio ácido-base descrito en la Ecuación (4.1):



Este resultado es consistente con el análisis por FT-IR, donde la muestra BG-SG mostró una mayor intensidad de las bandas asociadas a grupos O-H.

Lejos de representar una desventaja, el potencial Zeta negativo resulta favorable para aplicaciones de regeneración ósea. Como señalan Doostmohammadi y col. [54], superficies con carga negativa cercana a -16 mV facilitan la atracción electrostática de iones calcio (Ca^{2+}) presentes en el medio fisiológico, actuando como el paso inicial para la nucleación de fosfato de calcio amorfo y su posterior transformación a hidroxiapatita. Asimismo, se ha reportado que las superficies negativamente cargadas favorecen la adhesión y proliferación de osteoblastos en mayor medida que superficies neutras o positivas.

En conjunto, el valor de -16.1 mV indica que el BG-SG presenta una superficie activa rica en grupos silanol desprotonados. Aunque esta carga limita la estabilidad coloidal y favorece la formación de aglomerados micrométricos (observados por DLS), también promueve la interacción iónica temprana con el medio biológico.

4.2 Evaluación del biovidrio obtenido por fusión-temple (BG-FT) en la formación de microesferas

La incorporación del biovidrio obtenido por fusión y temple (BG-FT) en la matriz de quitosano generó alteraciones reológicas evidentes durante la emulsificación (S/W)/O. El análisis por microscopía electrónica de barrido permitió distinguir dos comportamientos estructurales claramente dependientes de la presencia de glutaraldehído como agente reticulante.

4.2.1. Análisis morfológico (MEB): evidencia de inestabilidad de la emulsión

Cuando se añadió glutaraldehído (GTA), la morfología esférica desapareció por completo y el sistema formó una estructura polimérica continua, compacta y amorfa, semejante a un aglomerado (Figura 4.8A). Este resultado no corresponde a un fallo experimental, sino a una consecuencia directa de la cinética de reacción. La interacción entre los grupos aldehído del glutaraldehído y los grupos amino ($-NH_2$) del quitosano ocurre de manera muy rápida [60]; al introducir el reticulante durante la emulsificación, la velocidad de formación de la red tridimensional supera a la velocidad de estabilización interfacial proporcionada por el tensoactivo. En términos prácticos, la fase dispersa aumenta súbitamente su viscosidad y las fuerzas de cizalla dejan de ser suficientes para fragmentarla en gotas individuales.

En sistemas de microencapsulación Agnihotri y col. [1] y Sinha y col. [11] han reportado que una solidificación demasiado temprana o un aumento rápido de viscosidad previo a la evaporación del solvente favorece la fusión de gotas vecinas antes de que adopten su forma esférica, fenómeno descrito como coalescencia. En estas condiciones, el biovidrio queda atrapado dentro de agregados amorfos en lugar de microesferas independientes. Aunque el

Thakkar y Murthy [48] reportaron que el glutaraldehído puede favorecer la formación de redes densas y partículas más pequeñas en matrices puramente poliméricas, también se ha señalado que concentraciones elevadas o una reticulación descontrolada afectan negativamente la morfología final.

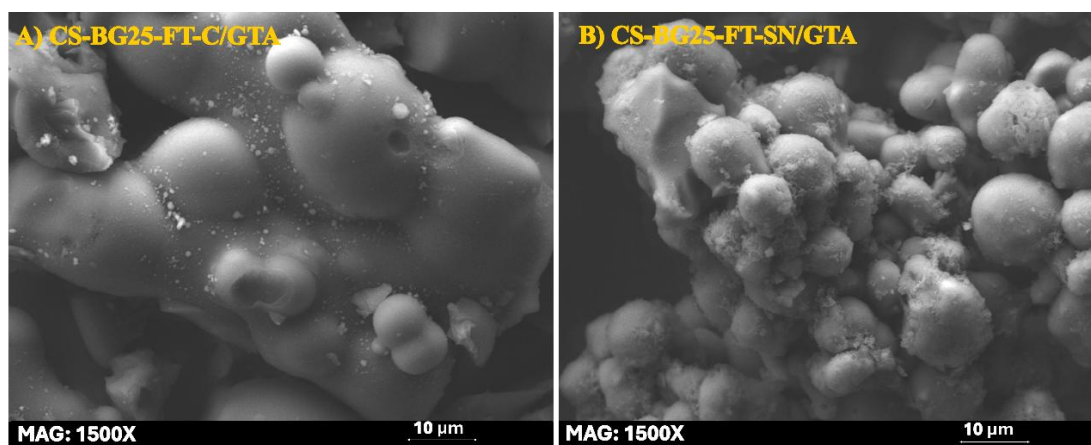


Figura 4.8. Micrografías MEB comparativas del efecto del reticulante en el sistema con 25% de biovidrio (fusión-temple): (A) sistema con glutaraldehído (CS-BG25-FT-C/GTA); (B) sistema sin reticulante (CS-BG25-FT-SN/GTA).

En el sistema compuesto evaluado, la presencia de partículas sólidas de BG-FT probablemente intensifica este efecto, ya que actúan como sitios de heterogeneidad dentro de la fase dispersa y favorecen la gelificación localizada del quitosano. En conjunto, los resultados indican que la reticulación química ocurrió a una velocidad mayor que la estabilización interfacial de la emulsión.

Al eliminar el glutaraldehído del sistema (Figura 4.8B) se recuperó la formación de estructuras esféricas reconocibles, lo que indica que la emulsificación S/W/O puede sostenerse mediante estabilización física. Sin embargo, las microesferas presentaron superficies altamente irregulares, rugosas y con tendencia a la aglomeración.

La morfología obtenida puede explicarse considerando la interacción entre la matriz polimérica flexible y la fase inorgánica rígida. El biovidrio obtenido por fusión y molienda

(BG-FT) presenta partículas angulosas tipo *shard-like*, con aristas definidas y superficies de fractura planas, lo cual dificulta su empaquetamiento dentro de la matriz. Borden y col. [28] demostraron que esta geometría irregular impide un empaquetamiento eficiente debido a que las esferas mantienen un espaciado uniforme y las partículas irregulares tienden a generar patrones de empaquetamiento más densos y variables.

Durante la evaporación del solvente, el quitosano sufre una contracción volumétrica asociada a la reorganización de sus cadenas. A diferencia del polímero, las partículas de biovidrio no presentan deformación apreciable; por ello, la matriz tiende a colapsar localmente alrededor de las aristas rígidas del relleno, generando irregularidades superficiales. Este comportamiento ha sido descrito por Dias y col. [42] en sistemas análogos de alginato/vidrio; dado que las partículas de vidrio rígidas no se contraen, la matriz polimérica colapsa sobre las aristas del vidrio inorgánico durante el secado, generando una morfología superficial rugosa e irregular.

Aunque el surfactante (Span 80) permite estabilizar la interfase durante la formación inicial de la emulsión [11], la ausencia de una red reticulada permanente deja a la matriz susceptible a deformaciones durante el secado, Li y col. [13] observaron un fenómeno similar en membranas compuestas, donde las partículas de vidrio generaron asperezas distribuidas en la superficie de la matriz de quitosano. Además, la movilidad residual del polímero facilita la aproximación entre partículas, favoreciendo la aglomeración por efectos capilares y fuerzas de Van der Waals una vez eliminado el solvente.

Concluyendo, que la comparación de ambos sistemas evidencia un equilibrio entre estabilidad química y estabilidad física durante la formación de microesferas híbridas con BG-FT. En presencia de glutaraldehído, la reticulación ocurre de manera temprana y rigidiza la fase dispersa antes de la estabilización de las gotas, favoreciendo la coalescencia. En ausencia del reticulante, la emulsión puede formarse, pero la estabilización física resulta insuficiente para contrarrestar la contracción del polímero alrededor de partículas rígidas e irregulares, originando partículas deformadas y aglomeradas.

En conjunto, estos resultados indican que la morfología y tamaño del relleno inorgánico influyen de manera determinante en la estabilidad interfacial del sistema. Esto justifica la

necesidad de emplear biovidrios de tamaño más fino y morfología más homogénea, como los obtenidos por ruta sol-gel, con el fin de favorecer una dispersión uniforme y la formación de microesferas bien definidas.

4.2.2 Efecto de la carga de biovidrio en la morfología (Sistema sin reticulante)

Tras descartar el uso de glutaraldehído debido a la gelificación prematura observada, se evaluó la capacidad de la matriz de quitosano para estabilizar físicamente las microesferas en función del contenido de carga inorgánica. Para ello se prepararon formulaciones con 25 %, 50 % y 75 % p/p de biovidrio obtenido por fusión-temple (BG-FT).

La evolución morfológica observada en la Figura 4.9 muestra cambios progresivos en la integridad estructural de las partículas conforme aumenta la fracción de sólidos incorporada. A menores contenidos de biovidrio aún se identifican microesferas discretas, mientras que al incrementar la carga aparecen deformaciones y estructuras aglomeradas. Estos resultados permiten identificar un límite práctico de carga para este sistema, a partir del cual la matriz polimérica pierde su capacidad de mantener la forma esférica durante el proceso de emulsificación y secado.

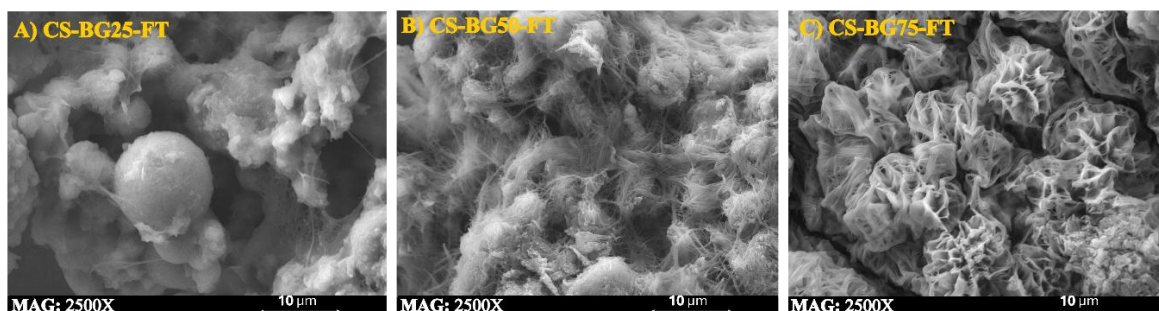


Figura 4.9. Evolución morfológica de las microesferas de CS-BG-FT (sin reticulante) en función del porcentaje de carga cerámica: (A) 25% BG, (B) 50% BG y (C) 75% BG.

Los resultados evidencian una pérdida progresiva de la integridad estructural conforme aumenta la carga inorgánica:

La formulación con 25% de biovidrio (Figura 4.9., A) permitió conservar una geometría esférica relativamente definida. En esta proporción, la cantidad de quitosano aún es suficiente para recubrir completamente las partículas de vidrio, funcionando como una fase continua que amortigua las fuerzas de cizalla generadas durante la emulsificación.

Este comportamiento coincide con lo reportado por Ravarian y col. [18], quienes establecieron que en compuestos quitosano/biovidrio, concentraciones de carga moderadas ($< 40\%$) permiten mantener una estructura homogénea y evitan la fragilidad excesiva del material. En estas condiciones el quitosano actúa como una especie de “jaula” viscoelástica que sostiene la gota y soporta la tensión superficial durante la evaporación del solvente, mecanismo coherente con la teoría de estabilización de emulsiones descrita por Sáez y col. [39].

Al incrementar la carga al 50% se pierde la esfericidad y aparecen estructuras alargadas e irregulares con apariencia fibrosa (Figura 4.9B). Esta transición morfológica puede explicarse por dos fenómenos reportados anteriormente en la literatura.

Primero, la contracción volumétrica diferencial. Dias y col. [42] y Costa y Dias [61] demostraron que al aumentar la fracción inorgánica en matrices biopoliméricas como alginato o quitosano, la contracción durante el secado se vuelve mucho más considerable. Al existir menor cantidad de polímero ocupando el volumen intersticial, la matriz colapsa sobre las partículas rígidas de vidrio, generando superficies deformadas y altamente rugosas.

El segundo factor es la interferencia reológica. He y col. [59] señalan que altas cargas de sólidos incrementan la viscosidad del sistema y modifican la reología del *feedstock*. En este caso, las partículas irregulares del BG-FT dificultan la ruptura adecuada de la gota durante la emulsificación, provocando que el polímero se estire en lugar de formar gotas esféricas estables, lo que explica la morfología fibrosa observada. De forma similar, Li y col. [13] reportaron que la incorporación de biovidrio en matrices de quitosano genera asperezas y aumenta la rugosidad superficial debido a la distribución heterogénea de la carga.

Cuando la concentración se incrementa al 75% (Figura 4.9C), el sistema deja de formar partículas discretas y evoluciona hacia estructuras laminares organizadas, lo que sugiere un proceso de sedimentación severa o incluso inversión de fase.

Este comportamiento indica que la matriz polimérica ya no es capaz de mantener la cohesión del sistema. Ben-Arfa y col. [27] explican que distribuciones de partículas amplias y de gran tamaño (características del BG-FT molido) tienden a sedimentar rápidamente si la viscosidad del medio no es suficiente para mantenerlas suspendidas. Además, Borden y col. [28] señalan que las partículas tipo “astilla” obtenidas por fusión presentan un empaquetamiento poco eficiente en comparación con partículas esféricas, dificultando la formación de microesferas compactas.

A este nivel de carga ocurre además un fenómeno de percolación: las partículas de vidrio entran en contacto directo entre sí, rompiendo la continuidad de la película de quitosano. Como consecuencia, la microesfera se desintegra en agregados laminares, un tipo de segregación de fases que Ravarian y col. [18] predicen cuando se supera el volumen crítico de carga.

En conjunto, los resultados indican que el BG-FT introduce inestabilidad en la emulsión S/W/O cuando la carga supera el 25 %, principalmente por su morfología irregular, su densidad relativamente alta y su amplia distribución de tamaño. Estas características favorecen la ruptura de la película polimérica y la sedimentación gravitacional antes de que la microesfera pueda consolidarse.

Por ello, para obtener microesferas con alto contenido cerámico y una morfología controlada, se consideró necesario sustituir el material de relleno por un biovidrio sintetizado por la ruta sol-gel (BG-SG). De acuerdo con Luz y Mano [30] y con Zheng y col. [35], las partículas sol-gel presentan tamaños nano o submicrométricos y una mayor área superficial, lo que facilita su dispersión homogénea dentro de la matriz polimérica y mejora la interacción interfacial mediante grupos silanol, evitando el colapso estructural observado con el vidrio fundido.

4.3 Caracterización estructural de microesferas con biovidrio sol-gel (BG-SG)

Con base en la inestabilidad previamente observada, el sistema se reformuló sustituyendo la carga inorgánica por biovidrio sintetizado vía sol-gel (BG-SG). Esta modificación se apoyó

en las propiedades texturales características de estos materiales: como señalan Jones [36] y He y col. [59], los biovidrios sol-gel presentan una porosidad intrínseca, un área superficial específica hasta dos órdenes de magnitud mayor que la de los vidrios obtenidos por fusión y, además, un tamaño de partícula submicrométrico que favorece su dispersión dentro de matrices poliméricas.

Bajo estas nuevas condiciones morfológicas se reintrodujo el glutaraldehído (2 % v/v) como agente reticulante con el fin de mejorar la estabilidad mecánica, en concordancia con lo reportado por Thakkar y Murthy [48] para sistemas coloidales de naturaleza proteica. La hipótesis de trabajo plantea que la elevada densidad de grupos silanol (Si-OH) residuales en la superficie del BG-SG, característica reportada por Aguiar y col. [32], incrementa la afinidad química con los grupos amino del quitosano.

De acuerdo con lo descrito para nanocompuestos por Ravarian y col. [18] y por Luz y Mano [30], esta interacción interfacial más íntima permite que las partículas de vidrio funcionen como puntos de anclaje o nodos de reticulación física, modulando la cinética de reacción con el glutaraldehído. Como consecuencia, se esperaría evitar la coalescencia macroscópica y el colapso estructural observados previamente en los sistemas cargados con partículas densas obtenidas por fusión.

4.3.1 Análisis morfológico y distribución elemental (MEB-EDS)

El análisis mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) permitió correlacionar el incremento en la carga de biovidrio sol-gel (BG-SG) con la evolución topográfica y la estabilidad estructural de las microesferas. La Figura 4.10. presenta las micrografías representativas y los mapas de distribución elemental (EDS) para las formulaciones con 25 %, 50 % y 75 % p/p de carga.

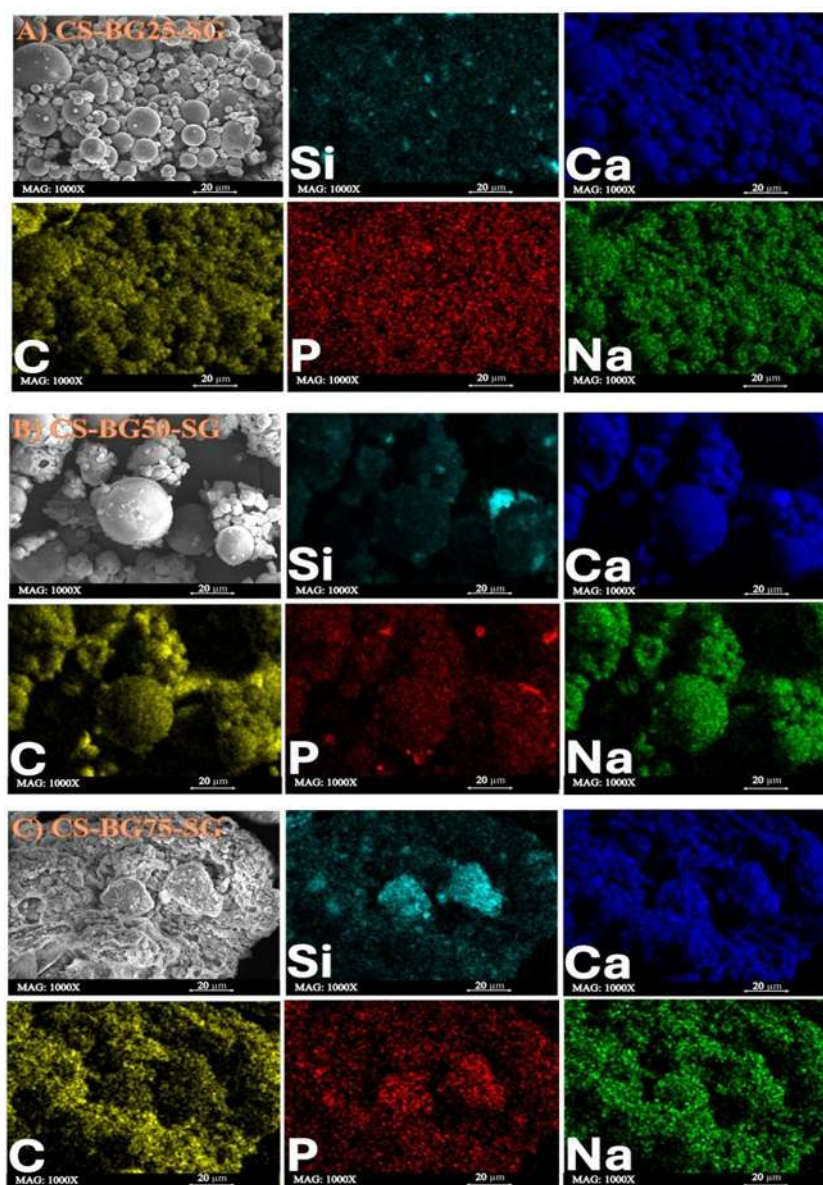


Figura 4.10. Caracterización morfológica y elemental de microesferas de quitosano/biovidrio sol-gel (CS-BG-SG) reticuladas con GTA (2% v/v) con diferentes porcentajes de carga cerámica: (A) 25 %, (B) 50 % y (C) 75 %.

En la formulación CS-BG25-SG (Figura 4.10A) se observó predominancia de microesferas con geometría esférica bien definida, superficie lisa y una distribución de tamaños relativamente homogénea. La integridad estructural indica que, a esta proporción, la cantidad

de quitosano fue suficiente para encapsular completamente las partículas nanométricas de biovidrio, actuando como una fase continua que recubre y estabiliza la carga inorgánica.

La presencia ocasional de partículas adheridas a la superficie corresponde a un fenómeno típico de emulsificación; Sinha y col. [11] lo atribuyen a procesos de nucleación secundaria o colisión de gotas antes de la solidificación total. Además, la superficie lisa sugiere que durante el secado predominó la tensión superficial de la fase polimérica, preservando la esfericidad, comportamiento similar al descrito en microesferas de quitosano puro reportadas por Xiangxiang y col. [41].

Al aumentar la carga al 50 % (CS-BG50-SG, Figura 4.10B) la esfericidad global aún se conserva; sin embargo, la superficie presenta una rugosidad notable y una textura heterogénea. Este cambio topográfico puede explicarse mediante el fenómeno de contracción volumétrica diferencial descrito por Costa y Dias [61] y por Dias y col. [42] en sistemas híbridos polisacárido/vidrio. Durante la evaporación del solvente, la matriz de quitosano sufre una contracción significativa, mientras que las partículas rígidas de biovidrio mantienen su dimensión. Al disminuir la relación polímero/vidrio, la matriz colapsa parcialmente sobre la carga cerámica, originando una superficie porosa, donde las asperezas corresponden a partículas de vidrio recubiertas por una película polimérica cada vez más delgada. Los mapas EDS respaldan este mecanismo: se observan zonas con mayor intensidad de calcio (Ca) y fósforo (P), lo que indica que las partículas cerámicas se encuentran muy próximas a la superficie o parcialmente expuestas debido al adelgazamiento de la capa polimérica [13].

En la formulación con 75% de biovidrio (CS-BG75-SG, Figura 4.10., C) la morfología esférica se pierde por completo, obteniéndose estructuras compactas, aglomeradas e irregulares. Este comportamiento evidencia que el sistema superó su capacidad crítica de carga. De acuerdo con He y col. [56], una alta concentración de sólidos incrementa la viscosidad y favorece el contacto directo partícula-partícula (percolación), impidiendo la formación de una fase polimérica continua. Un efecto equivalente fue reportado por Dias y col. [42] en microesferas de alginato con 75 % de vidrio, donde la insuficiencia de matriz para rellenar los intersticios provocó la desestabilización de las gotas de emulsión y una coalescencia irreversible, generando aglomerados densos incapaces de conservar la forma esférica tras el secado.

A pesar de las variaciones morfológicas, el análisis elemental (recuadros en Figura 4.10) confirma la naturaleza híbrida del sistema en todas las formulaciones. La detección simultánea de carbono, asociado a la matriz de quitosano, junto con silicio, calcio, sodio y fósforo (correspondientes a la fase inorgánica) indica que no ocurrió segregación macroscópica durante el mezclado.

No obstante, el incremento progresivo en la intensidad de las señales inorgánicas (Si, Ca y P) se correlaciona directamente con la disminución del volumen polimérico disponible para la encapsulación, tendencia también observada por Li y col. [13] en membranas compuestas multifuncionales.

4.3.2 Confirmación cristalográfica (DRX) e integridad química (FT-IR)

Aunque la microscopía electrónica confirmó la incorporación morfológica del refuerzo, resulta necesario verificar si la estructura cristalina del biovidrio sol-gel se conserva tras las condiciones de procesamiento ácido y, al mismo tiempo, evidenciar la naturaleza de su interacción con la matriz de quitosano. Con este propósito, se integraron los análisis de difracción de rayos X (DRX) y espectroscopía infrarroja (FT-IR).

El difractograma de las microesferas compuestas (CS-BG-SG) se presenta en la Figura 4.11. Como referencia, el patrón del quitosano puro exhibe únicamente un halo amplio centrado en $2\theta \approx 20^\circ$, característico de su naturaleza polimérica semicristalina o amorfa. En contraste, las microesferas compuestas muestran reflexiones cristalinas agudas superpuestas a este halo polimérico, confirmando la presencia de una segunda fase.

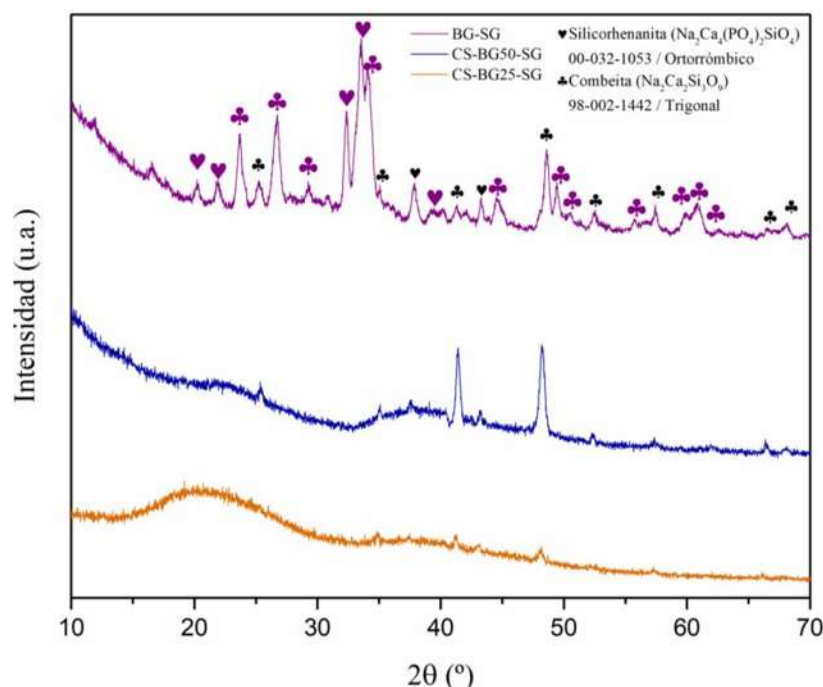


Figura 4.11. Patrones de difracción de rayos X (DRX) comparativos del biovidrio sol-gel y las microesferas sintetizadas con cargas del 25% y 50% en peso de BG, mostrando la correspondencia de las fases cristalinas.

Se identificaron picos de difracción principales en 26° , 35° , 38° , 41° , 44° , 49° , 57° , 66° y 69° . El análisis de indexación indica que estas reflexiones corresponden mayoritariamente a las fases silicorhenanita ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$) y combeita ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$). Como se mencionó anteriormente, la aparición de fases complejas de fosfosilicato como la Silicorhenanita en este estudio resulta coherente con la termodinámica propia de los sistemas sol-gel descrita por Lefèbvre y col. [33]. De acuerdo con estos autores, durante el tratamiento térmico el vidrio sufre una separación de fases, generándose dominios ricos en sílice y dominios ricos en fosfato. La fracción rica en fosfato tiende a cristalizar de manera independiente, formando Silicorhenanita alrededor de 800°C , o incluso a temperaturas menores cuando existen humedad residual o precursores acuosos, funcionando además como sitio de nucleación heterogénea.

La detección de estas fases cristalinas después del proceso de emulsificación confirma que la estructura del biovidrio resistió la exposición al medio ácido acético empleado para la

solubilización del quitosano. Este resultado valida la estabilidad química de la fase cerámica tratada térmicamente a 700 °C y demuestra su incorporación efectiva dentro de la matriz polimérica, lo cual representa uno de los retos habituales en la obtención de compósitos híbridos [61].

De manera complementaria a los análisis morfológicos y estructurales se utilizó la espectroscopía FT-IR con el objetivo de examinar la integridad química de los componentes después del proceso de microencapsulación. La Figura 4.12 muestra los espectros comparativos correspondientes al quitosano puro (CS), al biovidrio sintetizado mediante sol-gel (BG-SG) y a las microesferas compuestas.

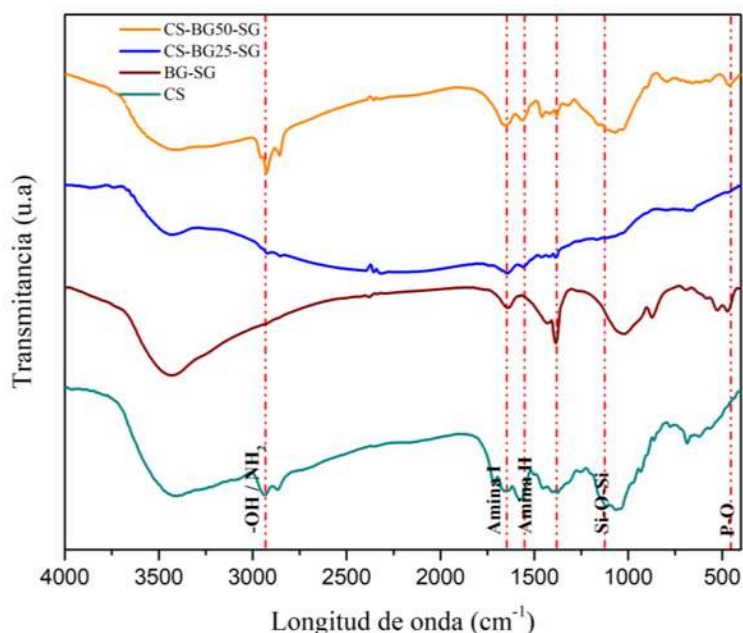


Figura 4.12. Espectros FT-IR del quitosano (CS), del biovidrio sol-gel (BG-SG) y de las microesferas compuestas CS-BG25-SG y CS-BG50-SG. Las líneas punteadas resaltan las bandas relevantes asociadas a la interacción polímero-cerámico.

En primer lugar, la matriz de quitosano conservó sus señales características reportadas por Sánchez Cepeda y col. [62], observándose la vibración de estiramiento del grupo carbonilo (Amida I) cercana a 1650 cm^{-1} y la flexión N-H (Amida II) alrededor de 1590 cm^{-1} .

Por su parte, en la fase inorgánica se identificaron las vibraciones fundamentales de la red de sílice descritas por Aguiar y col. [32], particularmente el estiramiento asimétrico Si-O-Si en la región de 1000-1100 cm^{-1} y el modo de balanceo (*rocking*) cercano a 460 cm^{-1} .

Al comparar los espectros de las microesferas con los materiales de partida se observaron modificaciones sutiles pero consistentes, principalmente en la banda ancha comprendida entre 3000 y 3600 cm^{-1} , asociada a la superposición de grupos hidroxilo (O-H) y amino (N-H), la cual presentó un ligero ensanchamiento y desplazamiento. Este comportamiento, de acuerdo con Costa y Dias [61] y Ravarian y col. [18], no corresponde a la formación de nuevos enlaces covalentes fuertes, sino que es compatible con la generación de enlaces de hidrógeno entre los grupos silanol (Si-OH) presentes en la superficie del biovidrio sol-gel y los grupos amino e hidroxilo de la cadena de quitosano.

La ausencia de desplazamientos significativos en las bandas de amida indica que no ocurrió una reacción química destructiva entre ambas fases [62]. Por el contrario, estas interacciones físicas resultan favorables, ya que incrementan la cohesión estructural de la microesfera y explican la adecuada integridad morfológica observada en las formulaciones con 25 % y 50 % de carga, sin comprometer la bioactividad potencial asociada a los grupos silanol superficiales.

4.3.3 Caracterización de tamaño de partícula y potencial Zeta de las microesferas control (CS-Control) y las microesferas híbridas (CS-BG%-SG)

Posterior a la evaluación morfológica y estructural, se analizó el comportamiento coloidal de las microesferas mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Debido a que el tamaño real de las partículas ($> 10 \mu\text{m}$ observado por MEB) se encuentra fuera del intervalo óptimo de precisión de la técnica, los valores de tamaño obtenidos no deben interpretarse como el diámetro físico real, sino como una estimación del radio hidrodinámico de la fracción efectivamente suspendida. Este enfoque es consistente con lo señalado por Desai y Park [7] al estudiar microesferas hinchables bajo limitaciones similares de medición. En este contexto, el principal aporte del análisis no es la distribución de tamaño en sí, sino el

Potencial Zeta, el cual proporciona información cualitativa esencial sobre la química superficial y la estabilidad electrostática del sistema.

La Figura 4.13 muestra la distribución de tamaño y el potencial Zeta de las microesferas de quitosano sin carga inorgánica. Se obtuvo un tamaño hidrodinámico entre 10 y 22 μm y un potencial Zeta promedio de -8.8 mV.

Resulta particularmente relevante que el quitosano presente un potencial negativo, considerando que se trata de un polímero intrínsecamente catiónico debido a la presencia de grupos amino protonables ($-\text{NH}_3^+$). Este comportamiento se explica por las modificaciones químicas inducidas durante la síntesis.

En primer lugar, la reacción de reticulación con glutaraldehído consume grupos amino libres del quitosano. El mecanismo ocurre mediante un ataque nucleofílico de los grupos $-\text{NH}_2$ sobre los grupos aldehído del reticulante, formando enlaces imina covalentes ($-\text{N}=\text{C}$), también conocidos como bases de Schiff. Monteiro y Airolidi [60] demostraron que este proceso reduce de forma significativa la densidad de grupos disponibles para la protonación, disminuyendo así la carga positiva del polímero.

Adicionalmente, la presencia residual de surfactantes no iónicos (Span 80) adsorbidos en la interfase contribuye a enmascarar la carga superficial. Sinha y col. [11] reportaron que estos compuestos modifican las propiedades electrocinéticas al apantallar la carga efectiva del polímero.

Finalmente, el pH de medición desempeña un papel determinante. A pH neutro, la mayoría de los grupos amino remanentes se encuentran desprotonados, por lo que predominan las contribuciones de los grupos hidroxilo y residuos de acetilo. Como consecuencia, la superficie adquiere una carga neta ligeramente negativa o cercana a la neutralidad, comportamiento que coincide con lo observado por Xiangxiang y col. [41] en sistemas de quitosano químicamente modificado.

El valor de -8.8 mV ubica al sistema dentro de la región de inestabilidad coloidal ($-30 \text{ mV} < \text{p.Z.} < +30 \text{ mV}$) según la clasificación de Hanaor y col. [51], lo que explica la rápida sedimentación y la marcada tendencia a la aglomeración observada experimentalmente.

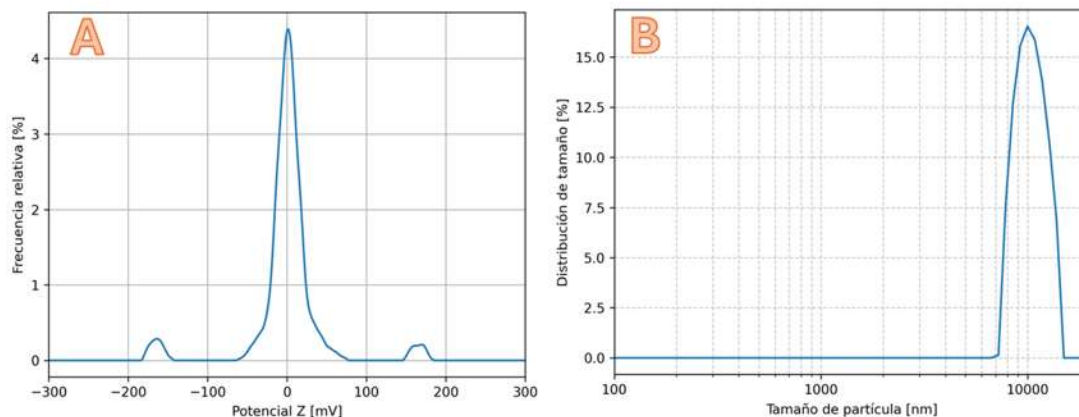


Figura 4.13. Distribución de tamaño y potencial Zeta de las microesferas de quitosano (CS).

La incorporación de 25% de biovidrio sol-gel (Figura 4.14.) desplazó el tamaño hidrodinámico estimado hacia el intervalo de 18-30 μm y modificó el potencial Zeta a un valor más negativo de -9.8 mV.

Este cambio confirma la exposición parcial de la fase inorgánica en la superficie de la microesfera. Doostmohammadi y col. [54] demostraron que las nanopartículas de biovidrio sol-gel presentan un potencial Zeta negativo cercano a -16 mV a pH fisiológico debido a la disociación de los grupos silanol superficiales:



Por ello, el desplazamiento hacia valores más negativos tras la incorporación del biovidrio indica que los grupos silanol del material cerámico participan activamente en la electrocinética del sistema.

Asimismo, el hecho de que el potencial Zeta del sistema híbrido sea intermedio entre el del quitosano puro (-8.8 mV) y el del biovidrio puro (más negativo) sugiere que el polímero recubre parcialmente las partículas de vidrio sin bloquear completamente su superficie.

Permanecen, por tanto, suficientes grupos silanol expuestos para influir en la carga superficial global. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Luz y Mano [30], quienes establecen que en materiales híbridos la magnitud del potencial Zeta depende del balance de cargas presente en la capa difusa externa.

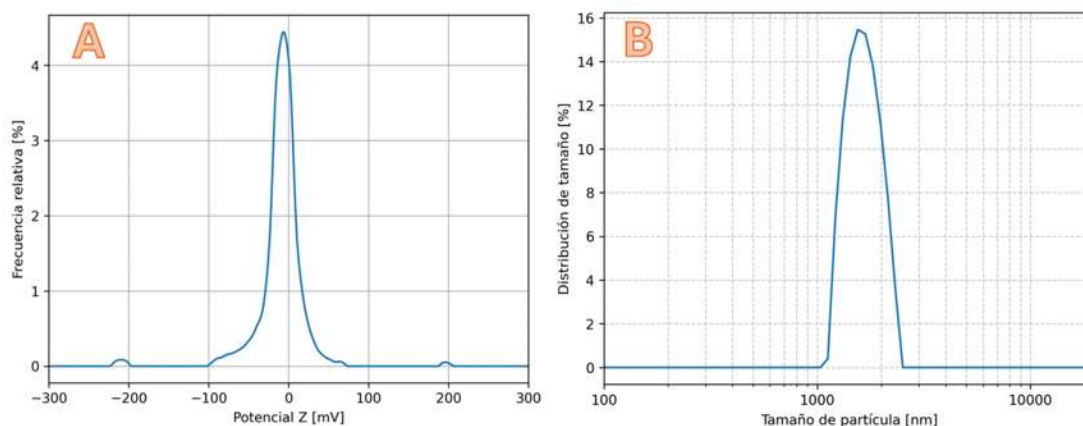


Figura 4.14. Distribución de tamaño y potencial Zeta de las microesferas CS-BG25-SG.

Los resultados correspondientes a la formulación con 50% de biovidrio (CS-BG50-SG) se presentan en la Figura 4.15. El tamaño de partícula estimado mediante DLS se ubicó entre 7 y 16 μm . A primera vista, este intervalo parecería indicar una reducción respecto a las formulaciones con menor contenido de carga; sin embargo, esta disminución no corresponde necesariamente a una reducción real del diámetro de las microesferas, sino a una limitación propia de la técnica.

Como señalan Desai y Park [7], el DLS es más confiable para suspensiones coloidales estables de tamaño submicrométrico. En sistemas con alta fracción inorgánica (50 % p/p), la densidad de las partículas aumenta considerablemente, lo que provoca que las fracciones de mayor tamaño ($> 20 \mu\text{m}$) sedimenten rápidamente antes o incluso durante la medición. Por ello, los valores obtenidos deben interpretarse únicamente como representativos de la fracción hidrodinámicamente estable en suspensión y no del tamaño promedio real del polvo seco observado por microscopía.

El potencial Zeta alcanzó -10.7 mV, el valor más negativo de toda la serie experimental. Este desplazamiento confirma que, al incrementar la cantidad de biovidrio, la química superficial del sistema deja de estar dominada por el quitosano y pasa a regirse progresivamente por la fase inorgánica. La superficie de la microesfera adquiere entonces un comportamiento cercano al del biovidrio sol-gel puro. Doostmohammadi y col. [54] reportaron que nanopartículas de biovidrio bioactivo (63S) presentan potenciales cercanos a -16.18 mV a pH fisiológico (7.4), atribuidos a la disociación de los grupos silanol superficiales ($\text{Si-OH} \rightarrow \text{Si-O}^- + \text{H}^+$). El cambio observado, desde -8.8 mV en el quitosano puro hasta -10.7 mV en CS-BG50-SG, indica que una mayor densidad de estos grupos silanol queda expuesta en la superficie, superando el efecto de los grupos amino residuales del polímero.

Adicionalmente, se registró una conductividad del medio cercana a 15 mS/cm. Este incremento no puede atribuirse únicamente a la dispersión de partículas, sino que constituye evidencia directa de la reactividad superficial del material. De acuerdo con el mecanismo de disolución de vidrios bioactivos descrito por Hench [25] y revisado por Jones [36], la primera etapa de bioactividad consiste en un intercambio iónico rápido en el cual cationes modificadores de red, principalmente Na^+ y Ca^{2+} , son liberados desde la estructura vítrea hacia el medio acuoso y reemplazados por protones. Este flujo de iones explica el aumento de la fuerza iónica de la solución y representa el paso inicial para la formación de la capa de gel de sílice y la posterior nucleación de hidroxiapatita.

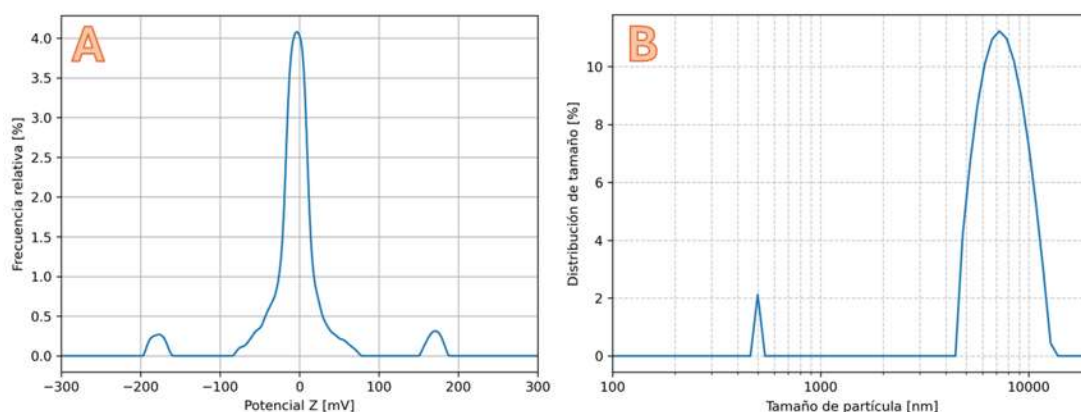


Figura 4.15. Distribución de tamaño y potencial Zeta de las microesferas CS-BG50-SG.

4.3.4 Evaluación de la eficiencia del proceso y propiedades fisicoquímicas

Con el fin de evaluar la viabilidad del método de síntesis (S/W/O), se analizaron el rendimiento de producción y el contenido de humedad residual de las microesferas obtenidas. Ambos parámetros permiten valorar, desde un punto de vista práctico, la eficiencia de la técnica de doble emulsión y la respuesta de la matriz polimérica frente al proceso de secado, aspectos clave para su manejo, almacenamiento y posible aplicación posterior.

4.3.4.1 Rendimiento de producción

El rendimiento porcentual (R%) se determinó por vía gravimétrica, comparando la masa final de microesferas secas recuperadas (M_f) con la masa teórica inicial de los componentes sólidos empleados (M_i). Los resultados se resumen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Datos del rendimiento de producción de las microesferas control (CS) y compuestas (CS-BG%-SG)

Formulación	M_i (g)	M_f (g)	Rendimiento (%)
CS (Control)	0.28560	0.14860	52.03
CS-BG25-SG	0.34320	0.18097	52.73
CS-BG50-SG	0.48630	0.36339	74.73

El análisis del rendimiento de producción, expresado como recuperación de masa, permitió valorar la viabilidad técnica del método de emulsificación cuando se trabaja con sistemas de alta carga sólida. Los resultados mostraron que la eficiencia del proceso depende directamente de la formulación.

En las microesferas de quitosano puro (CS) y en el compuesto con 25 % de biovidrio (CS-BG25-SG) se obtuvieron rendimientos moderados, cercanos al 52%. Aunque Sinha y col. [11] proponen rendimientos ideales mayores al 85 %, valores cercanos al 50-60% son habituales en procesos de emulsión-evaporación de solvente a escala de laboratorio. Badis y col. [15] atribuyen estas pérdidas principalmente a dos mecanismos: la adhesión del polímero

a las paredes del reactor y a las aspas de agitación (*sticking*) y la pérdida de micropartículas muy finas ($< 1 \mu\text{m}$) durante las etapas de lavado por filtración o centrifugación. En formulaciones con baja carga inorgánica la densidad de las partículas es menor, lo que dificulta su sedimentación completa y favorece la migración de la fracción más fina hacia el sobrenadante, incrementando la pérdida de material.

Al aumentar la carga inorgánica al 50% (CS-BG50-SG), el rendimiento se incrementó de manera notable hasta 74.73 %. Este comportamiento no se relaciona con una saturación del sistema, sino con un cambio en la naturaleza física de las microesferas. Hariyadi y col. [16] observaron que al aumentar la densidad de la matriz o el grado de reticulación se facilita la precipitación y recuperación de las partículas durante el lavado. En este caso, la incorporación de biovidrio generó núcleos más densos y pesados, lo que promovió una sedimentación más rápida y redujo la pérdida de partículas finas que sí ocurría en el quitosano puro.

Sin embargo, el rendimiento no alcanzó valores cercanos al 100 %. Las pérdidas restantes, cercanas al 25 %, pueden explicarse por la capacidad crítica de carga del sistema. Como señalan Boccaccini y col. [14] y Badis y col. [15], cuando la fracción cerámica es elevada, parte del material inorgánico no logra quedar completamente encapsulado si la cantidad de polímero resulta insuficiente para humectar toda la superficie del vidrio. Ese biovidrio libre se elimina durante los lavados, lo que impide alcanzar rendimientos teóricos y además es consistente con la rugosidad superficial observada por MEB.

En conjunto, el método de doble emulsión permitió recuperar la mayor parte del material sólido y evidenció un efecto positivo de la carga inorgánica sobre el rendimiento gravimétrico, el cual aumentó aproximadamente de 52 % a 74 %. Este comportamiento se asocia principalmente al incremento de densidad de las partículas compuestas, que facilita su sedimentación y recolección durante el proceso.

4.3.4.2 Determinación del contenido de humedad residual

El contenido de humedad residual se evaluó a partir de la pérdida de masa tras un secado exhaustivo, ya que este parámetro influye directamente en la estabilidad del material, su

capacidad de hinchamiento y su comportamiento frente a procesos de degradación o liberación de fármacos. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Contenido de humedad residual de las microesferas tras secado

Formulación	W_i (g)	W_f (g)	Humedad residual (%)
CS (Blanco)	0.17093	0.14864	13.04
CS-BG25-SG	0.24288	0.18097	25.49
CS-BG50-SG	0.39540	0.36339	8.10

El contenido de humedad permitió evaluar indirectamente la capacidad de hidratación y la accesibilidad estructural de la matriz híbrida. Las microesferas de quitosano puro presentaron un valor intermedio de humedad (13.04 %), comportamiento coherente con la naturaleza hidrofílica del biopolímero. Los grupos amino ($-\text{NH}_2$) e hidroxilo ($\text{O}-\text{H}$) del quitosano favorecen la retención de agua tanto físicamente adsorbida como químicamente ligada mediante puentes de hidrógeno dentro de la red tridimensional, fenómeno ampliamente descrito por Berger y col. [4] y Laredo-Alcalá y col. [63].

La incorporación de biovidrio sol-gel modificó notablemente este comportamiento. La formulación con 25 % de carga (CS-BG25-SG) mostró el mayor contenido de humedad de la serie (25.49 %), resultado que, en principio, podría parecer contradictorio al añadir una fase inorgánica. Sin embargo, este aumento se explica por las propiedades texturales características del biovidrio sintetizado por sol-gel. Li y col. [37] y Aguiar y col. [32] señalan que estos materiales poseen una estructura mesoporosa intrínseca y áreas superficiales extremadamente elevadas ($200\text{-}600\text{ m}^2/\text{g}$), muy superiores a las de los vidrios fundidos. La gran superficie interna contiene abundantes grupos silanol ($\text{Si}-\text{OH}$) y agua molecular adsorbida en los nanoporos, difícil de eliminar mediante secado convencional. En consecuencia, la reducción de la fracción polimérica, que normalmente retiene agua, es compensada e incluso superada por la capacidad higroscópica del gel de sílice incorporado, fenómeno también observado por Costa y Dias [61] en híbridos de alginato/vidrio.

Cuando la carga aumentó al 50 % (CS-BG50-SG), el contenido de humedad descendió hasta 8.10 %, el valor más bajo registrado. Este comportamiento se relaciona con una restricción volumétrica progresiva de la matriz. Ravarian y col. [18] demostraron que, en matrices de quitosano con contenidos de biovidrio superiores al 40 %, la capacidad de hinchamiento disminuye notablemente debido al efecto de bloqueo estérico generado por la fase cerámica. La elevada densidad de partículas rígidas restringe la movilidad de las cadenas poliméricas, limita su relajación estructural y reduce el volumen libre disponible para alojar moléculas de agua.

El análisis conjunto de humedad y comportamiento estructural indica que la formulación CS-BG25-SG constituye el punto de equilibrio del sistema. Aunque presenta mayor retención de agua, esta característica resulta favorable desde el punto de vista bioactivo, ya que el agua adsorbida en los poros del vidrio sol-gel facilita el intercambio iónico inicial necesario para la formación de apatita. A diferencia de la formulación con 50 % de carga, que mostró colapso estructural en MEB y una marcada reducción en la hidratación, la muestra con 25 % conserva la integridad morfológica y, al mismo tiempo, mantiene una superficie altamente reactiva.

4.3.5 Análisis de la carga y comportamiento de liberación del fármaco

La cuantificación de la carga y el perfil de liberación del acetaminofén se realizaron mediante espectrofotometría UV-Vis, empleando un protocolo de inmersión en PBS a pH 7.4 y 37 °C para simular condiciones fisiológicas, metodología consistente con los ensayos de disolución para andamios poliméricos descritos recientemente por Alshammari y col. [64].

Como paso previo a la cuantificación del fármaco, se realizó un barrido espectral entre 190 y 850 nm con el objetivo de identificar la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx.}}$) del acetaminofén en el medio de liberación empleado. Aunque estudios previos, como el de Cui y col. [65], reportan un máximo cercano a 243 nm cuando el fármaco se analiza en PBS, en este trabajo el espectro mostró un desplazamiento del máximo hacia 248 nm.

Este corrimiento batocrómico, de aproximadamente 5 nm, no se asocia a degradación química del acetaminofén. Por el contrario, ha sido previamente documentado. Pyka y col. [53], durante la validación espectrodensitométrica del fármaco, establecieron que bajo determinadas condiciones de matriz el máximo de absorción puede localizarse precisamente en 248 nm. El cambio observado puede explicarse por efectos solvatocrómicos generados por la fuerza iónica del PBS y por la presencia de especies solubles provenientes del sistema quitosano/biovidrio, las cuales modifican ligeramente el entorno electrónico del cromóforo aromático del fármaco. Con base en la coincidencia experimental y el respaldo bibliográfico, se adoptó 248 nm como longitud de onda analítica, ya que proporciona la mayor sensibilidad y precisión para la cuantificación.

El uso de PBS a pH 7.4 no sólo busca simular el fluido extracelular, sino también controlar la estabilidad estructural de la matriz. Desai y Park [7] describen que las microesferas de quitosano se hinchan rápidamente en medios ácidos, mientras que a pH fisiológico conservan su integridad, permitiendo que la liberación esté dominada por difusión a través de la matriz hidratada y no por una desintegración inmediata del sistema.

Los resultados de la eficiencia de encapsulación del acetaminofén no pudieron expresarse como valores cuantitativos absolutos debido a limitaciones instrumentales que impidieron aplicar correctamente la ley de Beer-Lambert. La elevada cantidad de fármaco liberada al medio provocó la saturación del detector UV-Vis, registrándose absorbancias mayores a 2.7 unidades, fuera del rango dinámico lineal del equipo. Por ello, la evaluación se abordó de manera comparativa mediante el Índice de Disponibilidad Relativa (IDR), lo que permitió describir el comportamiento cinético del sistema y evidenciar una elevada retención del principio activo sin depender de la cuantificación absoluta de masa.

4.3.5.1 Evaluación de la eficiencia de encapsulación y limitaciones instrumentales

La eficiencia de encapsulación del acetaminofén se evaluó de manera indirecta a partir de la concentración del fármaco liberado al medio. No obstante, durante las mediciones se

registraron valores de absorbancia consistentemente elevados, superiores a 2.7 unidades, incluso en los primeros tiempos de muestreo.

La curva de calibración construida a concentraciones altas mostró una pendiente negativa ($m = -0.000002$) y un coeficiente de determinación moderado ($R^2 = 0.82$), evidenciando una desviación significativa del comportamiento lineal esperado de acuerdo con la ley de Beer-Lambert. Este resultado indica que las concentraciones de acetaminofén alcanzadas durante los ensayos superaron el rango dinámico lineal del detector del NanoDrop One C, provocando saturación instrumental.

Si bien esta limitación impidió la determinación cuantitativa absoluta de la eficiencia de encapsulación mediante un enfoque espectrofotométrico convencional, los resultados permiten extraer conclusiones cualitativas relevantes. La liberación del fármaco a partir de únicamente 10 mg de microesferas en un volumen reducido de PBS generó soluciones altamente concentradas, lo que sugiere una elevada capacidad de carga del sistema y una liberación inicial intensa del principio activo.

4.3.5.2 Cinética de liberación: índice de disponibilidad relativa (IDR)

Debido a la saturación del detector UV-Vis y a la desviación de la linealidad en la curva de calibración a concentraciones elevadas, el perfil de liberación del acetaminofén no pudo evaluarse de forma fiable mediante porcentaje liberado absoluto. Por ello, la cinética se interpretó mediante el Índice de Disponibilidad Relativa (IDR, %), normalizando cada punto respecto al máximo de absorbancia registrado. Aunque no es el enfoque tradicional, resulta adecuado cuando el sistema genera concentraciones por encima del rango analítico.

Esta aproximación cuenta con respaldo reciente. Niederquell y col. [52] describen este mismo problema en formulaciones basadas en sílice mesoporosa (material funcionalmente análogo al biovidrio sol-gel), donde se producen estados rápidos de supersaturación en el medio de disolución. En tales condiciones, el porcentaje absoluto pierde precisión experimental, por lo que recomiendan evaluar la pendiente inicial de liberación y la capacidad de mantener la

supersaturación. En consecuencia, el uso del IDR permite comparar la intensidad de la liberación inicial aun cuando la cuantificación absoluta no sea fiable.

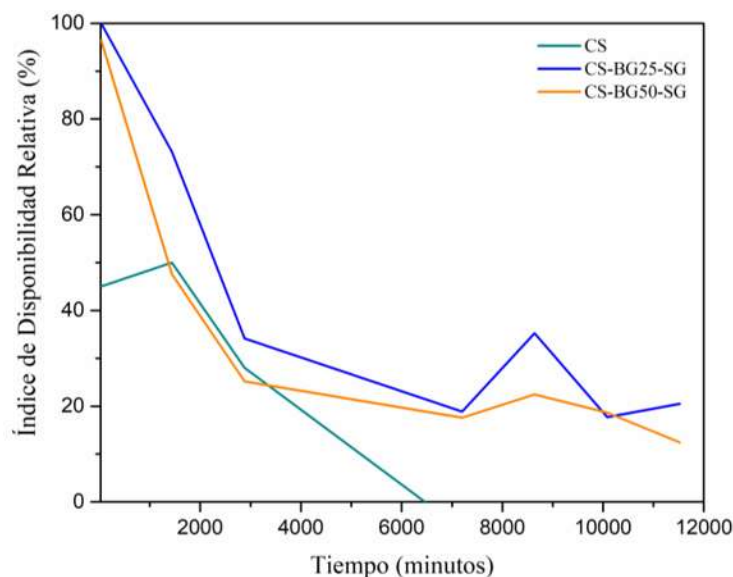


Figura 4.16. Perfil de liberación relativa (IDR) del acetaminofén en PBS a 37 °C.

Las formulaciones híbridas con biovidrio (CS-BG25-SG y CS-BG50-SG) alcanzaron valores cercanos al 100 % del IDR en tiempos cortos ($t < 1500$ min), evidenciando un marcado efecto *burst*. Este comportamiento coincide con lo reportado para microesferas de quitosano, donde la liberación inicial corresponde al fármaco adsorbido en la superficie o localizado en la capa superficial de la matriz [9]. La presencia del biovidrio amplifica el fenómeno: Badis y col. [15] señalan que las cargas sólidas favorecen la cristalización superficial del fármaco y su disolución inmediata. Además, la hidrofiliidad de los grupos silanol del biovidrio sol-gel incrementa la humectabilidad y acelera la penetración del medio acuoso, facilitando la liberación temprana.

En contraste, las microesferas de quitosano puro mostraron un IDR inicial menor (~50%). Este comportamiento corresponde al mecanismo típico de matrices poliméricas: penetración de agua, transición vítreo-gomosa por hinchamiento y posterior difusión del fármaco. Al no existir la porosidad ni el área superficial adicional aportada por el biovidrio, la relajación

macromolecular del quitosano actúa como etapa limitante, generando una liberación más lenta y controlada.

A tiempos prolongados ($t > 2000$ min) se observó una disminución gradual de la absorbancia. Este fenómeno puede explicarse por dos procesos complementarios. Primero, la re-adsorción dinámica: Niederquell y col. [52] reportan que en materiales silíceos mesoporosos parte del fármaco liberado puede volver a fijarse en la superficie activa del soporte. Segundo, la inestabilidad química: Lengyel y col. [10] señalan que ensayos prolongados a pH fisiológico y 37 °C pueden inducir degradación hidrolítica parcial, reduciendo la concentración detectable por UV-Vis.

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

En la discusión se integran los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de los biovidrios y de las microesferas de quitosano, así como del análisis del proceso de microencapsulación y del comportamiento de liberación del acetaminofén. Se analiza la influencia de la ruta de síntesis del biovidrio en su interacción con la matriz polimérica y en la estabilidad del sistema durante la emulsificación, así como su efecto en la formación de microesferas con morfología definida. Los valores de potencial Zeta se interpretan considerando el grado de reticulación del quitosano y la contribución superficial de la fase inorgánica. Finalmente, el perfil de liberación del fármaco se discute en función de las características estructurales y fisicoquímicas del material compuesto, sin atribuirlo a fenómenos que no fueron evaluados experimentalmente. A partir de este análisis, se presentan en el capítulo siguiente las conclusiones generales del estudio.

5.1 Evaluación de los objetivos experimentales

En esta sección se presenta una evaluación comparativa entre los objetivos planteados al inicio del trabajo y los resultados experimentales obtenidos para la formulación seleccionada como óptima (CS-BG25-SG). El análisis se centra en el tamaño de partícula de las microesferas, la eficiencia de encapsulación del acetaminofén y el rendimiento del proceso de microencapsulación, considerando las limitaciones inherentes al sistema y a las técnicas analíticas empleadas.

5.1.1 Tamaño de partícula de las microesferas

En conjunto, las microesferas obtenidas no alcanzaron el rango objetivo de 50-100 μm , presentando tamaños promedio entre 18 y 30 μm ; sin embargo, esta desviación no representa una limitación funcional. Por el contrario, el tamaño cercano a 25 μm , especialmente la formulación optimizada CS-BG25-SG (25 % biovidrio), resulta adecuado para la administración oral, ya que evita una liberación inmediata del fármaco y proporciona mayor superficie específica para la interacción del biovidrio con el medio. La reducción del tamaño

puede explicarse por la alta cizalla durante la emulsificación y la contracción del quitosano durante el secado, fenómeno característico de matrices hidrogel. Por lo tanto, el sistema puede considerarse funcionalmente apropiado aun cuando la meta dimensional no se alcanzó estrictamente.

5.1.2 Eficiencia de encapsulación del acetaminofén

La eficiencia de encapsulación no pudo cuantificarse debido a la saturación del detector UV-Vis (absorbancias > 2.7) y la pérdida de linealidad de la curva de calibración ($R^2 = 0.82$), por lo que el análisis se realizó mediante el Índice de Disponibilidad Relativa (IDR).

El perfil obtenido muestra que las formulaciones con biovidrio (CS-BG25-SG y CS-BG50-SG) alcanzan casi el 100% del IDR en los tiempos iniciales, indicando fármaco superficial con rapidez disponible, y posteriormente descienden hasta valores bajos, sugiriendo un equilibrio entre liberación y re-adsorción en la matriz. En cambio, el quitosano puro inicia alrededor de 45-50% y disminuye de forma continua, consistente con una liberación gobernada por hidratación y difusión.

Así, el sistema sí retiene el acetaminofén y el biovidrio modifica la cinética de liberación; sin embargo, la encapsulación sólo puede establecerse cualitativamente, sin asignar un porcentaje numérico de eficiencia.

5.1.3 Rendimiento del proceso de microencapsulación

El rendimiento de producción se mantuvo dentro del intervalo esperado (60-80%) e incluso alcanzó valores cercanos al límite superior al incrementar la proporción de biovidrio, confirmando la eficiencia del método de doble emulsión con evaporación de solvente. La fase inorgánica favoreció la recuperación de partículas al aumentar su densidad y reducir pérdidas durante los lavados, en comparación con sistemas poliméricos puros. En consecuencia, el proceso no solo cumplió la meta de rendimiento, sino que además mostró

estabilidad operativa y potencial de escalamiento para la obtención reproducible de microesferas cargadas con fármaco.

5.2 Efecto de la ruta de síntesis del biovidrio 45S5

Los resultados experimentales evidencian que la ruta de síntesis del biovidrio 45S5 influye de manera directa en su comportamiento dentro del sistema de microencapsulación. El biovidrio obtenido por fusión y temple presentó un material amorfo de mayor tamaño de partícula y menor reactividad superficial, lo que limitó su interacción con la matriz de quitosano.

Estas características se reflejaron en una baja estabilidad del sistema durante la emulsificación, impidiendo la formación de microesferas definidas, incluso al modificar la presencia de agente reticulante.

En contraste, el biovidrio sintetizado por la ruta sol-gel mostró un tamaño de partícula menor y una superficie más reactiva, asociada a la presencia de grupos silanol. Estas propiedades favorecieron su incorporación dentro de la matriz polimérica y permitieron la formación de microesferas con morfología más homogénea.

5.3 Estabilidad del sistema de microencapsulación

La estabilidad del sistema de doble emulsión estuvo fuertemente condicionada por las propiedades fisicoquímicas del biovidrio y por las condiciones del proceso, incluyendo el uso de agentes reticulantes y tensoactivos. En las formulaciones con biovidrio de fusión, se observaron fenómenos de desestabilización interfacial y colapso estructural, independientemente del uso de reticulante.

Por el contrario, las formulaciones preparadas con biovidrio sol-gel permitieron la formación de microesferas estables hasta una carga del 50 % p/p. Cargas superiores condujeron a la pérdida de integridad del sistema, lo que sugiere la existencia de un límite práctico en la

cantidad de fase inorgánica que puede incorporarse sin comprometer la estabilidad de la emulsión.

5.4 Comportamiento de liberación del acetaminofén

Las microesferas compuestas de quitosano y biovidrio sol-gel mostraron una elevada capacidad para incorporar acetaminofén. El perfil de liberación evidenció una liberación rápida inicial, asociada a la naturaleza hidrofílica del sistema y a la mayor permeabilidad de la matriz en presencia del biovidrio.

En comparación, las microesferas de quitosano puro presentaron un comportamiento de liberación más gradual. La modificación del perfil de liberación observada en los sistemas compuestos se atribuye a cambios estructurales del material y a la interacción entre el fármaco y los componentes del sistema, sin asociarse a fenómenos biológicos no evaluados experimentalmente.

RECOMENDACIONES

Con el fin de mejorar la reproducibilidad del proceso, optimizar la eficiencia de los ensayos y fortalecer la seguridad biológica del sistema, se proponen las siguientes recomendaciones para trabajos futuros relacionados con la obtención y evaluación de las microesferas:

Uso de Cromatografía Líquida (HPLC) para la cuantificación del fármaco

Durante los ensayos de liberación del acetaminofén se observó la saturación de la señal obtenida por espectrofotometría UV-Vis, limitación asociada tanto a la elevada carga del fármaco en las microesferas como a la posible interferencia de productos de degradación presentes en el medio de liberación. Esta condición dificultó la cuantificación precisa de la concentración liberada, particularmente en intervalos de tiempo prolongados, donde la acumulación del analito puede exceder el rango de linealidad establecido por la ley de Beer-Lambert.

En este contexto, resulta pertinente considerar el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como técnica de cuantificación alternativa. El empleo de HPLC permitiría la separación del acetaminofén respecto a posibles productos de degradación térmica o hidrolítica, como el p-aminofenol, asegurando que la señal analítica corresponda al fármaco intacto [65]. Esta aproximación ha sido ampliamente reportada en la literatura para la determinación de acetaminofén en distintas formas farmacéuticas, donde se reconoce al HPLC como un método con mayor especificidad y robustez frente a técnicas espectrofotométricas convencionales [10].

Sustitución de agentes reticulantes por alternativas de menor toxicidad

Aunque el glutaraldehído resultó efectivo para la estabilización estructural de las microesferas, debido a su interacción con los grupos amino del quitosano en sistemas homogéneos, su posible toxicidad residual representa una limitación importante para aplicaciones biomédicas avanzadas. Por esta razón, resulta conveniente evaluar agentes

reticulantes alternativos compatibles con enfoques de química verde, como la genipina, un compuesto de origen natural obtenido del fruto de *Gardenia jasminoides* [4, 11].

En este sentido, la sustitución de reticulantes convencionales por alternativas de baja toxicidad constituye un aspecto clave para mejorar la seguridad biológica de las microesferas y ampliar su viabilidad en futuras investigaciones orientadas a la regeneración de tejidos.

Optimización del método de secado mediante liofilización

El secado al aire utilizado en este trabajo provocó, en algunos casos, contracción y densificación de la matriz polimérica, un comportamiento frecuente en hidrogeles de quitosano asociado a las fuerzas de tensión superficial que se generan durante la evaporación del solvente [2, 4]. En este contexto, se considera recomendable el uso de liofilización como método de secado final de las microesferas. Este procedimiento, basado en la sublimación del solvente previamente congelado, permite preservar la estructura porosa original del hidrogel y reducir el colapso de la red polimérica [19].

La conservación de dicha arquitectura resulta determinante para favorecer la rehidratación del material, la difusión de fluidos y la cinética de liberación del principio activo, aspectos estrechamente vinculados con su desempeño en aplicaciones biomédicas. Asimismo, la obtención de una porosidad interconectada y controlada mediante liofilización contribuye a mejorar la estabilidad del sistema compuesto quitosano/biovidrio en medios fisiológicos [31, 64].

TRABAJO FUTURO

Con el objetivo de dar continuidad a los resultados obtenidos en este trabajo y ampliar el alcance del biomaterial desarrollado, se identifican a continuación algunas líneas de investigación futuras. Estas propuestas se fundamentan tanto en el comportamiento experimental observado como en tendencias recientes reportadas en la literatura especializada, y buscan explorar nuevas aplicaciones del sistema quitosano/biovidrio sintetizado.

Incorporación de microesferas en bio-tintas para impresión 3D

Las microesferas CS-BG-SG desarrolladas en este estudio presentan potencial no solo como sistemas particulados independientes, sino también como fase de refuerzo dentro de formulaciones para bioimpresión. En trabajos recientes se ha reportado el uso de materiales compuestos en impresión 3D con el fin de obtener andamios personalizados con propiedades bioactivas mejoradas [59, 66, 67].

En este contexto, se propone la incorporación de las microesferas en un hidrogel vehicular, como alginato o gelatina, para el desarrollo de bio-tintas compuestas. La presencia del biovidrio permitiría conservar la bioactividad del sistema, mientras que la fase particulada podría contribuir a mejorar la estabilidad estructural y las propiedades mecánicas del andamio impreso. Este enfoque abriría la posibilidad de fabricar estructuras con geometrías controladas y potencial aplicación en defectos óseos de forma personalizada [59, 67].

Redirección del sistema hacia aplicaciones en osteomielitis

El perfil de liberación rápida observado en este trabajo, caracterizado por un efecto inicial pronunciado, puede representar una limitación para aplicaciones de liberación prolongada; sin embargo, este mismo comportamiento resulta atractivo para el tratamiento localizado de infecciones óseas, como la osteomielitis.

Se propone evaluar el sistema como vehículo para la liberación local de antibióticos de amplio espectro, como la vancomicina. Estudios recientes han demostrado que compósitos de quitosano/biovidrio pueden ser eficaces en este tipo de aplicaciones, ya que la liberación inicial del fármaco favorece la eliminación del biofilm bacteriano, mientras que el biovidrio contribuye a la alcalinización del medio, creando condiciones desfavorables para el crecimiento bacteriano y compatibles con la regeneración ósea posterior [13, 64]

Modificación composicional del biovidrio mediante dopaje iónico

Otra estrategia de interés consiste en la modificación del biovidrio 45S5 mediante la incorporación de iones terapéuticos, una línea ampliamente explorada en estudios recientes. En particular, se sugiere la síntesis de biovidrios obtenidos por sol-gel dopados con estroncio (Sr) o magnesio (Mg).

La incorporación de Sr ha mostrado efectos positivos en la regeneración ósea, debido a su capacidad para estimular la actividad osteoblástica e inhibir la resorción ósea mientras que el Mg se ha asociado con una mejor respuesta biológica temprana y una regulación más controlada de la degradación del material [63]. La evaluación de estos biovidrios dopados dentro de la matriz de quitosano permitiría estudiar su impacto sobre la bioactividad y estabilidad del sistema compuesto [68].

Evaluación del comportamiento del sistema en condiciones dinámicas

Finalmente, con el fin de aproximarse de manera más realista al entorno fisiológico, se propone complementar los ensayos de bioactividad realizados en condiciones estáticas mediante estudios en sistemas dinámicos, como biorreactores de perfusión. A diferencia de los ensayos convencionales en medios estáticos, el flujo continuo permite simular de manera más adecuada las condiciones de transporte de fluidos presentes en tejido óseo vascularizado [66].

Este tipo de ensayos permitiría evaluar la estabilidad mecánica de las microesferas bajo condiciones de cizalladura, así como analizar la influencia del flujo sobre la cinética de formación de apatita. La información obtenida contribuiría a una mejor predicción del comportamiento del material en aplicaciones in vivo [66].

REFERENCIAS

- [1] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, y T. M. Aminabhavi, "Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery", *Journal of Controlled Release*, vol. 100, no. 1, pp. 5–28, noviembre 2004, doi: 10.1016/j.jconrel.2004.08.010.
- [2] S. Freitas, H. P. Merkle, y B. Gander, "Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology", *Journal of Controlled Release*, vol. 102, no. 2, pp. 313–332, febrero 2005, doi: 10.1016/j.jconrel.2004.10.015.
- [3] P. B. O'Donnell y J. W. McGinity, "Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 28, no. 1, pp. 25–42, octubre 1997, doi: 10.1016/S0169-409X(97)00049-5.
- [4] J. Berger, M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, N. A. Peppas, y R. Gurny, "Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 57, no. 1, pp. 19–34, enero 2004, doi: 10.1016/s0939-6411(03)00161-9.
- [5] I. Cacciotti, M. Lombardi, A. Bianco, A. Ravaglioli, y L. Montanaro, "Sol–gel derived 45S5 bioglass: synthesis, microstructural evolution and thermal behaviour", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 23, no. 8, pp. 1849–1866, agosto 2012.
- [6] L. L. Hench, "The story of Bioglass®", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 17, no. 11, pp. 967–978, noviembre 2006.
- [7] K. G. H. Desai y H. J. Park, "Preparation and characterization of drug-loaded chitosan–tripolyphosphate microspheres by spray drying", *Drug Development Research*, vol. 64, no. 2, pp. 114–128, febrero 2005.
- [8] M. Iqbal, N. Zafar, H. Fessi, y A. Elaissari, "Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 496, no. 2, pp. 173–190, diciembre 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.057.
- [9] F. Khan, A. Khan, Z. Ur Rahman, y N. Fazal, "Applications of Chitosan Microspheres as Drug Delivery Vehicles", en *Advanced Drug Delivery Systems - Innovations in*

Nanoparticles, Biopolymers, and Natural Extracts, B. Kumar, Ed., Londres: IntechOpen, 2025. doi: 10.5772/intechopen.1010284.

[10] M. Lengyel, N. Kállai-Szabó, V. Antal, A. J. Laki, y I. Antal, "Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery", *Scientia Pharmaceutica*, vol. 87, no. 3, p. 20, septiembre 2019.

[11] V. R. Sinha, A. K. Singla, S. Wadhwa, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, y S. Dhawan, "Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 274, no. 1-2, pp. 1–33, abril 2004.

[12] Y. Yeo y K. Park, "Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems", *Archives of Pharmacal Research*, vol. 27, no. 1, pp. 1–12, enero 2004, doi: 10.1007/BF02980037.

[13] W. Li, Y. Ding, S. Yu, Q. Yao, y A. R. Boccaccini, "Multifunctional chitosan-45S5 bioactive glass-poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microsphere composite membranes for guided tissue/bone regeneration", *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 7, no. 37, pp. 20845–20854, septiembre 2015, doi: 10.1021/acsami.5b06128.

[14] A. R. Boccaccini, M. Erol, W. J. Stark, D. Mohn, Z. Hong, y J. F. Mano, "Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: a review", *Composites Science and Technology*, vol. 70, no. 13, pp. 1764–1776, noviembre 2010.

[15] K. Badis, H. Merine, Y. Ramli, O. Larbi, y C. H. Memou, "Effect of Polymers nature and Stirring Speeds on Physicochemical Properties and the Controlled Release of Allopurinol-loaded Microspheres", *Journal of the Mexican Chemical Society*, vol. 66, no. 1, pp. 17–33, 2022.

[16] D. M. Hariyadi, T. Purwanti, y S. Adilla, "Influence of crosslinker concentration on the characteristics of erythropoietin-alginate microspheres", *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, vol. 6, no. 1, pp. 250–259, enero 2018.

[17] B. N. Singh y K. H. Kim, "Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention", *Journal of Controlled Release*, vol. 63, no. 3, pp. 235–259, febrero 2000, doi: 10.1016/s0168-3659(99)00204-7.

- [18] R. Ravarian, M. Craft, y F. Dehghani, "Enhancing the biological activity of chitosan and controlling the degradation by nanoscale interaction with bioglass", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 103, no. 9, pp. 2898–2908, septiembre 2015, doi: 10.1002/jbm.a.35423.
- [19] M. Biernat, A. Ponizej, A. Andrzejewska, Ł. Ławniczak, A. Zgoła-Grześkowiak, y A. Voelkel, "Porous chitosan/ZnO-doped bioglass composites as carriers of bioactive peptides", *International Journal of Applied Ceramic Technology*, vol. 17, no. 6, pp. 2807–2816, noviembre 2020.
- [20] J. Siepmann y F. Siepmann, "Mathematical modeling of drug delivery", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 364, no. 2, pp. 328–343, diciembre 2008, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.004.
- [21] P. L. Ritger y N. A. Peppas, "A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs", *Journal of Controlled Release*, vol. 5, no. 1, pp. 23–36, junio 1987.
- [22] C. Bunchorntavakul y K. R. Reddy, "Acetaminophen-related hepatotoxicity", *Clinics in Liver Disease*, vol. 17, no. 4, pp. 587–607, noviembre 2013, doi: 10.1016/j.cld.2013.07.005.
- [23] B. Liu, J. Sun, J. Zhao, y X. Yun, "Hybrid graphene and carbon nanotube–reinforced composites: polymer, metal, and ceramic matrices", *Advanced Composites and Hybrid Materials*, vol. 8, no. 1, p. 1, febrero 2025, doi: 10.1007/s42114-024-01074-3.
- [24] J. Silvestre, C. Delattre, P. Michaud, y H. De Baynast, "Optimization of Chitosan Properties with the Aim of a Water Resistant Adhesive Development", *Polymers*, vol. 13, no. 22, p. 4031, noviembre 2021, doi: 10.3390/polym13224031.
- [25] L. L. Hench, "Bioceramics: from concept to clinic", *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 74, no. 7, pp. 1487–1510, julio 1991.
- [26] J. Fauré, R. Drevet, A. Lemelle, N. Ben Jaber, A. Tara, H. El Btaouri, y H. Benhayoune, "A new sol-gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 47, pp. 407–412, febrero 2015.

- [27] B. A. Ben-Arfa y R. C. Pullar, "A comparison of bioactive glass scaffolds fabricated by robocasting from powders made by sol–gel and melt-quenching methods", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, p. 615, 2020.
- [28] M. Borden, L. E. Westerlund, V. Lovric, y W. R. Walsh, "Controlling the bone regeneration properties of bioactive glass: Effect of particle shape and size", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 110, no. 4, pp. 910–922, abril 2022, doi: 10.1002/jbm.b.34971.
- [29] M. C. Ortega, M. F. de Santiago, D. A. Mota, M. de la L. M. González, y A. C. Castillo, "Síntesis y caracterización de vidrio bioactivo 45S5 libre de alcóxidos obtenido por química suave", *Latin American Journal of Applied Engineering*, vol. 6, no. 1, pp. 41–46, 2023.
- [30] G. M. Luz y J. F. Mano, "Preparation and characterization of bioactive glass nanoparticles prepared by sol–gel for biomedical applications", *Nanotechnology*, vol. 22, no. 49, p. 494014, 2011.
- [31] P. Sepulveda, J. R. Jones, y L. L. Hench, "Bioactive sol-gel foams for tissue repair", *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 59, no. 2, pp. 340–348, febrero 2002.
- [32] H. Aguiar, J. Serra, P. González, y B. León, "Structural study of sol-gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies", *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 355, no. 8, pp. 475–480, abril 2009.
- [33] L. Lefèbvre, L. Gremillard, J. Chevalier, R. Zenati, y G. Bernache-Assolant, "Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments", *Acta Materialia*, vol. 55, no. 9, pp. 3305–3313, mayo 2007.
- [34] J. Massera, S. Fagerlund, L. Hupa, y M. Hupa, "Crystallization mechanism of the bioactive glasses, 45S5 and S53P4", *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 95, no. 2, pp. 607–613, febrero 2012.
- [35] K. Zheng, M. Kapp, y A. R. Boccaccini, "Aging time and temperature effects on the structure and bioactivity of gel-derived 45S5 glass-ceramics", *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 98, no. 1, pp. 30–38, enero 2015.
- [36] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: from Hench to hybrids", *Acta Biomaterialia*, vol. 9, no. 1, pp. 4457–4486, enero 2013.

- [37] R. Li, A. Clark, y L. Hench, "An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing", *Journal of Applied Biomaterials*, vol. 2, no. 4, pp. 231–239, 1991.
- [38] Q.-Z. Chen, Y. Li, L.-Y. Jin, J. M. Quinn, y P. A. Komesaroff, "A new sol–gel process for producing Na₂O-containing bioactive glass ceramics", *Acta Biomaterialia*, vol. 6, no. 10, pp. 4143–4153, octubre 2010.
- [39] V. Sáez, L. López, e I. Katime, "Liberación controlada de fármacos. Micropartículas", *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 4, no. 2, pp. 3–69, 2003.
- [40] P. Tewa-Tagne, S. Briançon, y H. Fessi, "Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: formulation aspects, liquid phase interactions and particles characteristics", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 325, no. 1-2, pp. 63–74, noviembre 2006.
- [41] X. Xiangxiang, H. Lulu, Z. Haibing, Z. Zhang, y G. Jiangang, "Preparation and Characterization of Vanillin Cross-linked Chitosan Microspheres Modified by Silver Nanoparticles", *Journal of Wuhan University of Technology-Materials Science Edition*, vol. 29, no. 1, pp. 73–78, febrero 2014.
- [42] M. R. Dias, R. C. Leão, y H. de Souza Costa, "Obtenção e caracterização de microesferas de alginato/vidro bioativo", *Revista Eletrônica de Processos Tecnológicos*, vol. 12, 2020.
- [43] S. R. Shah, L. D. Tatara, D. A. Youssef, D. P. Ayala, A. G. Mikos, y F. K. Kasper, "Effects of Antibiotic Physicochemical Properties on Their Release Kinetics from Biodegradable Polymer Microparticles", *Pharmaceutical Research*, vol. 31, no. 12, pp. 3379–3389, diciembre 2014.
- [44] J. C. Vélez, N. Betancur, y O. Gutiérrez, "Síntesis y caracterización de biovidrios de fosfato mediante el método de pirólisis de aerosol de llama", *Revista Politécnica*, vol. 17, no. 33, pp. 126–132, 2021.
- [45] A. Niroula, A. T. Poortinga, y A. Nazir, "Pickering stabilization of double emulsions: Basic concepts, rationale, preparation, potential applications, challenges, and future perspectives", *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 343, p. 103531, septiembre 2025.

- [46] S. Hema, A. Karmakar, R. K. Das, y P. H. Srivastava, "Simple formulation and characterization of double emulsion variant designed to carry three bioactive agents", *Heliyon*, vol. 8, no. 9, p. e10397, septiembre 2022.
- [47] Y. Pérez-Pacheco, B. Tylkowski, y R. García-Valls, "Chitosan Micro/Nanocapsules in Action: Linking Design, Production, and Therapeutic Application", *Molecules*, vol. 30, no. 2, p. 252, enero 2025.
- [48] H. Thakkar y R. Murthy, "El polietilenglicol como agente antiagregante en la preparación de microesferas de gelatina con celecoxib", *Ars Pharmaceutica*, vol. 46, no. 1, pp. 19–34.
- [49] C. Chen, H. Cheng, X. Zhang, H. Yu, H. Tian, y Q. Chen, "Encapsulation of Lactocaseibacillus casei TCS using a Pickering water-in-oil-in-water double emulsion to preserve bacterial viability and aroma characteristics in yogurt", *LWT - Food Science and Technology*, vol. 223, p. 117740, mayo 2025.
- [50] V. S. Chernyshev y M. Skliar, "Diffusivity Measurements of Solutes Impacting Interfacial Tension", *International Journal of Heat and Mass Transfer*, vol. 78, pp. 350-357, 2014.
- [51] D. Hanaor, M. Michelazzi, C. Leonelli, y C. C. Sorrell, "The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂", *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 32, no. 1, pp. 235–244, 2012.
- [52] A. Niederquell, A. Hofer, B. Vraníková, y M. Kuentz, "Approaching drug release performance from mesoporous silica formulations by modeling of chemical potentials", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 214, p. 107283, noviembre 2025.
- [53] A. Pyka, M. Budzisz, y M. Dołowy, "Validation thin layer chromatography for the determination of acetaminophen in tablets and comparison with a pharmacopeial method", *BioMed Research International*, vol. 2013, no. 1, p. 545703, 2013.
- [54] A. Doostmohammadi, A. Monshi, R. Salehi, M. H. Fathi, Z. Golniya, y A. U. Daniels, "Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential", *Ceramics International*, vol. 37, no. 7, pp. 2311–2316, septiembre 2011.

- [55] M. Miola, E. Verné, F. E. Ciraldo, L. Cordero-Arias, y A. R. Boccaccini, "Electrophoretic Deposition of Chitosan/45S5 Bioactive Glass Composite Coatings Doped with Zn and Sr", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 3, octubre 2015, doi: 10.3389/fbioe.2015.00159.
- [56] Q. Nawaz, A. de Pablos-Martín, J. Martins de Souza e Silva, K. Hurle, A. T. C. Jaimes, D. S. Brauer, y A. R. Boccaccini, "New insights into the crystallization process of sol-gel-derived 45S5 bioactive glass", *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 103, no. 8, pp. 4234–4247, agosto 2020, doi: 10.1111/jace.17124.
- [57] V. Sugumaran y B. Subramanian, "Influence of ageing time on crystallization kinetics and hydroxyapatite Mimicking Silicorhenanite (β -Na₂Ca₄(PO₄)₂SiO₄) phase evolution in 45S5® bioactive glass for advanced biomedical applications", *Materials Chemistry and Physics*, vol. 327, p. 129893, noviembre 2024, doi: 10.1016/j.matchemphys.2024.129893.
- [58] Q. Z. Chen, I. D. Thompson, y A. R. Boccaccini, "45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2414–2425, 2006.
- [59] L. He, J. Yin, y X. Gao, "Additive manufacturing of bioactive glass and its polymer composites as bone tissue engineering scaffolds: a review", *Bioengineering*, vol. 10, no. 6, p. 672, 2023.
- [60] O. A. C. Monteiro y C. Airoidi, "Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 26, no. 2-3, pp. 119–128, noviembre 1999.
- [61] H. D. S. Costa y M. R. Dias, "Alginate/Bioactive Glass Beads: Synthesis, Morphological and Compositional Changes Caused by SBF Immersion Method", *Materials Research*, vol. 24, no. 4, p. e20200587, 2021.
- [62] Á. P. Sánchez Cepeda, R. Vera-Graziano, E. de J. Muñoz-Prieto, E. Y. Gómez-Pachón, M. J. Bernad-Bernad, y A. Maciel-Cerda, "Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina", *Ciencia y Desarrollo*, vol. 7, no. 2, pp. 133–151, 2016.

- [63] E. I. Laredo-Alcalá, C. G. Martínez-Rueda, J. L. García-Cué, A. S. Velázquez-Rodríguez, A. Muratalla-Lúa, y J. P. Pérez-Orozco, "Effect of biodegradable hydrogels on moisture retention and germination of alfalfa", *Terra Latinoamericana*, vol. 41, 2023.
- [64] N. D. Alshammari, P. Uttreja, R. Elkanayati, L. R. Jaidev Chakka, S. K. Vemula, y M. A. Repka, "Development of 3D-printed chitosan/p-coumaric acid scaffolds for wound healing: antibacterial properties and drug release kinetics", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 219, p. 114953, febrero 2026.
- [65] W. Cui, X. Li, X. Zhu, G. Yu, S. Zhou, y J. Weng, "Investigation of drug release and matrix degradation of electrospun poly (DL-lactide) fibers with paracetamol inoculation", *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 5, pp. 1623–1629, mayo 2006.
- [66] A. Abdullah, A. K. Idris, Z. A. A. Hamid, N. A. S. Mohd Puad, y M. I. Idris, "3D hydrogel/bioactive glass scaffolds in bone tissue engineering: Status and future opportunities", *Biomedical Materials*, vol. 18, no. 4, p. 042001, 2023.
- [67] J. Sun, C. Chen, B. Zhang, C. Yao, y Y. Zhang, "Advances in 3D-printed scaffold technologies for bone defect repair: materials, biomechanics, and clinical prospects", *BioMedical Engineering OnLine*, vol. 24, no. 1, p. 51, abril 2025.
- [68] A. K. Singh y A. Biswas, "Strontium doped 58S bioglass incorporated chitosan/gelatin porous scaffold for bone tissue engineering applications", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 283, p. 136983, 2024.

ANEXOS



Página 2 de 134 - Descripción general de integridad

Identificador de la entrega trn:oid::3117:560337058

7% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- ▶ Texto citado
- ▶ Texto mencionado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 7%  Fuentes de Internet
- 4%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.