



# Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Químico Farmacobiología  
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas  
Área: Biotecnología Alimentaria

**“Ácido fólico injertado en carboximetilcelulosa para  
obtener nanopartículas como suplemento alimenticio”**

## **TESIS**

Presenta:

QFB. Karen Aloha Zavala Castillo

Para obtener el grado académico de:  
Maestra en Ciencias Biológicas

Directora:

D.C. Nelly Flores Ramírez

Co-director:

D.C. Salomón R. Vásquez García

Morelia, Michoacán. Mayo de 2019.



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas**

**DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES  
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E**

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Ácido Fólico injertado a carboximetilcelulosa para obtener nanopartículas como suplemento alimenticio" presentado por la QFB. Karen Aloha Zavala Castillo con Número de Matrícula 0802063E, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

Morelia, Michoacán, a 10 de abril de 2019

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA**

Dra. Nelly Flores Ramirez  
Asesora

Dr. Salomón R. Vásquez García  
Co Asesor

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores

Dr. Asdrúbal Aguilera Méndez

Dr. Leandro García González

## RESUMEN

“Ácido fólico injertado en carboximetilcelulosa para obtener nanopartículas como suplemento alimenticio”

Por:

QFB. Karen Aloha Zavala Castillo, Mayo 2019

Dirigida por: Dra. Nelly Flores Ramírez

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Los biopolímeros de uso alimentario han sido empleados como agentes encapsulantes en la elaboración de nanopartículas, para proteger compuestos bioactivos, incrementar la vida útil de anaquel, mejorar las características organolépticas del producto, etc; entre los diversos componentes bioactivos destaca el ácido fólico (AF) o vitamina B9, el cual es importante consumir en cantidades adecuadas para evitar enfermedades coronarias, anemia megaloblástica y malformaciones congénitas. Por lo tanto, algunos productores adicionan cereales, leche de fórmula para bebés y alimentos de formulación médica, con ácido fólico para cumplir fácilmente con la dosis diaria recomendada de vitamina B9 en su dieta. Actualmente, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) aprobó la fortificación de la harina para masa de maíz con ácido fólico. Sin embargo, dicha vitamina es termolábil y susceptible a hidrólisis, perdiendo su actividad biológica durante el procesamiento de alimentos, por ejemplo en la elaboración de botanas hechas a base de maíz. Por lo tanto, en el presente trabajo se llevó a cabo la formación de un complejo entre la carboximetilcelulosa (CMC) y ácido fólico (añadida en diferentes concentraciones) en solución, lo cual se corroboró por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). La obtención de nanopartículas se realizó mediante dos métodos diferentes: *spray drying* (secado por aspersion) y nanoemulsión inversa. La caracterización morfológica determinó que a través de *spray drying*, se generaron cúmulos de nanopartículas esféricas con superficie lisa mientras que mediante la nanoemulsión inversa, las nanopartículas quedan

embebidas en la matriz de CMC. El análisis por rastreo de nanopartículas (NTA) demostró la formación de partículas con tamaño promedio en el orden nanométrico por ambos métodos, de 54 y 61 nm, respectivamente; presentando un menor tamaño aquéllas con el mayor contenido de ácido fólico. La eficiencia de encapsulado determinó que a través del *spray drying* se obtuvo un 90% mientras que por nanoemulsión inversa fue de entre 87-90%. Finalmente, se realizó el análisis térmico de las nanopartículas obtenidas por ambos métodos, mediante termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido, con lo cual se demostró una mayor estabilidad del ácido fólico conferido por su interacción con la carboximetilcelulosa, en aquellas nanopartículas obtenidas por *spray drying*.

**Palabras Claves:** biopolímero, *spray drying*, nanoemulsión, vitamina B9, estabilidad térmica.

## ABSTRACT

Biopolymers for food use have been used as encapsulating agents in the manufacture of nanoparticles, to protect bioactive compounds, in order to improve the shelf life, improve the organoleptic characteristics of the product, etc. Among the various bioactive components, folic acid (AF) or vitamin B9 stands out, which is important to consume in adequate amounts to avoid coronary heart disease, megaloblastic anemia and congenital malformations. Consequently, it has been added to breakfast cereals, enriched bread, pasta, rice and milk for babies and foods of medical formulation, in such a way that people could consume it more easily to achieve the recommended daily dose. Actually, the Food and Drug Administration of the United States (FDA) has fortification of corn flour with folic acid. However, the bioactivity of this element decreases because of its thermolabile activity and hydrolysis reactions during food processing. To protect this bioactivity, can be used nanoparticles based on carboxymethylcellulose (CMC). Thus, in this work two different methods were used to obtain the FA-CMC nanoparticles: spray drying and reverse nanoemulsion. Subsequently, the nanoparticles were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Scanning Electronic Microscopy (SEM), Nanoparticle Analysis System (NTA), Thermogravimetry Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The analysis indicated that spherical nanoparticle clusters with a smooth surface were generated through spray drying while by reverse nanoemulsion, the nanoparticles were embedded into the CMC matrix. These nanoparticles showed an average size in the range of 54 and 61 nm. Those nanoparticles with the highest folic acid content exhibited the smaller size. The efficiency of encapsulation was determined, it was 90% for the spray drying, while by reverse nanoemulsion was between 87-90%. Finally, nanoparticles obtained by spray drying showed higher thermal stability of folic acid as consequence of its interaction with carboxymethylcellulose.

**Key words: biopolymer, spray drying, nanoemulsion, vitamin B9, thermal stability.**

---

---

**LISTA DE TABLAS**

<b>No. de tabla</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
1	Fórmulas para calcular las diferentes viscosidades de un polímero en solución	18
2	Formulación de las emulsiones inversas	28
3	Concentración de AF con su respectiva absorbancia	33
4	Viscosidades de las diferentes soluciones de CMC	36
5	Rendimiento de producción del complejo CMC-AF con el mayor contenido de ácido fólico	39
6	Rendimiento de producción de las emulsiones inversas	41
7	Frecuencias características de ácido fólico	42
8	Frecuencias características de la CMC	43
9	Frecuencias del Span 80	48
10	Análisis EDS del ácido fólico	53
11	Análisis EDS de la carboximetilcelulosa	54
12	Análisis EDS de nanopartículas CMC-AF obtenidas por <i>spray drying</i>	56
13	Análisis EDS de nanopartículas CMC-AF obtenida por emulsión inversa	58
14	Tamaño promedio de partículas obtenidas por ambos métodos	59
15	Eficiencia de encapsulado de AF en las nanopartículas obtenidas por ambos métodos	61
16	Pérdida de masa en función de la temperatura del AF por termogravimetría	63
17	Pérdida de masa en función de la temperatura de la CMC por termogravimetría	64
18	Pérdida de masa en función de la temperatura de las	

---

	NP CMC-AF obtenidas por <i>spray-drying</i>	65
19	Pérdida de masa en función de la temperatura de las NP CMC-AF obtenidas por <i>spray-drying</i>	67
20	Pérdida de masa en función de la temperatura de las NP CMC-AF obtenidas por emulsión inversa	68
21	Transiciones térmicas del AF por DSC	71
22	Transiciones térmica de la CMC por DSC	72
23	Transiciones térmica de NP CMC-AF vs AF por DSC	73
24	Transiciones térmica de una mezcla de CMC y AF por DSC	74
25	Transición térmicas de NP CMC-AF por nanoemulsión inversa versus AF por DSC	75

---

---

**LISTA DE FIGURAS**

<b>No. de figura</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
1	Equipo Nanospray dryer	10
2	Estructura química del ácido fólico	13
3	Estructura química de la carboximetilcelulosa	14
4	Esquema de un viscosímetro capilar	17
5	Esquema de un espectro IR con transformada de Fourier	20
6	Instrumento de Nanosight	22
7	Equipo de <i>NanoSpray Dryer</i> B-90 Büchi	27
8	Viscosímetro de Ostwald	29
9	Equipo PERKIN ELMER FTIR Spectrum 400	29
10	Microscopio óptico VELAB	30
11	Equipo MEB JEOL JSM 7600F	31
12	Equipo <i>NanoSight</i> modelo LM20	32
13	Espectrofotómetro UV-Vis VELAB	32
14	Curva de calibración de ácido fólico	33
15	Equipo NETZSCH STA 449F3	34
16	Prueba cualitativa de solubilidad del AF por 12 h en: a)DMS, b) ác. acético, c) agua destilada, e) etanol y d) acetona	36
17	Gráfico de la viscosidad intrínseca de la CMC	37



---

18	Esquema de reacción propuesta entre ácido fólico y carboximetilcelulosa	38
19	Reacción entre la CMC y AF: a) sistema en condiciones de oscuridad y b) complejo CMC-AF	38
20	Solución de CMC-AF con diferente contenido de ácido fólico: a) 0.005, b) 0.015, c) 0.030 mg/ml y d) muestra representativa de cada sln. 0,5% (v/v)	39
21	Sistema empleado para emulsión inversa	40
22	Espectros infrarrojos de: a) AF, b) CMC y c) complejo CMC-AF	44
23	Espectros infrarrojos de la reacción entre CMC y AF durante: a) 48 h y b) 36 h	45
24	Espectros infrarrojos de la reacción entre CMC y AF con diferente concentración de AF: a) 0.005, b) 0.015 y c) 0.030 mg/ml	45
25	Espectros infrarrojos de a) mezcla de CMC con AF y b) complejo CMC-AF	46
26	Espectro infrarrojo del Span 80	48
27	Espectros infrarrojos de emulsiones inversas de CMC-AF con diferente contenido de AF: a)0.005, b)0.015 y c)0.30 mg/ml	49
28	Micrografías de zonas representativas de: a)CMC y b)AF	50
29	Micrografía del polvo obtenido por <i>spray drying</i>	50
30	Micrografías de muestras representativas de nanoemulsiones inversas CMC-AF con diferente contenido de AF: a) EM-1, b) EM-II y c) EM-III	51

---

31	Micrografías por MEB de AF a diferentes ampliaciones: a)500x, b)1,000x, c)2,500x y d)5,000x	52
32	Espectro EDS de una muestra representativa de AF	53
33	Micrografías por MEB de CMC a diferentes ampliaciones: a) 500x, b)1,000x, c)2,500x y d)5,000x	54
34	Espectro EDS de una muestra representativa de CMC	55
35	Micrografías por MEB de nanopartículas CMC-AF obtenidas por <i>Spray drying</i> a diferentes ampliaciones: a) 500x, b) 1,000x, c) 2,500x, d) 5,000x y e) 10,000x	55
36	Espectro EDS de una muestra representativa de NP de CMC-AF obtenidas por <i>spray-drying</i>	56
37	Micrografías por MEB de nanopartículas de CMC-AF obtenidas por emulsión inversa a diferentes ampliaciones: a) 500x, b)2,500, c)5,000 y d)10,000x	57
38	Espectro EDS de una muestra representativa de NP CMC-AF obtenidas por nanoemulsión inversa	58
39	Micrografías por MEB del tamaño de partícula obtenidas por: a) <i>spray drying</i> y b)nanoemulsión inversa	59
40	Distribución y tamaño de nanopartículas de CMC-AF obtenidas: a) <i>spray-drying</i> y b) nanoemulsión inversa	60
41	Distribución y tamaño de las nanopartículas obtenidas por nanoemulsión inversa: a) EM-I y b) EM-II	60
42	Termograma del ácido fólico: a) TGA y b) DTG	63
43	Termograma de la CMC: a) TGA y b) DTG	64
44	Termograma de las nanopartículas de CMC-AF,	

---

---

	obtenidas por <i>spray-drying</i> : a)TGA y b)DTG	66
45	Termograma de una mezcla de CMC y AF: a)TGA y b)DTG	67
46	Termograma de nanopartículas de CMC-AF obtenidas por nanoemulsión inversa: a)TGA y b)DTG	69
47	Curva DSC del ácido fólico	70
48	Curva DSC de la carboximetilcelulosa	71
49	Curva DSC de las nanopartículas CMC-AF obtenidas por <i>spray-drying</i>	72
50	Curva DSC de una mezcla de CMC y AF	73
51	Curva DSC de nanopartículas de CMC-AF obtenidas por nanoemulsión inversa	74

---

---

**ABREVIATURAS**

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre</b>
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>AF</b>	Ácido fólico
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulosa
<b>CMC-AF</b>	Complejo de carboximetilcelulosa-ácido fólico
<b>cP</b>	Centipoise
<b>EDS</b>	Detector de dispersión de energía
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DS</b>	Grado de sustitución
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de barrido
<b>FT-IR</b>	Espectroscopía infrarroja
<b>HLB</b>	Balance Lipofílico-hidrofílico
<b>HMDA</b>	Hexametildiamina
<b>M</b>	Peso molecular
<b>MEB</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>MHS</b>	Ecuación Mark-Houwink-Sakurada
<b>MO</b>	Microscopía óptica
<b>NP</b>	Nanopartículas
<b>O/W</b>	Emulsión aceite en agua
<b>PIC</b>	Inversión de fase por composición
<b>PIT</b>	Inversión de fase por temperatura
<b>TGA</b>	Termogravimetría
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopía visible- ultravioleta
<b>W/O</b>	Emulsión agua en aceite
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto

## DEDICATORIA

*A mis padres, el profesor Julio César Zavala  
Partida y la profesora Aloa Castillo Santibáñez  
por todo su amor, apoyo y educación.*

*A mis hermanos, Julio César y Janette por  
ayudarme en momentos difíciles y mostrarme  
el lado positivo de las cosas.*

*A mi esposo, el Arquitecto Emilio Guzmán  
por procurar mi crecimiento personal y  
profesional, por la paciencia y el amor que  
me demuestra cada día.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico proporcionado para la realización del presente proyecto.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, especialmente a la Facultad de Químico Farmacobiología, por la infraestructura prestada para la realización del presente trabajo.

A mi ASESORA D.C. Nelly Flores Ramírez por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su guía académica y personal, por su comprensión y ayuda en todo momento.

Al D.C. Salomón R. Vásquez por su valiosa contribución en el proceso de realización de este trabajo de tesis.

Al D.C. Héctor E. Martínez, por las facilidades prestadas para trabajar en el laboratorio de Alimentos de la Facultad de Químico Farmacobiología, así como las importantes aportaciones para la realización del presente trabajo.

Al D.C. Asdrúbal Aguilera y al D.C. Leandro García, por las aportaciones y consejos para la realización del presente trabajo.

A los compañeros del Posgrado de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera y del Posgrado de Química del Laboratorio de polímeros, por compartir sus conocimientos conmigo y por su ayuda en el laboratorio.

Resultados relacionados con esta investigación fueron presentados en los siguientes congresos:

1. Karen A. Zavala, Nelly Flores, Salomón R. Vásquez. “Ácido fólico injertado en carboximetilcelulosa para obtener nanopartículas como suplemento alimenticio”. 8º Foro Académico de Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Morelia, Michoacán, 07 y 08 de Diciembre, 2017 (cartel).
2. Karen A. Zavala, Nelly Flores. “Ácido fólico injertado en carboximetilcelulosa para obtener nanopartículas como suplemento alimenticio”. 13º Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán, 18 y 19 de Octubre, 2018 (oral).
3. Karen A. Zavala, Nelly Flores, Héctor Miranda, Héctor E. Martínez. “Ácido fólico injertado en carboximetilcelulosa para obtener nanopartículas como suplemento alimenticio”. 15º Foro de Ingeniería e Investigación en Materiales. Morelia, Michoacán, 14, 15 y 16 de Noviembre, 2018 (oral).
4. Karen A. Zavala, Nelly Flores. “Ácido fólico injertado en carboximetilcelulosa para obtener nanopartículas como suplemento alimenticio”. 9º Foro académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Morelia, Michoacán, 10 y 11 de Diciembre, 2018 (oral).
5. Karen A. Zavala, Nelly Flores, Martha P. Zapata, Héctor Miranda, Salomón R. Vásquez. “Ácido fólico injertado en carboximetilcelulosa para obtener nanopartículas como suplemento alimenticio”. XL Encuentro Nacional Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. Huatulco, Oaxaca, 7-10 de Mayo, 2019 (cartel).

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Copolímero.** Polímero constituido por más de un tipo de monómero.

**Disolvente.** Líquido que disuelve otra o más sustancias para formar una disolución.

**Emulsión.** Mezcla en la cual dos sustancias inmiscibles, como el agua y el aceite permanecen unidas entre sí gracias a una tercera sustancia llamada emulsificante. El aceite es estabilizado en el agua ocluyéndose en el centro de la micela. De esa forma, el agua y el aceite permanecen mezclados.

**Enlace por puente de hidrógeno.** Fuerte interacción atractiva entre un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo y un átomo electronegativo unido generalmente a otra molécula.

**Movimiento browniano.** Movimiento aleatorio e impredecible producido por las colisiones de las moléculas de un líquido contra las partículas suspendidas en él.

**Surfactante.** Sustancias cuyas moléculas poseen a la vez un grupo polar y un grupo apolar. El grupo polar es en general un grupo funcional que contiene heteroátomos como O, S, N o P; los grupos polares más comunes son los grupos: carboxilato, sulfonato, sulfato, amonio y fosfato.

**Suspensión.** Mezcla en que pequeñas partículas de un sólido o líquido se mantienen suspensas en un líquido o un gas.

**Transición térmica.** Cambio que tiene lugar en un material cuando es calentado o enfriado, como por ejemplo la fusión, la cristalización o la transición vítrea.

**Viscosidad.** Propiedad que todo fluido real presenta cuando resiste al movimiento relativo de cualquiera de sus partes por acción de una fuerza.





---

---

## ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	i
<b>Abstract</b>	iii
<b>Lista de tablas</b>	iv
<b>Lista de figuras</b>	vi
<b>Abreviaturas</b>	x
<b>Dedicatoria</b>	xi
<b>Agradecimientos</b>	xii
<b>Glosario</b>	xiv
<b>Capítulo I. Introducción</b>	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo general	2
1.2.2 Objetivos particulares	2
1.3 Justificación	3
1.4 Hipótesis	4
<b>Capítulo II. Marco teórico</b>	5
2.1 Antecedentes	5
2.2 Nanotecnología en la industria alimentaria	6
2.3 Nanoencapsulación	6

---

2.4 Métodos de nanoencapsulación	8
2.4.1 <i>Spray Drying</i> (Secado por aspersión)	8
2.4.2 Nanoemulsión inversa	10
2.4.2.1 Surfactante	12
2.4.2.2 Span 80	12
2.5 Ácido fólico como componente bioactivo	12
2.4.1 Estabilidad del ácido fólico	13
2.6 Carboximetilcelulosa sódica	15
2.6.1 Generalidades	15
2.6.2 Usos de la carboximetilcelulosa en la industria alimentaria	15
2.7 Métodos de caracterización	16
2.7.1 Prueba cualitativa de solubilidad	16
2.7.2 Viscosimetría de polímeros en solución	16
2.7.3 Espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier	19
2.7.4 Microscopia óptica (OM)	20
2.7.5 Microscopia electrónica de barrido con detector EDS	21
2.7.6 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)	22
2.7.7 Eficiencia de encapsulado por espectroscopia UV-Vis	23
2.7.8 Termogravimetría	23
2.7.9 Calorimetría diferencial de barrido	24

---

---

<b>Capítulo III. Metodología y materiales</b>	25
3.1 Parte experimental	25
3.1.1 Reactivos y solventes	25
3.1.2 Preparación del complejo de carboximetilcelulosa con ácido fólico	26
3.2 Obtención de nanopartículas de CMC-AF	26
3.2.1 <i>Spray drying</i> (secado por aspersion)	26
3.2.2 Nanomulsión inversa	27
3.3 Técnicas de caracterización	28
3.3.1 Prueba cualitativa de solubilidad	28
3.3.2 Peso molecular por viscosimetría de Ostwald	28
3.3.3 Caracterización del grado de injerto de AF	29
3.3.4 Caracterización morfológica por análisis microscópico	30
3.3.5 Caracterización morfológica de las nanopartículas por microscopia electrónica de barrido con detector de energía dispersiva (EDS)	30
3.3.6 Análisis de rastreo de nanopartículas	31
3.3.7 Determinación de la eficiencia de encapsulado por espectrofotometría UV-Vis	32
3.3.7 Análisis térmico	34
<b>Capítulo IV. Resultados y discusión</b>	35
4.1 Prueba de solubilidad	35
4.2 Peso molecular por Viscosimetría de Ostwald	36

---

---

4.3 Reacción entre la carboximetilcelulosa y el ácido fólico	37
4.4 <i>Spray drying</i> (secado por aspersion)	38
4.4.1 Rendimiento de producción por <i>spray drying</i>	39
4.5 Nanoemulsión inversa	40
4.5.1 Rendimiento de producción por nanoemulsión inversa	40
4.6 Espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier	41
4.6.1 Solución del complejo CMC-AF	41
4.6.2 Nanoemulsión inversa	47
4.7 Microscopía óptica	49
4.8 Microscopía electrónica de barrido con EDS	51
4.9 Tamaño y distribución de partículas	58
4.10 Determinación de la eficiencia de encapsulado	61
4.11 Análisis Termogravimétrico	62
4.12 Calorimetría diferencial de barrido	69
<b>5. Conclusiones</b>	<b>75</b>
<b>6. Perspectivas</b>	<b>76</b>
<b>7. Referencias</b>	<b>77</b>

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades

El ácido fólico o vitamina B9 es esencial para el ser humano debido a que funciona como una coenzima en la biosíntesis de nucleótidos (bases púricas y pirimídicas), también participa en el metabolismo de algunos aminoácidos (metionina, histidina) e incluso en la síntesis de ciertos neurotransmisores (serotonina, dopamina). Por lo tanto, la mejor manera de satisfacer las necesidades diarias de esta vitamina es a través de la dieta (Bekaert *et al.*, 2002). Por otro lado, existen condiciones fisiológicas donde se requiere un mayor aporte de ácido fólico (AF) como en el caso del embarazo y lactancia porque la vitamina B9 previene la aparición de malformaciones congénitas; así como también juega un papel importante en la prevención de enfermedades de los vasos sanguíneos, enfermedades coronarias y en el mantenimiento normal de la función neurológica (Taylor *et al.*, 2005). Dada su gran importancia para el ser humano, muchos de los alimentos que hoy se consumen llevan ácido fólico adicionado debido a que durante su manipulación puede provocarse la pérdida de más de la mitad del contenido natural de esta vitamina, es decir, el ácido fólico puede destruirse durante las cocciones prolongadas en abundante agua, con el recalentamiento de la comida o durante el almacenamiento a temperatura ambiente. Por lo tanto, la vitamina B9 tiene limitaciones en su estabilidad frente a factores como elevadas temperaturas, pH y exposición a luz ultravioleta (Seneida *et al.*, 2009). Por esta razón, se han desarrollado estrategias que mejoren su estabilidad sin afectar su actividad biológica; siendo una de ellas, el uso de nanopartículas que actúan como un reservorio de ácido fólico. Por lo que el interés del presente trabajo de tesis es incorporar ácido fólico a carboximetilcelulosa a través de una reacción de injerto para obtener nanopartículas, las cuales podrían emplearse como suplemento alimenticio.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo general**

Incorporar ácido fólico a carboximetilcelulosa a través de una reacción de injerto y obtener nanopartículas para promover su uso como suplemento alimenticio.

### **1.2.2 Objetivos particulares**

1.2.3 Sintetizar nanopartículas a base del complejo formado entre la carboximetilcelulosa y ácido fólico.

1.2.4 Identificar la interacción molecular y el grado de injerto del ácido fólico en la carboximetilcelulosa.

1.2.5 Conocer la morfología y tamaño de las nanopartículas formadas de carboximetilcelulosa con ácido fólico.

1.2.6 Determinar el nivel de absorción del ácido fólico en las nanopartículas obtenidas.

1.2.7 Conocer la estabilidad térmica del ácido fólico en las nanopartículas formadas.

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

En México se ha empleado como estrategia nutricional, la elaboración de harinas de maíz adicionadas con ácido fólico para prevenir la aparición de enfermedades en la población principalmente como riesgos cardiovasculares, anemia megaloblástica y defectos en el tubo neural durante la gestación (Rosado *et al.*, 1999). De igual forma, mediante ésta estrategia se facilita que las embarazadas incrementen su consumo de ácido fólico durante la gestación. No obstante, la mayoría de los embarazos no son planeados; por lo que el consumo de ácido fólico se inicia de forma tardía incrementando la posibilidad de malformaciones congénitas, productos prematuros e incluso bajo peso al nacer. Además los habitantes de zonas rurales clasificadas como de marginación social, particularmente las mujeres, tienen dificultades para acudir a algún centro de salud que les pueda proporcionar comprimidos que contienen ácido fólico aunado al hecho de que cuentan con hábitos alimenticios inadecuados; por lo que no cumplen con la dosis diaria recomendada de vitamina B9. Asimismo, durante el procesamiento de alimentos que contienen ácido fólico de forma natural, se pierde más de la mitad del contenido de ésta vitamina ya que es degradado por efecto de la temperatura y disolución en agua. Por consiguiente, ha surgido la necesidad de emplear alguna técnica a través del cual se asegure la estabilidad del ácido fólico mediante el uso de un material inocuo como la carboximetilcelulosa para la elaboración de nanopartículas que podrían incorporarse a productos alimenticios de alto consumo en nuestro país.



## **1.4 HIPÓTESIS**

La incorporación de ácido fólico a un biopolímero como la carboximetilcelulosa permite la obtención de partículas muy finas, las cuales mejoran la estabilidad térmica de la vitamina B9 para su posible uso como suplemento alimenticio.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes

El ácido fólico ha sido encapsulado empleando diferentes matrices poliméricas para protegerlo tanto de factores que provocan su degradación durante el procesamiento de alimentos como de las condiciones ambientales. **Veloso y Della-Rocca** en el 2015 llevaron a cabo la microencapsulación de ácido fólico utilizando dos métodos, el primero fue a través de *spray drying* (secado por aspersión) y el segundo fue mediante gelificación iónica. Además, emplearon dos polímeros de recubrimiento en cada caso: goma arábiga y alginato de calcio, respectivamente. Como resultado, lograron obtener micropartículas de ácido fólico con goma arábiga con un tamaño de 1-2  $\mu\text{m}$  mediante *spray drying*; mientras que a través de la gelificación iónica con alginato de calcio, se obtuvieron micropartículas con un tamaño de 800-900  $\mu\text{m}$ . Con lo cual, concluyeron que las microcápsulas de mayor tamaño serían más adecuadas para adicionar ácido fólico de forma homogénea a la harina de arroz dirigida a la población celíaca.

A principios del 2016, **Alupei et al.** obtuvieron nanopartículas de quitosano cargadas con ácido fólico mediante emulsión inversa usando glutaraldehído como agente entrecruzante y además incorporaron un medicamento empleado en la quimioterapia (5-fluorouracil). En el mismo año, también **Zhengyu et al.** lograron injertar ácido fólico en carboximetil-quitosano para obtener nanopartículas por autoensamblaje y ser empleado como un sistema de transporte para el metotrexate, uno de los fármacos empleados en el tratamiento de la leucemia mieloide con la finalidad de minimizar el efecto tóxico del medicamento tras su administración.

A finales del 2016, **Movagharneshad y Moghadam** sintetizaron un copolímero de carboximetilcelulosa/hexametilendiamina-ácido fólico (CMC/HMDA-AF) a través de una reacción de injerto debido a que previamente, obtuvieron un compuesto de carboximetilcelulosa con hexametildiamina para posteriormente unir el ácido fólico de manera covalente y obtener el conjugado final (CMC/HMDA-

AF) el cual podría ser empleado como vehículo para transportar medicamentos anticancerígenos como la doxorubicina.

## **2.2 Nanotecnología en la industria alimenticia**

Actualmente, el uso de la nanotecnología se ha extendido a la industria farmacéutica, cosmética, textil y alimentaria. Entre sus aplicaciones en la industria alimentaria destacan las áreas de envasado, de calidad y seguridad alimentaria (biosensores); así como la mejora de procesos (gelatinización, espumas y emulsiones) y desarrollo de nuevos productos donde a través de la nanoencapsulación se evita la pérdida de compuestos sensibles con propiedades volátiles (que aportan sabor u olor), también permite reducir la reactividad e incompatibilidad de ciertos compuestos con el medio, etc. Así como disminuir la pérdida del valor nutricional del producto y controlar la liberación del componente bioactivo (Dasgupta *et al.*, 2015).

## **2.3 Nanoencapsulación**

La nanoencapsulación es un método efectivo para proteger a diversos compuestos bioactivos de la degradación ambiental donde los sistemas de liberación controlada varían en tamaño que van desde varios nanómetros hasta cientos de micras (Dan, 2016). Se ha propuesto el uso de la nanoencapsulación como una solución a la inestabilidad química de compuestos hidrofílicos que pueden inactivarse o degradarse fácilmente en sistemas acuosos, sensibles a oxidantes, luz y temperatura mediante su incorporación a sistemas de liberación controlada para aumentar su estabilidad e incluso mejorar las propiedades organolépticas del producto (Soto y López, 2011).

Por otro lado, el tamaño de las nanopartículas hace que sus propiedades físico-químicas sean diferentes a las de aquellas partículas de mayor tamaño, obteniéndose una mejora en la estabilidad frente a los fenómenos de agregación, velocidad de difusión, mayor solubilidad, mayor velocidad de penetración ante las barreras biológicas, etc. El agente bioactivo puede ser liberado de las partículas

de diferentes maneras dependiendo de la estructura de las mismas mediante difusión o por fragmentación física o química (Dan, 2016).

Asimismo, las nanopartículas se clasifican en orgánicas e inorgánicas, en función de sus características químicas, su capacidad para transportar diferentes ingredientes y su reacción frente a diferentes condiciones del medio ambiente. Muchas de las nanopartículas inorgánicas son modificaciones de aditivos alimentarios, por ejemplo el dióxido de titanio (colorante alimentario que puede utilizarse como barrera de protección en el envasado de alimentos) o las nanopartículas de plata, utilizadas como agentes antimicrobianos en los paneles de los frigoríficos, en los recipientes de almacenamiento, líneas de envasado y otras superficies destinadas a entrar en contacto con los alimentos. Por otra parte, las nanopartículas orgánicas se emplean principalmente para mejorar el valor nutritivo de los alimentos, utilizándose como vehículo para la liberación de vitaminas y otros nutrientes (Cacho *et al.*, 2009). Aunque la formulación de dichas nanopartículas implica ciertos desafíos puesto que se debe tener una distribución de tamaño homogéneo, una morfología adecuada, presentar una biocompatibilidad entre el polímero y el compuesto bioactivo de interés; además de las propiedades fisicoquímicas del agente bioactivo (Li *et al.*, 2010).

En función de su morfología y del proceso de formación empleado, las nanopartículas se clasifican en nanoesferas y nanocápsulas aunque, en general, se definen como partículas coloidales sólidas. Con respecto a las nanoesferas, éstas se definen como partículas donde toda la masa sólida y las moléculas pueden ser adsorbidas en la superficie, en general, son esféricas pero el término “nanoesfera” no hace referencia necesariamente a una morfología totalmente redonda. En contraste, las nanocápsulas son sistemas vesiculares, actúan como un depósito en el que las sustancias atrapadas se limitan a una cavidad que consta de un núcleo líquido (agua o aceite) rodeado por una cubierta polimérica con lo cual presentan una forma esférica homogénea (Rao y Geckeler, 2011).

## 2.4 Métodos de nanoencapsulación

Las técnicas empleadas para la nanoencapsulación de componentes bioactivos dependen principalmente de las características fisicoquímicas tanto del material de recubrimiento como del compuesto a encapsular debido a que debe existir una biocompatibilidad entre ambos materiales. Por consiguiente, los procesos de encapsulación se pueden dividir en dos grupos: químicos y mecánicos. Con respecto a los procesos químicos se incluye la coacervación, emulsión inversa, polimerización interfacial, gelificación iónica y atrapamiento en liposomas; dentro de los procesos mecánicos se encuentra el *spray drying* (secado por aspersión), *spray cooling/chilling* (atomización en frío), liofilización y extrusión (Nesterenko *et al.*, 2013.)

Aunque se han desarrollado muchas técnicas para nanoencapsular ingredientes alimenticios, el *spray drying* es la tecnología más comúnmente usada debido a su bajo costo comparado con la liofilización y facilidad de manejo del equipo (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

### 2.4.1 *Spray drying* (secado por aspersión)

El *spray drying* generalmente se usa en la industria de alimentos para asegurar la estabilidad de productos, evitar el riesgo de degradaciones químicas y biológicas, reducir los costos de transporte, almacenamiento y para obtener un producto con propiedades específicas como solubilidad instantánea (Medina *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2010). La conveniencia del uso de esta técnica radica en los tiempos cortos de producción, la factibilidad económica y el uso de bajas temperaturas, lo cual es un parámetro crucial para aquellos productos sensibles al calor debido a que promueve una alta retención de sabor, color y nutrientes (Ferrari *et al.*, 2012).

Durante el *spray drying* se pueden distinguir las siguientes etapas de acuerdo a lo reportado por Gharsallaoui *et al.*, 2007 y como se muestra en la Figura 1:

- **Atomización:** el objetivo de esta etapa es crear la máxima superficie de transferencia de calor entre el aire seco y el líquido para optimizar la transferencia de masa y calor. El tipo de atomizador empleado (boquilla de presión, sónico etc.) depende de la naturaleza y viscosidad de la alimentación y de las características deseadas en el producto seco. No obstante, el tamaño de las partículas aumenta cuando la viscosidad y la tensión superficial del líquido inicial son grandes.
- **Contacto de gota-aire caliente:** este contacto toma lugar durante la atomización y se inicia la etapa de secado. De acuerdo al sitio o lugar donde se encuentra localizado el atomizador, comparado con el aspersor de aire caliente, puede ser en sentido de la corriente (paralela) o en contracorriente. En el primer caso, el líquido es asperjado en la misma dirección de flujo de aire caliente cuya temperatura de entrada es de entre 150-220°C y la evaporación ocurre instantáneamente. El polvo seco obtenido se expone a una temperatura de salida moderada de entre 50-80°C para evitar la degradación térmica de algunos compuestos. En contraste, en el proceso a contra-corriente, el líquido es asperjado en dirección contraria al flujo de aire caliente y el producto seco es expuesto a altas temperaturas, lo cual limita su aplicación a productos termosensibles.
- **Evaporación del agua:** en el momento en que ocurre el contacto de las gotas de líquido con el aire caliente, se establece el balance de temperatura y presión parcial de vapor entre la fase líquida y gaseosa. Por lo tanto la transferencia de calor se lleva a cabo del aire hacia el producto como resultado de la diferencia de temperatura; mientras que la transferencia de agua se lleva a cabo en sentido opuesto debido a la diferencia de la presión de vapor. Justo después del contacto del líquido con el aire caliente, la transferencia de calor causa el incremento de temperatura de las gotas hasta un valor constante produciendo una velocidad de difusión de agua, desde el núcleo de la gota hasta su superficie, igual a la velocidad de evaporación para finalmente formar una corteza seca.

- **Separación del producto seco y aire húmedo:** ésta separación se hace a través de un ciclón colocado fuera de la cámara de secado, lo cual reduce las pérdidas del producto a la atmósfera debido a que las partículas de mayor densidad son recuperadas en la base de la cámara de secado, mientras que las finas pasan a través de un ciclón para ser separadas del aire húmedo. Los polvos obtenidos están hechos de partículas que se originan a partir de gotas esféricas tras contraerse.

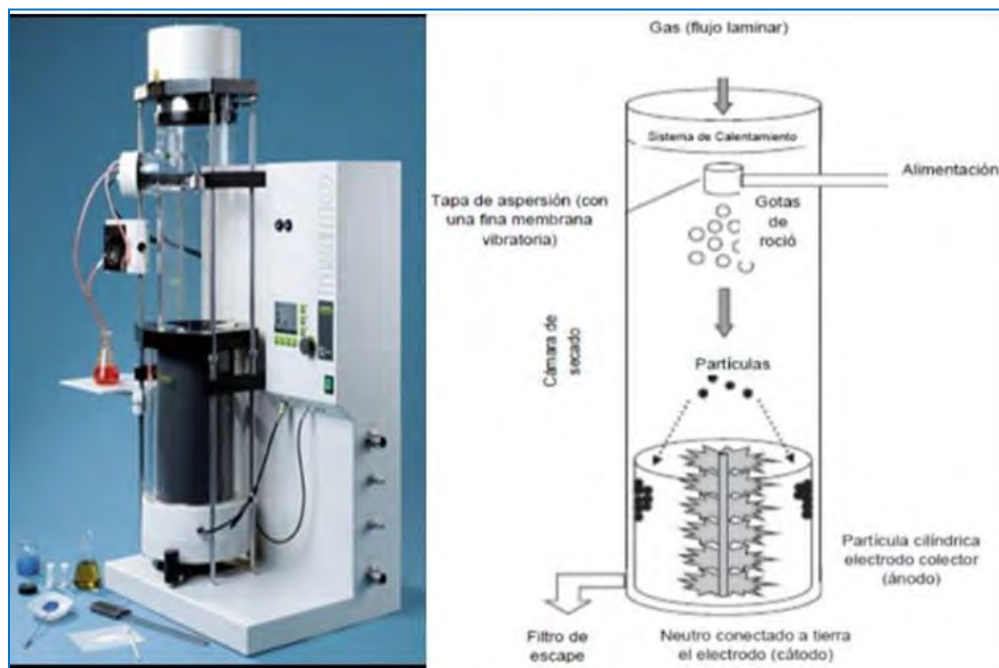


Figura 1. Equipo *NanoSpray dryer*.

#### 2.4.2 Nanoemulsión inversa

Una emulsión es un sistema que contiene dos fases líquidas inmiscibles, una de las cuales está dispersa en la otra y cuya estructura es estabilizada por un agente surfactante o emulsionante. La fase que se encuentra en forma de gotas se denomina fase dispersa o interna mientras que la otra fase recibe el nombre de continua o externa. En la mayoría de los alimentos, el diámetro de las gotas en las emulsiones es de 0.1 a 100  $\mu\text{m}$ . Existen dos tipos de emulsiones de acuerdo a la naturaleza de la fase dispersa; se denomina emulsión aceite en agua (O/W, por

sus siglas en inglés) cuando exhiben gotas de aceite dispersas en una fase acuosa, mientras que una emulsión inversa es aquella donde ocurre lo contrario, es decir las gotas de agua se dispersan en una fase oleosa (W/O, por sus siglas en inglés) (McClements, 2010).

En la industria alimentaria las nanoemulsiones se han empleado como un sistema de transporte y de liberación de una amplia variedad de componentes bioactivos debido a su mínimo impacto en las características sensoriales de los alimentos. Entre las ventajas que ofrece el uso de nanoemulsiones sobre las emulsiones convencionales, se encuentran una mayor estabilidad de las gotas ante la agregación, mayor solubilidad y un aumento en la biodisponibilidad de los componentes bioactivos dispersos. Las nanoemulsiones son de apariencia translúcida y de alta estabilidad cinética, sin requerir concentraciones de elevadas de surfactante para su formación debido a que son termodinámicamente inestables, no se forman de manera espontánea y sus características dependerán del método de preparación utilizado (Nedovic *et al.*, 2011). Por lo tanto, para su formación requieren de un suministro de energía, ya sea por medios mecánicos como homogenizadores de alta presión, agitación a altas velocidades o aplicación de ultrasonido; o bien, provista por el potencial químico de los componentes y/o los cambios de fase experimentados durante la preparación de las mismas (Zheng *et al.*, 2015). Entre los métodos fisicoquímicos utilizados para la formación de una nanoemulsión inversa se encuentra el método PIT (*Phase Inversion Temperature*) que por sus sigla en inglés se refiere a la inversión de fase al variar la temperatura, produciendo una emulsión W/O a partir de una emulsión O/W o viceversa y el método PIC (*Phase Inversion Composition*) que se refiere a la inversión de fase al cambiar la composición de la emulsión pasando de una emulsión W/O a una O/W por adición de agua en sistemas constituidos por agua/surfactante/aceite a temperatura constante y sin necesidad de aplicar fuerte agitación (Solans *et al.*, 2004).



### 2.4.2.1 Surfactante

Un surfactante es una sustancia anfifílica, es decir, posee una doble afinidad ya que tiene una parte polar o hidrofílica (una cabeza con afinidad a sustancias polares como el agua) y otra parte no polar o lipofílica (una cola con afinidad a sustancias no polares como lípidos). Por lo cual, los surfactantes tienden a migrar a la interfase de dos sustancias inmiscibles dada su doble polaridad orientando la parte polar hacia la fase acuosa y la parte apolar hacia la fase oleosa formando micelas directas o inversas, éstas últimas tienen al centro las cabezas polares y se presentan en emulsiones del tipo W/O (agua en aceite, por sus siglas en inglés) (Kumar *et al.*, 2014). Con el fin de medir la naturaleza anfótera de los agentes tensoactivos, Griffin ideó una escala empírica denominada balance hidrofílico-lipofílico conocido como HLB, siendo un sistema numérico que entre mayor sea dicho valor, mayor será su carácter hidrofílico (Fernández, 2004).

### 2.4.2.2 Span 80

El Span 80 es un surfactante no iónico formado por la esterificación del sorbitán con ácido oleico, en otras palabras es un derivado del sorbitol (monooleato de sorbitán) por lo que es insoluble en agua debido a que tiene una cadena lipofílica conformada por 18 carbonos, lo cual lo hace soluble en solventes orgánicos. Se emplea tanto en la industria farmacéutica como alimentaria ya que presenta baja toxicidad y además se emplea para formar emulsiones inversas ya que cuenta con un HLB de 4,3 (Sateesh *et al.*, 2012).

## 2.5 Ácido fólico como componente bioactivo

La estructura del ácido fólico (AF), como se muestra en la Figura 2, está formada por la unión de un doble anillo pterínico con una molécula de ácido p-aminobenzoico mediante un puente metilénico y éste compuesto a su vez, se une a una molécula de ácido glutámico mediante una unión peptídica (función amida) por lo cual pertenece a un grupo de compuestos denominados folatos (del latín *folium*, que significa hoja) (Suárez, 2003).



**Figura 2. Estructura química del ácido fólico.**

Los seres humanos no pueden sintetizar folatos, por lo cual es necesario incorporarlos a través de la dieta a partir de fuentes vegetales. Sin embargo, durante su cocción se puede destruir entre el 50 al 80%, por lo tanto se emplea su forma sintética y monoglutámica, es decir, el ácido fólico debido a que es más estable y biodisponible; así como también es comúnmente usado como suplemento y fortificante de alimentos (McKillop *et al.*, 2002).

La deficiencia de ácido fólico en la dieta está relacionada con defectos del tubo neural, enfermedades coronarias y anemia megaloblástica. Con respecto a las embarazadas la administración de ácido fólico previene defectos en el tubo neural (espina bífida o anencefalia) y otros defectos congénitos, especialmente en mujeres con antecedentes de hijo o feto con dichas deficiencias en el tubo neural, durante cuatro semanas antes de la concepción y los tres primeros meses de gestación (Brito *et al.*, 2012). La dosis recomendada de acuerdo a la OMS es de 0,4 mg (400 µg) de ácido fólico, durante 1 mes antes y 3 meses después de la fecundación (en mujeres sin antecedentes de defectos del tubo neural) y de 4 mg/día si ha habido alguna incidencia al respecto en embarazos anteriores (OMS, 2014).

### **2.5.1 Estabilidad del ácido fólico**

El enriquecimiento de alimentos con ácido fólico (AF), fundamentalmente productos lácteos y cereales, resulta ser un proceso complicado debido a que dicha vitamina es sensible a la temperatura, luz y cambios de pH, entre otros factores. Ninguno de sus compuestos de degradación tiene actividad biológica; por lo tanto, durante la formulación de productos farmacéuticos, nutracéuticos o

alimentos enriquecidos con AF se hace necesaria la protección de la vitamina frente a factores ambientales como la luz y factores de formulación como medios ácidos y básicos.

La fotólisis del AF es promovida fundamentalmente por la luz absorbida por el grupo pteridina y que compromete al máximo de absorción a 350 nm, donde se produce la ruptura del enlace amídico (C9 y N10), dando lugar al 2-amino-4-hidroxi-6-formil-pterina (6-FPT) y *p*-aminobenzoil-*L*-ácido glutámico (PABG) (Lopera *et al.*, 2009); en la reacción de fotólisis se da lugar a reacciones secundarias donde el 6-FPT es oxidado al correspondiente 6-ácido carboxílico (6-CBPT) y éste posteriormente sufre descarboxilación formando 2- amino-4-hidroxi-pteridina (Hua *et al.*, 2007).

**Vora *et al.* 2002**, determinaron que el ácido fólico presenta deterioro en su estructura, resultado del estrés térmico, durante el procesamiento de los alimentos. Por lo cual, estudiaron la estabilidad térmica del ácido fólico cristalino en estado sólido mediante termogravimetría, donde se calentó a 800 °C e informaron que a alrededor de 139.38 ° C, se pierde el resto de ácido glutámico, después de los 200 °C la degradación fue significativa ya que el ácido fólico cristalino se volvió amorfo; seguido de la degradación del anillo de pterina y el ácido *p*-aminobenzoico (PABA) que se traslapan en un rango de 265.98 °C a 404.26 °C. Un patrón similar de degradación también fue informado por Jankovi en el 2009 quien estudió específicamente la degradación de Folvax, un producto farmacológico comercial de ácido fólico.

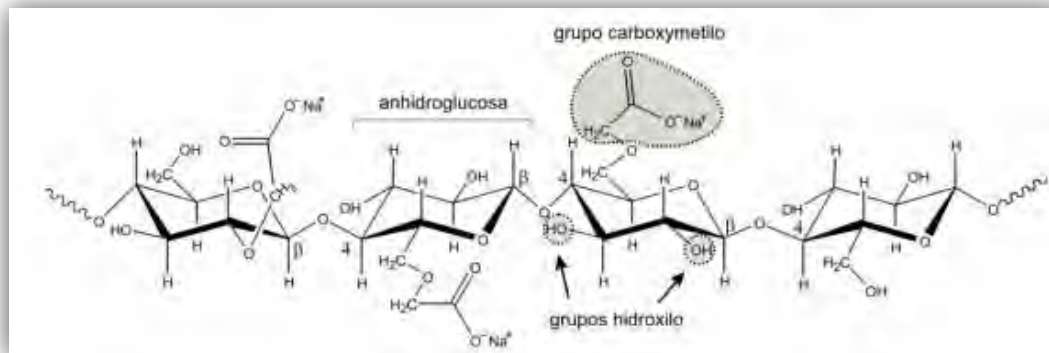
En el 2013 **Liang *et al.*** estudiaron la estabilidad del ácido fólico (10 mg/L) en varias condiciones de pH (1.95, 2.51, 3.51, 4.68, 5.36, 6.40, 8.05, 9.01 y 10.40) a temperatura ambiente para diferentes tiempos (2.5, 5, 7.5, 24, 48 y 72 h). Dicho estudio demostró que el ácido fólico es estable en condiciones alcalinas (pH rango 8.05–10.40) con solo 6.9% de degradación después de 72 h. En condiciones ácidas, la degradación no es homogénea; los investigadores encontraron una degradación por debajo del 45% a valores de pH de 1.95, 2.51, 5.36 y 6.40, pero la degradación fue del 5 al 15% a pH 3.51 y 4.68.

## 2.6 Carboximetilcelulosa sódica

### 2.6.1 Generalidades

La carboximetilcelulosa sódica (Na-CMC) se produce por modificación química de la celulosa. En el proceso de síntesis, se buscan introducir en las unidades repetitivas de la celulosa, grupos químicos de “carboximetil de sodio” ( $\text{CH}_2\text{COONa}$ ) como se muestra en la Figura 3, los cuales le darán al producto obtenido cierto grado de solubilidad en agua, propiedad que no tiene la celulosa.

Un aspecto muy importante, que define las propiedades funcionales de la Na-CMC, es el denominado grado de sustitución o DS. La magnitud del DS es función del número promedio de grupos hidroxilo sustituidos por grupos de  $\text{CH}_2\text{COONa}$  en una unidad de anhidroglucosa. Cada unidad de anhidroglucosa en la celulosa tiene tres grupos hidroxilos disponibles para un DS máximo de tres. Por ejemplo, en una Na-CMC, con un DS de 1.5, significa que en promedio 50% de los grupos hidroxilos son eterificados con el  $\text{CH}_2\text{COONa}$  y 50% promedio restante de cada unidad anhidroglucosa queda libre (Reyes *et al.*, 2011).



**Figura 3. Estructura química de un segmento representativo de la cadena de carboximetilcelulosa.**

### 2.6.2 Usos de la carboximetilcelulosa en la industria alimentaria

La carboximetilcelulosa es un polisacárido de carácter aniónico obtenido por la hidrólisis ácida y posterior alcalinización de la celulosa, se considera una goma semisintética (Badui, 2006) y se utiliza ampliamente en la industria de alimentos como espesante, estabilizante de emulsiones, ligante de agua,

mejorador de viscosidad y textura en diversos productos. La CMC se disuelve rápidamente en agua tanto fría como caliente y tiene ciertas ventajas como no aportar calorías en formulaciones de alimentos, lo convierte en un ingrediente adecuado para desarrollar alimentos dietéticos (Bayarri, González y Costell, 2009).

Otra ventaja del uso de la CM es que su dosis máxima de adición a alimentos es de acuerdo a las Buenas Prácticas de Fabricación, es decir que la cantidad de aditivo que se añada al alimento se limitará a la dosis mínima necesaria para obtener el efecto deseado y el aditivo será de una calidad alimentaria apropiada y se preparará y manipulará de la misma forma que un ingrediente alimentario (FAO/OMS, 2015).

## **2.7 Métodos de caracterización**

A continuación se describen las técnicas usadas para caracterizar las nanopartículas del complejo de carboximetilcelulosa con ácido fólico tanto estructural como morfológicamente.

### **2.7.1 Prueba cualitativa de solubilidad**

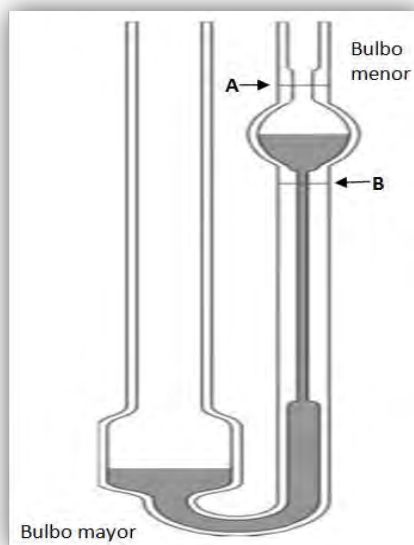
La solubilidad de una sustancia orgánica en diversos disolventes es un fundamento del método de análisis cualitativo orgánico desarrollado por Kamm, este método se basa en que una sustancia es más soluble en un disolvente cuando sus estructuras están íntimamente relacionadas. Cuando un compuesto (solute) se diluye en un disolvente, sus moléculas se separan y quedan rodeadas por las moléculas del disolvente (solvatación). También se considera que hay disolución cuando 0.05 g de la sustancia sólida o 0.1 ml de la sustancia líquida forman una fase homogénea a temperatura ambiente con 3 ml de disolvente (Burriel *et al.*, 2008).

### **2.7.2 Viscosimetría de polímeros en solución**

Los polímeros son macromoléculas formadas por la repetición de entidades estructurales denominadas monómeros, los cuales forman cadenas de diferente longitud. En virtud de lo anterior, para los polímeros solo es posible determinar un

peso molecular promedio, es decir, un peso estadístico relativo a todas las moléculas presentes en la muestra. Por lo tanto, una manera de llevar a cabo la dicha medición es a través de la viscosimetría del polímero en solución (Gartner y López, 2010).

El instrumento más sencillo para medir la viscosidad de un polímero es el viscosímetro de Ostwald debido a que permite un cálculo rápido (aunque no de máxima precisión) de la viscosidad relativa de un líquido midiendo el tiempo que un mismo volumen de dos líquidos distintos (polímero y solvente) tarda en pasar de la marca A a la marca B, como se muestra en la Figura 3. Dicha mediación se realiza llenando el bulbo mayor con el solvente usado para disolver el polímero de interés y se aspira por el capilar hasta sobrepasar el bulbo menor en la parte superior del viscosímetro, procurando no introducir burbujas de aire. Después, se deja caer el solvente y cuando llega a la marca A, se cuenta el tiempo que tarda en pasar hasta la marca B (Figura 4). El procedimiento se repite de 3 a 5 veces y se calcula el valor promedio de los tiempos obtenidos en cada medición. De igual manera se repite el procedimiento anteriormente descrito con la solución que contiene el polímero de interés y cuya viscosidad se desea conocer, obteniéndose el tiempo promedio tras las mediciones (Mondal *et al.*, 2016).



**Figura 4. Esquema de un viscosímetro de Ostwald.**

Una vez determinado los tiempos promedio tanto para el solvente como para el polímero, se calcula la viscosidad relativa donde  $\eta$  es la viscosidad de la solución de polímero y  $\eta_0$  es la viscosidad del disolvente puro; además  $t$  es el tiempo que tarda el polímero en pasar a través del viscosímetro. Después se puede determinar la viscosidad específica, la cual es necesaria para conocer la viscosidad reducida, dado que dicha medición se relaciona con la habilidad de un polímero para aumentar la viscosidad de un disolvente. Finalmente, la viscosidad intrínseca se obtiene de manera experimental emplean los términos de la tabla 1 de acuerdo a Barai *et al.*, 1997:

**Tabla 1. Fórmulas para calcular las diferentes viscosidades de un polímero en solución**

Viscosidades	Ecuación	Definición
<b>Viscosidad relativa</b>	$rel = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0}$	Relación entre las viscosidades de la disolución y el solvente puro.
<b>Viscosidad específica</b>	$esp = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = rel - 1$	Es la variación relativa de la viscosidad de la disolución.
<b>Viscosidad reducida</b>	$red = \frac{esp}{[c]}$	Es la variación relativa de la viscosidad por unidad de concentración de polímero.
<b>Viscosidad intrínseca</b>	$[ ] = \lim_{c \rightarrow 0} esp / c$	Es el valor de la viscosidad extrapolada a una dilución infinita, donde la concentración tiende a cero.

El peso molecular viscosimétrico se puede calcular utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) ecuación 1, donde  $M$  es el peso molecular viscosimétrico promedio y  $K$  junto con  $\alpha$  son constantes para un sistema dado polímero/ disolvente/temperatura (Barai *et al.*, 1997).

---

---

$$\text{Ec. 1. } [\eta] = KM^\alpha$$

Se puede calcular el peso molecular si se conocen los valores de K y  $\alpha$  para un conjunto de condiciones particulares empleando la ecuación 2:

$$\text{Ec. 2 } M = \left(\frac{[\eta]}{K}\right)^{\frac{1}{\alpha}}$$

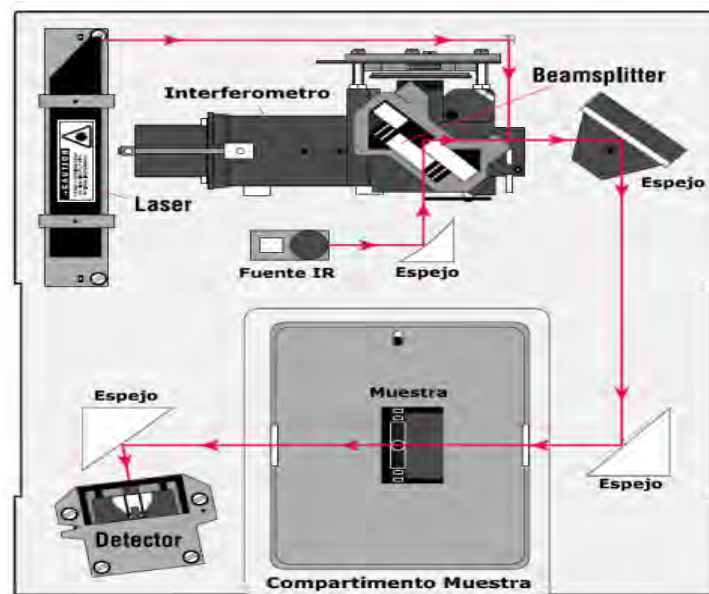
Se grafica la viscosidad relativa vs concentración y la recta se extrapola hacia la concentración igual a cero para hallar  $[\eta]$  o viscosidad intrínseca; la ordenada en el origen de la recta resultante es  $[\eta]$  y se sustituye en la ecuación 2. Para la carboximetilcelulosa, se reportan el valor de “K” y “ $\alpha$ ” como  $37 \times 10^{-5}$  dl/g y 0.61 a 35 °C respectivamente, utilizando como disolvente agua destilada (Barai *et al.*, 1997).

### 2.7.3 Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía de adsorción infrarroja (IR) recibe su nombre de la región del espectro electromagnético implicada y puede usarse para identificar un compuesto e investigar la composición de una muestra. La región infrarroja del espectro electromagnético se encuentra entre  $12,800 - 10 \text{ cm}^{-1}$ . Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los instrumentos se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR) que abarca de  $12,800 - 4,000 \text{ cm}^{-1}$ , IR medio:  $4,000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales y el IR lejano que va de los  $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$ . Para que ocurra la absorción en el infrarrojo, las vibraciones moleculares deben producir un cambio en el momento dipolar del enlace, es decir, mientras más polar sea el enlace será mayor la intensidad de su absorción y viceversa. Cada enlace diferente que cubra estas características dará lugar a una o varias señales en el infrarrojo y la posición de la absorción depende del tipo de átomos que forman el enlace, de la fuerza de éste y del cambio ocurrido (estiramiento o deformación) (Skoog y Leary, 1995).



La espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier utiliza un interferómetro para medir un espectro, como se muestra en la Figura 5, donde la luz infrarroja va desde la fuente incandescente hasta un separador de luz luminoso, parte de la luz atraviesa el separador y parte es reflejada. La luz reflejada incide sobre un espejo estacionario, mientras que la transmitida incide sobre un espejo que se mueve a velocidad constante. Un algoritmo computacional estándar llamado transformada de Fourier, convierte el dominio de tiempo en el espectro de dominio de frecuencia, el cual permite ver la intensidad de la absorción como una función de la frecuencia o de longitud de onda (Rouessac y Rouessac, 2004).



**Figura 5. Esquema de un espectrómetro IR con transformada de Fourier.**

#### **2.7.4 Microscopía óptica (MO)**

El microscopio óptico es un instrumento que permite observar objetos no perceptibles a simple vista. Esto se logra mediante un sistema óptico compuesto por lentes, que forman y amplifican la imagen del objeto en observación. El microscopio compuesto consta de tres partes: la parte mecánica, la óptica y el sistema de iluminación. La parte mecánica tiene la finalidad de sostener la preparación a examinar y soportar todo el sistema óptico del microscopio. Mientras

que la parte óptica está formada por dos sistemas de lentes convergentes centradas sobre un eje óptico, denominados objetivos (lentes próximos a la muestra) lo cuales tienen un aumento que varía entre 4x a 45x y oculares (se encuentran en la parte superior del microscopio). Por último, el sistema de iluminación facilita y mejora la observación microscópica de la muestra (Sperling, 2006).

### **2.7.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB) con detector de energía dispersiva (EDS)**

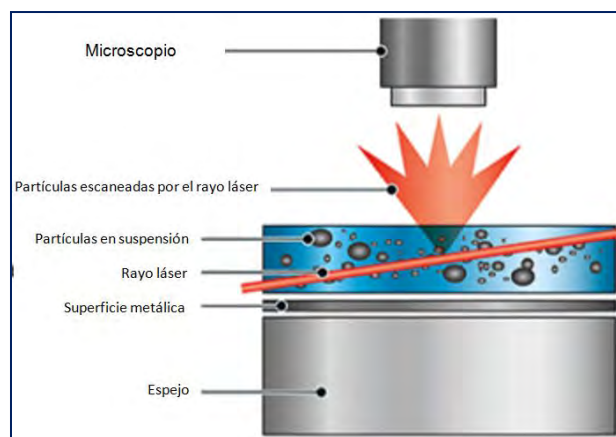
Esta técnica constituye una de las más empleadas para el análisis de superficies, gracias a que proporciona una imagen visual tridimensional. Las imágenes de un microscopio electrónico se obtienen mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales resultantes de las interacciones entre un haz de electrones de alta energía con la materia. Dicho microscopio constan de un cañón electrónico en una columna de alto vacío, del orden de 10<sup>-5</sup> mm de Hg, en la cual se genera un haz de electrones de alta energía (5 - 30 kV). Cuenta con detectores que registran las señales originadas por la interacción entre el haz de electrones y la muestra, que son procesadas y la imagen se obtiene a partir de las señales emitidas por la muestra y se va formando a medida que el haz de electrones se desplaza sobre una porción de su superficie, es decir, el barrido se realiza línea por línea sobre una pequeña zona de forma rectangular. Esta zona es visualizada en el sistema final de observación (computadora). A diferencia de una imagen óptica, el microscopio electrónico de barrido no forma una imagen real del objeto sino que construye una imagen virtual a partir de alguna de las señales emitidas por la muestra (Sperling, 2006).

El microscopio electrónico de barrido en ocasiones se encuentra equipado con diversos detectores, entre los que se menciona al detector de energía dispersiva (EDS), el cual permite coleccionar los rayos X característicos emitidos por la muestra y son detectados por un sistema que produce pulsos de altura proporcional a la energía de cada fotón incidente. Estos pulsos electrónicos son luego procesados por un analizador multicanal y finalmente visualizados en un espectro que grafica la cantidad de pulsos en función de la energía característica

de cada pulso. De esta manera, con el sistema dispersivo en energía, se pueden identificar rápidamente los elementos presentes en una muestra si su concentración es superior al 1 %. El sistema EDS tiene una mejor eficiencia de colección de fotones X, permite la colección simultánea de todos los elementos presentes y es muy fácil de adaptar a un microscopio electrónico de barrido (Goldstein *et al.*, 2007).

### 2.7.6 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

El análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) emplea tanto las propiedades de dispersión de luz como de movimiento browniano para obtener el tamaño promedio y la distribución de los tamaños que presentan las partículas en muestras que se encuentran en suspensión. En la Figura 6 se muestra como un rayo láser pasa a través de la cámara donde se coloca la muestra y las partículas en suspensión dispersan la luz de tal manera que pueden observarse a través de un microscopio de 20 aumentos a una distancia de trabajo lejana, en el que está montada una cámara de video. La cámara captura un archivo de video de las partículas en estado de movimiento browniano. El software de análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) realiza un seguimiento de muchas partículas individualmente y utiliza la ecuación Stokes-Einstein para calcular sus diámetros hidrodinámicos. Para lo cual se emplean equipos *NanoSight* que proporcionan mediciones de alta resolución del tamaño, la concentración y agregación de las partículas.



**Figura 6. Instrumento de Nanosight.**

### **2.7.7 Eficiencia de encapsulado por espectroscopía UV-Vis**

La espectroscopía UV-Vis se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética, en el rango de longitudes de onda del ultravioleta (380-200nm) y visible (780-380nm), que puede absorber o transmitir un analito en función de la cantidad presente del mismo en una muestra. La absorción de esta radiación se debe a la transición de los electrones más externos de los átomos de las moléculas, desde niveles fundamentales a niveles más altos de energía. La proporcionalidad entre la intensidad de luz absorbida o transmitida y la concentración del analito viene definida por la ley de Lambert-Beer. La medición de la absorbancia se lleva a cabo con la ayuda de un espectrofotómetro, que en esencia consta de un monocromador (prisma o red de difracción) que controla la longitud de onda de la radiación que se hace incidir sobre la muestra, de un sistema óptico que recibe la luz transmitida por la muestra, la focaliza y selecciona por longitudes de onda y un detector que recibe la señal de la intensidad de la luz transmitida a cada longitud de onda y la transforma en señal eléctrica que un ordenador pueda procesar. La absorbancia de la muestra se compara con la de una "referencia" que consta estrictamente de disolvente usado (Misra y Dubinskii, 2002).

### **2.7.8 Termogravimetría**

El análisis termogravimétrico se emplea para el estudio de las reacciones primarias en la descomposición de materiales sólidos y líquidos. Con la termogravimetría se analizan procesos de desorción, adsorción y reacciones de descomposición en un ambiente de gas inerte o en presencia de oxígeno. Dicho análisis consiste en registrar continuamente la variación de la masa del material en estudio conforme varía la temperatura a una tasa térmica constante (cambio de temperatura lineal). Como resultado del análisis termogravimétrico se obtienen los datos de cambio de masa con respecto a la temperatura y se obtiene un termograma, el cual es la representación gráfica de las variaciones porcentuales de la masa del material analizado (Rodríguez y Villegas, 2012).

### **2.7.9 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) es una técnica experimental dinámica que mide los cambios de energía de un material, es decir, permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado o al calentarse o enfriarse a velocidad constante en un determinado intervalo de temperatura. Este análisis consiste en calentar una muestra y un compuesto de referencia de tal manera que la temperatura es en todo momento igual en ambos. Esto se consigue midiendo las temperaturas con sensores y ajustando las potencias de calentamiento. Se aplican velocidades de calentamiento uniformes a la muestra y a la referencia para realizar el barrido de temperaturas. La representación de la potencia de calentamiento frente a la temperatura es lo que se denomina diagrama o curva DSC y normalmente en una calorimetría de caracterización de un polímero se registran cuatro barridos, de los cuales tres son de calentamiento y uno de enfriamiento. En el primer calentamiento realizado a 20°C/min, se obtiene información acerca de la fusión de la muestra y por tanto sobre el grado de cristalinidad inicial. La presencia a altas temperaturas de discontinuidades en la línea base puede ser un indicio de descomposición que deberá ser corroborada mediante un análisis termogravimétrico. Después se realiza un segundo calentamiento de la muestra para verificar la fusión de la muestra cristalizada a partir del fundido y la reproducibilidad de las fusiones observadas. A continuación, se somete la muestra a un enfriamiento rápido con el fin de obtener el polímero en un estado amorfo. Finalmente, se efectúa un tercer calentamiento que permite determinar la temperatura de transición vítrea del material, para observar si se produce una cristalización en frío (pico exotérmico) y la fusión asociada (pico endotérmico) (Suriñach *et al.*, 1992).

## CAPÍTULO III

### METODOLOGÍA y MATERIALES

#### 3.1 Parte experimental

##### 3.1.1 Reactivos y solventes

*Ácido fólico* (ácido pteroil-glutámico,  $C_{19}H_{19}N_7O_6$ ). Polvo de color amarillo con peso molecular de 441.4 g/mol y pureza de >97%. Producto de grado farmacéutico de la marca Sigma-Aldrich.

*Carboximetilcelulosa* (sal sódica de un éter policarboximetílico de la celulosa). Polvo granuloso blanco, higroscópico tras su desecación. Se dispersa en agua dando disoluciones coloidales, insoluble en acetona, etanol y tolueno. Producto de grado alimenticio de la marca QUIAL.

*Agua destilada*. Líquido incoloro, insípido con una pureza del 100%. Sustancia no tóxica que no produce daños a la salud. Producto de la marca Merck.

*Hexano* ( $C_6H_{14}$ ). Líquido incoloro volátil de olor característico. Causa irritación de la piel, ojos y puede ocasionar daño pulmonar al ser ingerido o inhalado. Producto de la marca J.T. Baker.

*Span 80* (sorbitán de monooleato,  $C_{24}H_{44}O_6$ ). Líquido viscoso de color amarillo empleado como surfactante no iónico. Presenta una composición lipídica formada por ácido oleico (<60%). Producto de grado farmacéutico de la marca Sigma-Aldrich.

*Metanol* (alcohol metílico,  $CH_3OH$ ). Líquido incoloro de olor característico. Tóxico por inhalación, ingestión o absorción de la piel. Producto de la marca Merck.

*Dimetilsulfóxido* ( $(CH_3)_2SO$ ). Líquido incoloro e higroscópico. Se absorbe por inhalación del aerosol a través de la piel y por ingestión. Producto de grado farmacéutico de la marca Sigma-Aldrich.

*Ácido acético* (ácido acético glacial,  $C_2H_4O_2$ ). Líquido incoloro de olor acre, reacciona violentamente con oxidantes originando peligro de incendio y explosión. Sustancia corrosiva para los ojos, piel y tracto respiratorio. Producto de la marca Merck.

*Alcohol isopropílico* (2-propanol, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O). Líquido transparente e incoloro de olor característico. Fácilmente inflamable, irrita los ojos y la inhalación de vapores puede provocar somnolencia y vértigo. Producto de la marca J.T. Baker.

*Etanol* (alcohol etílico, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O). Líquido incoloro, volátil de olor característico y sabor picante. Produce irritación de ojos y tracto respiratorio. Producto de la marca J.T. Baker.

### **3.1.2 Preparación del complejo de carboximetilcelulosa sódica con ácido fólico (CMC-AF)**

Se prepararon tres soluciones con diferentes concentraciones de ácido fólico (AF) (0.005, 0.015 y 0.030 mg/ml, nombradas como solución I, II y III) utilizando como solvente agua destilada bajo agitación constante a temperatura ambiente (25 °C) y en condiciones de oscuridad. Posteriormente se añadió a cada una de las soluciones de AF, una solución de carboximetilcelulosa al 1% (p/v, 1:1) por goteo. Cada solución preparada se dejó bajo agitación a 600 rpm durante 48 h a 25 °C y en condiciones de oscuridad.

## **3.2 Obtención de nanopartículas de CMC-AF**

### **3.2.1 *Spray drying* (secado por aspersion)**

La obtención de nanopartículas a partir del complejo de CMC-AF formado se realizó utilizando el equipo *Nano Spray Dryer* B-90 de la marca B C H (Figura 7) y las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Se trabajó a una temperatura interna de 100 °C con 33 bares de presión y una temperatura de salida de 46 °C.
- El microfiltro o caperuza utilizada fue de 7 µm.
- La capacidad evaporativa empleada fue de 0.5 ml/min y un porcentaje de la velocidad de atomización del 97%.

Cada una de las soluciones se emplearon con una concentración de 0.5% (v/v) y una viscosidad de 3.3 centipoise (cP) medida con el viscosímetro de

Brookfield. Después se filtró cada muestra usando papel filtro Whatman de 25, 11, 8 y 2.5  $\mu\text{m}$  (dos veces con cada uno).



**Figura 7. Equipo *NanoSpray Dryer B-90*.**

### **3.2.2 Nanoemulsión inversa**

Para la formación de nanopartículas a través de nanoemulsión inversa, se utilizó como fase continua u oleosa 50 ml de hexano al cual se le añadió, por goteo, 0.12 ml de Span 80 a temperatura ambiente (25 °C) bajo agitación constante (600 rpm). Después se agregaron 50 ml del complejo de CMC-AF en solución con diferente contenido de ácido fólico, es decir, se prepararon tres nanoemulsiones inversas diferentes con las soluciones I, II y III, como se muestra en la tabla 2; todos los procedimientos se realizaron en condiciones de oscuridad.

Enseguida para las tres nanoemulsiones inversas (con diferente contenido de ácido fólico) se elevó la temperatura de cada sistema de  $25 \pm 2$  °C a  $55 \pm 2$  °C en un lapso de 15 min, al llegar a la temperatura deseada, se llevó a cabo la emulsificación durante 3 h y una vez transcurrido ese tiempo, cada emulsión se



dejó enfriar lentamente en condiciones ambientales. Posteriormente, se realizó un lavado con metanol para precipitar las nanopartículas formadas en cada una de las muestras. Luego se decantó la mayor parte del solvente para dejar evaporar el resto dentro de la campana de flujo laminar y finalmente, cada muestra se colocó en estufa al vacío a 80 °C durante 12 h.

**Tabla 2. Formulación de las emulsiones inversas**

Fase	Reactivo	Volumen (ml)	Peso (g)	Peso (%)
<b>Continua</b>	Hexano	50	33.65	39.75
	Span 80	0.12	0.5001	0.59
<b>Discontinua</b>	CMC-AF(I)	50	0.50025	0.59-0.61
	CMC-AF (II)	50	0.50075	
	CMC-AF (III)	50	0.5015	
	Agua destilada	50	49.992	59.05

### 3.3 Técnicas de caracterización

#### 3.3.1 Prueba cualitativa de solubilidad

Se realizó una prueba de solubilidad cualitativa del ácido fólico en diferentes disolventes dimetilsulfóxido (DMSO), ácido acético, agua destilada, etanol y alcohol isopropílico. Se adicionaron aproximadamente 0.1 g de ácido fólico en 3 ml de cada uno de los disolventes durante 12 h y se observó si la sustancia se disuelve o no.

#### 3.3.2 Peso molecular por viscosimetría de Ostwald

Se determinó el peso molecular promedio de la carboximetilcelulosa mediante viscosidad intrínseca del biopolímero en solución, donde se empleó el viscosímetro capilar de Ostwald (Figura 8) y tres soluciones de carboximetilcelulosa de 0.3%, 0.6% y 0.12% (p/v) en NaOH 0.1 M (Mondal *et al.*, 2016).



**Figura 8. Viscosímetro de Ostwald.**

### **3.3.3 Caracterización del grado de injerto del ácido fólico**

La estructura química del complejo CMC-AF fue caracterizada por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier usando el equipo PERKIN ELMER Spectrum 400 FT-IR (Figura 9) con una lámpara de tungsteno en un rango de número de onda de  $4000-600\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 9. Equipo PERKIN ELMER Spectrum 400.**

### **3.3.4 Caracterización morfológica por análisis microscópico**

El análisis microscópico de las muestras que contienen las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por ambos métodos se realizó usando un microscopio óptico binocular de la marca VELAB (Figura 10) con un aumento de 40x.



**Figura 10. Microscopio óptico VELAB.**

### **3.3.5 Caracterización morfológica de las nanopartículas por microscopía electrónica de barrido con detector de energía dispersiva (EDS)**

Para estudiar la morfología de las nanopartículas obtenidas por ambos métodos se utilizó un microscopio electrónico de barrido de la marca JEOL modelo JSM 7600F de alta resolución (1nm), con una ampliación de hasta 1 voltaje de aceleración de 0.1-30 kV, equipado con un haz atenuante especial para muestras no conductoras. Además está provisto con un microanalizador de energía dispersiva de rayos X (Figura 11) para determinar la composición química de la muestra.



**Figura 11. Equipo MEB JEOL JSM 7600F.**

### **3.3.6 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)**

El tamaño y distribución de las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por ambos métodos se determinaron mediante análisis de rastreo de partículas (NTA) para lo cual se utilizó un equipo *NanoSight (nanoparticle analysis system)* modelo LM20, como se muestra en la Figura 12. Los resultados obtenidos se analizaron con el software de análisis propio del equipo (*Nanoparticle Tracking Analysis software*, versión 2.2) y la configuración del equipo para dicho análisis fue el siguiente: Fotogramas procesados: 899 de 900. Fotogramas por segundo: 30. Calibración: 166 nm/pixel. Desenfoque automático: Auto. Umbral de detección: 4 Multi. Tamaño mínimo esperado: Auto. Tamaño mínimo de seguimiento: 100 nm. Temperatura: 22 °C. Viscosidad: 0.95 cP.



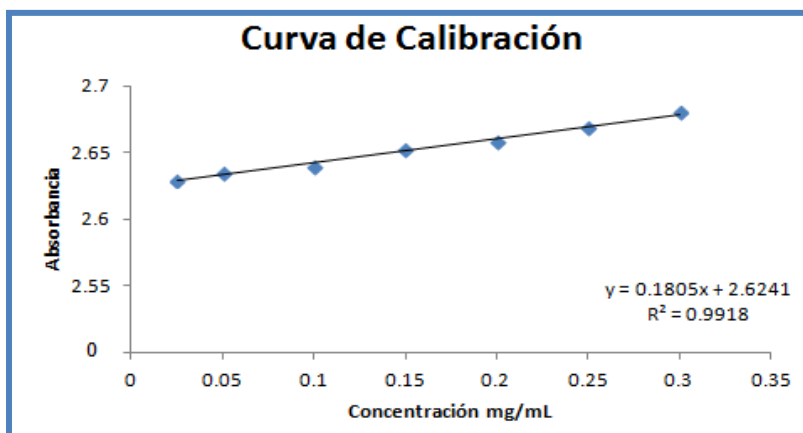
**Figura 12. Equipo *NanoSight* LM20.**

### **3.3.7 Determinación de la eficiencia de encapsulación por espectrometría UV-Vis**

El ácido fólico contenido en las nanopartículas obtenidas tanto por *spray drying* como por emulsión inversa, se cuantificó midiendo la absorbancia de la vitamina B9 a 280 nm usando un espectrofotómetro (UV-Vis Spectrophotometer VELAB, Figura 13). Previamente se elaboró una curva de calibración a partir de una solución patrón de ácido fólico (Figura 14), realizando diluciones consecutivas en el rango de 0.02 – 0.3 mg/ml en NaOH 0.1 M y midiendo se respectiva absorbancia en el equipo mencionado como se muestra en la tabla 3.



**Figura 13. Espectrofotómetro UV-Vis VELAB.**



**Figura 14. Curva de calibración de ácido fólico.**

**Tabla 3. Concentración de AF con su respectiva absorbancia**

Concentración (mg/ml)	Abs. (nm)
0.02	2.629
0.05	2.635
0.10	2.640
0.15	2.652
0.20	2.658
0.25	2.669
0.30	2.680

El proceso de extracción de AF consistió en pesar 50 mg de nanopartículas y después se disolvió en 10 ml de agua destilada. Luego se colocó en baño ultrasónico durante 10 min para posteriormente cuantificar el contenido de ácido fólico mediante espectrometría ultravioleta-visible.

Para la determinación del AF encontrado, se pesaron 50 mg de nanopartículas obtenidas mediante los dos diferentes métodos anteriormente descritos y tras haber aplicado el método de extracción, se analizó por espectrometría UV-Vis y se calculó el porcentaje de eficiencia de encapsulación

aplicando la **ecuación 3**. Se realizaron 3 réplicas para cada tratamiento y la ecuación obtenida de la curva de calibración fue  $y=1.8051x + 2.6241$ ,  $R^2= 0.9918$ .

La eficiencia de encapsulación se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Ec. 3} \quad \%EE = \frac{\text{mg AF encontrado}}{\text{mg de AF teórico}} \times 100$$

### 3.3.8 Análisis térmico

La determinación del comportamiento térmico de las nanopartículas obtenidas se realizó mediante el análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) de manera simultánea. Se empleó el equipo NETZSCH modelo STA 449 F3 (Figura 15). Para cada una de las muestras se pesó entre 3.2-3.5 mg y fueron colocadas en el equipo en crisoles de aluminio, dichas muestras fueron calentadas de 25 °C hasta 600 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C min<sup>-1</sup> en una atmósfera inerte de nitrógeno gaseoso (10 ml min<sup>-1</sup>).



**Figura 15. Equipo NETZSCH STA 449F3.**

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

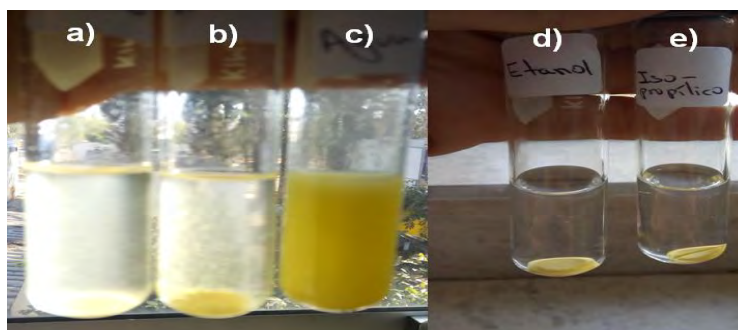
Se analizó el método empleado por **Movagharneshad y Moghadam** en el 2016, para alargar las cadenas del polímero de carboximetilcelulosa e incorporar tanto ácido fólico como un quimiofármaco (doxorrubicina) a través de la formación de un copolímero mediante enlaces amida para lo cual usaron dimetilsulfóxido como disolvente. Por lo mencionado anteriormente, en el presente trabajo se llevó a cabo una reacción directa entre la carboximetilcelulosa (CMC) y ácido fólico (AF) sin utilizar un compuesto intermediario, para obtener un complejo de CMC-AF usando un solvente no tóxico como el agua destilada.

#### 4.1 Prueba de solubilidad de ácido fólico (cualitativa)

La prueba de solubilidad cualitativa se realizó con la finalidad de seleccionar un solvente común con el que se llevó a cabo la reacción directa entre la CMC y AF. En la Figura 16, se muestra los diferentes disolventes (dimetilsulfóxido, ácido acético, agua destilada, etanol y acetona) usados para observar si el ácido fólico se disolvía por completo, en cada uno de ellos, durante 12 h a temperatura ambiente. En la Figura 16a se muestra el sistema usado donde se observó que el ácido fólico es moderadamente soluble en DMSO y poco soluble en ácido acético (Figura 16b). Mientras que en agua destilada se apreció una mayor solubilidad del ácido fólico (Figura 16c) en comparación con los otros solventes mencionados. Por otro lado, en la Figura 16a se observó que el ácido fólico es insoluble en etanol y en acetona (Figura 16b).

De acuerdo con la literatura, el ácido fólico es insoluble en alcoholes y poco soluble en agua, aumentando su solubilidad en soluciones ligeramente alcalinas; por lo cual, se optó por emplear agua destilada como solvente dado que la carboximetilcelulosa en solución tiene un pH ligeramente alcalino, de acuerdo a lo reportado por *Younis et al.* en el 2009, lo cual incrementa la solubilidad del ácido fólico.





**Figura 16. Prueba cualitativa de solubilidad del AF por 12 h en: a) DMSO, b) ácido acético, c) agua destilada, d) etanol y e) alcohol isopropílico**

#### 4.2 Peso molecular por viscosimetría de Ostwald

Para determinar el peso molecular promedio de la CMC se empleó el viscosímetro capilar de Ostwald y tres soluciones de carboximetilcelulosa de 0.3%, 0.6% y 0.12% (p/v) en NaOH 0.1 M, de acuerdo al procedimiento reportado por Mondal *et al.*, en el 2016. Empleando las fórmulas mencionadas en la tabla 1 del apartado 2.7.1, se muestran los resultados obtenidos en la tabla 4:

**Tabla 4. Viscosidades de las diferentes soluciones de carboximetilcelulosa**

Solución	Concentración (p/v%)	Tiempo promedio (s)	Viscosidad		
			Relativa (rel)	Específica (esp)	Reducida (red)
<b>Solvente</b>	-	67	-	-	-
<b>1</b>	0.03	221	3.2985	2.2985	0.766
<b>2</b>	0.06	347	5.1791	4.1791	0.696
<b>3</b>	0.125	451	6.7313	5.7313	0.477

En la Figura 17, se muestran los resultados obtenidos para calcular el peso molecular empleando la ecuación 2 del apartado 2.7.1, dando como resultado por extrapolación un peso molecular promedio de **335,115 g/mol**, el resultado obtenido corresponde a un polímero de peso molecular alto.

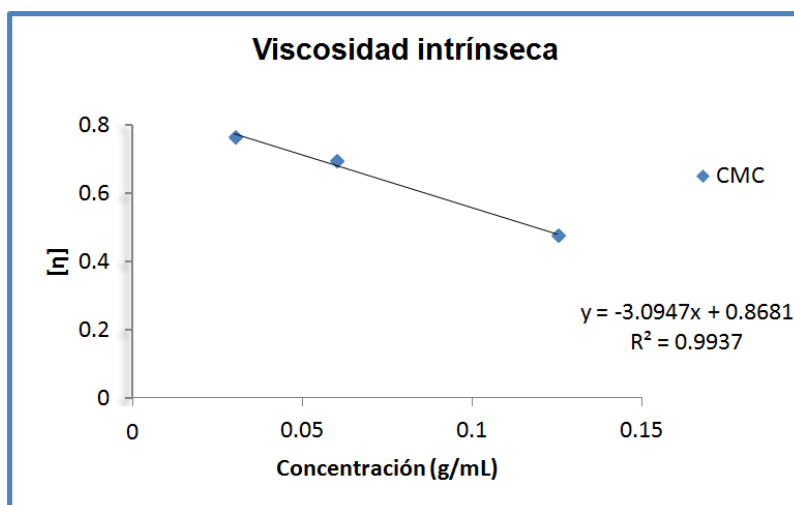


Figura 17. Gráfico de la viscosidad intrínseca de la CMC.

#### 4.3 Reacción directa entre carboximetilcelulosa y ácido fólico

En el 2016 Zhengyu *et al.*, lograron encapsular ácido fólico empleando carboximetil quitosano por autoensamblaje, debido a que la reacción entre ambos, se llevó a cabo en presencia de un agente activante de grupos carboxílicos del AF para formar un enlace amida con el grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) de cada unidad de anhidroglucosa del quitosano. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone que la reacción entre la CMC y el ácido fólico podría llevarse a cabo mediante dos mecanismos diferentes, como se muestra en la Figura 18:

a) El grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) del anillo de pterina que forma parte de la estructura química del ácido fólico podría unirse a los grupos OH presentes en los grupos carboximetílicos del biopolímero a través de un enlace amida.

b) El ácido fólico (añadido en diferentes concentraciones) será injertado a la CMC mediante una reacción de condensación entre el grupo H del resto de ácido glutámico que forma parte de la estructura química del AF y los grupos OH presentes en las unidades de anhidroglucosa de la CMC con la consiguiente formación de una molécula de agua, bajo condiciones de oscuridad.

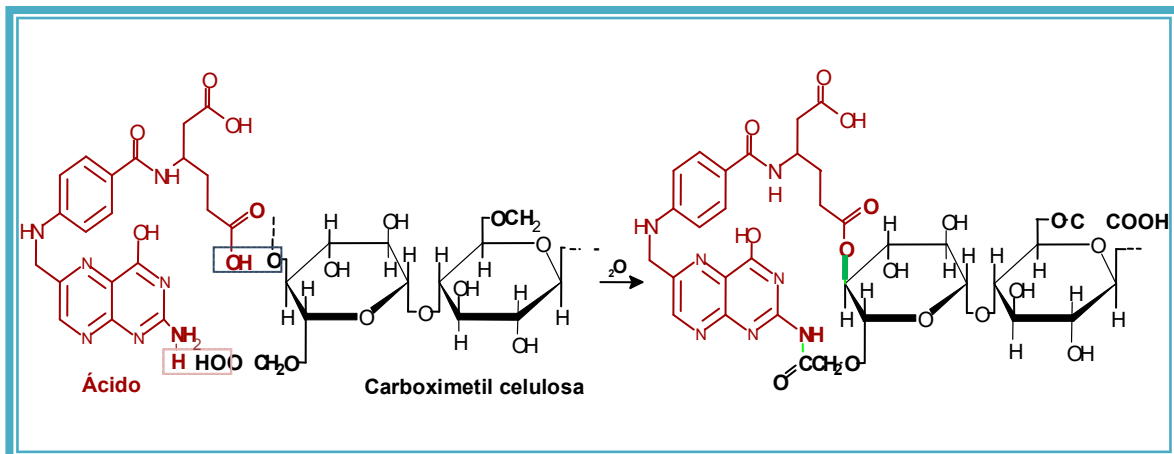


Figura 18. Esquema de la reacción propuesta entre CMC y AF.

En la Figura 19 se muestra el sistema empleado para llevar a cabo la reacción entre la carboximetilcelulosa y el ácido fólico en condiciones de oscuridad para favorecer la reacción:

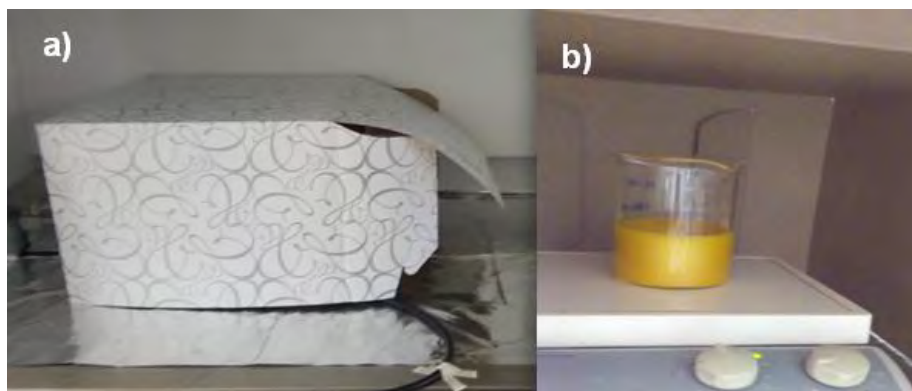
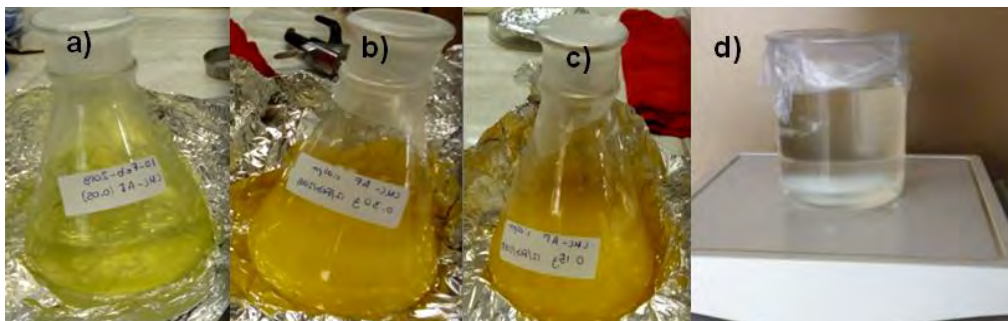


Figura 19. Reacción entre la carboximetilcelulosa y ácido fólico: a) sistema en condiciones de oscuridad y b) complejo CMC-AF en solución.

#### 4.4 *Spray drying* (secado por aspersión)

Se colocaron 100 ml de cada solución de CMC-AF al 0.5% (v/v) como se muestra en la Figura 20, en diferentes sesiones en el equipo de *Nanospray dryer*. Después se obtuvo, de cada muestra, un polvo amarillento en el cilindro colector electrostático después de 3 h y 30 min de funcionamiento.



**Figura 20. Soluciones de CMC-AF: a) Sln. I (0.005 mg/ml de AF), b) Sln. II (0.15 mg/ml de AF), c) Sln. III (0.30 mg/ml de AF) y d) muestra representativa de cada solución al 0.5% (v/v).**

Se destaca que la cantidad obtenida de la solución I y II del complejo CMC-AF fue apenas perceptible en el cilindro recolector. Mientras que para la solución III, la de mayor contenido de ácido fólico, se obtuvo como producto final 250 mg de un polvo amarillento. Dado que no existen reportes del uso de este equipo para encapsular específicamente AF empleando CMC como matriz se calculó el rendimiento de producción, con lo cual se puede evaluar la eficiencia del proceso.

#### 4.4.1 Rendimiento de producción por *spray drying*

Para obtener el rendimiento de producción de las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por *Spray drying* se empleó la ecuación reportada por Su *et al.* en el 2008:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{(\text{peso de las nanopartículas obtenidas por } \textit{spray-drying})}{(\text{peso total teórico})} (100)$$

**Tabla 5. Rendimiento de producción del complejo CMC-AF con el mayor contenido de ácido fólico nombrado como solución III**

Muestra	Cantidad teórica (g)	Peso obtenido (g)	Rendimiento (%)
Sln. III	0.0627	0.0250	39.8

Con base a los rendimientos obtenidos, se consideran inicialmente bajos. Sin embargo los rendimientos están directamente relacionados con las condiciones de operación en el equipo empleado y al tipo de material usado. En procesos de encapsulado utilizando *spray drying* se reportan resultados con rendimientos entre 35-80%, por lo cual se puede indicar que el rendimiento obtenido para el material en estudio, se encuentra dentro de los intervalos reportados por Su *et al.* (2008) quienes encapsularon el extracto de una planta medicinal (*Salvia miltiorrhiza*) usando como material encapsulante una mezcla de carboximetilcelulosa con gelatina mediante *spray drying*.

#### 4.5 Nanoemulsión inversa

Se llevaron a cabo tres emulsiones inversas con diferente contenido de ácido fólico, las cuales al añadir el surfactante se tornaron de un color blanco lechoso (Figura 21). Posteriormente, se realizó un lavado con metanol para precipitar las nanopartículas formadas, se decantó parte del solvente y se filtró cada muestra.



**Figura 21. Sistema empleado para emulsión inversa.**

##### 4.5.1 Rendimiento de producción por nanoemulsión inversa

Para calcular el rendimiento de producción de las nanopartículas de CMC-AF obtenidas mediante emulsión inversa, se utilizó la fórmula del apartado **4.4.1**.

**Tabla 6. Rendimiento de producción de las nanoemulsiones inversas**

<b>Código</b>	<b>Cantidad teórica (g)</b>	<b>Peso obtenido (g)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
EM-I	1.0005	0.9224	92.2
EM-II	1.0015	0.9370	93.5
EM-III	1.0030	0.9440	94.1

Se observa, que los rendimientos son altos para las tres concentraciones de ácido fólico, lo cual es una característica del método empleado. Se considera una emulsión de buen rendimiento si inmediatamente después de formarse da rendimientos del 95%, considerando si después de algunas semanas de almacenamiento inactivo es del 70-80% de acuerdo con Kosegarten *et al.*, en el 2012.

#### **4.6 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)**

##### **4.6.1 Solución del complejo de CMC-AF**

En la Figura 22, se muestra de forma comparativa los espectros infrarrojos obtenidos del ácido fólico, la carboximetilcelulosa pura y del complejo CMC-AF.

La Figura 22a exhibe las frecuencias de vibración características del **ácido fólico**; la vibración de tensión -OH muestra una amplia banda de absorción en la región de  $3,500-3,300\text{ cm}^{-1}$  debido a la acidez de la molécula aparece centrada a  $3,250\text{ cm}^{-1}$ . En esta misma región se observa un pico a  $3,525\text{ cm}^{-1}$  por la tensión del grupo hidroxilo (-OH) porque el compuesto puede formar interacciones de hidrogeno en la fase condensada. Así mismo, la amplia banda del -OH se sobrepone a las señales de la tensión de vibración del N-H, que como consecuencia de la vibración de tensión presenta dos picos a  $3,315$  y  $3245\text{ cm}^{-1}$ , usado el ultimo para describir a las aminas primarias, cuya presencia esta combinada a la señal de flexión a  $1592\text{ cm}^{-1}$ . También se muestra en  $1693\text{ cm}^{-1}$  y a  $1604\text{ cm}^{-1}$ , vibraciones de tensión características del grupo amida del ácido

glutámico y el enlace C=C aromático del ácido  $\rho$ -aminobenzoico, respectivamente.

En la tabla 7, se establecen las frecuencias que caracterizan al ácido fólico, reportadas por Hamed *et al.*, en el 2009 y las obtenidas de manera experimental.

**Tabla 7. Frecuencias del ácido fólico (v= tensión,  $\delta$ = deformación simétrica, as= asimétrica, s= simétrica)**

Grupo	Vibración	Posición aprox. (cm <sup>-1</sup> )	Frecuencia exp. (cm <sup>-1</sup> )
OH	v	3421-3415	3411
NH (amida I)	v	3230	3315
CH	v <sub>as</sub>	3106-2926	2933
CH	v <sub>s</sub>	2840	2850
C=O	v	1718	1690
COO <sup>-</sup>	v <sub>as</sub>	1569	1572
CH	$\delta$	1483-1413	1485
COO <sup>-</sup>	v <sub>s</sub>	1453-1337	1456
NH (amida II)	$\delta$	1528	1519
CC	v <sub>as</sub>	1323-1230	1326
CN	v	1106	1115
CC	v <sub>s</sub>	971	969
CC	$\delta$	765	763

En la Figura 22b, aparecen las señales de vibración de la **carboximetilcelulosa pura**. En la región de 3,600-3,000 cm<sup>-1</sup> se aprecia una banda muy ancha por la vibración del -OH, la cual es una tensión “normal” para polímeros que le son asignados un gran número de tensiones internas y externas para el grupo -OH. Se aprecia el impacto de la anchura de la banda sobre las señales cercanas a esta, como la fracción hidrocarbonada de la carboximetilcelulosa pura (la cual es menos pronunciada en referencia al ácido fólico). A 2,927 cm<sup>-1</sup> se observan señales poco pronunciadas por la tensión de los

grupos CH saturados del anillo de glucopiranososa, donde los picos a 1590 y 1409  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen al estiramiento asimétrico de los grupos carboximéticos ( $\text{COONa}$ ). Finalmente, a 1104 y 1058  $\text{cm}^{-1}$  se aprecian dos picos que representan la vibración asimétrica y simétrica del grupo éter (C-O-C unidades de anhidroglucosa).

En la tabla 8, se establecen las frecuencias que caracterizan al ácido fólico, reportadas por Chai e Isa en el 2013 y las obtenidas de manera experimental.

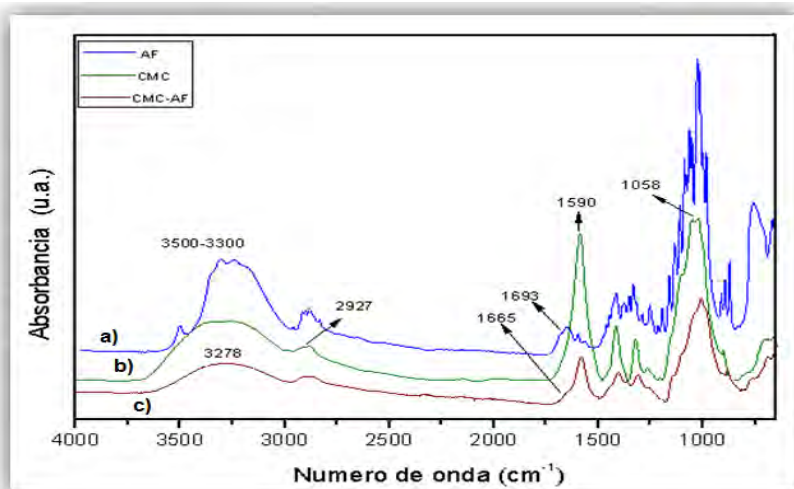
**Tabla 8. Frecuencias de la CMC (v= tensión,  $\delta$ = deformación simétrica, as= asimétrica, s= simétrica)**

Grupo	Vibración	Posición aprox. ( $\text{cm}^{-1}$ )	Frecuencia exp. ( $\text{cm}^{-1}$ )
OH	v	3428	3315
CH	$v_s$	2934-2900	2927
$\text{COO}^-$	v	1606	1590
$\text{COONa}$	v	1413	1409
C-O-C	$v_{as}$	1050	1058

La Figura 22c ilustra el complejo de CMC-AF, donde el componente mayoritario es la CMC y se observa más marcadamente en el espectro FTIR. Sin embargo, se aprecian ciertas modificaciones y señales, las cuales se deben a las tensiones que aporta el AF. En la región de 3,600-3,000  $\text{cm}^{-1}$  se aprecia una banda menos intensa en la vibración del -OH. Esto se acompañó de un desplazamiento de posición asociado al -OH (cambio de la distribución electrónica) lo cual se da por la interacción directa de los ácidos carboxílicos del AF con la CMC. Adicionalmente, a 1665  $\text{cm}^{-1}$  se observa un pequeño hombro, así como un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda con respecto a la CMC, lo cual se atribuye a la presencia de la vibración de deformación del grupo carbonilo (C=O) debida a fuertes interacciones, lo cual sugiere que dicha deformación, se deba a la formación de un grupo éster. Dicho resultado es similar

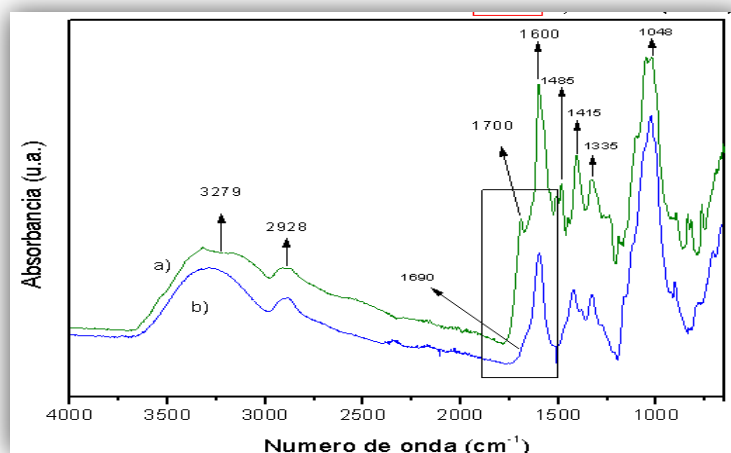


al obtenido por Borah *et al.* en el 2018, quienes confirmaron por FTIR la esterificación del ácido fólico en las cadenas ramificadas de amilopectina, mediante la activación de los grupos carboxílicos del AF con los grupos OH de las cadenas de la amilopectina, a través de la aparición de una nueva señal a  $1695\text{ cm}^{-1}$ , característico de los grupos éster.



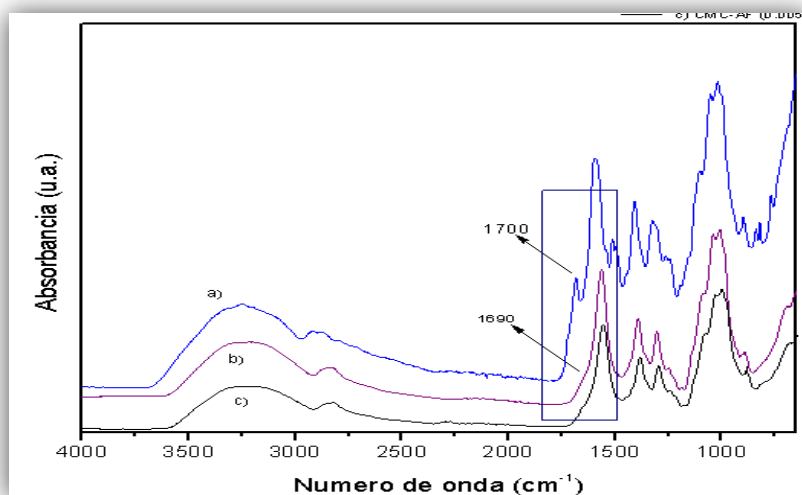
**Figura 22. Espectros infrarrojos de: a) ácido fólico, b) carboximetilcelulosa pura y c) complejo CMC-AF.**

En la Figura 23 se muestran los espectros obtenidos al llevarse a cabo la reacción entre la CMC y AF durante: a) 48 h y b) 36 h, donde se aprecia que al prolongarse el tiempo de reacción se dio lugar a la formación de un grupo éster, cuya señal se observa como un pico a  $1700\text{ cm}^{-1}$ ; con lo cual, se establece que la interacción entre la vitamina B9 y la carboximetilcelulosa se lleva a cabo mediante una reacción de condensación entre el grupo H del resto de ácido glutámico que forma parte de la estructura química del AF y los grupos OH presentes en las unidades de anhidroglucosa de la CMC.



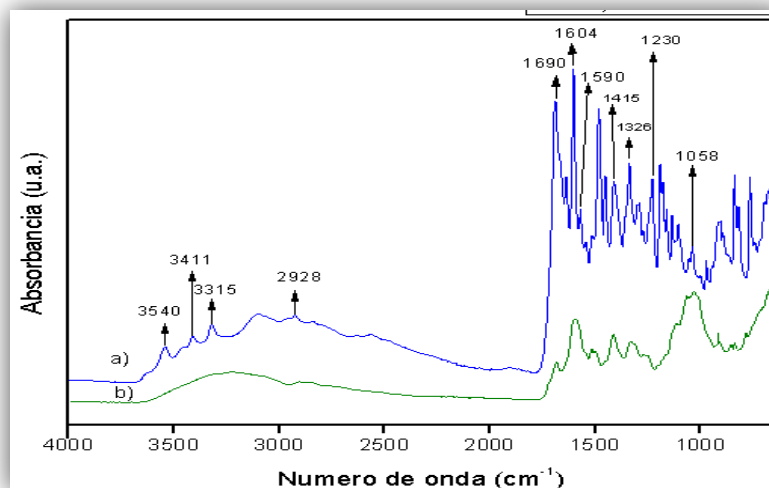
**Figura 23. Espectros de la reacción entre la CMC y el AF durante: a) 48 h y b) 36 h.**

En la Figura 24 se muestra la reacción entre la CMC y AF realizada durante 48 h y con diferentes concentraciones de vitamina B9: a) 0.005, b) 0.015 y c) 0.030 mg/ml, donde se observa que al incrementarse la cantidad de AF, se intensifica la frecuencia de vibración a  $1700\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un grupo éster.



**Figura 24. Espectros de la reacción entre CMC y AF con diferentes concentraciones de AF: a) 0.005, b) 0.015 y c) 0.030 mg/ml.**

En la Figura 25, se comparan los espectros obtenidos de: a) una mezcla de CMC con AF y b) complejo CMC-AF, con el objetivo de corroborar la interacción entre las materias prima. La Figura 25a muestra las señales de tensión obtenidas del análisis de la mezcla de CMC con AF, donde se aprecian las frecuencias de vibración correspondientes a los grupos hidroxilo (OH) de la CMC a  $3540\text{ cm}^{-1}$  y del AF a  $3411\text{ cm}^{-1}$  mientras que la vibración a  $3315\text{ cm}^{-1}$  se atribuye al grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) del anillo de pterina que forma parte de la estructura química del ácido fólico. En comparación con el espectro correspondiente al complejo CMC-AF, se observa una banda ancha de  $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$  indicativo de la interacción de los grupos OH a través de puentes de hidrógeno intra e intermolecular de la CMC; además de traslaparse la frecuencia vibracional característica de los grupos NH del AF. También, se demuestra la ausencia de la formación de un enlace éster entre la CMC y AF en la mezcla, debido a que las vibraciones de tensión a  $1690\text{ cm}^{-1}$  y  $1604\text{ cm}^{-1}$ , corresponden al grupo amida del ácido glutámico y al grupo carboxílico de la CMC.



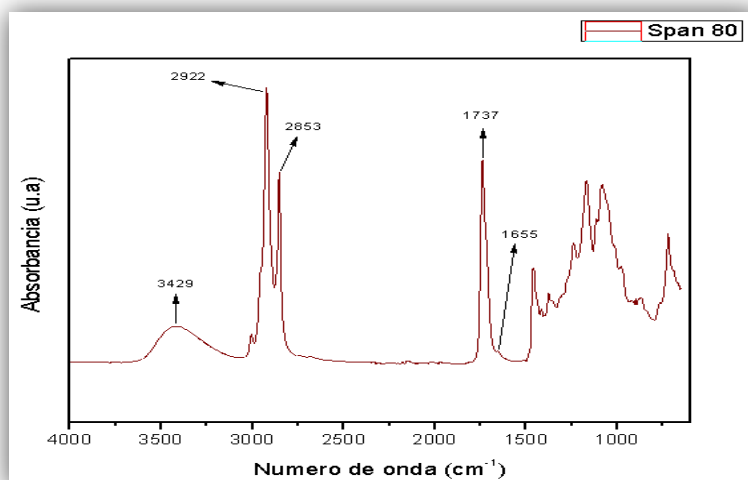
**Figura 25. Espectros infrarrojos de: a) Mezcla de CMC con AF y b) complejo CMC-AF.**

El complejo de CMC-AF en solución se obtuvo al prolongarse el tiempo de reacción a 48 h y en función de la concentración usada de AF, lo cual se corroboró por FTIR mediante la presencia de un grupo éster en la frecuencia  $1700\text{ cm}^{-1}$ .

Con respecto al enlace por los grupos amida, no se puede establecer claramente ya que la señal correspondiente a este se pudo ver traslapada por el enlace éster. Comparando el complejo obtenido mediante una reacción directa, con reportes de otros investigadores quienes usaron moléculas intermediarias para unir al AF, se difiere con respecto al enlace que predomina en sus polímeros. Zhengyu *et al.*, en el 2016 lograron injertar ácido fólico a la cadena de carboximetil quitosano a través de un enlace amida, lo cual identificaron por FTIR en la frecuencia de  $1640\text{ cm}^{-1}$ . También Movagharneshad y Moghadam, en el mismo año, obtuvieron un copolímero formado por la unión de carboximetilcelulosa con ácido fólico, usando como intermediario la hexametildiamina, a través de enlaces amida que de igual manera comprobaron por FTIR debido a la presencia de un pico en la frecuencia de  $1680\text{ cm}^{-1}$ .

#### **4.6.2 Nanoemulsión inversa**

En la Figura 26, se muestra el espectro del Span 80 (monooleato de sorbitán) donde se observa la banda de absorción a  $3403\text{ cm}^{-1}$  característica de los grupos hidroxilo, los cuales participan en la formación de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares. La banda de absorción ubicada a  $2922\text{ cm}^{-1}$  se debe a la vibración asimétrica C-H del  $\text{CH}_2$  incorporado a la cadena del agente tensioactivo. También se observa la señal del grupo carbonilo C=O localizada a  $1739\text{ cm}^{-1}$ . El estiramiento del enlace C=C a  $1654\text{ cm}^{-1}$  da lugar a una banda relativamente débil en el espectro IR debido a que este grupo funcional carece de un momento dipolar significativo.



**Figura 26. Espectro infrarrojo del Span 80.**

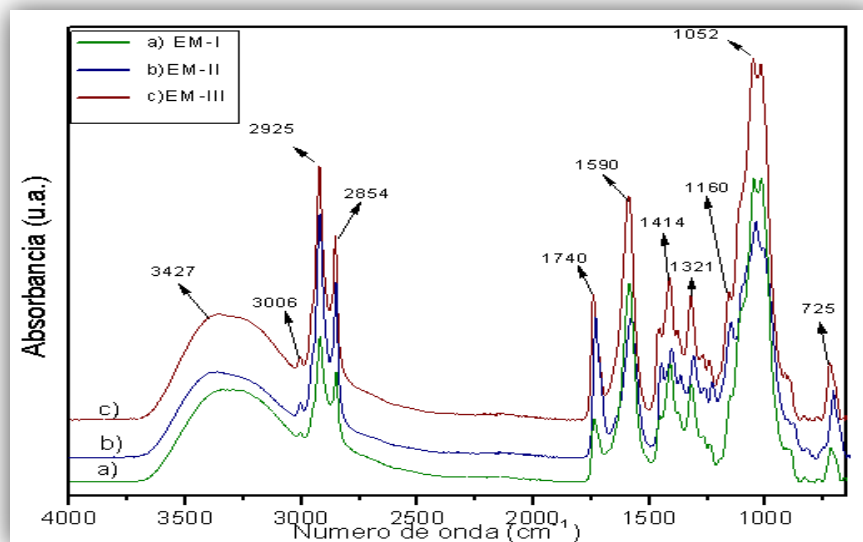
En la tabla 9, se establecen las frecuencias que caracterizan al Span 80 reportadas por Sateesh *et al.*, en el 2012 y las obtenidas de manera experimental.

**Tabla 9. Frecuencias del Span 80 (v= tensión, as= asimétrica, s= simétrica)**

Grupo	Vibración	Posición aprox. (cm <sup>-1</sup> )	Frecuencias exp., cm <sup>-1</sup>
O-H	v	3370±50	3403
CH <sub>2</sub>	v <sub>a</sub>	3000±50	2922
CH <sub>3</sub>	v <sub>s</sub>	2870-2840	2852
C=O	v	1785-1715	1739
C=C	v <sub>as</sub>	1680-1620	1654

En la Figura 27, se muestra de forma comparativa los espectros infrarrojo obtenidos de las emulsiones de CMC-AF (con diferente concentración de ácido fólico nombrados como EM-II, EM-II y EM-III), en donde se aprecia en cada espectro una banda ancha de 3427 a 3198 cm<sup>-1</sup> lo cual es un indicativo de que posiblemente el surfactante (Span 80) se encuentra interaccionando con el complejo CMC-AF a través de la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo (-OH) tanto del complejo como del surfactante. También se

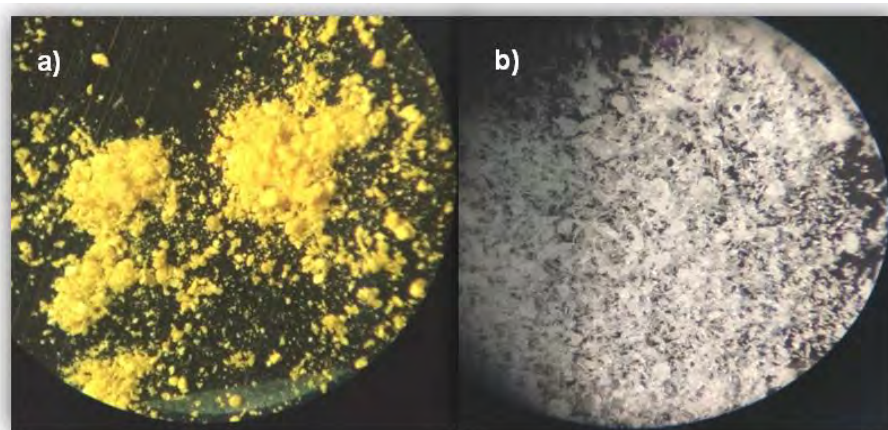
aprecia un recorrimiento del espectro característico de la tensión del anillo de la glucopiranososa de la CMC de  $2,927\text{ cm}^{-1}$  a  $2,925\text{ cm}^{-1}$ , por una acumulación de los estiramientos asimétricos de los enlaces C-H de grupos metilenos ( $\text{CH}_2$ ) provenientes de la cadena del Span 80. Mientras que el pico a  $1740\text{ cm}^{-1}$  se intensifica por la acumulación de los grupos éster presentes tanto en el surfactante como en el complejo CMC-AF.



**Figura 27. Espectros de las emulsiones de CMC-AF con diferente contenido de ácido fólico: a) 0.005, b) 0.015 y c) 0.030 mg/mL.**

#### 4.7 Microscopía Óptica

El análisis superficial de la CMC y del AF mediante microscopía óptica, se muestra en la Figura 28, con una ampliación de 40x; donde se observa una zona representativa del ácido fólico (Figura 28a) de color amarillo con una dispersión moderada. Mientras que la carboximetilcelulosa (Figura 28b) se aprecia como un polvo de aspecto granuloso y color blanco.



**Figura 28. Micrografías de: a) CMC pura y b) AF.**

En la Figura 29 se observa una muestra representativa del polvo que contiene las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por *spray drying*, el cual se aprecia como un material aglomerado, compacto y de color amarillo.

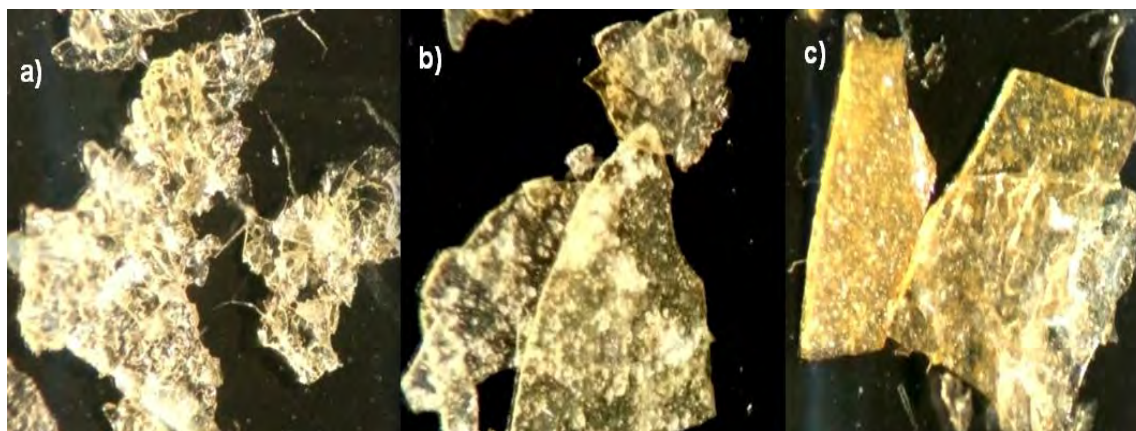


**Figura 29. Micrografía del polvo obtenido por *spray drying*.**

El polvo obtenido como producto final del *spray drying*, da indicios de que el ácido fólico se encuentra en la superficie de las nanopartículas junto con la carboximetilcelulosa debido a la coloración que presenta. Comparado con lo reportado por Santacruz *et al.* en el 2013, quienes obtuvieron nanocápsulas de ácido fólico por *spray-drying*, éstas presentaron un color blanco y su apariencia correspondía a un sólido pulverizado debido a que usaron como agente

encapsulante goma arábica y el ácido fólico (amarillo) fue atrapado en el núcleo de las nanocápsulas.

En la Figura 30, se muestra las micrografías correspondientes a zonas representativas de las nanoemulsiones inversas con diferente contenido de ácido fólico, las cuales tienen un aspecto pseudoplástico de superficie rugosa y con diferente coloración amarilla dependiendo de la cantidad de ácido fólico contenido.



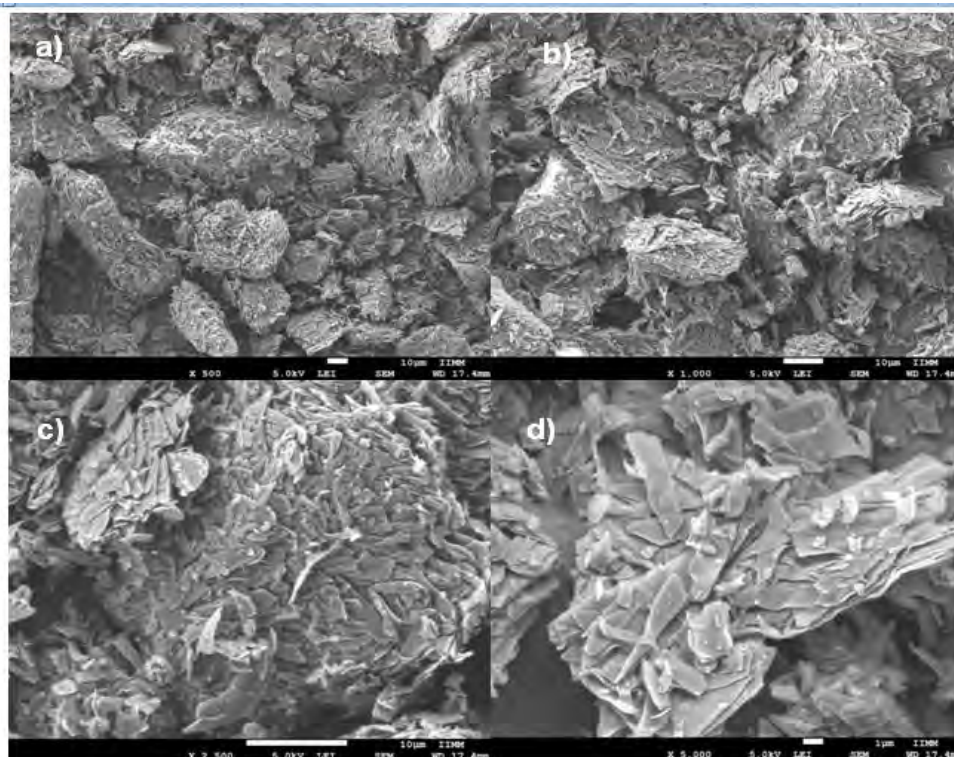
**Figura 30. Micrografías de muestras representativas de las nanoemulsiones inversas de CMC-AF con diferente contenido de ácido fólico nombradas: a) EM- I, b) EM- II y c) EM- III.**

#### **4.8 Microscopía electrónica de barrido (MEB) con detector de energía dispersiva (EDS).**

El análisis morfológico se realizó mediante MEB para observar la forma tridimensional, textura y tamaño de las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por ambos métodos. De manera simultánea se realizó un análisis semicuantitativo de la composición química de las nanopartículas obtenidas con ayuda de un detector de energía dispersiva (EDS).

La Figura 31, muestra cuatro micrografías con ampliación de 500x, 1,000x, 2,500x y 5,000x obtenidas por MEB de una zona representativa de ácido fólico, donde se aprecian apilados de hojuelas con superficie lisa.



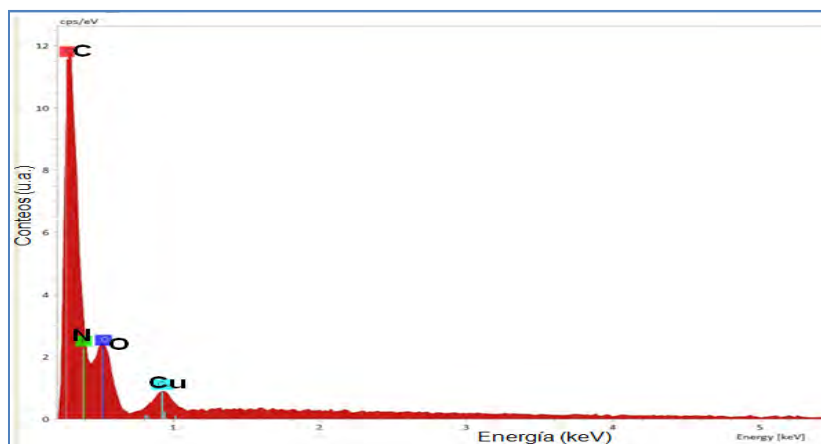


**Figura 31. Micrografías tomadas por MEB del ácido fólico diferentes ampliaciones: a) 500x, b) 1,000x, c) 2,500x y d) 5,000x, respectivamente.**

En la Figura 32, se muestra el espectro EDS obtenido del análisis químico de los elementos que constituyen al AF como se muestra en la tabla 10. Asimismo, se observa la presencia de cobre dado que dicho elemento químico se empleó para cubrir la muestra y convertirla en un material conductor para su análisis.

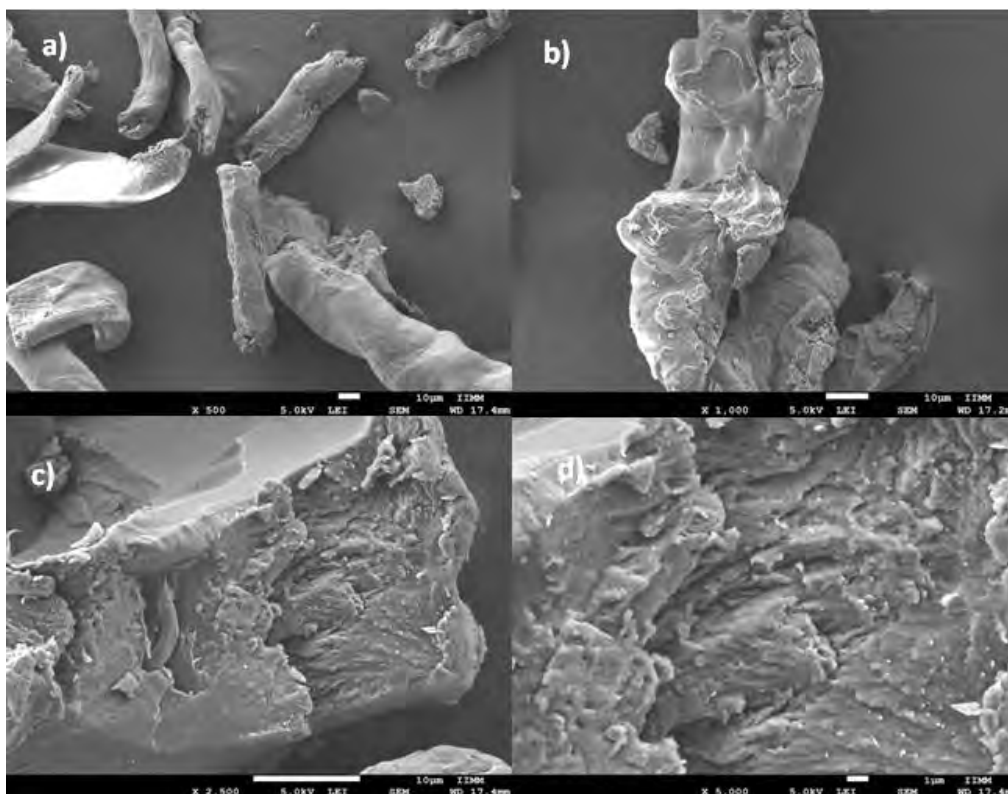
**Tabla 10. Análisis EDS del ácido fólico**

Elemento	% Peso	% Atómico
<b>Carbono</b>	45.77	45.03
<b>Oxígeno</b>	25.37	21.86
<b>Nitrógeno</b>	28.86	33.10
<b>Total</b>	100	100



**Figura 32. Espectro EDS de una muestra representativa de ácido fólico.**

En la Figura 33, se muestran micrografías a diferentes ampliaciones (500x, 1,000x, 2,500x y 5,000x) obtenidas por MEB tomadas de una zona representativa de una muestra de CMC, donde se observa como un material compacto con superficie rugosa y porosa.

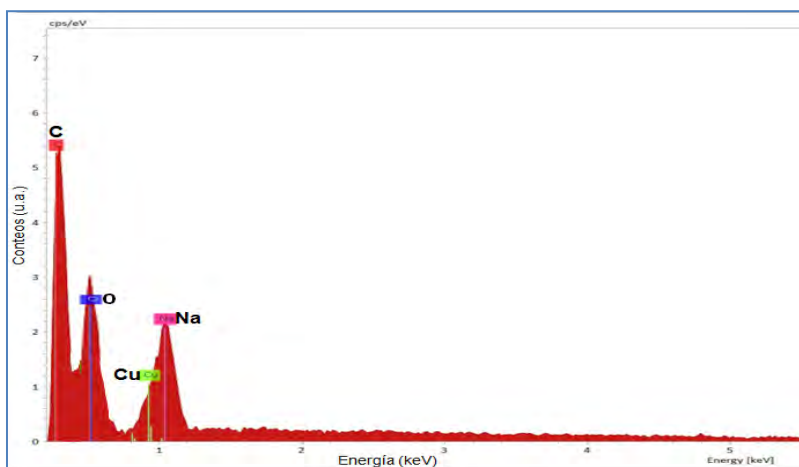


**Figura 33. Micrografías tomadas por MEB de la CMC a diferentes ampliaciones: a) 500x, b) 1,000x, c) 2,500x y d) 5,000x, respectivamente.**

En la Figura 34, se muestra el espectro EDS obtenido del análisis químico de los elementos que constituyen a la carboximetilcelulosa como se muestra en la tabla 11.

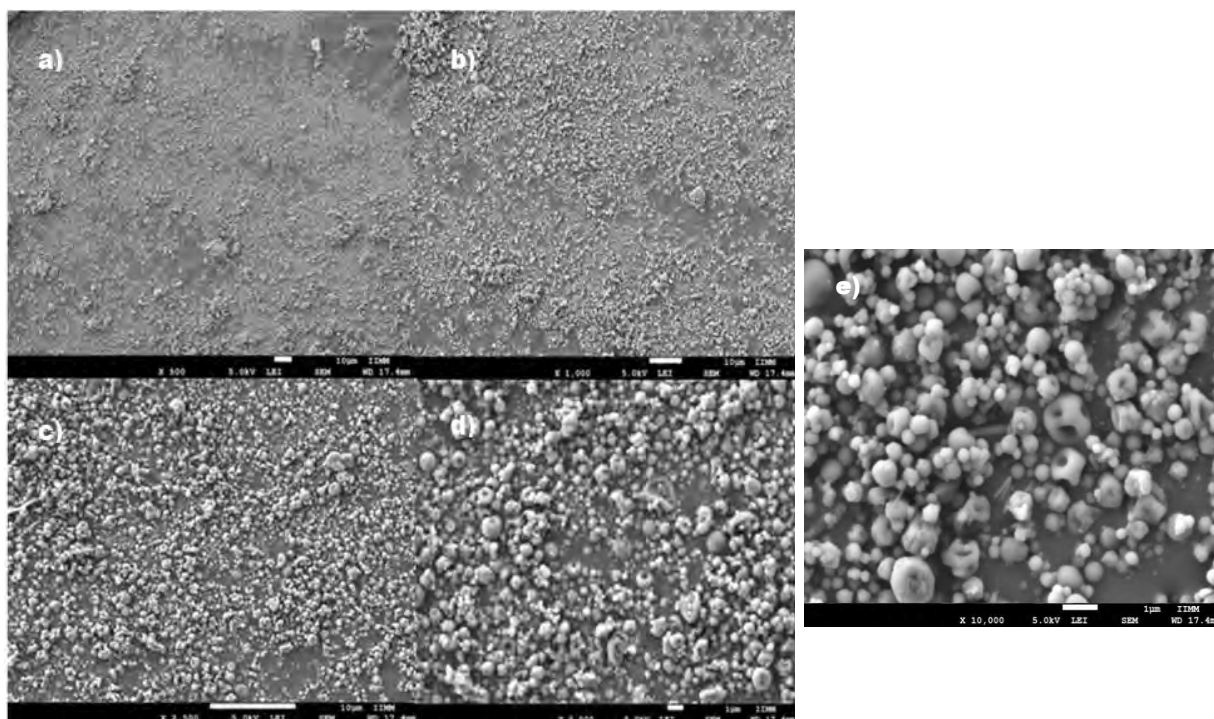
**Tabla 11. Análisis EDS de la CMC**

Elemento	% Peso	%Atómico
Carbono	67.17	63.82
Oxígeno	25.58	30.78
Sodio	7.25	5.40
Total	100	100



**Figura 34. Espectro EDS de una muestra representativa de la carboximetilcelulosa.**

En la Figura 35, se muestran micrografías tomadas de una zona representativa de las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por *spray drying* a diferentes ampliaciones; donde se observan cúmulos de nanopartículas esféricas con superficie lisa y de tamaño variable.



**Figura 35. Micrografías por MEB de nanopartículas de CMC-AF obtenidas por *spray drying* a diferentes ampliaciones: a) 500x, b) 1,000x, c) 2,500x, d) 5,000x y e) 10,000x, respectivamente.**

En la Figura 36, se muestra el espectro EDS del análisis químico de elementos que se encuentran en las nanopartículas CMC-AF obtenidas por *spray drying*, donde se aprecia un incremento en la cantidad de C y O, además de la presencia de nitrógeno y sodio, con lo cual se comprueba la presencia ambas materias primas. También se detectó la presencia de elementos trazas debido a impurezas presentes en el equipo empleado.

**Tabla 12. Análisis EDS de las nanopartículas CMC-AF obtenidas por *spray drying***

Elemento	% Peso	% Atómico
Carbono	47.79	45.15
Oxígeno	28.02	33.74
Nitrógeno	13.41	13.44
Sodio	8.33	5.06

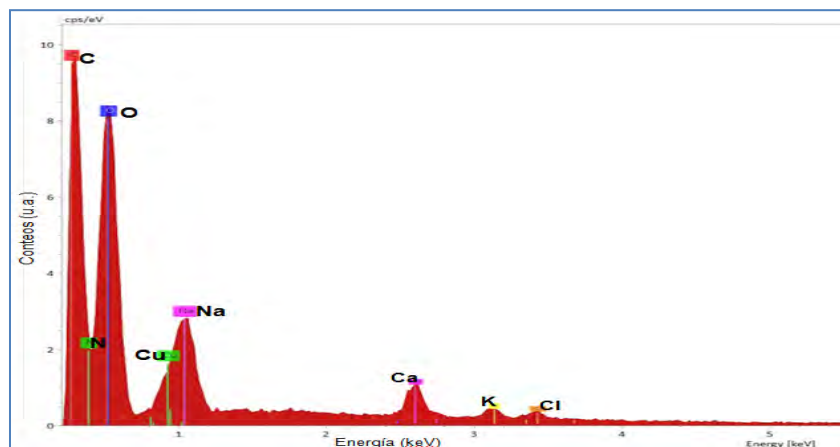
---

---

<b>Calcio</b>	0.99	1.01
<b>Potasio</b>	0.87	0.86
<b>Cloro</b>	0.59	0.74
<b>Total</b>	100	100

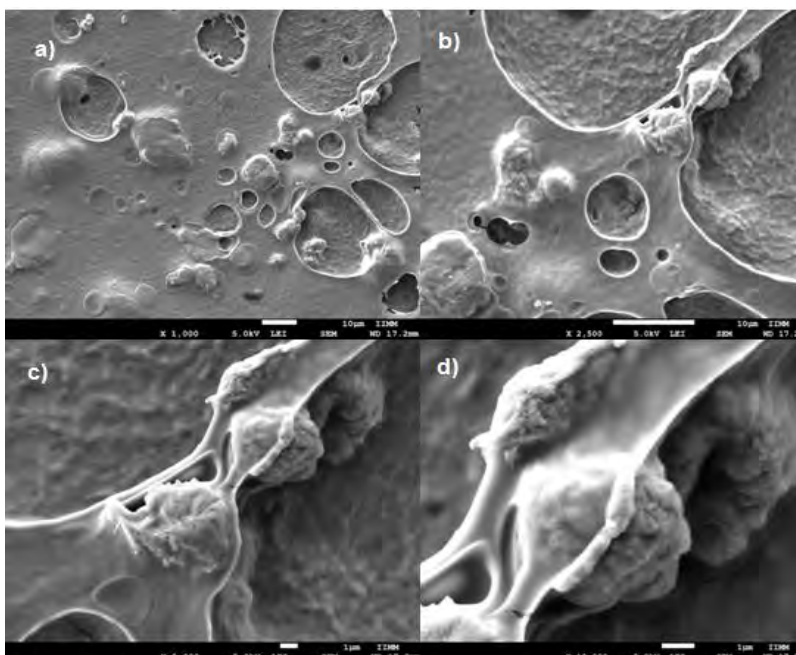
---

---



**Figura 36. Espectro EDS de una muestra representativa de nanopartículas CMC-AF obtenidas por *spray drying*.**

En la Figura 37, se muestran micrografías de una zona representativa de la nanoemulsión inversa con el mayor contenido de ácido fólico a diferentes ampliaciones debido a que fue la única muestra donde se logró observar la presencia de algunas nanopartículas con forma esféricas, superficie rugosa y de tamaño variable atrapadas en la matriz de CMC, lo cual se podría deber a las condiciones en las cuales se llevó a cabo el secado de la muestra, además de la naturaleza de la carboximetilcelulosa para formar películas.



**Figura 37. Micrografías por MEB de las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por nanoemulsión inversa a diferentes ampliaciones: a) 500x, b) 2,500x, c) 5,000x y c) 10,000x, respectivamente.**

En la Figura 38, se muestra el espectro obtenido por EDS del análisis químico de elementos que constituyen a las nanopartículas de CMC-AF formadas por nanoemulsión inversa, donde se incrementa la concentración de O, debido a la presencia del surfactante (Span 80) en la superficie de las nanopartículas; además, se detectó la presencia de nitrógeno y sodio con lo cual se comprueba la presencia de las materias primas.

**Tabla 13. Análisis EDS de las nanopartículas CMC-AF obtenidas por nanoemulsión inversa**

Elemento	% Peso	% Atómico
Carbono	39.58	37.70
Oxígeno	35.15	33.21
Nitrógeno	22.91	26.42
Sodio	2.36	2.67
Total	100	100

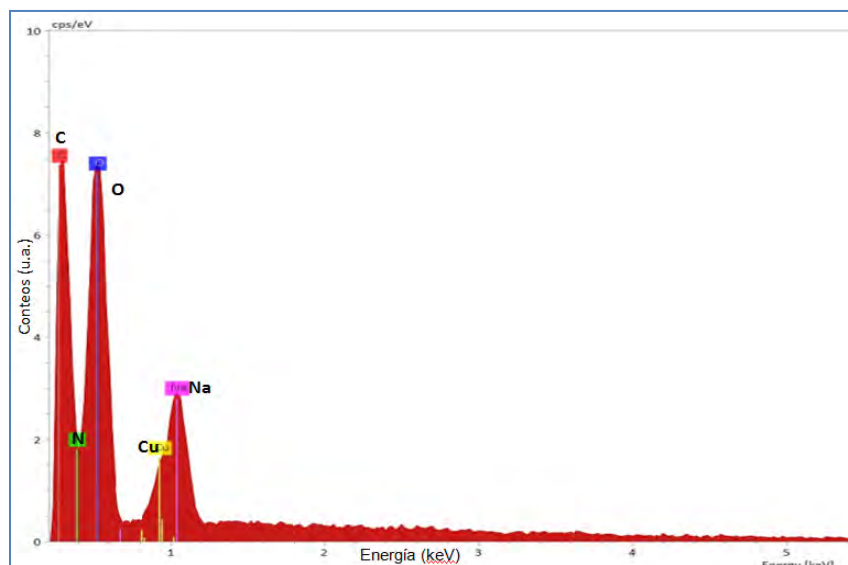


Figura 38. Espectro EDS de una muestra representativa de nanopartículas CMC-AF obtenidas por nanoemulsión inversa.

#### 4.9 Tamaño y distribución de partícula

a) **Determinación del tamaño de partícula por MEB:** los tamaños de partícula observados por MEB, en las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por *spray drying* fue de entre 0.23 a 1.29  $\mu\text{m}$  (Figura 39a), mientras que las nanopartículas obtenidas por nanoemulsión inversa oscilo entre 3.79  $\mu\text{m}$  a 5.43  $\mu\text{m}$  (Figura 39b).

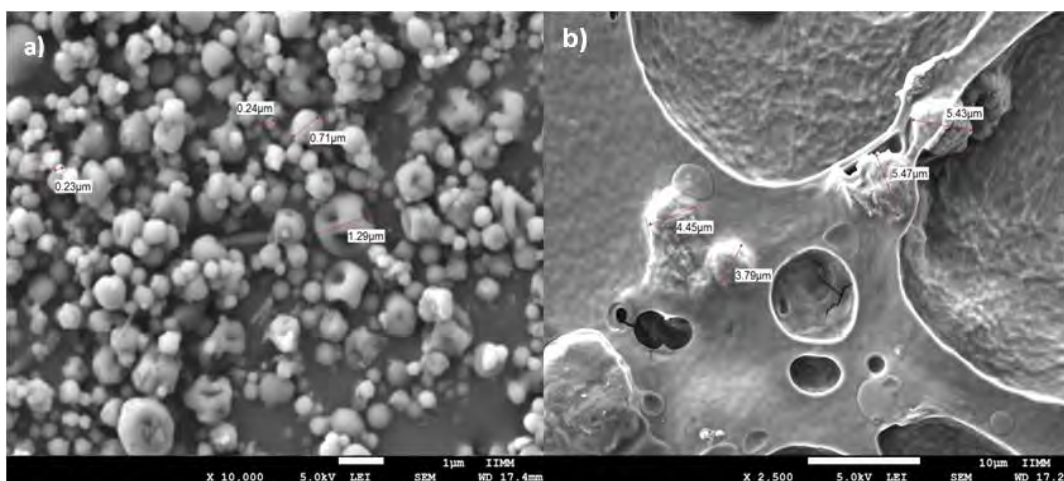


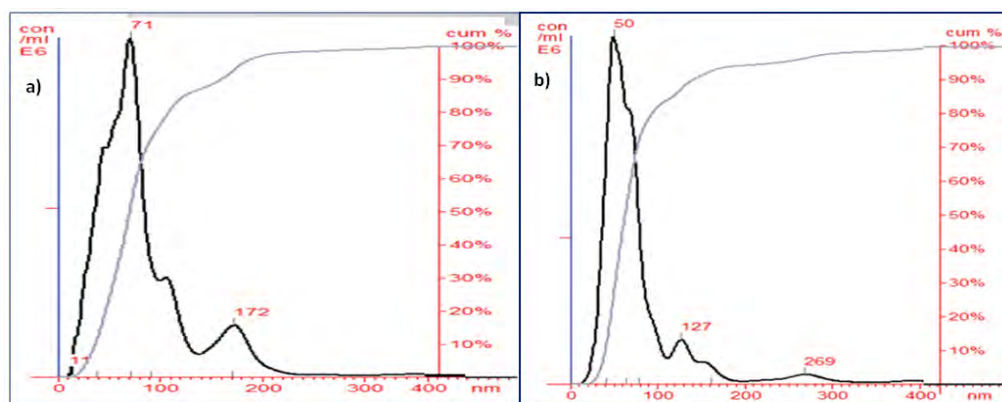
Figura 39. Micrografías por MEB del tamaño de partícula obtenidas por: a) *spray drying* y b) nanoemulsión inversa.

**b) Determinación del tamaño de partícula por NTA** : para determinar el tamaño promedio y la distribución de las nanopartículas obtenidas por ambos métodos, fue necesario dispersarlas en agua destilada para su posterior análisis en el equipo NTA, obteniendo como resultado que en ambos métodos se logró obtener un tamaño en el orden nanométrico como se muestra en la tabla 14:

**Tabla 14. Tamaño promedio de partículas obtenidas por ambos métodos**

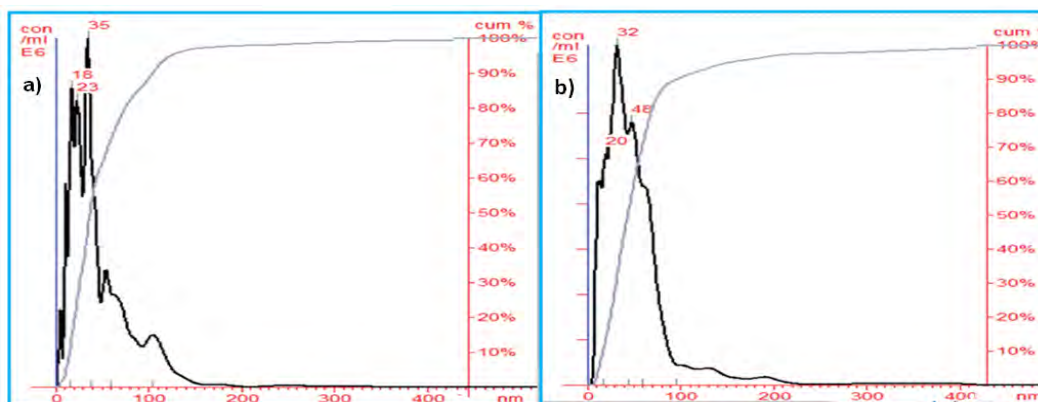
Muestra	Promedio	Moda	D.S.
ASP	54 nm	35 nm	21 nm
EM-I	95 nm	71 nm	26 nm
EM-II	99 nm	50 nm	32 nm
EM-III	61 nm	32 nm	37 nm

Las nanopartículas de CMC-AF con mayor contenido de vitamina B9, obtenidas por *spray drying*, mostraron un tamaño de partícula promedio de 54 nm (Figura 40a). En comparación con las nanopartículas también con el mayor contenido de ácido fólico obtenidas por nanoemulsión inversa, mostraron un tamaño promedio de 61 nm (Figura 40b); lo cual, las posiciona en un rango cercano de medida. Lo anterior se podría deber a la cantidad de ácido fólico contenido por que las nanoemulsiones inversas con menor contenido de ácido fólico muestran un mayor tamaño de partículas cercano a 100 nm (Figura 41).



**Figura 40. Distribución y tamaño de las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por: a) *spray drying* y b) nanoemulsión inversa.**





**Figura 41. Distribución y tamaño de las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por nanoemulsión inversa: a) EM-I y b) EM-II.**

Con respecto a la distribución de las nanopartículas obtenidas por *spray drying*, se aprecia que aproximadamente el 15% tiene un tamaño mayor a los 100 nm, lo cual podría corresponder al resultado obtenido por MEB. De igual manera, las nanopartículas obtenidas por nanoemulsión inversa muestran que menos del 10% tienen un tamaño mayor a 127 nm e incluso superan los 269 nm, lo cual corresponde al resultado obtenido por MEB.

Los resultados obtenidos acerca del tamaño de partícula en suspensión, el cual disminuye al incrementarse la cantidad de ácido fólico, son similares a los obtenidos por Assadpour *et al.* 2016. Dichos investigadores optimizaron la formulación de una nanoemulsión inversa (w/o, por sus siglas en inglés) con la finalidad de encapsular la vitamina B9 usando maltodextrina y proteína de suero como material encapsulante a través de *spray drying*. Reportaron que el tamaño de partícula en suspensión, medida por dispersión láser, fue de 38.5 nm debido al incremento del contenido de surfactante (Span 80) y de ácido fólico (3 mg/ml) al prolongarse también el tiempo de emulsión; ya que al emplear la misma cantidad del Span 80 y menor cantidad de ácido fólico (1 y 2 mg/ml) se incrementó el tamaño de partícula a 51 nm y 90 nm, respectivamente.

#### 4.10 Determinación de la eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulado se calculó utilizando la ecuación 2 y se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 15. Eficiencia de encapsulado de ácido fólico en las nanopartículas obtenidas por ambos métodos**

Tratamiento	Concentración encontrada (mg/ml)	Eficiencia de encapsulado (%)
ASP	0.27	90
EM-I	0.04	88
EM-II	0.13	87
EM-III	0.27	90

La eficiencia de encapsulado de ácido fólico en las nanopartículas obtenidas mediante secado por aspersión fue del 90%, dicho resultado es aproximado debido a dificultades en la recolecta del polvo al retirarlo del cilindro colector.

El resultado obtenido, es similar al reportado por **Lopera et al.**, en el 2009, donde al utilizar como material encapsulante una mezcla de goma arábica y maltodextrina (70-30%) mediante *spray drying*, determinaron una eficiencia de encapsulado del 88.95%, dicho porcentaje se incrementó al utilizar una mayor cantidad de goma arábica la cual es un polisacárido de carácter aniónico similar a la carboximetilcelulosa. Por otra parte, las nanopartículas obtenidas por emulsión inversa mostraron una eficiencia de encapsulado de entre 87-90%, lo cual es similar a los resultados obtenidos por **Assdpour et al.**, en el 2016 al obtener una eficiencia de encapsulado de ácido fólico del 86.60% a partir de una doble emulsión, en la cual primero se dio lugar a la formación de una nanoemulsión inversa (w/o) de ácido fólico usando como surfactante Span 80 y posteriormente, la fase acuosa externa contenía el material encapsulante (maltodextrina junto con proteína de suero) para someterse a *spray drying*.

#### 4.11 Análisis Termogravimétrico (TGA)

La descomposición térmica de la carboximetilcelulosa pura (CMC), ácido fólico (AF) y de las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por dos métodos diferentes (*spray drying* y nanoemulsión inversa) en función de la temperatura fueron analizados.

En la Figura 42, se muestra el termograma obtenido del **ácido fólico**: a) TGA y b) DTG, donde existen cuatro etapas de degradación térmica. En la primera etapa hay una pérdida de masa de 8.99% a 150 °C debido a la pérdida de agua absorbida, seguida de una segunda descomposición térmica a los 262 °C con una pérdida de masa de 12.62%, correspondiente a la pérdida del resto de ácido glutámico. Mientras que en el intervalo de 262 °C a 411 °C, ocurrió la mayor pérdida de masa de 34.17%, donde se da el rompimiento del enlace entre el C-9 y N-10, produciendo una pterina y ácido p-aminobenzoico. Finalmente, al alcanzar una temperatura de 571 °C, ocurrió una pérdida de masa de 32.21% para obtener una masa residual de 12% a 590 °C, resultado que está acorde con el obtenido por **Vora et al. (2004)**.

**Tabla 16. Pérdida de masa en función de la temperatura del ácido fólico por TGA**

TGA /DTG Ácido fólico			
Pérdida de masa (%)		Temperatura de degradación (°C)	
Experimental	Reportada	Experimental	Reportada
8.99	-	150	108.22
12.62	-	262	265.98
34.17	-	262 - 411	404.26
32.21	-	571	694.46

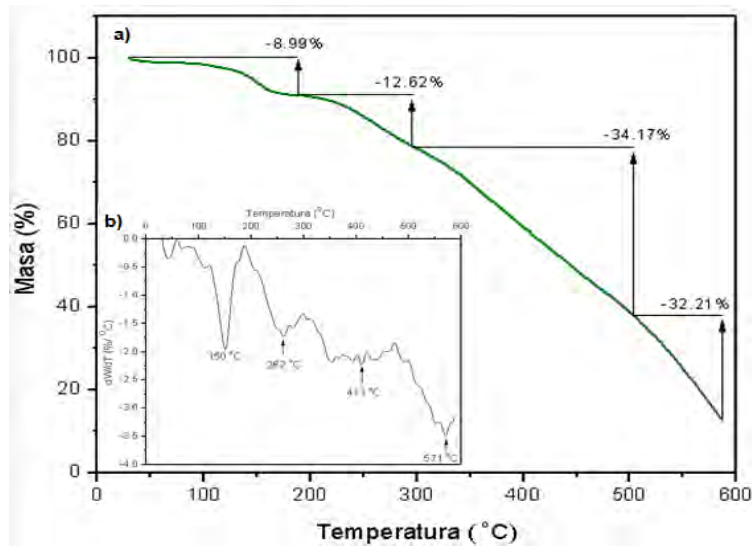


Figura 42. Termograma del ácido fólico: a) TGA y b) DTG.

En la Figura 43, se muestra la descomposición térmica en dos etapas de la **carboximetilcelulosa pura**: a) TGA y b) DTG, en donde se aprecia una pérdida inicial de masa del 18.23% a 67 °C, lo cual se puede atribuir a la evaporación del agua ligada a la estructura del polímero. Posteriormente, una segunda descomposición térmica se observa a 295 °C con una pérdida máxima de masa del 52.89% característico de la CMC en donde ocurre la degradación de las cadenas del biopolímero con pérdida de dióxido de carbono. Por otro lado, a 370 °C se aprecia la degradación de las cadenas del polisacárido y finalmente, presenta una masa residual de 28.86% a una temperatura de 590 °C, resultado que está acorde con el obtenido por **El-Sayed et al., en el 2011**.

Tabla 17. Pérdida de masa y temperatura de degradación de la CMC por TGA

TGA /DTG Carboximetilcelulosa			
Pérdida de masa (%)		Temp. de degradación (°C)	
Experimental	Reportada	Experimental	Reportada
18.23	15	67	75
52.89	39-75	295	289
-	-	370	-

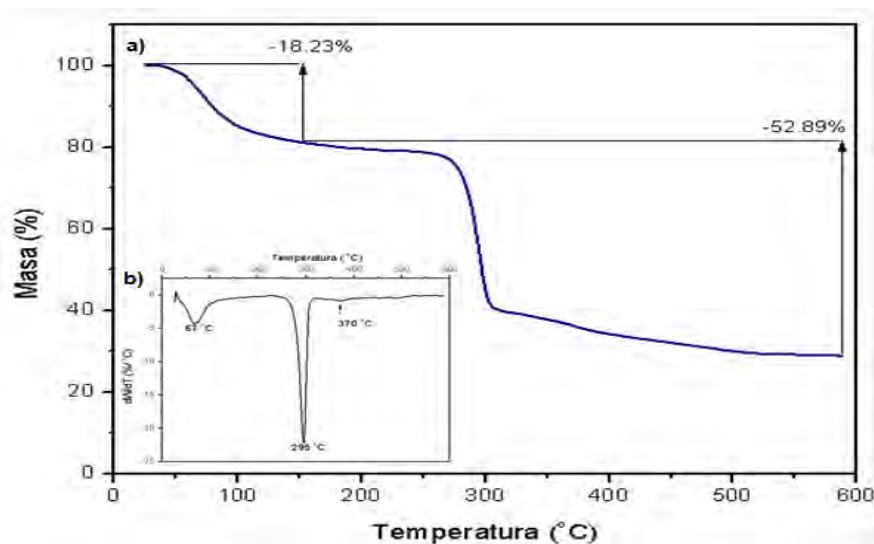


Figura 43. Termograma de la CMC: a) TGA y b) DTG.

En la Figura 44, se muestra el termograma de las **nanopartículas de CMC-AF** obtenidas por *spray drying*: a) TGA y b) DTG, donde ocurrió una pérdida inicial de masa de 17% a los 65 °C, lo cual se atribuye a la pérdida de agua ligada a la estructura debido a que la CMC es higroscópica tras su desecación. Adicionalmente, se observó un desplazamiento de la segunda etapa de descomposición térmica de 262 a 274 °C con respecto al ácido fólico con una máxima pérdida de masa de 43.90% debido a su interacción con la CMC y finalmente, ocurrió otro desplazamiento de temperatura de descomposición térmica correspondiente a la tercera etapa de 571 a 581 °C con una pérdida de masa de 11.97%, lo cual se atribuye a que la CMC le confiere una mayor estabilidad térmica al ácido fólico para dejar una masa residual de 27.09% al alcanzar los 589 °C.

Tabla 18. Pérdida de masa en función de la temperatura de las NP CMC-AF obtenidas por *spray-drying* vs. ácido fólico

TGA /DTG Nanopartículas CMC-AF por <i>spray drying</i>			
Pérdida de masa (%)		Temperatura de degradación (°C)	
Complejo CMC-AF	AF	Complejo CMC-AF	AF
17	-	65	-
-	8.99	-	150
43.90	12.62	274	262
11.97	34.17	-	411
	32.21	581	571

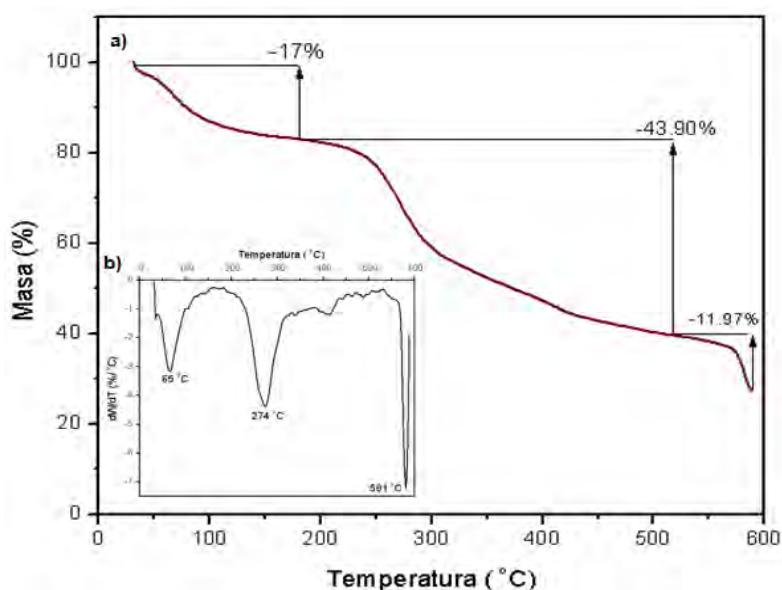


Figura 44. Termograma de las nanopartículas de CMC-AF, obtenidas por *spray drying*: a) TGA y b) DTG.

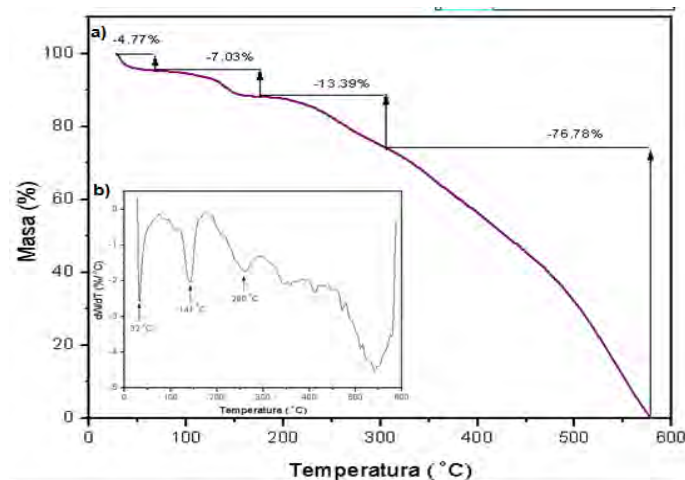
De acuerdo con los resultados obtenidos por termogravimetría, el ácido fólico comienza a degradarse a temperaturas más elevadas debido a su interacción con la carboximetilcelulosa, lo cual es similar a lo obtenido por Alupey *et al.* en el 2016, ya que dichos investigadores reportaron que las nanopartículas de quitosano con ácido fólico que sintetizaron en un paso, presentaron una máxima pérdida de masa de 39.73% en el rango de 249 -306 °C de acuerdo a su

análisis termogravimétrico, lo cual se debe a ácido fólico injertado en la cadena del polímero. De igual manera, Movagharneshad y Moghadam en el 2016 reportaron que el copolímero formado entre la carboximetilcelulosa con hexametildiamina y ácido fólico presentó tres etapas de degradación térmica, donde la segunda etapa presentó una máxima pérdida de masa del 32% en el rango de 131 a 340 °C, lo cual se debe al desprendimiento de hexametildiamina unida con el ácido fólico de las cadenas del polímero de carboximetilcelulosa.

En la Figura 45, se muestra el termograma de una mezcla que contiene carboximetilcelulosa y ácido fólico: a) TGA y b) DTG, donde se observa una pérdida inicial de masa del 4.77% al alcanzar los 32 °C debido a la presencia de humedad. Seguida de una segunda pérdida de masa del 7.03% a 141 °C lo cual es cercano a la primera etapa de degradación del ácido fólico que ocurre a 150 °C. Al alcanzar los 260 °C se observa una tercera etapa de degradación de la mezcla con una pérdida de masa del 13.39%, lo cual corresponde a la tercera etapa de degradación del ácido fólico (12.62% a los 262 °C). En comparación con los resultados obtenidos para el complejo formado entre el biopolímero de CMC y la vitamina B9, se observó que la segunda etapa de degradación ocurrió a los 274 °C mientras que en la mezcla ocurre a los 262 °C, lo cual corrobora la interacción entre ambos. Finalmente, el mayor porcentaje de pérdida de masa fue de 76.78% a los 540 °C con una masa residual de 1.97% al alcanzar los 589 °C.

**Tabla 19. Pérdida de masa en función de la temperatura de forma comparativa del complejo de CMC-AF y una mezcla de CMC con AF**

<b>TGA /DTG Complejo CMC-AF vs. Mezcla</b>			
<b>Pérdida de masa (%)</b>		<b>Temp. de degradación (°C)</b>	
CMC-AF	MEZCLA	CMC-AF	MEZCLA
17	4.77	65	32
-	7.03	-	141
43.90	13.39	274	260
11.97	76.78	581	540



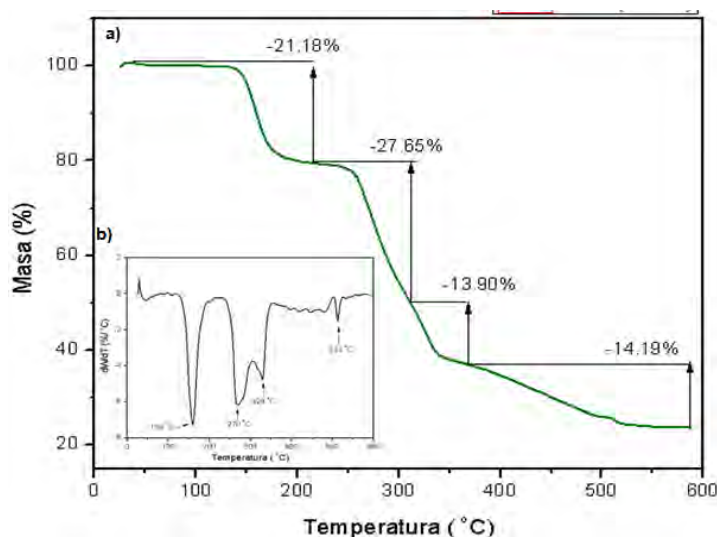
**Figura 45. Termograma de una mezcla de CMC y AF: a) TGA y b) DTG.**

En la Figura 46, se muestra el termograma de nanopartículas de CMC-AF obtenidas a través de emulsión inversa: a) TGA y b) DTG, donde se observan cuatro etapas de degradación térmica, donde la primera etapa presenta una pérdida de masa del 21.18% a los 159 °C, lo cual es cercano a la primera etapa de degradación del ácido fólico. Seguida de una máxima pérdida de masa de 27.65% a los 270 °C, la cual es una temperatura intermedia entre la segunda etapa de degradación del ácido fólico (262 °C) y de la carboximetilcelulosa a los 295 °C, debido a la interacción entre ambos. Con respecto a la tercera etapa de degradación, tiene una pérdida de masa del 13.90% a los 329 °C, dicha temperatura corresponde a la segunda etapa de degradación de la CMC, la cual se desplazó de 295 °C a 329 °C debido a su interacción con el surfactante (Span 80) el cual tiene su punto de fusión cercano a los 300 °C, según lo reportado por Sagiri *et al.*, en el 2012. Finalmente, se observa otro desplazamiento de la temperatura correspondiente a la última etapa de degradación del ácido fólico de 411 °C a 513 °C con una pérdida de masa del 14.19% y una masa residual de 23.67% a los 590 °C.



**Tabla 20. Pérdida de masa en función de la temperatura de las NP de CMC-AF obtenidas por nanoemulsión inversa**

TGA /DTG Nanopartículas CMC-AF por emulsión inversa			
Pérdida de masa (%)		Temp. de degradación (°C)	
CMC-AF	AF	CMC-AF	AF
21.18	8.99	159	150
27.65	12.62	270	262
13.90	34.17	329	262-411
14.19	32.12	513	571



**Figura 46. Termograma de nanopartículas de CMC-AF obtenidas por nanoemulsión inversa: a) TGA y b) DTG.**

Las nanopartículas de CMC-AF obtenidas mediante nanoemulsión inversa presentaron una etapa adicional de degradación en comparación a las nanopartículas obtenidas por *spray drying* debido a la presencia del surfactante. De acuerdo con **Alupei et al. en el 2016**, dichos investigadores obtuvieron nanopartículas de quitosano con ácido fólico mediante nanoemulsión, como segundo método, usando como surfactante Span 80 y glutaraldehído como agente

entrecruzante y de acuerdo con el análisis termogravimétrico que realizaron, reportaron cinco etapas de degradación térmica donde la primera y segunda etapa ocurrió en un rango de 62.22 a 214 °C con una pérdida de masa de 23.6%, debido a la pérdida de agua ligada a la estructura y a la degradación del agente entrecruzante. Para la tercera etapa de degradación observaron una máxima pérdida de masa de 23.6% en el rango de 271.5 -339.4 °C, lo cual se atribuye por lo tanto al surfactante y a la degradación de la cadena del polímero.

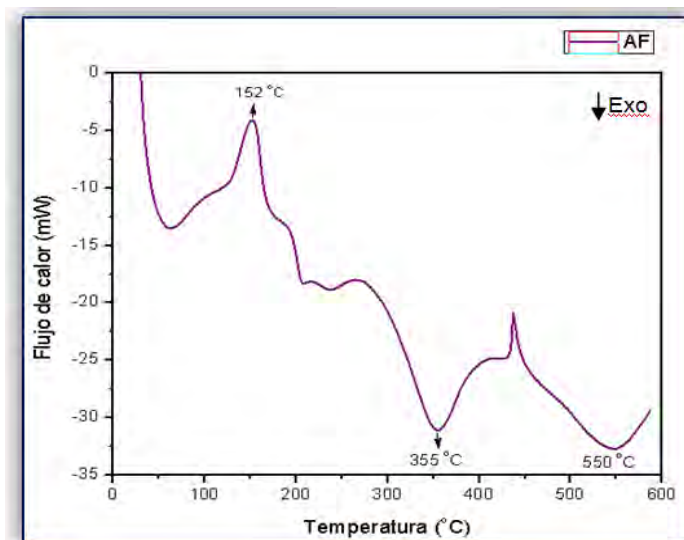
#### 4.12 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El estudio de la influencia del tratamiento térmico sobre la microestructura de un polímero mediante calorimetría diferencial de barrido permite conocer las condiciones en las que el material podrá ser procesado y empleado industrialmente.

En la Figura 47, se muestra la curva DSC del ácido fólico donde se aprecia una primera transición endotérmica como un pico a 152 °C con una entalpía de 3.5 kJ/g correspondiente a la pérdida del resto de ácido glutámico (resultado que se correlaciona con el obtenido por TGA/DTG); seguida de dos transiciones exotérmicas a 355 °C y a 550 °C con una entalpía de 6.5 kJ/g, lo cual corresponde a la temperatura de cristalización con el consiguiente reacomodo de la estructura del AF, dicho resultado es similar al obtenido por Vora *et al.*, en el 2004 como se muestra en la tabla 21.

**Tabla 21. Transiciones térmicas del AF por DSC**

<b>Calorimetría diferencial de barrido de AF</b>				
<b>Transición</b>	Temperatura Exp. (°C)	Entalpía $\Delta H$ (kJ/g)	Temperatura Reportada (°C)	Entalpía rep. $\Delta H$ (J/g)
<b>Endotérmica</b>	152	3.5	184.01	391.8
<b>Exotérmica</b>	355	6.5	208	76.34
	550		282	983.6

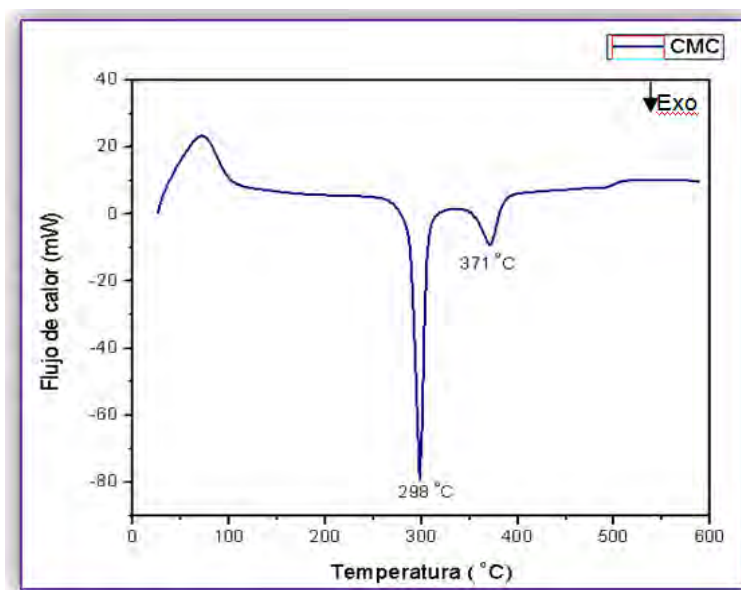


**Figura 47. Curva DSC del ácido fólico.**

En la Figura 48, se muestra la curva DSC de la carboximetilcelulosa pura, donde se observa una transición endotérmica a los 75 °C aproximadamente. Además de dos picos exotérmicos a 298 °C y a 371 °C con entalpías de 7.5 kJ/g y 1.5 kJ/g, respectivamente. Lo anterior se debe a la despolimerización de la CMC por la escisión de los enlaces glicosídicos, seguido de la combustión de los productos degradados, dicho resultado corresponde al obtenido por Hebeish *et al.*, en el 2015 como se muestra en la tabla 22.

**Tabla 22. Transiciones térmicas del CMC por DSC**

<b>Calorimetría diferencial de barrido de CMC</b>				
<b>Transición</b>	<b>Temperatura Exp. (°C)</b>	<b>Entalpía <math>\Delta H</math>(kJ/g)</b>	<b>Temperatura reportada(°C)</b>	<b>Entalpía rep. <math>\Delta H</math>(kJ/g)</b>
<b>Endotérmica</b>	75	-	76	12
<b>Exotérmica</b>	298	7.5	208	3.61
	371	1.5	380	-



**Figura 48. Curva DSC de la carboximetilcelulosa.**

En la Figura 49, se muestra la curva DSC obtenida de las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por *spray-drying* donde se observa una transición endotérmica a los 75 °C aproximadamente. Por otro lado, se aprecia una transición exotérmica a los 276 °C con una entalpía de 3.4 kJ/g, seguida de una segunda transición exotérmica, la cual presenta un desplazamiento de 355 a 411 °C, con respecto al ácido fólico debido a su interacción con la carboximetilcelulosa y finalmente, se observa un pico exotérmico a 581 °C, lo cual se correlaciona con el resultado obtenido por TGA.

**Tabla 23. Transiciones térmicas de NP CMC-AF vs AF por DSC**

Transición	NP de CMC-AF		AF	
	Temperatura Exp. (°C)	Entalpía $\Delta H$ (kJ/g)	Temperatura Exp. (°C)	Entalpía exp.. $\Delta H$ (kJ/g)
<b>Endotérmica</b>	75	-	152	3.5
<b>Exotérmica</b>	276	3.4	355	6.5
	411	-	550	-
	581	-		

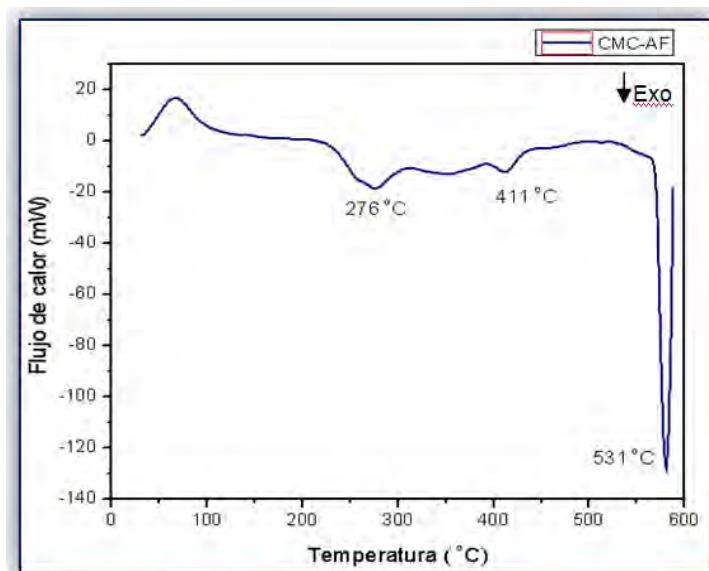


Figura 49. Curva DSC de las nanopartículas de CMC-AF obtenidas por *spray drying*.

En la Figura 50, se muestra la curva DSC de una mezcla de CMC y AF donde se observa una transición endotérmica a los 141 °C con una entalpía de 1.3 kJ/g, debido a la presencia de humedad; seguida de una segunda transición exotérmica a los 210 °C con una entalpía de 2.1 kJ/g . Mientras que a los 349 °C se observa una tercera transición exotérmica con una entalpía de 10.5 kJ/g, el cual corresponde a la primera etapa exotérmica del AF (355 °C). Finalmente, se aprecia una cuarta transición exotérmica a 534 °C con una entalpía de 11 kJ/g.

Tabla 24. Transiciones térmicas de una mezcla CMC y AF por DSC

Transición	Mezcla de CMC y AF		AF	
	Temperatura Exp. (°C)	Entalpía $\Delta H$ (kJ/g)	Temperatura reportada (°C)	Entalpía rep. $\Delta H$ (kJ/g)
<b>Endotérmica</b>	141	1.3	76	-
<b>Exotérmica</b>	210	2.1	208	-
	349	10.5	380	-
	534	11	-	-

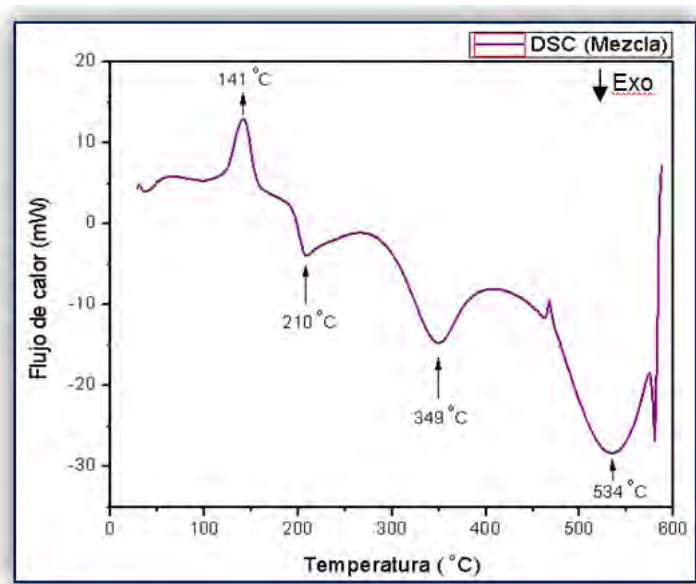
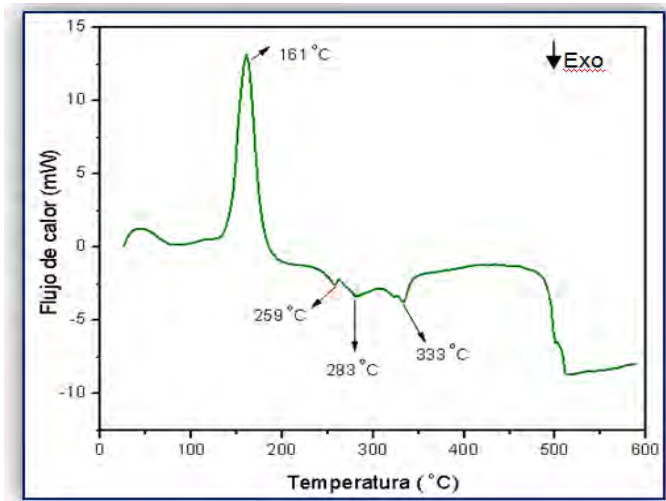


Figura 50. Curva DSC de una mezcla de CMC y AF.

En la Figura 51, se muestra la curva DSC de nanopartículas de CMC-AF obtenidas por emulsión inversa donde se aprecia una transición endotérmica a los 161 °C con una entalpía de 2.1 kJ/g, lo cual se debe a la presencia del surfactante por lo cual es necesario absorber una mayor cantidad de calor; seguida de una transición exotérmica en un rango de 259 °C a 333 °C con una entalpía de 4.5 kJ/g, donde al superar la temperatura de 300 °C, se termina de degradar el surfactante Span 80 de acuerdo a lo reportado por **Sateesh *et al.***, en el 2012.

Tabla 24. Transiciones térmicas de NP CMC-AF por nanoemulsión inversa versus AF por DSC

Calorimetría diferencial de barrido de NP CMC-AF por nanoemulsión inversa vs AF				
Transición	Temperatura Exp. (°C)	Entalpía $\Delta H$ (kJ/g)	Temperatura Exp. (°C)	Entalpía exp. $\Delta H$ (kJ/g)
Endotérmica	161	2.1	152	-
Exotérmica	259-333	4.5	355 550	-



**Figura 51. Curva DSC de nanopartículas de CMC-AF obtenidas por nanoemulsión inversa.**

## 5.- CONCLUSIONES

A partir de la investigación realizada en el presente trabajo, se muestran las siguientes conclusiones:

- A través del análisis estructural, se corroboró la interacción entre el ácido fólico y la carboximetilcelulosa en solución.
- También se pudo determinar que para el secado por aspersion se generan cúmulos de partículas dispersas, con forma esférica y superficie lisa. Mientras que a través de emulsión inversa, las partículas quedan embebidas en la matriz de carboximetilcelulosa. Adicionalmente, se obtuvo un tamaño promedio en el orden nanométrico de las partículas obtenidas por ambos métodos, presentando un menor tamaño aquellas con el mayor contenido de ácido fólico.
- Por otro lado, la eficiencia de encapsulado del ácido fólico en las nanopartículas obtenidas a través del secado por aspersion fue de 90% mientras que la eficiencia de las nanopartículas obtenidas por emulsión inversa fue de entre 87-90%, con lo cual se considera a la carboximetilcelulosa como un buen material encapsulante.
- Finalmente, mediante el análisis térmico se demostró una mayor estabilidad del ácido fólico conferido por la carboximetilcelulosa, empleando como método encapsulante el secado por aspersion.



## 6.- Perspectivas

La nanoencapsulación de ácido fólico usando como agente encapsulante a la carboximetilcelulosa, siendo el mejor método para dicho objetivo el *spray drying*, representa una alternativa viable para adicionar alimentos con ácido fólico de alto consumo en México como los productos hechos a base de maíz. Dado el sesgo de memoria relacionado con el consumo de comprimidos de ácido fólico antes de la concepción, se propone cumplir con la dosis diaria recomendada de vitamina B9 a través de un alimento, por lo tanto el producto obtenido en este proyecto dada sus características, es factible incorporar en alimentos principalmente para habitantes con hábitos dietéticos inadecuados. Por lo cual, se propone estudiar la incorporación de las nanopartículas en alimentos de fácil acceso, durante su preparación o bien en producto terminado y realizar un estudio de la cinética de liberación del AF *in vitro*.

## 7. Referencias

- Ahmed, M., Akter, M., Lee, J. y Eun, J. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *Food Science and Technology*, 43:1307-1312.
- Alupeii, L., Lisa, G., Butnariu, A., Desbrieres, J., Cadinoiu, A., Anisoara, C., Calin, G. y Popa, M. (2016). New folic acid-chitosan derivative based nanoparticles potential applications in cancer therapy. *Cellulose chemistry and technology*, 51(7-8):631-648.
- Antunes, A., Fierro, I., Guerrante, R., Mendes, F. y Alencar M. (2013). Trends in Nanopharmaceutical Patents. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4): 7016-7031.
- Badui Dergal, S. (2006). Química de los alimentos (4ta). México: Person educación.
- Barai, B.K., Singhal, R.S. y Kulkarni, P.R. (1997). Optimization of a process for preparing carboxymethylcellulose from water hyacinth (*Eichornia crassipes*). *Carbohydrate Polymers*, 32(3): 229-31.
- Bayarri, S., González-Tomás, L. y Costell, E. (2009). Viscoelastic properties of aqueous and milk systems with carboxymethyl cellulose. *Food Hydrocolloids*, 23(2): 441-450.
- Bekaert, S., Storozhenko, S., Mehrshahi, P., Bennett, M.J., Lambert, W. y Gregory, J.F. (2002). Folate biofortification in food plants. *Trends in Plant Science*, 13(1): 28-35.
- Biswal, D. y Singh R. (2004). Characterisation of *Carboxymethylcellulose* and Polyacrylamide Graft Copoly-mer. *Carbohydrate Polymers*, 57(4):379-383.
- Borah, P., Rappolt, M., Duary, R. y Sarkar, A.(2018). Effects of folic acid esterification on the hierarchical structure of amylopectin corn starch. *Food Hydrocolloids*, 86:162-171.

- Brito A., Hertrampf, E., Olivares, M., Gaitán, D., Sánchez, H. y Allen L. (2012). Folate, vitamin B12 and human health. *Revista Médica de Chile*, 140(11): 1464-1475.
- Burki, K., Jeon, I., Arpagaus, C., y Betz, G. (2011). New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. *International Journal of Pharmaceutics*, 408:248-256.
- Burriel, F., Conde, F., Arribas, S. y Hernández J. (2008). Conceptos generales de química analítica. En *Química analítica cualitativa (5-7)*. España : Editorial Spain Paraninfo.
- Cacho, J., Cepeda, A., Farré, R., Vidal, C., Gallego, A. y López, R. (2009). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al uso de la nanotecnología en la industria alimentaria. pp: 29-41.
- Cerón, M. (2012). Purificación, fraccionamiento y formación de bionanocompuestos con flavonoides del maíz azul y efecto terapéutico sobre células tumorales de cérvix. Tesis Doctoral, Institucional Politécnico Nacional.
- Chai, M. e Isa, M. (2013). The oleica cid composition effect on the carboxymethylcellulose based biopolymer electrolyte. *Journal of Crystallization Process and Technology*, 3:1-4.
- Chen, H., Weiss, J. y Shahidi, F. (2006). Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods. *Food Technology*, 60:3-8.
- Coppedè, F. (2015). The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. *Genetic* 6: 223.
- Dan, N. (2016). Transport and release in nano-carriers for food applicatios. *Journal of Food Engineering*, 175:136-144.

- Dasgupta, N. Ranjan, S., Mundekkad, D., Ramalingam, C., Shanker, R. y Kumar, A. (2015). Nanotechnology in agro-food: From field to plate. *Food Research International*, 69:381-400.
- de Paz, R. y Hernandez, F. (2006). Management, prevention and control of megaloblastic anemia, secondary to folic acid deficiency. *Nutrición Hospitalaria*, 21(1):113-119.
- Des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y. y Preat, V. (2006). Nanoparticles as potencial oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *Journal of Control Release*, 116(1):1-27.
- El-Sayed, S., Mahmoud, K., Fatah., A. y Hassen, A. (2011). DSC, TGA and dielectric properties of carboxymethylcellulose/polyvinyl alcohol blends. *Physica B*, 406:4068-4076.
- Fallic, A. y Montero, N. (2012). Importancia de los polímeros naturales en la preparación de sistemas de liberación controlada de fármacos. Síntesis y caracterización de nanopartículas basadas en mezclas de quitosano y albúmina. *Reduca*, 10:134.
- FAO/OMS (2015). Norma general para los aditivos alimentarios. CODEX STAN 192-1995. FAO, Roma.
- Fenech, M. (2012). Folate (vitamin B9), vitamin B12, and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutation Research journal*, 733(2): 21-33.
- Ferrari, C., Marconi, S. y Aguirre, J. (2012). Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder. *Drying Technologies in Food Processing*, 30:154-163.
- Gartner, C. y López, B. (2010). Medidas de la rigidez del quitosano en solución a través de la viscosidad intrínseca. *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 53:20-29.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. y Saurel, R. (2007). Applications of *spray-drying* in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9):1107–1121.

- Gil, M., Alzate, L., Sánchez, A. y Millán, L. (2011). Secado por aspersión: una alternativa para la conservación de los compuestos bioactivos y aromáticos del extracto de ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Lasallista de Investigación*, 8(2):40-52.
- Goldstein, J., Newbury, D., Joy, D., Lyman, C., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer L., y Michael J. (2007). Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, *Analytical Chemistry*, 9(5):95-270.
- Gómez, M., Waniska, R. y Rooney, L. (1991). Starch characterization of nixtamalized corn flour. *Journal of Cereal Chemistry*, 68: 578-582.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 15:330-347.
- Graveland-Bikker, J. y de Kruif C. (2006). Unique milk protein-based nanotubes: Food and nanotechnology meet. *Trends in Food Science & Technology*, 17:196-203.
- Hamed, E., Attia, M. y Bassiouny, K. (2009). Synthesis, spectroscopic and thermal characterization of copper and iron complexes of folic acid and their absorption efficiency in the blood. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2009, 979680.
- Hebeish, A., Elrafie, M., Rabie, A., Aly, A. y Refaat, D. (2015). Synthesis and properties of superabsorbent carboxymethyl cellulose graft-poly (acrylic acid-co-acrylamide) *Egyptian Journal of Chemistry*, 58(6):721-739.
- Hua, Q. y Chu, K. (2007). Direct observation for photophysical and photochemistry processes of folic acid in DMSO solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 185(1): 51-56.
- Kandi, V. y Vadakedath, S. (2015). Effect of DNA methylation in various diseases and the probable protective role of nutrition: a mini-review. *Cureus*, 7(8): 309.
- Kosegarten, C. y Jiménez, M. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*, 6(2):1-18.

- Kumar, M., Soni, G. y Mishra, R. (2014). Nanoemulsion: A novel drug delivery tool. *International Journal of Pharma Research and Review*, 3(7):32-43.
- Li, X., Anton, N., Arpagaus, C., Belleteix, F. y Vandamme, T. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology. *Journal of Controlled Release*, 147:304-310.
- Lopera, S., Guzmán, C., Cataño, C. y Gallardo, C. (2009). Desarrollo y caracterización de micropartículas de ácido fólico formadas por secado por aspersión, utilizando goma arábica y maltodextrina como materiales de pared. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1):55-65.
- Magnusson, B., Jonaitis, T. y Card J. (2011). A brief review of the occurrence, use, and safety of food-related nanomaterials. *Journal Food Science*. 76:126-133.
- Mahmood L. (2014). The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *Journal of Health Research and Reviews*, 1:5-9.
- McClements, D. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual Review of Food Science Technology*, 47:241-269.
- McKillop, D., Pentieva, K., Daly, D., McPartlin, J., Hughes, J. y Strain, J. (2002). The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *British Journal Nutrition*, 88(6): 681-720.
- Medina, L., García, E., Calderas, F., González, R., Sánchez G., Gallegos, J., Rocha, N. y Rodríguez, J. (2013). Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *Food Science and Technology*, 50:642-650.
- Mondal, M., Ahmed, F. y Fakrul, A. (2016). Synthesis and grafting of carboxymethyl cellulose from environmental pollutant cellulosic wastes of textile industry. *British Journal Nutrition*, 7(2):102.

- Mora, C., Fessi, H. y Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385:113-142.
- Movagharneshad, N. y Moghadam, P. (2016). Folate-decorated carboxymethyl cellulose for controlled doxorubicin delivery. *Colloid Polym Sci*, 294:199-206.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1:1806-1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>
- Nesterenko, A., Alric., I., Silvestre, F. y Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42:469-479.
- OMS. Directriz: Administración diaria de suplementos de hierro y ácido fólico en el embarazo. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2014.
- Paul, W., Hebert, F. y Sinkula, G. (2003). Investing in nanotechnology. *Nature Biotechnology*, 21:10-16.
- Pérez, R., Lopez, R., Periago, M., Ros, G., Lagaron, J. y Lopez, A. (2015) Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through *nanospray drying* and *electrospraying* for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, 168:124-133.
- Peters, R., ten Dam, G., Bouwmeester, H., Helsper, J., Allmaier, G., van den Kammer, F., Ramsch, R., Solans, C., Tomaniova, T., Hajslova, J. y Weigel S. (2011). Identification and characterization of organic nanoparticles in food. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 30:100-112.
- Pita-Rodríguez G, Pineda D, Martín I, Monterrey-Gutiérrez P, Serrano-Sintes G y Macías-Matos C. (2003). Ingesta de macronutrientes y vitaminas en embarazadas durante un año. *Revista Cubana de Salud Pública*, 29: 220-227.
- Rao, J.P. & Geckeler, K.E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36:887-913.

- Reyes, M., Martín, E., González, V. y Martínez, L. (2011). Uso de carboximetilcelulosa como matriz polimérica en la síntesis de nuevos materiales híbridos. *Ciencia UANL*. 14(4):459-465.
- Roco, M. (2004). Nanoscale science and engineering: unifying and transforming tools. *Journal American Institute of Chemical Engineers*, 50(5):1023-1025.
- Rodríguez, E. y Villegas, E. (2012). Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. *Métodos y materiales*, 2:25-30.
- Rosado, J., Camacho-Solís, R. y Bourges, H. (1999). Adición de vitaminas y minerales a harinas de maíz y de trigo en México. *Salud pública México*, 41(2):130-135.
- Rouessac, F. y Rouessac, A. (2003). Análisis químico, métodos y técnicas instrumentales modernas. Editorial McGraw Hill, España.
- Salager, J. (1999). Formulación, composición y fabricación de emulsiones para obtener las propiedades deseadas. Estado del Arte Parte A. FIRP S747A. Universidad de los Andes. Venezuela.
- Sanguansri, P. y Augustin, M. (2006). Nanoscale materials development: A food industry perspective. *Trends Food Science Technology*. 17:547-548.
- Sateesh, S., Behera, B., Sudheep, T. y Pal, K. (2012). Effect of composition on the properties of Tween-80-Span-80 based organogels. *Designed monomers and polymers*, 15(3): 253-273. DOI:10.1163/156855511X615669.
- Schafroth, N., Arpagaus, C., Jadhav, U. Y., Makne, S. y Douroumis, D. (2012). Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 90:8-15.
- Sheppard, C.J.R. (1993). Confocal Microscopy - Principles, Practice and Options.
- Skoog D. y Leary J. (1995). Análisis instrumental. Editorial McGraw-Hill. Cuarta edición. México.
- Solans, C., Uson, N., García, M., Azemar, N., Esquena, J. (2004). Procedimiento de preparación de nanoemulsiones de tipo agua-en-aceite (w/o) por métodos de emulsificación de condensación. *Oficina Española de Patentes y marcas*. ES2197836A1.



- Soto, G. y López, A. (2011). Nanotecnología en alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(1):11-21.
- Sperling, L.H. (2006). Introduction to physical polymer science. Fourth edition. Jhon Wiley and Sons Publications.
- Su, Y., Fu, J., Zhang, J., Wang, W., Wang, H., Wang Y. y Zhang, Q. (2008). Microencapsulation of Radix salvia miltiorrhiza nanoparticles by spray-drying. *Powder Technology*, 184:114:121.
- Suárez de Ronderos, M. (2003). Ácido fólico: nutriente redescubierto. *Act. Médico Costarricense*, 45(1): 5-9.
- Suárez de Ronderos, M. (2003). Ácido fólico: Nutriente redescubierto. *Acta Médica Costarricense*, 45(1):5-9.
- Suriñach, S., Baro, M., Bordas, S., Clavaguera, N. y Clavaguera, M. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de materiales. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 31(1):11-17.
- Takhistoy, P., Weiss, J. y McClements, J., (2006). Food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71:9-14.
- Tataru, G., Popa, M. y Desbrieres, J. (2011). Microparticles of hidrogel type based on carboxymethylcellulose and gelatin for controlled release of water soluble drugs. *Revue Roumaine de Chimie*, 56(4): 399-410.
- Taylor, T., Davidson, P., Bruce, B. y Weiss J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:587-605.
- Veloso, F. y Della Rocca, P. (2015). Encapsulación de ácido fólico en matrices poliméricas diferentes. *Proyecciones Facultad Regional Buenos Aires* 13(2): 31-40.
- Vemmer, M. y Patel, A. V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67:380-389.

- Vora, A., Riga, A., Dollimore, D. and Alexander, K. (2004). Thermal stability of folic acid in the solid-state. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 75:709-717.
- Vora, A., Riga, A., Dollimore, D., Alexander, K.S.(2002). Thermal stability of folic acid. *Thermochimica Acta*, 392:209–220.
- Younis, I., Stamatakis, M., Callery, P. y Meyer, P. (2009). Influence of pH on the dissolution of folic acid supplements. *International Journal of Pharmaceutics*, 367:97-102.
- Zheng, W., Neves, M., Isoda, H. y Nakajima, M. (2015). Preparation and characterization of micro/nano-emulsions containing functional food components. *Japan Journal of Food Engineering*, 16(4): 263-276.
- Zhengyu, H., Dan, L., Xiong, X., Mingyuan, T. y Dan H. (2016). Self-assembled nanoparticles based on folic acid modified carboxymethyl chitosan conjugated with targeting antibody. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater*, 31 (2): 446-452. DOI 10.1007/s11595-016-1390-z.