

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PREPARADAS POR ELECTROSPRAY COAXIAL PARA LIBERACIÓN CONTROLADA DE EMBELINA

AGUSTÍN MARTÍNEZ CEBADA

**Proyecto final para optar al grado de Ingeniero
en Materiales**

Director: Dr. Bioing. Pablo R. Cortez Tornello

Co-Director: Dr. Gustavo A. Abraham

Universidad Nacional de Mar del Plata

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería en Materiales

Contacto: agustinmartinezcebada@gmail.com



Mar del Plata, Febrero 2025.



RINFI es desarrollado por la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución- NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PREPARADAS POR ELECTROSPRAY COAXIAL PARA LIBERACIÓN CONTROLADA DE EMBELINA

AGUSTÍN MARTÍNEZ CEBADA

**Proyecto final para optar al grado de Ingeniero
en Materiales**

Director: Dr. Bioing. Pablo R. Cortez Tornello

Co-Director: Dr. Gustavo A. Abraham

Universidad Nacional de Mar del Plata

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería en Materiales

Contacto: agustinmartinezcebada@gmail.com



Mar del Plata, Febrero 2025.

Contenido

Listado de figuras	4
Listado de tablas	5
Agradecimientos	6
Resumen.....	7
1. Introducción.....	9
1.1 Materiales para aplicaciones biomédicas.....	11
1.1.1 Biomateriales	11
1.1.1.1 Biopolímeros	11
1.1.1.2 Quitosano.....	14
1.1.1.3 Embelina.....	15
1.2 Nanopartículas en el campo de la liberación de drogas.....	17
1.3 Electropray monoaxial y coaxial.....	20
1.4 Liberación controlada a partir de partículas.....	22
1.5. Modelos matemáticos de liberación.....	28
1.5.1. Modelo de Orden Cero	30
1.5.2. Modelo de Higuchi	30
1.5.3 Modelo de Korsmeyer-Peppas.....	31
2 Objetivos	32
2.1 Objetivo general.....	32
2.2 Objetivos específicos	33
3 Materiales	33
4 Métodos.....	33
4.1 Preparación de partículas de quitosano (Qp)	33
4.2 Preparación de partículas core-shell de Q-Embelina (Q-Ep)	34
4.3 Caracterización.....	35
4.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	35
4.3.2 Análisis térmico mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)	38
4.3.3 Análisis de conductividad.....	39
4.3.4 Análisis mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	41
4.3.5 Difracción de rayos X (DRX).....	42
4.4 Cuantificación del contenido de embelina	43
4.5 Análisis de hinchamiento de las partículas de Quitosano en medio Buffer	44
4.6 Estudio del proceso de liberación de embelina a partir de las partículas core-shell	45

4.7 Escalado	46
4.7 Estudio de Mercado de Sistemas de Liberación Controlada de Embelina en el país	47
5 Resultados y discusión	48
5.2 Obtención de las partículas.....	48
5.3 Análisis de la caracterización fisicoquímica de las partículas Qp y Q-Ep	53
5.3.1 Propiedades térmicas y cristalinidad de las partículas.	53
5.3.2 Análisis de conductividad	55
5.3.3. Estudio de la composición química superficial	57
5.3.4. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación	58
5.4 Estudio del hinchamiento de las partículas Qp.....	59
5.5 Proceso de liberación.....	60
5.4.1 Influencia del medio liberación y del recubrimiento en los sistemas de nanopartículas.....	60
5.4.2 Estudio de la cinética de liberación de embelina a partir de Q-Ep	63
5.5 Análisis de costos, escalado y normativa del sistema de producción de partículas core-shell mediante electrospray	66
5.6 Estudio de mercado	69
6 Conclusiones	72
6. Dificultades.....	73
7. Trabajos futuros.....	74
Bibliografía	76

Listado de figuras

Figura 1. Características ideales de los sistemas poliméricos para su empleo en liberación controlada de agentes terapéuticos.	12
Figura 2. Clasificación de Biopolímeros de acuerdo a su origen.....	14
Figura 3. Estructura química de la a) Quitina y el b) Quitosano.	14
Figura 4. Embelia ribes, es una especie de planta de la familia Myrsinaceae.	16
Figura 5. Especie Oxalis erythrorhiza, nombre común “boldo de la Cordillera”.	17
Figura 6. Estructura química de embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona)	17
Figura 7. Beneficios de usar la plataforma de nanomedicina para administrar fármacos al complejo tumoral	19
Figura 8. Clasificación de partículas poliméricas y su relación con el agente terapéutico	20
Figura 9. Esquema proceso de electrospray coaxial para preparación de partículas core-shell biofuncionales Quitosano-Embelina	23
Figura 10. Imagen del cono de Taylor obtenida en la práctica experimental	23
Figura 11. Disciplinas científicas interrelacionadas con la liberación de agentes terapéuticos.	24
Figura 12. Difusión de agente terapéutico a partir de una matriz polimérica	26
Figura 13. Sistema de liberación de agentes terapéuticos por activación del solvente: sistema controlado por hinchamiento (superior) y sistema reservorio (inferior).	26
Figura 14. Sistema de liberación a partir de polímeros biodegradables: a) degradación de masa, b) erosión superficial	27
Figura 15. Sección transversal de un sistema osmótico para administración oral	28
Figura 16. Liberación inicial rápida en un perfil de liberación	29
Figura 17. Formación de gotas concéntricas de embelina y quitosano antes de la aplicación de potencial en el proceso de electrospraying	36
Figura 18. Esquema del Microscopio electrónico de barrido.....	38
Figura 19. Microscopio Electrónico de Barrido	39
Figura 20. Esquema de un equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido.....	41
Figura 21. Gráfico de flujo de calor en función de la temperatura.....	41
Figura 22. Conductímetro serie EC700, Apera Instruments	42
Figura 23. Equipo de Espectroscopia infraroja por transformada de Fourier (FTIR)	44
Figura 24. Curva de calibración de la embelina AA:DCM (80:20).....	45
Figura 25. Espectrofotómetro UV/Visible.....	46
Figura 26. Imágenes SEM de partículas de quitosano obtenidas por electrospray: a) 10 cm – 15 kV, b) 10 cm – 17 kV, c) 10 cm – 20 kV, d) 10 cm – 22 kV, e) 12 cm – 15 kV, f) 12 cm – 17 kV, g) 12 cm – 20 kV, h) 12 cm – 22 kV, i) 15 cm – 15 kV, j) 15 cm – 17 kV, k) 15 cm – 20 kV, l) 15 cm – 22 kV, m) 17 cm – 15 kV, n) 17 cm – 17 kV, o) 17 cm – 20 kV, p) 17 cm – 22 kV. Partículas de quitosano con embelina: q) $\Phi_o:\Phi_i = 4:1$, $d = 12$ cm, $V = 24$ kV, r) $\Phi_o:\Phi_i = 2:1$, $d = 12$ cm, $V = 24$ kV.....	56
Figura 27. Termogramas del Quitosano comercial, partículas de quitosano, partículas de quitosano con embelina encapsulada y embelina comercial.....	56
Figura 28. Difracción de Rayos X (DRX): Comparación de patrones para quitosano, embelina comercial, partículas de quitosano y partículas de quitosano con embelina.....	58
Figura 29. . Espectros FTIR de quitosano de bajo peso molecular, embelina, partículas Qp y Q-Ep	61
Figura 30. Perfil de hinchamiento de las nanopartículas Qp.....	64
Figura 31. Cinética de liberación de embelina: Evaluación del porcentaje liberado en función del tiempo.....	67
Figura 32. Cinética inicial de liberación de embelina: Evaluación detallada durante las primeras 8 horas.....	67
Figura 33. Etapa de liberación inicial rápida “burst effect”.....	70
Figura 34. Ajuste matemático en la etapa intermedia de liberación con los tres modelos: Modelo de Orden Cero, Modelo de Primer Orden y Modelo de Korsmeyer-Peppas	70
Figura 35. Ajuste matemático en la etapa final de liberación con los tres modelos: Modelo de Orden Cero, Modelo de Primer Orden y Modelo de Korsmeyer-Peppas.....	71

Listado de tablas

<i>Tabla 1. Mecanismos de liberación difusional para sistemas poliméricos de diferentes geometrías</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 2. Condiciones experimentales para la obtención de partículas de Quitosano.</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 3. Medición de diámetro medio de partícula y desviación estándar</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 4. Conductividad de las soluciones utilizadas en el estudio</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 5. Características fisicoquímicas y rendimiento de encapsulación de nanopartículas</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 6. Parámetros de Ajuste de los Modelos de Liberación en las Distintas Etapas</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 7. Factores directos.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 8. Factores indirectos.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 9. Costo de las materias primas.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 10. Costo de las materias primas por gramo de partícula.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 11. Costos variables y costos fijos.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 12. Empresas que comercializan equipos de electro spraying en el mundo.....</i>	<i>68</i>

Agradecimientos

Al llegar al final de esta etapa, me es imposible no detenerme a reflexionar sobre todas las personas que, de una forma u otra, hicieron posible este recorrido.

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Pablo R. Cortez Tornello. Su guía, paciencia y constante predisposición no solo fueron fundamentales para la realización de este trabajo, sino que también despertaron en mí una pasión genuina por la investigación. Su enseñanza ha sido un pilar en mi formación y su apoyo ha sido invaluable.

Al resto del equipo de trabajo, el Dr. Gustavo A. Abraham, el Dr. Matthäus Popov y la Bioing. Ana Suárez, gracias por compartir sus conocimientos, por su ayuda y por crear un ambiente de trabajo donde siempre hubo espacio para el aprendizaje y la colaboración.

A mi familia, especialmente a mis padres, por su amor incondicional, por su apoyo en cada desafío y por haber sido siempre mi mayor sostén. Sin su confianza y aliento, este camino habría sido mucho más difícil.

A mis amigos, por ser mi refugio en los momentos de incertidumbre, por las risas en los días difíciles y por recordarme siempre que hay vida más allá de los libros y los experimentos.

Y, por último, a mis compañeros de la facultad, con quienes compartí no solo clases y estudios, sino también desafíos y grandes momentos que hicieron que esta carrera fuera más llevadera. Gracias por el apoyo mutuo, por las charlas interminables y por demostrar que este camino, aunque arduo, es mucho mejor cuando se transita acompañado.

A todos, gracias de corazón.

Resumen

El avance en la producción de nanopartículas se ha convertido en un área de gran relevancia en el ámbito biomédico debido a su potencial para mejorar la administración de fármacos, optimizando su biodisponibilidad, solubilidad y eficacia terapéutica. En particular, el uso de nanopartículas como sistemas de liberación controlada permite una dosificación más precisa, reducción de efectos adversos y mayor estabilidad de los compuestos activos. Estas ventajas son especialmente importantes en el contexto de enfermedades infecciosas y patologías crónicas, donde el control de la concentración del principio activo en el organismo es crucial para maximizar su efectividad y minimizar la toxicidad sistémica. En este trabajo, se desarrollaron nanopartículas de quitosano mediante la técnica de electrospray para la encapsulación de embelina, un agente bioactivo con propiedades antimicrobianas y terapéuticas.

El quitosano, un biopolímero derivado de la quitina, es ampliamente utilizado en biomedicina por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y efecto antimicrobiano. Su capacidad de adhesión a superficies biológicas y su versatilidad para formar sistemas de liberación controlada lo convierten en un material ideal para aplicaciones farmacéuticas avanzadas. En este estudio, el quitosano se empleó como matriz polimérica para la obtención de nanopartículas capaces de vehiculizar y proteger compuestos bioactivos. Por otra parte, la embelina, una benzoquinona con actividad antimicrobiana, anticonvulsivante y antidiabética, se extrae en Argentina del arbusto *Oxalis erythrorhiza Gill*, el cual crece en altitudes elevadas en la provincia de San Juan. Sin embargo, su baja solubilidad en agua limita su aplicación directa, lo que motiva su encapsulación en sistemas nanoestructurados para mejorar su estabilidad y liberación controlada.

Para la producción de las nanopartículas se empleó la técnica de electrospray, o *electrospraying*, también conocida como atomización electrohidrodinámica (EHDA), que permite obtener partículas con tamaños controlados y morfologías uniformes sin requerir agentes surfactantes o disolventes orgánicos en exceso. Se optimizaron las condiciones del proceso para garantizar una alta eficiencia de encapsulación, estabilidad estructural y reproducibilidad de los sistemas obtenidos. La caracterización morfológica se realizó a partir de microscopía electrónica de barrido (SEM) para evaluar el diámetro medio y la distribución del tamaño de las partículas. La caracterización fisicoquímica incluyó el estudio mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos x (DRX), calorimetría diferencial de barrido (DSC), estudio de la conductividad de las soluciones poliméricas, y la determinación de la eficiencia de encapsulación mediante espectrofotometría ultravioleta-visible.

Asimismo, se evaluó la cinética de liberación de embelina desde las partículas, en condiciones fisiológicas simuladas en medio buffer, resultando un perfil caracterizado por una fase inicial de liberación rápida seguida de una liberación sostenida en el tiempo. Este comportamiento es deseable para tratamientos donde se requiere una acción inmediata del fármaco (dosis de ataque) seguida de una liberación prolongada que mantenga la concentración terapéutica en el sitio de acción.

Finalmente, se realizó un estudio de mercado respecto del equipamiento y sistemas de liberación similares disponibles. Además, se exploraron aspectos clave para la escalabilidad del sistema, evaluando la viabilidad de su producción a nivel preindustrial y el cumplimiento de normativas regulatorias para su posible aplicación clínica.

El desarrollo de estos sistemas de liberación controlada representa una estrategia prometedora para mejorar la administración de compuestos bioactivos poco solubles en agua, y plantea nuevas oportunidades en el tratamiento de infecciones y otras patologías. Este estudio contribuye al conocimiento sobre la aplicación de nanopartículas poliméricas en biomedicina y sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a su implementación en terapias avanzadas, favoreciendo el diseño de estrategias terapéuticas más efectivas y seguras.

1. Introducción

La investigación y desarrollo de nanopartículas despiertan un creciente interés en el campo de la salud, ya que ofrecen sistemas altamente funcionales con aplicaciones significativas en diagnóstico, prevención y tratamiento de diversas enfermedades (1). Las partículas elaboradas a partir de polímeros biodegradables son motivo de investigaciones intensivas en los campos de la bioingeniería e ingeniería de materiales, encontrando aplicaciones cruciales como biomateriales para la liberación controlada de agentes terapéuticos, además de permitir la reducción de los costos de las terapias y riesgos de toxicidad para el paciente (2). En la industria farmacéutica, las partículas poliméricas se presentan como una opción muy atractiva, ya que permiten mejorar la biodisponibilidad, solubilidad y tiempo de retención de agentes terapéuticos solubles o poco solubles en agua (3).

Las enfermedades infecciosas representan una de las principales causas de mortalidad (14,9 millones de muertes) a nivel mundial, y afectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados. Estas infecciones producidas por microorganismos pueden llegar a ser crónicas y responden pobremente a los tratamientos con antibióticos (4,5). En los últimos años, el uso indebido y generalizado de antibióticos tradicionales ha provocado un aumento de la resistencia de los microorganismos (bacterias y hongos). Algunas estrategias abordadas actualmente para combatirla incluyen, políticas efectivas para monitorear su propagación, el uso adecuado de antibióticos, terapias combinadas, y obtención de nuevas moléculas bioactivas provenientes de fuentes naturales para permitir la aplicación de nuevas terapias antiinfecciosas (6).

Los avances en ingeniería y ciencia de materiales han contribuido a mejorar radicalmente algunos de los inconvenientes farmacéuticos asociados al uso de agentes terapéuticos tales como, baja solubilidad en agua, inestabilidad fisicoquímica, corta vida media, biodistribución inadecuada y toxicidad (7,8,9). La liberación localizada de agentes terapéuticos directamente en el sitio de acción, evitando la exposición sistémica, ha mejorado notablemente los coeficientes de seguridad de muchos medicamentos. Al mismo tiempo, la técnica de atomización electrohidrodinámica (EHDA, por sus siglas en inglés) denominada también como *electrospraying* está avanzando rápidamente como una tecnología prometedora para la producción de partículas poliméricas bioactivas (9). En comparación con las técnicas de fabricación de emulsión tradicionales, la EHDA tiene el potencial de reducir la desnaturalización de fármacos y biomacromoléculas, proporcionando un control más estricto sobre la distribución de tamaño de las partículas y su morfología (9). Las partículas pueden prepararse a partir de polímeros naturales, sintéticos o sistemas híbridos naturales/sintéticos, y administrarse a través de la mayoría de las rutas de administración de drogas: oral, parenteral, inhalatoria y oftálmica, con capacidad de facilitar tanto la vectorización activa como pasiva. Sin embargo, cada material requiere de la optimización del procesamiento para la obtención de partículas uniformes y reproducibles. Con la selección del agente terapéutico y la funcionalización apropiada del sistema portador, es posible desarrollar sistemas biofuncionales sofisticados que optimicen las terapias farmacológicas para tratamientos antimicrobianos (10, 11), de cáncer (12), y hormonales (13), entre otros.

Dentro de este contexto, el principal objetivo de este trabajo consiste en optimizar las condiciones de procesamiento de nanopartículas coaxiales obtenidas por electrospray para su empleo como sistema de liberación controlada de fármacos. El sistema bicapa poseerá un interior o núcleo hidrofóbico que contendrá el agente terapéutico embelina, y una capa exterior hidrofílica que favorecerá la biodisponibilidad, regulará la liberación y facilitará el direccionamiento hacia la membrana celular de bacterias (*bacteria-targeting*) (14, 15).

El interior o núcleo de las partículas se preparará a partir de una solución del agente terapéutico embelina mezclado con solventes orgánicos, de manera tal que permita obtener partículas con buena disponibilidad del agente terapéutico en su interior. Mientras que la cubierta o capa superficial será de quitosano (como un elemento estructural), un polisacárido natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza (17, 18). El quitosano forma parte de la estructura de numerosos organismos vivos, y resulta además como subproducto importante de varias industrias como la pesquera, generando un valor agregado en la utilización de residuos. La gran importancia del quitosano en el campo biomédico está dada por sus excelentes propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, hemostasia, promoción de absorción, actividad antimicrobiana y antioxidante (12, 13).

La embelina, una benzoquinona de interés biológico, se encuentra como el principal metabolito secundario en especies de las familias Myrsinaceae y Oxalidaceae (16, 17, 18), y presenta diversas actividades biológicas relevantes, incluyendo actividad anticonvulsivante, antidiabética y antimicrobiana (17, 19). A partir de las especies mencionadas se extrae, como el principal metabolito secundario, la benzoquinona embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona). Durante un largo período de tiempo, esta sustancia de origen indígena ha sido utilizada para tratar diversas enfermedades, como se registra en textos históricos como el Charaka Samhita en 1949, Sushruta Samhita en 1942 y Ashtanga Hridaya en 1950. La embelina se halla en concentraciones de 2 a 3 % en los frutos de los arbustos *Embelia ribes*, *E. robusta* (20), *Ardisia spp* (21) y en *Rapanea spp* (Mirsináceas), *Embelia ribes* (*E. gladulifera*), *Embelia tsjeriam-Cottam* (*E. robusta*, *Roxb*), es un arbusto distribuido a lo largo de la costa de Malabar de Sri Lanka, y se extiende a través de Sylhet, Singapur y China, así como también en Assam de Cochin y las zonas montañosas de Maharashtra y Konkan en la India (22). En Argentina, el arbusto *Oxalis erythrorhiza Gill.* (Oxalidaceae) llamada comúnmente “boldo de la cordillera”, se encuentra a una altitud entre los 4000-4500 m en la localidad de Bauchaceta, departamento de Iglesia de la provincia de San Juan (23).

Desde su descubrimiento, la embelina ha sido reconocida como un compuesto valioso en la farmacopea. Fue incluida en el British Pharmaceutical Codex en 1934, seguido por el Indian Pharmaceutical Codex en 1953, y finalmente se estableció como una medicina oficial en la Farmacopea de la India en 1966 (24). Actualmente se comercializa a nivel mundial a través de empresas tales como Merck, ThermoFisher Scientific, o R&D Systems (Biotechne), con costos promedios de 10 USD por cada miligramo de embelina.

Físicamente, la embelina se presenta como cristales de color amarillo anaranjado que cristalizan en agujas de oro amarillo. Tiene un punto de fusión de 142-143 °C y es pobremente soluble en agua (0,13 mg/ml), pero es soluble en solventes como diclorometano, metanol, éter de petróleo y cloroformo, entre otros. Estas características hacen de la embelina un candidato prometedor para la encapsulación en nanopartículas poliméricas, con el potencial de mejorar significativamente la eficacia y seguridad de los tratamientos médicos (21).

En las secciones siguientes, se explorará en detalle los objetivos específicos de este trabajo y su contribución al avance del campo de las nanopartículas para aplicaciones biomédicas.

1.1 Materiales para aplicaciones biomédicas

1.1.1 Biomateriales

Los biomateriales se sitúan en la intersección crucial entre la biología, la química, la medicina y la ingeniería, ofreciendo soluciones avanzadas a desafíos complejos en el cuidado de la salud. Estos materiales, diseñados para interactuar de forma segura y efectiva con sistemas biológicos, están destinados a tratar, mejorar o reemplazar funciones corporales o para facilitar diagnósticos precisos (25).

En 1987 se acordó denominar biomaterial a “un material no vivo usado en un dispositivo médico, destinado a interactuar con el sistema biológico” (26). Sin embargo, la evolución en la ciencia de materiales y las tecnologías relacionadas con la salud tornaron pronto obsoleta esta definición. La función de un biomaterial es más compleja, debe dirigir el curso de un tratamiento médico, ya sea diagnóstico o de terapia, y debe hacerlo controlando específicamente las interacciones con los componentes biológicos del paciente a ser tratado (27).

En 2018 se alcanzó un nuevo consenso entre los líderes más reconocidos a nivel global en la comunidad de los biomateriales reuniendo más del 90% de los votos. Así se reformuló la última definición y se planteó que se refiere a “un material diseñado para tomar una forma que pueda dirigir, a través de interacciones con los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnósticos” (27, 28).

Inicialmente concentrados en aplicaciones estructurales como implantes y prótesis, el espectro de uso de los biomateriales se ha ampliado notablemente hacia áreas como la liberación controlada de fármacos, la ingeniería de tejidos y los dispositivos de diagnóstico. Este desarrollo refleja avances significativos tanto en la comprensión de la interacción entre materiales y biología como en las técnicas de fabricación y diseño de nuevos materiales (29).

La clasificación de los biomateriales en metales, cerámicos, polímeros (naturales y sintéticos) y composites subraya la diversidad de propiedades mecánicas, químicas y biológicas que estos materiales pueden ofrecer. Esta diversidad permite la creación de soluciones médicas personalizadas, adaptadas a las necesidades individuales de los pacientes y los requisitos específicos de diversas aplicaciones médicas. La selección cuidadosa de biomateriales es crucial para el éxito de implantes duraderos, andamios que promueven la regeneración de tejidos, y sistemas de entrega de fármacos con la capacidad de unirse a sitios específicos dentro del cuerpo (30).

El enfoque actual en la investigación de biomateriales no sólo incluye el desarrollo de materiales con nuevas propiedades físicas y químicas, sino también la comprensión profunda de cómo estos materiales interactúan con el cuerpo a nivel celular y molecular. Esta aproximación multidisciplinaria es esencial para el diseño de la próxima generación de biomateriales, que no sólo son biocompatibles sino también capaces de inducir respuestas biológicas deseables para la regeneración de tejidos o la liberación controlada de medicamentos (31).

1.1.1.1 Biopolímeros

A partir de finales del siglo XIX y a lo largo del siglo XX, el desarrollo y la diversificación de los polímeros experimentó un crecimiento considerable. Esto permitió la creación de materiales con

propiedades únicas, lo que revolucionó múltiples campos de la ingeniería. Hoy en día, tanto polímeros de origen natural como sintético tienen aplicaciones muy variadas en el sector biomédico. Algunos, como el polimetilmetacrilato o el polietileno, son altamente estables y se emplean en dispositivos permanentes. Otros, en cambio, son biodegradables y se utilizan para aplicaciones temporales, lo que resulta ventajoso en muchos contextos clínicos.

En los últimos diez años, el uso de polímeros para la liberación de fármacos y agentes terapéuticos ha crecido de manera notable, tanto en la industria farmacéutica como en el ámbito agrícola. Las proyecciones futuras indican que los polímeros biodegradables, empleados en tecnologías de liberación controlada, tendrán un impacto significativo en la medicina moderna. Estos materiales permiten administrar medicamentos de manera más eficiente, ya sea a nivel sistémico o directamente en sitios específicos del cuerpo, sin la necesidad de extraer el sistema de liberación una vez finalizado el tratamiento (32).

El uso de estos polímeros en biomedicina requiere que cumplan con ciertas propiedades claves para que puedan funcionar como sistemas de liberación controlada de medicamentos. Estas características esenciales se resumen en la Figura 1, destacando su importancia para garantizar una administración eficaz y segura de los agentes terapéuticos.

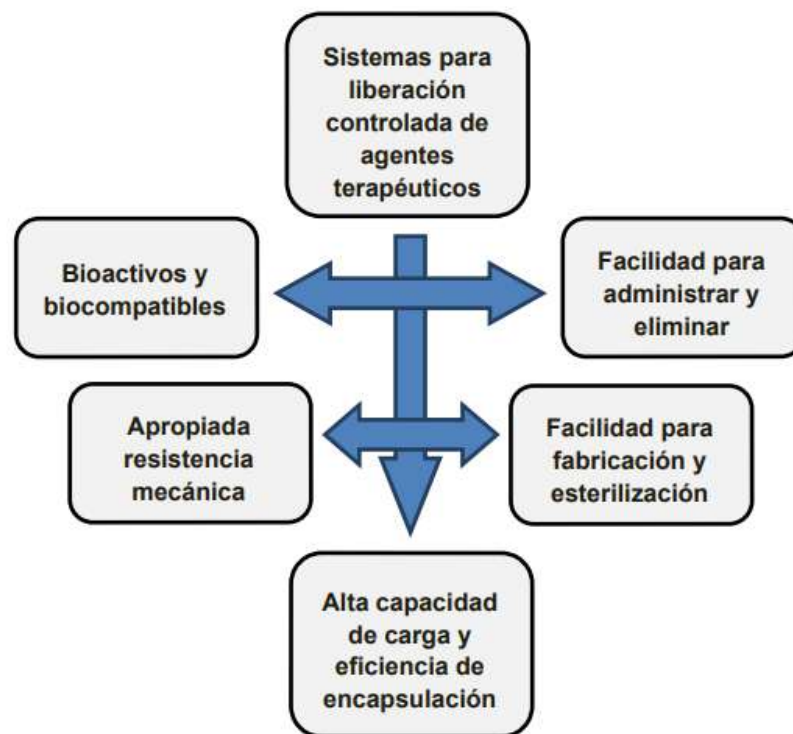


Figura 1. Características ideales de los sistemas poliméricos para su empleo en liberación controlada de agentes terapéuticos.

Los polímeros naturales, compuestos orgánicos macromoleculares encontrados en la naturaleza, desempeñan un papel crucial en el campo de los biomateriales debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y funcionalidad específica. Estos polímeros abarcan una amplia gama de sustancias (Figura 2) como proteínas (por ejemplo, colágeno, elastina), polisacáridos (por ejemplo, celulosa, quitosano, alginato) y ácidos nucleicos (ADN y ARN), que han sido utilizados en numerosas aplicaciones médicas y biotecnológicas (33). La diversidad de fuentes

naturales y la variedad de propiedades que estos polímeros pueden ofrecer hacen que sean materiales altamente versátiles y adaptables para diferentes necesidades en la medicina y la biotecnología.

La biocompatibilidad de los polímeros naturales es particularmente importante para aplicaciones en ingeniería de tejidos y liberación controlada de fármacos. En estos campos, la interacción entre el material y el tejido puede influir significativamente en la efectividad y seguridad del tratamiento. Por ejemplo, el colágeno, una proteína abundante en el cuerpo humano, es ampliamente utilizado debido a su capacidad para promover la adhesión celular y la regeneración tisular (34). Los polisacáridos como el quitosano y el alginato también son valorados por sus propiedades biocompatibles y su capacidad para formar estructuras tridimensionales que imitan la matriz extracelular del tejido (35).

Además de ser biocompatibles, los polímeros naturales son biodegradables, lo que significa que pueden ser metabolizados o eliminados por el cuerpo después de cumplir su función, reduciendo así el riesgo de complicaciones a largo plazo. Esta propiedad es crucial para aplicaciones en las que los materiales implantados necesitan ser absorbidos por el cuerpo sin causar reacciones adversas. La biodegradabilidad de los polímeros naturales asegura que no se acumulen residuos tóxicos en el cuerpo, lo que es especialmente importante en aplicaciones a largo plazo como los andamios para la regeneración tisular y los sistemas de liberación de fármacos (36).

Una de las propiedades más valiosas de los polímeros naturales es su capacidad para ser funcionalizados o modificados químicamente. Esta capacidad permite el diseño de sistemas de liberación de fármacos con administración controlada o andamios para la ingeniería de tejidos con propiedades mecánicas y biológicas específicas. Por ejemplo, el quitosano puede ser modificado para mejorar su solubilidad en agua y su capacidad para interactuar con diversas biomoléculas, lo que amplía su aplicación en diferentes campos de la biomedicina. Estas modificaciones pueden mejorar la interacción de los polímeros con células y tejidos, promoviendo la regeneración de tejidos o la respuesta inmune deseada (35).

Entre los polímeros naturales, el quitosano ha recibido considerable atención debido a sus propiedades únicas, como la no toxicidad, biodegradabilidad y actividad antimicrobiana. Estas características lo hacen ideal para aplicaciones que van desde vendajes antimicrobianos hasta sistemas de liberación de fármacos y andamios para la ingeniería de tejidos. La capacidad del quitosano para formar películas y geles lo hace especialmente útil en la fabricación de dispositivos médicos y sistemas de liberación controlada de fármacos. Además, su actividad antimicrobiana inherente es una ventaja adicional para aplicaciones en las que la prevención de infecciones es crítica (35, 37).

La versatilidad y las propiedades intrínsecas de los polímeros naturales los posicionan como una solución innovadora y efectiva para avanzar en la medicina regenerativa y la farmacología, demostrando su potencial para transformar significativamente estos campos y mejorar la salud humana.

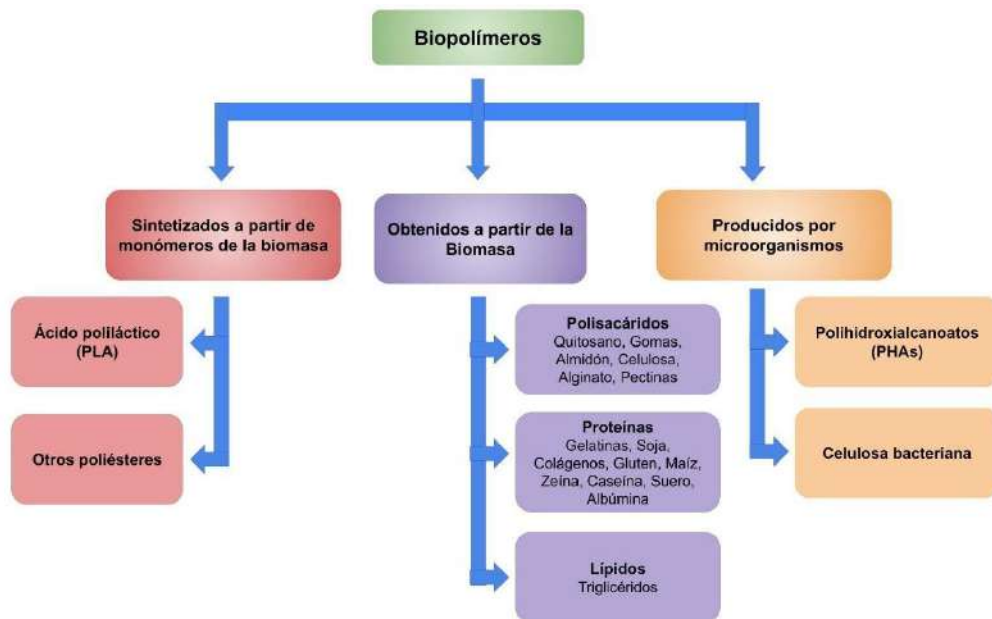


Figura 2. Clasificación de Biopolímeros de acuerdo a su origen

1.1.1.2 Quitosano

El quitosano se ha establecido como un polímero natural de considerable interés en el vasto campo de los biomateriales. Originario de la quitina, este biopolímero es predominantemente extraído de los exoesqueletos de crustáceos, como cangrejos y camarones, así como de las paredes celulares de ciertos hongos. La quitina, a través de un proceso químico de desacetilación, se transforma en quitosano, lo que implica la eliminación de grupos acetilo para revelar grupos amino libres, fundamentales para las características únicas del quitosano (35).

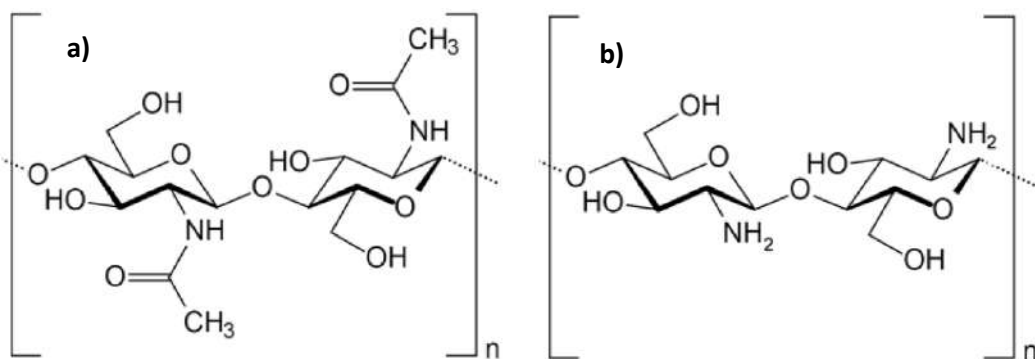


Figura 3. Estructura química de la a) Quitina y el b) Quitosano.

La estructura molecular del quitosano, enriquecida con grupos amino, confiere al polímero propiedades notables como la solubilidad en soluciones ácidas, una capacidad singular entre los polisacáridos. Esta propiedad es esencial para su procesamiento y aplicación en diversas formas, incluyendo películas, fibras, y geles. Estas formas permiten la utilización del quitosano en un rango amplio de aplicaciones, desde la medicina hasta la ingeniería ambiental (33).

En el ámbito biomédico, el quitosano es ampliamente reconocido por su excepcional biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo que permite su uso en aplicaciones críticas como la ingeniería de tejidos, vendajes avanzados, y sistemas de liberación controlada de medicamentos. La biodegradabilidad asegura que el quitosano se descompone en componentes no tóxicos que

pueden ser fácilmente eliminados o absorbidos por el cuerpo, minimizando cualquier riesgo de reacción adversa a largo plazo.

En el campo de la ingeniería de tejidos, el quitosano ha sido explorado por su capacidad para apoyar la formación y el crecimiento de tejidos. La fabricación de andamios de quitosano que imitan la matriz extracelular natural ofrece un entorno óptimo para la adhesión, proliferación y diferenciación celular, promoviendo la regeneración de tejidos dañados. Este uso del quitosano no sólo se limita a la reparación de tejidos blandos, sino que también se extiende a la regeneración ósea y la reparación del cartílago, áreas en las que la funcionalización del quitosano con bioactivos específicos puede dirigir efectivamente la formación de tejidos específicos (38).

Por otra parte, el quitosano ha demostrado ser un material excepcionalmente versátil en la administración de fármacos, gracias a su capacidad para formar complejos estables con principios activos y liberar el contenido de manera controlada en el sitio de acción. Estas propiedades han permitido su aplicación en múltiples plataformas terapéuticas, desde hidrogeles hasta nanopartículas, mejorando la eficacia de los tratamientos y minimizando efectos adversos.

Su selección en este estudio responde a una combinación de características que lo convierten en un candidato ideal para el desarrollo de sistemas biomédicos avanzados. Derivado de la quitina, presente en los exoesqueletos de crustáceos y en las paredes celulares de ciertos hongos, el quitosano es un material natural y sostenible, lo que lo hace particularmente atractivo en la búsqueda de biomateriales ecológicamente responsables.

Además de su flexibilidad estructural, el quitosano destaca por su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. Su capacidad para degradarse en compuestos no tóxicos dentro del organismo lo hace idóneo para aplicaciones médicas en las que la seguridad es un requisito fundamental. Su uso en la administración de fármacos permite no solo una liberación prolongada y eficiente, sino también una reducción del impacto ambiental y biológico de los residuos farmacéuticos.

La combinación de estas propiedades convierte al quitosano en un recurso valioso para la investigación biomédica y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Su potencial para mejorar la administración de fármacos y su versatilidad en diversas aplicaciones lo consolidan como un material con un impacto significativo en la medicina moderna y en la evolución de tecnologías médicas más eficientes y sostenibles.

1.1.1.3 Embelina

El género *embelia* comprende un conjunto de arbustos que pertenecen a la familia de plantas Myrsinaceae (39) y Oxalidaceae (23). En la medicina ayurvédica, se les conoce comúnmente como vidanga. Uno de los principales metabolitos secundarios extraídos de estos arbustos es una benzoquinona llamada embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona).



Figura 4. *Embelia ribes*, especie de la familia Myrsinaceae.



Figura 5. Especie *Oxalis erythrorhiza*, nombre común "boldo de la Cordillera".

Durante varios años, esta medicina tradicional ha sido recomendada para tratar diversas enfermedades, con menciones registradas en textos históricos como el Charaka Samhita en 1949, Sushruta Samhita en 1942 y Ashtanga Hridaya en 1950. La embelina se encuentra en concentraciones del 2 al 3% en los frutos de distintos arbustos que se distribuyen a lo largo de la costa de Malabar de Sri Lanka, y se extienden a través de Sylhet, Singapur, China, así como en Assam de Cochin y las zonas montañosas de Maharashtra y Konkan en la India. En Argentina, el arbusto *Oxalis erythrorhiza* Gill. (Oxalidaceae) (Figura 5), comúnmente conocido como "boldo de la cordillera", se encuentra a una altitud entre los 4000 y 4500 m en la localidad de Bauchaceta, departamento de Iglesia de la provincia de San Juan (43).

Los frutos brillantes de color naranja ricos en hidroxibenzoquinona embelina se han establecido en la etnomedicina y se atribuye su acción farmacológica a este componente. Se ha

descrito a estos frutos como una serie de atributos, incluyendo acre, astringente, amargo, picante, expectorante, depurativo, digestivo y carminativo con propiedades antibacterianas, estomacales, diuréticas, vermífugas, anticonceptivas, rejuvenecedoras, alternativas, estimulantes, febrífugas, cólicas y tónicas. Se considera que estos frutos son beneficiosos en enfermedades cutáneas crónicas, así como en trastornos respiratorios, helmintiasis y trastornos gastrointestinales. También se cree que promueven funciones inmunológicas, mejoran la circulación sanguínea y poseen efectos antienvjecimiento (22).

La Figura 6 muestra la estructura química de la embelina (CAS N° 550-24-3), de fórmula empírica $C_{17}H_{26}O_4$ y peso molecular $294,39 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

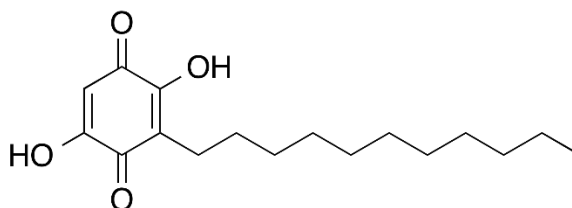


Figura 6. Estructura química de embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona)

Desde su descubrimiento, la embelina ha sido reconocida como un compuesto valioso en la farmacopea. Fue incluida en el British Pharmaceutical Codex en 1934, seguido por el Indian Pharmaceutical Codex en 1953, y finalmente se estableció como una medicina oficial en la Farmacopea de la India en 1966 (24).

Presenta diversas actividades biológicas relevantes reportadas tales como, efecto quimiopreventivo en Nnitrosodietilamina/fenobarbital en casos de hepatocarcinogénesis inducida en ratas Wistar (39), efecto de antifertilidad (40), actividad citotóxica in vitro en líneas celulares B16 y XC (42), actividad anticonvulsivante (19), antidiabética (43), y antimicrobiana (27).

1.2 Nanopartículas en el campo de la liberación de drogas

Las nanopartículas son partículas coloidales sólidas de menos de $1 \mu\text{m}$ que comúnmente fluctúan entre 100 y 500 nm de tamaño, que han revolucionado el ámbito de la administración de medicamentos. Se caracterizan por tener una relación de superficie-volumen particularmente elevada, dotándolas de capacidades singulares para la interacción con sistemas biológicos. Esta propiedad clave optimiza significativamente la administración de fármacos, facilitando su liberación de manera más precisa, mejorando la solubilidad y biodisponibilidad del agente terapéutico, minimizando los efectos adversos típicos de las terapias tradicionales, como se muestra en la Figura 7 (44).

La relevancia de las nanopartículas en la medicina moderna es incuestionable, destacándose por su capacidad para cruzar barreras biológicas y facilitar la liberación dirigida de fármacos en sitios específicos dentro del cuerpo. Esta capacidad representa un avance significativo sobre los sistemas tradicionales de entrega de medicamentos, ofreciendo nuevas posibilidades para el tratamiento de enfermedades complejas y crónicas. En dichos sistemas los fármacos se administraban generalmente por vía oral o intranasal, mediante estrategias de dosificación por inhalación o a través de mucosas, como alternativas menos invasivas a la administración tradicional mediante inyecciones intramusculares o intravenosas. Además, la naturaleza versátil de las

nanopartículas permite su modificación y adaptación para cargas diversas, desde moléculas pequeñas hasta macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, abriendo el camino para innovaciones en terapias y vacunas (45).

Por otro lado, los fármacos administrados convencionalmente presentan menor absorción, distribución sistémica aleatoria, mayor toxicidad y menor biodisponibilidad en el sitio de acción deseado. Presentando menor eficiencia por excreción temprana, y mayores obstáculos tales como degradación enzimática, diferencias de pH, pérdidas por barreras mucosales, o liberación inmediata acelerada (45).

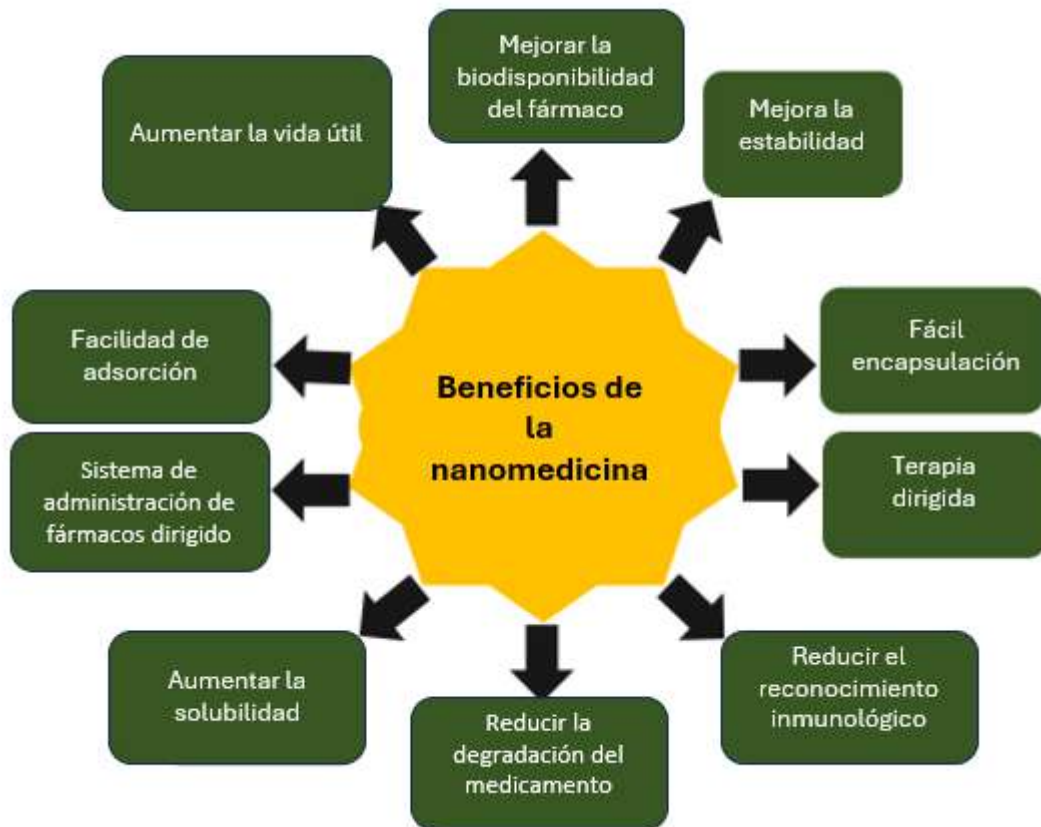


Figura 7. Beneficios de usar la plataforma de nanomedicina para administrar fármacos.

Resulta de suma importancia la caracterización completa y precisa de las nanopartículas para evaluar su potencial toxicidad en sistemas biológicos. La caracterización adecuada de las nanopartículas es esencial para garantizar que los resultados sean reproducibles y proporcionar una base sólida para comprender las propiedades de las nanopartículas que determinan sus efectos biológicos. Dicha caracterización incluye mediciones de tamaño, distribución del tamaño, forma (características morfológicas), composición química, solubilidad, área superficial, estado de dispersión, química superficial, entre otras propiedades fisicoquímicas esenciales para una evaluación toxicológica completa.

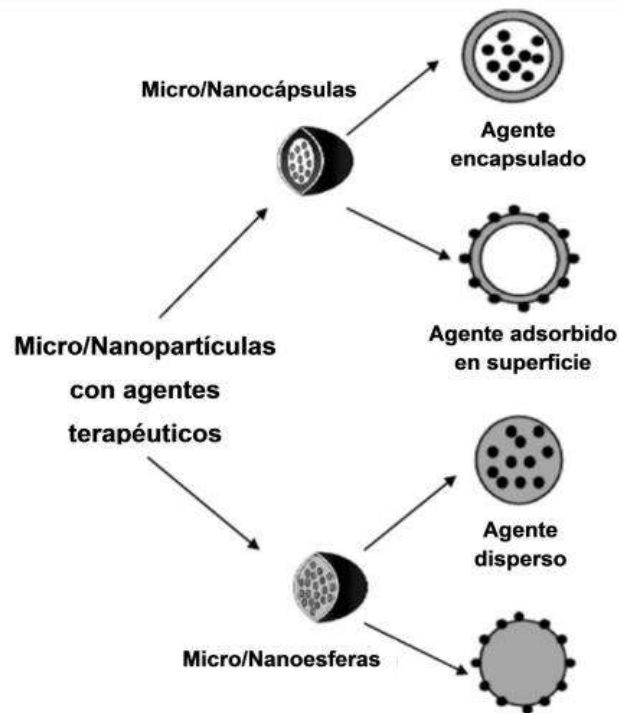


Figura 8. Clasificación de partículas poliméricas y su relación con el agente terapéutico.

Los sistemas de partículas destinados a la liberación controlada de agentes terapéuticos se pueden categorizar según su tamaño, distribución y la relación entre la partícula y el agente terapéutico. Estas características son fundamentales, ya que determinan cómo interactúan las partículas con las membranas celulares y su capacidad para atravesar las barreras fisiológicas naturales. En la Figura 8 se muestran distintos tipos de sistemas de partículas y las posibles interacciones con los agentes terapéuticos. Según su composición y organización estructural, las micro y nanopartículas pueden dividirse en micro y nanoesferas, así como en micro y nanocápsulas. Las micro y nanoesferas consisten en una matriz polimérica que retiene la sustancia activa en su interior o la adsorbe en su superficie, sin presentar un núcleo definido. Por otro lado, las micro y nanocápsulas cuentan con un núcleo que contiene la sustancia activa, rodeado por una cubierta o capa polimérica.

La implementación de nanopartículas en aplicaciones médicas y biológicas presenta desafíos significativos, incluida la necesidad de métodos de síntesis que permitan un control preciso sobre sus propiedades y la comprensión de su interacción con los sistemas biológicos para garantizar la seguridad y eficacia del tratamiento. A pesar de estos desafíos, el desarrollo continuo y los avances en el campo prometen superar estas barreras, consolidando el papel de las nanopartículas en el futuro de la medicina regenerativa y la entrega de fármacos (46).

En este sentido, las nanopartículas de quitosano emergen como una vanguardia en la intersección de la nanotecnología y las aplicaciones biomédicas, gracias a las inherentes propiedades de este polímero. Este polisacárido natural, derivado de la quitina, se distingue por su biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo cual es esencial para su integración en sistemas biológicos sin provocar efectos adversos significativos. Además, la capacidad del quitosano para su funcionalización permite su adaptación para una multitud de aplicaciones específicas, desde la liberación controlada de fármacos hasta la ingeniería de tejidos y aplicaciones antimicrobianas.

En el ámbito de la liberación de fármacos, las nanopartículas de quitosano ofrecen una plataforma excepcional para la entrega precisa y controlada de medicamentos. Su estructura permite encapsular una variedad de fármacos, mejorando su solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad, lo cual es crucial para optimizar la eficacia terapéutica y minimizar los efectos secundarios. La biocompatibilidad y biodegradabilidad del quitosano aseguran que estas nanopartículas sean seguras para aplicaciones a largo plazo, descomponiéndose en componentes no tóxicos que el cuerpo puede eliminar o absorber fácilmente.

En la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, las nanopartículas de quitosano han demostrado ser valiosas como andamios para facilitar el crecimiento celular y la regeneración de tejidos dañados. Su compatibilidad con las células promueve la adhesión y proliferación celular, esencial para la reparación y reconstrucción de tejidos. Además, las propiedades antimicrobianas del quitosano lo hacen útil en la creación de vendajes y recubrimientos que previenen infecciones, destacando su versatilidad en aplicaciones médicas.

La innovación que representan las nanopartículas de quitosano se debe a su combinación única de seguridad, eficacia y versatilidad, lo que las posiciona como líderes en la nanomedicina. Su capacidad para cruzar barreras biológicas y entregar medicamentos de manera eficiente subraya el potencial de estas nanopartículas para revolucionar la forma en que se administran los tratamientos. Además, su desarrollo sostenible, derivado de fuentes renovables, refleja la demanda creciente de soluciones tecnológicas que son responsables tanto con el medio ambiente como con los imperativos éticos de la medicina moderna (47).

1.3 Electropray monoaxial y coaxial.

La ingeniería de partículas implica la exploración de diversas metodologías para preparar partículas con dimensiones, formas, estabilidad y propiedades deseadas, adaptadas a usos particulares en sectores como la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y agroindustrial.

El *electrospray*, como método para dispersar una muestra líquida en forma homogénea, es una técnica antigua. Su efecto físico subyacente fue descrito por primera vez por Sir Geoffrey Taylor. Desde muy temprano, se especuló por Malcolm Dole *et al.* que el *electrospray* podría ser utilizado para generar haces moleculares de grandes moléculas, pero no pudieron respaldar esta especulación con experimentos convincentes; su configuración experimental era demasiado limitada. Fue en 1988, el grupo de John Fenn pudo demostrar que era posible transferir grandes moléculas, como proteínas, como iones a la fase gaseosa sin descomponerlas. Otros grupos de investigación y empresas que ya trabajaban con *electrospray* o técnicas de pulverización similares interfazadas con espectrómetros de masas adoptaron rápidamente los descubrimientos, lo que marcó el inicio del uso de esta técnica en ciencias biomoleculares.

Hoy en día, el *electrospray* es una técnica ampliamente utilizada para el análisis de muestras en forma líquida, y la obtención de nanopartículas poliméricas y compuestas (47). El proceso de *EHDA* consiste en la aplicación de una diferencia de potencial del orden de los kilovoltios, a una solución polimérica diluida contenida en una boquilla. La gota de solución que se encuentra en la punta de la boquilla experimenta un equilibrio entre dos fuerzas dominantes para cada punto de su superficie. Una fuerza derivada de la tensión superficial intenta devolver el líquido a la boquilla para minimizar el área superficial desfavorable desde el punto de vista energético, y por otro lado la atracción electrostática de Coulomb atrae el líquido hacia el electrodo contrario. Cuando la diferencia de potencial aplicada supera la tensión superficial de la gota, la forma elíptica de la

superficie de la gota cambia repentinamente de forma, para convertirse en un cono puntiagudo. En la punta del cono se produce una ruptura y atomización de la solución, formándose pequeñas gotas. Sir Geoffrey Taylor mostró que un equilibrio de fuerzas derivadas de la tensión superficial y fuerzas electrostáticas puede alcanzarse para todos los puntos de su superficie sólo para un cono líquido con un ángulo de apertura de 49.3° . Antes de que se alcance la tensión umbral, la igualdad entre las dos fuerzas se cumple para un radio de curvatura específico en el vértice del líquido. Sin embargo, la ecuación para el punto del vértice muestra que, a una tensión específica llamada Tensión de Cono de Taylor, el equilibrio de fuerzas se vuelve independiente del radio de curvatura; formándose un cono característico denominado Cono de Taylor. En la punta de este cono comienza la atomización o *electrospray*.

Una vez que se forman las gotas, el solvente de la superficie comienza a evaporarse en el camino hacia el colector. Las moléculas de solvente abandonan la gota como partículas neutras, lo que conduce a un aumento de la densidad de campo en la superficie de las gotas. En menos de unos pocos microsegundos, las gotas se comienzan a secar, dando lugar a la formación de partículas submicrométricas. Cuanto más pequeñas sean las gotas y mayor sea la tensión superficial, más esférica serán las partículas resultantes (48).

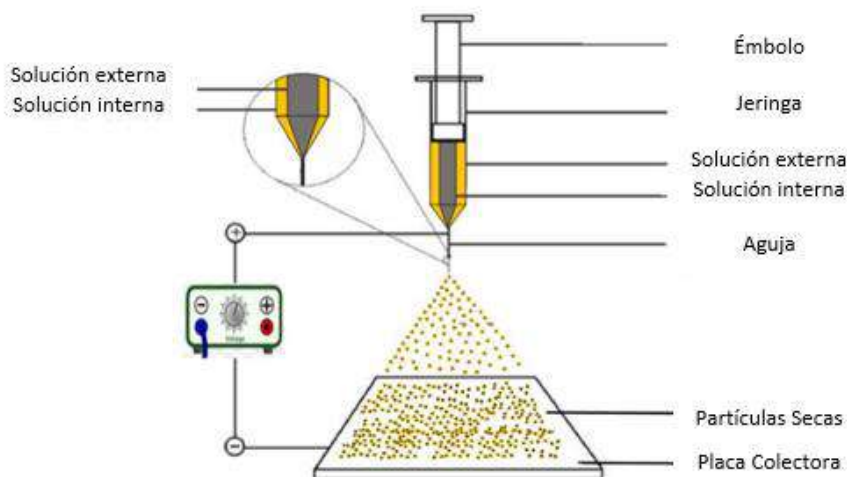


Figura 9. Esquema proceso de electro-spray coaxial para la preparación de partículas core-shell biofuncionales quitosano-embelina.

La Figura 9 presenta un esquema típico del proceso experimental de Atomización Electrohidrodinámica (EHDA). En este proceso, una solución de polímero natural o sintético, se introduce de manera controlada y a un flujo conocido (Q) a través de un tubo capilar o aguja. La aguja se mantiene a un alto potencial (V) en comparación con un electrodo cercano, conocido como colector, mediante una fuente de alta tensión aplicada. En la figura, el electrodo colector se muestra como una placa plana conectada a tierra. Cuando se aplica una diferencia de potencial elevada, del orden de los kilovolts, y un flujo (Q) adecuado, la solución polimérica en la punta de la aguja forma el Cono de Taylor, en cuyo vértice se forman las microgotas que darán origen a las nanopartículas luego de la evaporación del solvente. La estabilidad de la forma cónica del menisco sólo puede lograrse con valores bien definidos de potencial y flujo, los cuales dependen de las propiedades fluidomecánicas y electrostáticas de la solución.



Figura 10. Imagen del cono de Taylor obtenida en la práctica experimental.

En particular la técnica de *electrospray* coaxial es un proceso electrohidrodinámico que produce micropartículas y nanopartículas multicapa mediante por acción de agujas concéntricas. A través de cada aguja fluye una solución diferente, aunque sobre ellas se aplica la misma diferencia de potencial. Esto permite, la formación de micro o nanocápsulas de dos o más capas. En comparación con otros procesos de micro-nanoencapsulación, el *electrospray* coaxial presenta ventajas significativas, tales como una alta eficiencia de encapsulación, protección efectiva de la bioactividad y una distribución uniforme del tamaño. Sin embargo, el control del proceso se ve desafiado por la naturaleza multifásica del proceso y la compleja interacción de múltiples parámetros de diseño, proceso y material (49).

La transición técnica del *electrospray* de un solo eje a *electrospray* coaxial fue estimulada por los avances recientes en nanotecnología y ciencias de la vida. Se han realizado muchos esfuerzos en los últimos años para modificar el proceso tradicional de *electrospray* con el fin de preparar micropartículas y nanopartículas multifuncionales con una calidad y productividad mejoradas. La técnica de *electrospray* coaxial modifica el proceso de *electrospray* monoaxial, empleando un sistema de agujas concéntricas como puede observarse en la Figura 9, lo que permite la formación de partículas con dos o más capas.

1.4 Liberación controlada a partir de partículas

El diseño y aplicación de **sistemas de liberación controlada de agentes terapéuticos** es uno de los campos más relevantes en el desarrollo de nuevas formas de medicación. Estos sistemas buscan mejorar la eficacia terapéutica, reducir los efectos secundarios y aumentar la comodidad del paciente al disminuir la frecuencia de administración.



Figura 11. Disciplinas científicas interrelacionadas con la liberación de agentes terapéuticos.

La utilización de **polímeros** como vehículos de liberación ha cobrado gran interés debido a su capacidad para regular y dosificar de manera precisa la liberación de agentes bioactivos en aplicaciones específicas. Estos polímeros pueden ser de origen natural, sintético o combinaciones de ambos, y permiten liberar el agente terapéutico de manera prediseñada, controlando tanto el modo de distribución como su farmacocinética. Dependiendo del sistema, la liberación puede ser constante durante largos períodos, cíclica, o bien activada por factores externos como cambios en el pH, temperatura, o la presencia de ciertos fluidos del cuerpo.

Uno de los principales objetivos de estos sistemas es evitar los inconvenientes asociados a la **administración convencional de fármacos**, como el riesgo de intoxicación por sobredosis o la fluctuación ineficaz de las concentraciones plasmáticas del agente terapéutico. En los métodos convencionales, las concentraciones de los agentes suelen variar de forma significativa, dando lugar a periodos de ineficacia o toxicidad. Esto es particularmente problemático cuando los niveles terapéutico y tóxico están muy cercanos entre sí.

El control de la **velocidad de liberación** depende de las propiedades del polímero, la interacción entre el polímero y el agente, y factores ambientales como el pH y la temperatura. La liberación controlada busca mantener una concentración uniforme del agente terapéutico en el cuerpo, minimizando la necesidad de dosis frecuentes, y reduciendo el riesgo de efectos secundarios.

En el sistema de liberación ideal, el agente terapéutico se mantiene en concentraciones constantes y efectivas durante un tiempo prolongado, con dosis más pequeñas y distribuidas de manera controlada, mejorando la eficacia del tratamiento y la seguridad para el paciente.

1.4.1 Liberación controlada a partir de sistemas poliméricos

La liberación controlada de agentes terapéuticos ha evolucionado significativamente en las últimas décadas, permitiendo administrar fármacos de manera precisa y eficiente. Estos sistemas no sólo mejoran la eficacia terapéutica, sino que también minimizan los efectos secundarios y

reducen la frecuencia de administración de los medicamentos, mejorando la comodidad del paciente.

Los sistemas de liberación controlada pueden clasificarse según el tipo de control que ejercen sobre el agente terapéutico, ya sea temporal (prolongado, retardado o pulsátil) o espacial (sitios específicos o sistemas diana). Además, estos sistemas se pueden agrupar en cuatro grandes categorías, basadas en el mecanismo que rige la liberación: sistemas controlados por difusión, activación del solvente, reacción química o enzimática, y respuesta al ambiente fisiológico.

1.4.2 Sistemas de liberación controlada por difusión.

La difusión es uno de los mecanismos más simples y efectivos para regular la liberación de un agente terapéutico. En estos sistemas, el fármaco está contenido o disperso en una matriz polimérica, y su liberación se produce a medida que difunde hacia el medio externo. La velocidad de liberación está gobernada por factores como el peso molecular del agente, su solubilidad en la matriz y en el medio de liberación, así como las propiedades físicas del polímero, como su estructura y porosidad (Figura 12). Estos sistemas son comunes en dispositivos como implantes, parches transdérmicos y dispositivos de administración oral.

Dependiendo de la arquitectura del sistema, la difusión puede ocurrir de dos maneras: a escala macroscópica, a través de poros en la matriz polimérica, o a nivel molecular, entre las cadenas de polímero. Los sistemas matriciales (o monolíticos) permiten la liberación del fármaco de manera gradual, mientras que, en los sistemas de reservorio, el agente terapéutico está contenido en un núcleo rodeado por una membrana polimérica que regula la velocidad de liberación. Ejemplos comunes incluyen cápsulas de dimetilsiloxano y copolímeros de etileno y acetato de vinilo, que permiten la liberación prolongada de agentes terapéuticos como el levonorgestrel durante varios años, manteniendo una cinética de orden cero.

La cinética de liberación en estos sistemas depende de diversos factores. Entre ellos se destacan el área superficial del dispositivo, la densidad de la membrana y el coeficiente de difusión del fármaco a través del polímero. Además, la cantidad de agente terapéutico incorporado en la matriz y la geometría del sistema pueden modificar la velocidad de liberación. Cuando existe suficiente cantidad de fármaco en el reservorio, la concentración interna se mantiene mayor que la externa, lo que permite una velocidad de liberación constante a lo largo del tiempo.

Los sistemas de liberación por difusión presentan la ventaja de mantener niveles terapéuticos constantes durante períodos prolongados, mejorando la adhesión del paciente a la terapia, al reducir la necesidad de dosis frecuentes. Sin embargo, la efectividad de estos sistemas depende significativamente de las propiedades fisicoquímicas tanto del fármaco como del polímero utilizado, lo que puede limitar su aplicación en algunos casos. Asimismo, en aplicaciones biomédicas, la biocompatibilidad del material es un factor crítico que debe ser considerado para evitar respuestas adversas en el organismo.

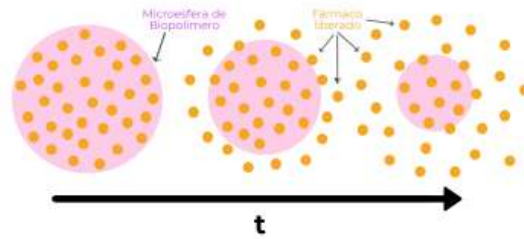


Figura 12. Difusión de agente terapéutico a partir de una matriz polimérica.

1.4.3 Sistemas de liberación controlada por activación del solvente

En este tipo de sistemas, el medio acuoso penetra en la matriz polimérica, hinchándola y formando canales por los cuales el agente terapéutico puede salir (Figura 13). Alternativamente, en ciertos casos, la liberación se impulsa mediante un sistema osmótico, en el que la entrada de agua crea presión, liberando el fármaco de manera controlada a través de una membrana semipermeable.

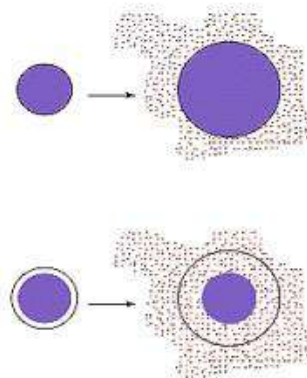


Figura 13. Sistema de liberación de agentes terapéuticos por activación del solvente: sistema controlado por hinchamiento (superior) y sistema reservorio (inferior).

1.4.4 Sistemas de liberación controlada por reacción química o enzimática.

En este enfoque, la liberación del agente terapéutico está controlada por una reacción química, generalmente de tipo hidrolítica o enzimática, que degrada el polímero contenedor. Este tipo de sistemas es comúnmente utilizado en polímeros biodegradables, los cuales se descomponen de manera natural dentro del cuerpo y son eliminados por rutas fisiológicas convencionales (Figura 14).

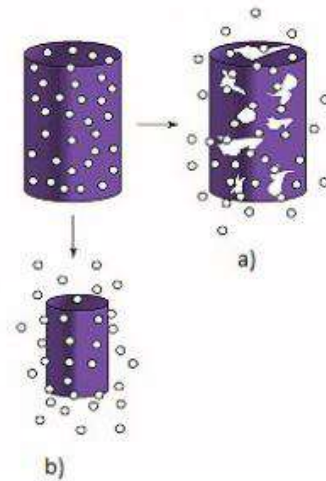


Figura 14. Sistema de liberación a partir de polímeros biodegradables: a) degradación de masa, b) erosión superficial.

1.4.5 Sistemas de liberación controlada por el ambiente fisiológico.

Estos sistemas están diseñados para responder a cambios en el entorno fisiológico, como variaciones en el pH, temperatura o la presencia de estímulos bioquímicos específicos. Los polímeros utilizados en estos sistemas, conocidos como polímeros "inteligentes", experimentan modificaciones estructurales abruptas en respuesta a estos estímulos, lo que permite la liberación controlada del agente terapéutico solo bajo condiciones específicas.

Uno de los ejemplos más comunes de este tipo de sistema es la **bomba osmótica**, la cual regula la liberación del fármaco en función de las condiciones del entorno corporal. La bomba osmótica elemental consiste en un núcleo osmótico central que contiene el agente terapéutico, rodeado por una membrana semipermeable y con un pequeño orificio para la liberación del fármaco (Figura 15). A simple vista, este sistema se asemeja a una pastilla convencional, pero su funcionamiento está basado en la ósmosis. Una vez en el tracto intestinal, el fármaco extrae agua a través de la membrana semipermeable hacia el núcleo. El agua es absorbida a una velocidad controlada, determinada por la permeabilidad de la membrana y la actividad osmótica de la formulación del núcleo.

Dado que la estructura de la membrana semipermeable impide que el volumen de la pastilla aumente, la disolución del agente terapéutico es expulsada a través del orificio al mismo tiempo que el agua entra por ósmosis. Este proceso mantiene una velocidad de liberación constante hasta que se disuelve completamente el núcleo osmótico. Además, una de las ventajas clave de estos sistemas es que la velocidad de liberación es independiente de las variaciones de pH a lo largo del tracto intestinal, garantizando una liberación controlada incluso en condiciones fisiológicas cambiantes. Al final del proceso, la membrana inerte es excretada intacta, lo que asegura que el sistema no cause daños en el cuerpo.

Además de las bombas osmóticas, los **polímeros "inteligentes"** utilizados en estos sistemas responden a una variedad de estímulos, que pueden clasificarse en tres categorías principales:

Estímulos físicos: cambios de temperatura, fuerza iónica, campos eléctricos, mecánicos o magnéticos, presión, radiaciones sónicas, entre otros.

Estímulos químicos: variaciones en el pH, la presencia de iones específicos o agentes químicos en el entorno.

Estímulos bioquímicos: sustratos de enzimas, ligandos afines y otros agentes biológicos.

Gracias a esta capacidad de respuesta controlada a estímulos externos, estos sistemas permiten minimizar la liberación no deseada de agentes terapéuticos en áreas que no lo necesitan. Por ejemplo, en sistemas sensibles al pH, los polímeros pueden cambiar de forma o solubilidad en respuesta a variaciones en los niveles de acidez, facilitando la liberación del fármaco en áreas específicas del cuerpo, como el tracto gastrointestinal o tejidos inflamados. De manera similar, los sistemas sensibles a la temperatura pueden liberar el fármaco cuando detectan un aumento localizado de calor, como en zonas inflamadas o tumorales.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la complejidad de estos sistemas también puede presentar desafíos, ya que la respuesta a estímulos externos debe ser diseñada cuidadosamente para evitar la liberación prematura o ineficaz del agente terapéutico. Esto requiere una planificación precisa durante su desarrollo, asegurando que los polímeros respondan de manera adecuada solo en las condiciones fisiológicas deseadas.

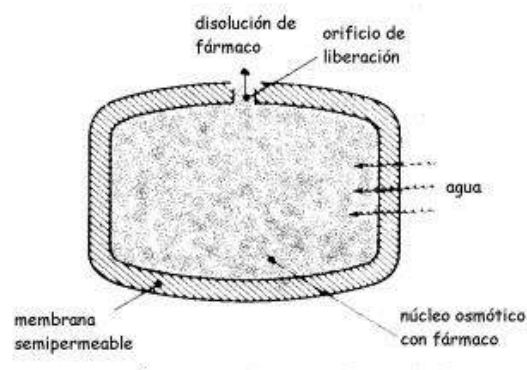


Figura 15. Sección transversal de un sistema osmótico para administración oral.

1.4.6 Aplicaciones y ventajas de los sistemas poliméricos

Las nanopartículas y micropartículas poliméricas han emergido como tecnologías claves en el diseño de estos sistemas. Su capacidad para encapsular agentes terapéuticos, protegerlos de la degradación prematura, y liberarlos de manera controlada ha ampliado el espectro de aplicaciones, especialmente en el ámbito biomédico. Los polímeros biodegradables, como el quitosano y el ácido poliláctico, han mostrado ser muy prometedores en la administración de fármacos y terapias dirigidas, permitiendo liberaciones prolongadas y minimizando la toxicidad sistémica.

El diseño de estas partículas permite optimizar tanto el perfil de liberación del agente terapéutico como su biodisponibilidad en el cuerpo. Factores como el tamaño de las partículas, la naturaleza del polímero y las condiciones fisiológicas son fundamentales para ajustar la velocidad

de liberación. Por ejemplo, las nanopartículas pueden circular durante más tiempo en el cuerpo, acumularse en tejidos específicos y liberar el fármaco de manera sostenida, lo que es crucial para tratamientos en enfermedades como el cáncer.

1.4.7 Liberación inicial rápida (Burst Release):

En algunos sistemas de liberación controlada, se observa una fase inicial donde una cantidad significativa del agente terapéutico se libera rápidamente tras la exposición al medio de liberación, antes de estabilizarse en un perfil más gradual. Este fenómeno, conocido como liberación inicial rápida o *burst release*, puede ocurrir debido a la presencia de moléculas del agente terapéutico en la superficie del sistema, así como por la morfología o estructura del polímero. Aunque en algunos casos este efecto puede ser beneficioso, por ejemplo, para lograr una rápida acción terapéutica en el tratamiento de heridas, en otros contextos puede resultar perjudicial al provocar concentraciones excesivas del agente en poco tiempo, lo que podría ser tóxico o disminuir la efectividad del sistema a largo plazo.

Es importante tener en cuenta la posible aparición de este fenómeno en la liberación de embelina a partir de las partículas de quitosano, ya que una liberación inicial rápida podría generar algún impacto en la eficiencia del tratamiento buscado. Existen estrategias para mitigar este efecto, como el uso de recubrimientos o la modificación de la superficie de las partículas, con el fin de regular la liberación de manera más controlada y prolongada.

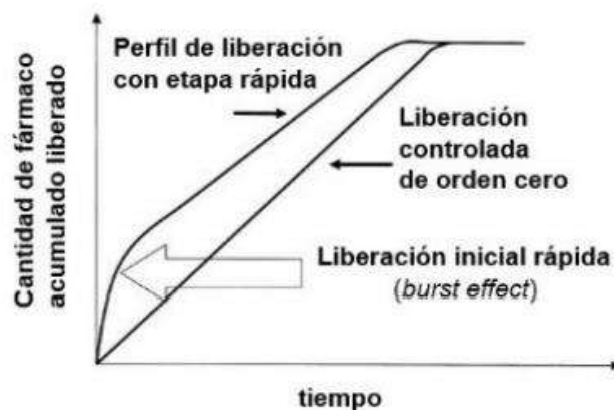


Figura 16. Liberación inicial rápida en un perfil de liberación

1.5. Modelos matemáticos de liberación.

El estudio teórico de la cinética de liberación está relacionado con la comprensión e interpretación de los complejos fenómenos de liberación, que dependen entre otros factores de la composición química, cristalinidad, solubilidad, cantidad y tamaño de partícula, factores dependientes del medio de liberación, transporte de masa a través de la matriz polimérica, técnica de preparación, entre otros. Resulta entonces un fenómeno difícil de modelizar intentando relacionar la cantidad de agente liberado (M) con el tiempo de liberación.

Los modelos que describen los mecanismos cinéticos de liberación se pueden agrupar en:

- a) Modelos matemáticos mecanicistas o reales, en los que la ecuación $M = f(t)$ tiene un sentido real y los parámetros que la constituyen se explican como resultado de un análisis teórico.
- b) Modelos matemáticos empíricos o no mecanicistas, basados en ecuaciones cuyo éxito reside en la capacidad para ajustar curvas experimentales.

La ventaja del uso de modelos matemáticos consiste en poder predecir el comportamiento del agente, lo que permite minimizar el número de experimentos necesarios y contribuir al desarrollo de nuevos productos farmacéuticos. Los mecanismos cinéticos más importantes en el proceso de liberación controlada son la difusión, el hinchamiento y la erosión.

Otro punto importante a considerar es si la constante de difusión depende o no de la concentración del polímero. En aquellos casos en que la matriz presenta poca interacción con el fluido ingresante, es decir se expande poco, la difusión del agente terapéutico dependerá del fluido ingresante al sistema. En estos casos, una buena aproximación es considerar que el fenómeno principal que afecta la velocidad de liberación es el gradiente de concentración y se considera la constante de difusión independiente de la concentración del polímero (primera ley de Fick) (49). La interacción entre la matriz polimérica y el flujo ingresante determinará la mejor aproximación o menor afinidad con los modelos cinéticos. Si es posible considerar que el fenómeno principal que afecta la velocidad de liberación es el gradiente de concentración y se considera la constante de difusión independiente de la concentración, responderá a la primera ley de Fick.

Para aquellos casos donde la matriz presenta una fuerte interacción con el fluido que ingresa, la expansión dependerá de las características fisicoquímicas del polímero, tales como su peso molecular, el grado de sustitución y la viscosidad. Por lo tanto, la difusividad del agente terapéutico dependerá del fluido ingresante y de las características de hinchamiento del polímero, proceso controlado por la segunda ley de Fick. Contrariamente, a mayor afinidad con el fluido ingresante, la expresión dependerá de las características fisicoquímicas del polímero (peso molecular, viscosidad, etc), en este caso la difusividad depende del hinchamiento del polímero, proceso controlado por la segunda ley de Fick.

Los recubrimientos impermeables al medio pueden incidir en los mecanismos de liberación, alterando las velocidades de relajación de las cadenas poliméricas y, por ende, las dimensiones en la expansión. Aunque las velocidades de difusión de los agentes se mantengan invariables, la presencia de estos recubrimientos puede impactar la velocidad de liberación al relajar las cadenas poliméricas (51). Esta capacidad de modificar la liberación sin afectar la difusión del agente terapéutico ha permitido desarrollar sistemas que comienzan a actuar después de un periodo específico, dependiendo del tipo y espesor del recubrimiento. La implementación de este tipo de recubrimientos ha posibilitado la creación de sistemas de liberación conocidos como "tiempo de explosión controlada", en los cuales la liberación del agente se inicia tras un lapso predefinido. Estos periodos sin liberación pueden ser programados, según el tipo de recubrimiento utilizado.

Por último, resulta fundamental tener en cuenta los procesos fisicoquímicos relacionados con la solubilidad del agente terapéutico en el medio acuoso de liberación, pudiendo distinguirse tres casos (52):

- ❖ Agentes muy solubles ($> 5 \text{ mg.ml}^{-1}$): la disolución depende del tiempo de infiltración del medio en la matriz, es decir, el tiempo en que el medio penetra e hincha la matriz polimérica.
- ❖ Agentes poco solubles ($< 0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$): la liberación dependerá de la erosión de la matriz polimérica, dado que el agua que ingresa e hincha el polímero no alcanza para solubilizar el agente terapéutico. En estos casos, la velocidad de disolución depende

mayoritariamente de las características de solubilidad del agente tales como el estado cristalino, estado iónico (polaridad) y tamaño de la partícula.

- ❖ Agentes parcialmente solubles (entre 0,5 y 5 mg.ml⁻¹): consiste en un comportamiento intermedio entre los anteriormente mencionados, es decir que la velocidad de liberación dependerá de la velocidad de infiltración e hinchamiento de la matriz, y por lo tanto de la velocidad de erosión de la matriz polimérica.

En base a lo expuesto previamente, se desprende que la liberación de un agente desde un sistema polimérico está condicionada tanto por su composición como por su geometría. A continuación, se describen algunos de los modelos mecanicistas más utilizados para ajustar la cinética de liberación.

1.5.1. Modelo de Orden Cero

El Modelo de Orden Cero surge de la base teórica desarrollada para el estudio cinético de las reacciones químicas, donde el término "orden" de reacción indica cómo la concentración de una sustancia influye en la velocidad de la reacción. En este contexto, se denomina "cinética de orden cero" a aquella en la que la velocidad es independiente de la concentración. Para la aplicación de este modelo, se asume que la velocidad de difusión del agente terapéutico es constante e independiente de la cantidad de agente disuelto, y que el área desde la cual se libera el agente permanece constante.

La ecuación básica del modelo se expresa como:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = A + k \cdot t \quad \text{Ec.1}$$

Donde M_t es la cantidad absoluta de agente terapéutico liberado al tiempo t , M_∞ es la cantidad total de agente terapéutico liberado a tiempo infinito (correspondiente a la cantidad total de agente inicialmente incorporado al sistema), A es la cantidad inicial de agente en solución (que generalmente es cero) y k es la constante de velocidad.

Este modelo se utiliza con éxito para ajustar datos de liberación obtenidos de sistemas osmóticos y reservorios, y también se ha propuesto para describir parcialmente la liberación en sistemas matriciales.

1.5.2. Modelo de Higuchi

El Modelo de Higuchi, probablemente una de las ecuaciones matemáticas más frecuentemente utilizadas para describir la velocidad de liberación de un agente terapéutico desde un sistema polimérico matricial, fue desarrollado por Higuchi. Aunque ha sido modificado y extendido para adaptarse a diferentes geometrías y características de las matrices, la ecuación básica del modelo propuesto se expresa en la siguiente ecuación:

$$M_t = A \cdot [D \cdot (2C_o - C_s) \cdot C_s \cdot t]^{\frac{1}{2}} \text{ para } C_o > C_s$$

Que puede expresarse como la fracción de masa liberada:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = A + k_H \cdot t^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec.2}$$

Siendo $k_H = [D \cdot (2C_o - C_s) \cdot C_s \cdot t]^{\frac{1}{2}}$, la constante de velocidad, donde M_t es la cantidad absoluta acumulativa de agente terapéutico liberado al tiempo t , A el área superficial del sistema de liberación controlada D es el coeficiente de difusión del agente en el medio matriz polimérica, C_o la concentración inicial del agente en el sistema matricial, C_s la solubilidad del agente en el

medio polimérico, M_{∞} la cantidad total de agente terapéutico liberado a tiempo infinito, la que se corresponde con la cantidad total de agente inicialmente incorporado al sistema, k_H es una constante que tiene en cuenta las variables de diseño del sistema y A es la fracción de liberación inicial. Las condiciones que deben tenerse en cuenta para aplicar este modelo son:

- a) La concentración inicial del agente terapéutico en el sistema es mucho mayor que la solubilidad del agente en el mismo (condiciones sink).
- b) El análisis matemático se basa en la difusión unidireccional (se desprecian las condiciones de contorno).
- c) El tamaño de partícula de agente terapéutico disperso en el sistema polimérico no es significativa frente al espesor.
- d) El hinchamiento y disolución del polímero son despreciables.
- e) La difusividad del agente es constante.
- f) En todo proceso de liberación se mantiene las condiciones sink.

Este modelo se puede aplicar con mayor exactitud a matrices unidireccionales tales como películas poliméricas poco solubles que no sufran hinchamiento y donde el agente es muy soluble.

Este modelo se puede aplicar con mayor precisión a matrices lineales como películas poliméricas poco solubles que no experimenten hinchamiento, y en las cuales el agente sea altamente soluble (52).

1.5.3 Modelo de Korsmeyer-Peppas

A partir de los años 70, se desarrollaron numerosos sistemas de liberación modificada con mecanismos basados en la difusión a través de matrices inertes o membranas, intercambio iónico, ósmosis, hinchamiento, entre otros. Sin embargo, se observó que el ajuste de las cinéticas de liberación de estos sistemas mediante las ecuaciones planteadas hasta ese momento era a menudo inadecuado. Era evidente que en numerosas ocasiones un solo mecanismo no podía explicar de manera completa el comportamiento de la liberación.

Fue entonces cuando Peppas y colaboradores desarrollaron un modelo que considera no sólo la difusión del agente terapéutico, sino también la relajación de las cadenas del polímero como factores determinantes de la liberación. En este modelo, la dependencia de la velocidad de liberación con el tiempo se conoce también como ley de potencia (53).

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = K_{KP} + t^n \quad \text{Ec.3}$$

donde K_{KP} es una constante que refleja las características estructurales y geométricas del sistema de liberación y n es el exponente de liberación, que indica el mecanismo de liberación que ocurre.

Esta ecuación puede entenderse como el resultado de la combinación de dos procesos aparentemente independientes: el transporte del agente terapéutico, que sigue las leyes de Fick, y el hinchamiento de la matriz, que implica la transición de un estado semirrígido a otro más flexible (transporte caso II). Dependiendo de los valores de n , pueden identificarse los siguientes mecanismos de liberación:

- Orden cero ($n = 1$): En este caso, se observa un control del hinchamiento en la liberación del agente. Prevalece el mecanismo correspondiente al transporte caso II en polímeros,

donde la relajación de la matriz polimérica debido a la absorción de agua juega un papel crucial en la velocidad de liberación.

- Difusión Fickiana ($n = 0,5$): Se refiere a situaciones en las que la velocidad de penetración del medio acuoso es menor que la velocidad de relajación de las cadenas poliméricas.
- Difusión anómala ($0,5 < n < 1$): Aquí coexisten los mecanismos de difusión y expansión de la matriz polimérica. Durante el proceso de hinchamiento, la difusión y la relajación viscoelástica de las cadenas poliméricas ocurren simultáneamente.
- Difusión cuasi-Fickiana ($n < 0,5$): Se da cuando la velocidad de penetración del medio acuoso es mucho menor que la velocidad de relajación de las cadenas del polímero.
- Supercaso tipo II ($n > 1$): Este caso está asociado a la presencia de poros en la matriz polimérica, lo que facilita una mayor área superficial e ingreso de medio acuoso, actuando como una vía para la difusión a través de la matriz.

Los valores característicos de los exponentes de difusión n para diferentes geometrías se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Mecanismos de liberación difusional para sistemas poliméricos de diferentes geometrías.

Film	Cilindro	Esfera	Mecanismo de liberación
$n < 0,5$	$n < 0,45$	$n < 0,43$	Difusión cuasi Fickiana
0,5	0,45	0,43	Difusión Fickiana
$0,5 < n < 1$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Difusión anómala
1	0,89	0,85	Transporte caso II
$n > 1$	$n > 0,89$	$n > 0,85$	Transporte súper caso II

2 Objetivos

En este trabajo se han establecido objetivos que abordan diferentes aspectos del proceso de obtención y caracterización de nanopartículas poliméricas a partir del biopolímero quitosano. Estos objetivos están diseñados para optimizar el proceso de fabricación, realizar análisis detallados de las propiedades de las nanopartículas, evaluar su efectividad como vehículos de liberación controlada de embelina, y explorar su potencial aplicación como agentes antimicrobianos. Además, se llevará a cabo un estudio de mercado y se redactará un informe final que resuma los hallazgos y resultados obtenidos, junto con su divulgación en eventos académicos y científicos.

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo consiste en obtener nanopartículas poliméricas de tipo *core-shell* a partir de un núcleo del compuesto bioactivo embelina, y una cubierta con propiedades

antibacterianas y mucoadhesivas formada por el biopolímero quitosano, que permita la liberación controlada del agente terapéutico poco soluble en agua.

2.2 Objetivos específicos

- Optimizar los parámetros del proceso para la preparación de nanoesferas de quitosano, y nanocápsulas core-shell de quitosano-embelina mediante la técnica de *electrospray*.
- Realizar la caracterización fisicoquímica y morfológica de los materiales y de las nanopartículas mediante análisis térmico (DSC), infrarrojo (FTIR), difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (SEM) y transmisión (TEM), y dispersión dinámica de la luz (DLS).
- Estudiar el contenido de embelina incorporada en las partículas core-shell y la cinética de liberación del fármaco mediante espectroscopía ultravioleta/visible (UV-Vis). Analizar la relación estructura-propiedad del sistema core-shell.
- Determinar el efecto antimicrobiano de las nanopartículas con embelina frente a cepas bacterianas y fúngicas tipificadas ATCC y aislados clínicos, mediante la técnica de microdilución en caldo.
- Realizar un estudio de mercado respecto de los sistemas de liberación controlada a partir de quitosano, factibilidad de escalado, y el marco regulatorio para la obtención de un producto comercializable.
- Divulgación de los avances y resultados en eventos académicos y científicos.

3 Materiales

En el presente trabajo se empleó quitosano de bajo peso molecular (CAS: 9012-76-4) adquirido a través de Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO, USA). La embelina fue obtenida y proporcionada por los Dres. Sandra López y Alejandro Tapia, miembros del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería, perteneciente a la Universidad Nacional de San Juan. Por otro lado, se empleó ácido acético glacial (CH_3COOH) de 60,05 g/mol obtenido de Anedra Research AG (Tigre, Bs. As, Argentina), mientras que el diclorometano (DCM) de PM: 84,93 (CAS: 75-09-2) fue obtenido de Cicarelli Laboratorios (San Lorenzo, Santa Fe, Argentina).

4 Métodos

4.1 Preparación de partículas de quitosano (Qp)

Para la obtención de las partículas se prepararon soluciones de quitosano en ácido acético glacial 1 M, en concentraciones del 1,5% p/v. Estas soluciones se utilizaron como alimentación para el proceso de *electrospray*. Se realizó la optimización de las condiciones de procesamiento mediante el ajuste de una variedad de parámetros, que incluyeron la distancia entre la aguja y el colector (d) con variaciones entre 10, 12, 15 y 17 cm. Asimismo, se ajustaron las diferencias de potencial (V) entre la aguja y la placa colectora conectada a tierra, entre 15, 17, 20 y 22 kV. Se mantuvo un flujo de infusión de la solución polimérica constante de $\phi = 0,2$ ml/h, empleando este valor dado que a valores de velocidad de infusión superiores se obtenía un procesamiento inestable. Es importante destacar que en el procesamiento de biopolímeros es necesario emplear valores de flujo bajos, para evitar el goteo y garantizar que toda la solución infundida sea procesada adecuadamente.

Estas variaciones en los parámetros de proceso permitieron explorar diferentes condiciones experimentales con el fin de evaluar su impacto en la producción de partículas mediante la técnica de electrospray. La elección de estos parámetros se basó en la literatura previamente reportada y en experimentos preliminares, buscando alcanzar una dispersión óptima y un rendimiento máximo en la formación de partículas.

Este enfoque sistemático y metódico en la selección de los parámetros del proceso resultó fundamental para comprender y controlar el procesamiento de cada sistema polímero-solvente, mediante la técnica de *electrospray*, permitiendo de esta manera maximizar la eficiencia de recolección de partículas y la reproducibilidad de la técnica. Los resultados obtenidos a partir de estos estudios preliminares proporcionaron información muy valiosa para optimizar el procesamiento de partículas de quitosano mediante *electrospray*, y su aplicación en diversas aplicaciones biomédicas humanas y veterinarias, entre otras.

En la Tabla 2 se detallan las diferentes condiciones de procesamiento exploradas en este trabajo.

Tabla 2. Condiciones experimentales para la obtención de partículas de quitosano.

Muestra	Caudal [ml/h]	Distancia [cm]	Voltaje [kV]
Qp-1	0,2	10	15
Qp-2	0,2	10	17
Qp-3	0,2	10	20
Qp-4	0,2	10	22
Qp-5	0,2	12	15
Qp-6	0,2	12	17
Qp-7	0,2	12	20
Qp-8	0,2	12	22
Qp-9	0,2	15	15
Qp-10	0,2	15	17
Qp-11	0,2	15	20
Qp-12	0,2	15	22
Qp-13	0,2	17	15
Qp-14	0,2	17	17
Qp-15	0,2	17	20
Qp-16	0,2	17	22

4.2 Preparación de partículas core-shell de Q-Embelina (Q-Ep)

La preparación de la cubierta o "*shell*" se llevó a cabo utilizando la solución de quitosano descrita en la sección 4.1 como base. Para el núcleo o "*core*", se realizaron pruebas de solubilidad de la embelina en varios solventes con el objetivo de encontrar una formulación adecuada.



Figura 17. Formación de gotas concéntricas de embelina y quitosano antes de la aplicación de potencial en el proceso de electro spray.

Inicialmente, se intentó disolver la embelina en una solución de ácido acético 1 M, utilizando 5 ml de ácido acético y 0,007 g de embelina. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron los esperados, ya que en lugar de obtener una solución se formó una suspensión con la embelina separada en fases, lo que no permitiría la estabilidad de la solución durante el tiempo de procesamiento. Posteriormente, se exploró una mezcla de solventes como alternativa, combinando ácido acético (AA) con diclorometano (DCM) en una relación de 80:20. Se preparó una solución utilizando 15 mg de embelina, 8 ml de ácido acético puro y 2 ml de DCM. Esta vez, los resultados fueron satisfactorios, lo que sugiere una mejor disolución de la embelina.

Es importante destacar que la elección de la mezcla de solventes fue crucial para el éxito del proceso, ya que asegura la estabilidad de la solución de embelina durante el tiempo de procesamiento. El DCM mejoró notablemente la disolución de la embelina, y por otro lado la presencia de AA garantiza la compatibilidad con la fase externa (*shell*) formada por la solución de quitosano en AA.

Además de la selección de solventes, se realizaron pruebas para optimizar los parámetros de procesamiento. Se llevaron a cabo experimentos con diferentes relaciones de flujos para las soluciones interna y externa. Se exploró una relación de flujos coaxiales, con la solución de embelina a flujos de 0,05, 0,1 y 0,2 ml/h, mientras que la solución de quitosano se mantuvo constante a 0,2 ml/h. Se aplicó una diferencia de potencial de 22 kV, y se ajustó la distancia entre la aguja y el colector a 10 cm.

La relación de masa utilizada fue del 10% de embelina en relación a la masa total de quitosano, buscando alcanzar un equilibrio entre la carga de fármaco y la eficiencia del proceso de encapsulación.

4.3 Caracterización

4.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Es esencial examinar cuidadosamente la forma y las dimensiones de las partículas preparadas en este trabajo. Por esta razón, se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) para llevar a cabo la evaluación morfológica de las partículas. Se emplearon métodos de análisis

de imágenes digitales en las fotomicrografías obtenidas mediante SEM, con el fin de determinar el diámetro medio de las partículas, y observar su distribución de tamaños.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica de imagen avanzada utilizada para examinar la morfología superficial de muestras a una escala microscópica. Este método opera emitiendo un haz de electrones de alta energía hacia la muestra y recopilando la señal generada por los electrones secundarios y retrodispersados resultantes de la interacción entre el haz de electrones y la muestra. Estos electrones secundarios se utilizan para crear una imagen de alta resolución de la superficie de la muestra.

La técnica SEM ofrece una resolución espacial significativa, que puede alcanzar magnificaciones de hasta varios cientos de miles de veces, permitiendo la observación detallada de características microscópicas de la muestra. Además, la capacidad de analizar muestras en condiciones de vacío y en diversos entornos permite su aplicación en una amplia gama de disciplinas científicas, como la ciencia de materiales, la biología, la geología y la ingeniería.

Esta técnica proporciona información detallada sobre la topografía, la textura y la composición química de las muestras, lo que la convierte en una herramienta esencial para la investigación científica y el desarrollo tecnológico. Su capacidad para obtener imágenes tridimensionales y realizar análisis cuantitativos la hace invaluable en la caracterización de materiales y la comprensión de su estructura y propiedades.

En la Figura 18 puede observarse un esquema de un microscopio electrónico de barrido, en el cuál la producción de electrones se lleva a cabo en la parte superior de la columna del cañón de electrones, donde son acelerados a través de la columna a un voltaje específico de aceleración, que generalmente oscila entre 1 keV y 30 keV. Las lentes y aperturas del condensador trabajan en conjunto para reducir el diámetro del haz, y la lente objetivo, ubicada en la parte final de la columna, se encarga de enfocar el haz en la superficie de la muestra. El diámetro del haz en un microscopio electrónico de barrido (SEM) puede variar considerablemente, desde menos de 1 nanómetro hasta 20 nanómetros, dependiendo de factores como el tipo de cañón de electrones, el voltaje de aceleración y la configuración de la lente.

La muestra se coloca en un portamuestras dentro del área de la cámara, y tanto la columna como la cámara se mantienen bajo vacío mediante una combinación de bombas de vacío. La intensidad del vacío puede ajustarse según el diseño del microscopio, y algunos modelos permiten un bombeo variable, lo que posibilita mantener la cámara de la muestra a un nivel de vacío más bajo que el resto de la columna para la captura de imágenes con bajo vacío.

El posicionamiento del haz de electrones sobre la muestra se controla mediante bobinas de exploración situadas encima de la lente objetivo. Estas bobinas posibilitan el escaneo del haz sobre la superficie de la muestra en el plano XY. Al incidir el haz escaneado sobre la muestra, se generan diversas señales, como electrones secundarios, electrones retrodispersados y rayos X característicos, que son detectadas por detectores especializados.

El generador de escaneo, en conjunto con un software especializado en una computadora externa, permite la sincronización de la información del generador de escaneo (que incluye la posición X, Y del haz en cada periodo de tiempo) con la intensidad captada por el detector. Esto posibilita la generación de una imagen en escala de grises, que puede ser visualizada en tiempo real, píxel por píxel. La relación señal-ruido puede modularse dependiendo del tiempo de permanencia del haz de electrones en cada posición X, Y. La ampliación de la imagen se determina por el tamaño del área escaneada, donde mayores aumentos corresponden a áreas escaneadas

más pequeñas. Además, la cantidad de píxeles dentro de un área de escaneo determinada puede ajustarse, lo que influye en la resolución aparente de la imagen.

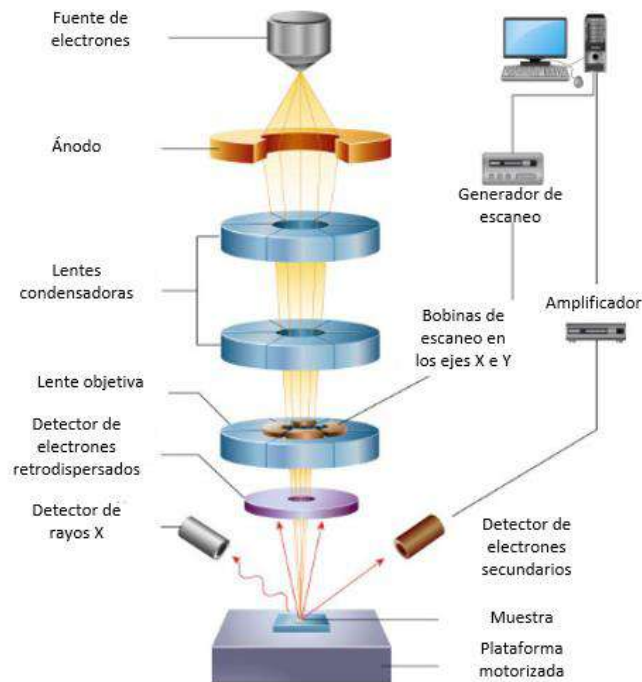


Figura 18. Esquema del Microscopio electrónico de barrido.

En este trabajo se utilizó un microscopio SEM (FESEM) ZEISS Modelo Crossbeam 350 disponible en el Laboratorio de Microscopía de INTEMA. Esta técnica proporciona imágenes con alta resolución en el orden submicrométrico y nanométrico, lo que resulta adecuado para la medición de las estructuras de interés. La Figura 19 muestra una imagen del equipo utilizado.

Se recolectaron muestras de las partículas preparadas bajo las distintas condiciones de procesamiento especificadas en las secciones 4.1 y 4.2, con el propósito de examinar sus características morfológicas. A partir de las micrografías obtenidas y mediante técnicas de procesamiento digital de imágenes, se determinaron el diámetro medio y la distribución de tamaño de las partículas empleando el software Image Pro Plus. Para este fin, se capturaron imágenes de varios sectores de la muestra y de diferentes lotes, midiendo un promedio de 80 partículas por imagen. Con esta información recopilada, se calcularon el diámetro medio y la desviación estándar de las partículas.



Figura 19. Microscopio Electrónico de Barrido

4.3.2 Análisis térmico mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es una técnica analítica ampliamente utilizada en ciencia de materiales y química para investigar las transiciones térmicas y las propiedades calorimétricas de diversos materiales. Su principio de funcionamiento se basa en medir la diferencia de flujo de calor entre una muestra y una referencia, ambas sometidas a un programa de temperatura controlada.

Durante el análisis, la muestra a analizar junto con una referencia se coloca en recipientes especiales en el equipo de DSC. En la Figura 20, se observa un esquema del equipo de DSC, donde los calentadores elevan la temperatura a una velocidad constante determinada ($5^{\circ} - 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) o mantienen el ensayo a una temperatura constante. De este modo, el equipo mide la diferencia en el flujo de calor entre la muestra y la referencia. En otras palabras, se registra el flujo extra de calor que el calorímetro debe suministrar a la muestra o a la referencia para mantenerlas a la misma temperatura en ambos recipientes, en función de la temperatura.

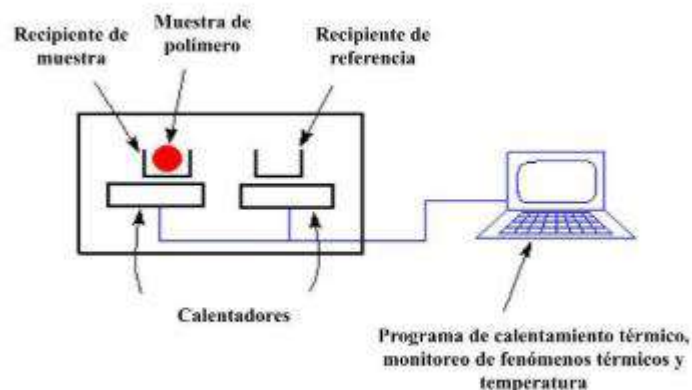


Figura 20. Esquema de un equipo de calorimetría diferencial de barrido.

Esta técnica permite determinar las transiciones endotérmicas y exotérmicas que experimentan las muestras a medida que el proceso térmico sucede. En los termogramas típicos de un ensayo DSC, se pueden observar los picos que corresponden a estas transiciones. En la Figura 21 se observa un termograma típico de un ensayo DSC. A partir de los termogramas, es posible obtener información sobre las propiedades de la muestra estudiada, como capacidades caloríficas, temperaturas de transición vítrea (T_g), temperatura de cristalización (T_c) y temperatura de fusión (T_m). Además, permite el cálculo de efectos térmicos, pureza, cinéticas de reacción y cristalización, entalpías de fusión y cristalización (ΔH_m y ΔH_c , respectivamente), de las cuales se obtiene el grado de cristalinidad (X_c) y diagramas de fase, entre muchas otras propiedades.

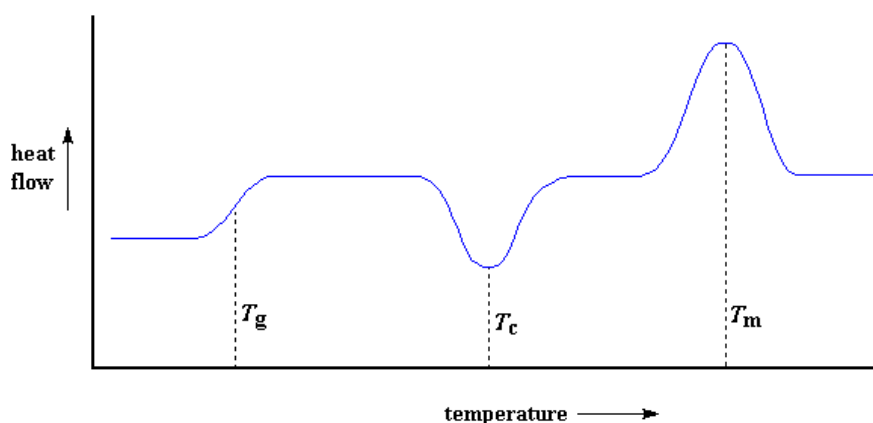


Figura 21. Gráfico de flujo de calor en función de la temperatura

En este trabajo se realizó el estudio de los materiales puros y de las partículas Qp y Q-Ep, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), empleando un equipo Pyris 1, Perkin Elmer, disponible en INTEMA. Los termogramas se obtuvieron empleando una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ y en atmósfera de nitrógeno.

4.3.3 Análisis de conductividad

La conductividad eléctrica de las soluciones poliméricas es una propiedad importante a tener en cuenta para el procesamiento mediante *electrospraying*, debido a que la puede influir directamente en la diferencia de potencial necesaria para lograr la atomización, y en el campo eléctrico entre la aguja y placa colectora. En una solución polimérica, la conductividad es impartida por electrolitos y polielectrolitos presentes. Los electrolitos son moléculas que se ionizan en presencia de un determinado solvente, mientras que los polielectrolitos aumentan la densidad de carga en la superficie del chorro polimérico, una vez que las cargas iónicas se encuentran directamente relacionadas con la conductividad.

Para la medición de la conductividad de las soluciones en este trabajo se empleó un conductímetro serie EC700, Apera Instruments del Área Polímeros Biomédicos (Figura 22). Para realizar las mediciones se colocaron las soluciones de quitosano y embelina en vasos de precipitado de 10 ml, y se realizaron las mediciones por inmersión de la sonda del equipo, bajo temperatura controlada de $21 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. La calibración del equipo se realizó utilizando **soluciones estándar de conductividad conocida**, asegurando la precisión de las lecturas durante todo el proceso experimental.

A continuación, se describe el proceso de medición:

- 1. Limpieza del electrodo:** Antes de cada medición, se aseguró que el electrodo del conductímetro estuviera perfectamente limpio y libre de contaminantes que pudieran alterar las lecturas. Para esto, se enjuagó el electrodo con agua destilada y luego se secó con papel libre de residuos.
- 2. Preparación del sistema de medición:** Las soluciones preparadas de quitosano y embelina se vertieron en vasos de precipitado limpios y secos, asegurando que el volumen fuera suficiente para cubrir el electrodo del conductímetro. Las soluciones se agitaron levemente para eliminar burbujas de aire que pudieran interferir con las lecturas.
- 3. Medición de la conductividad:** El electrodo del conductímetro se sumergió en las soluciones a medir, asegurando un contacto adecuado sin burbujas de aire atrapadas en la sonda. La **conductividad** fue medida en **miliSiemens por centímetro ($\mu\text{S}/\text{cm}$)**, y se registraron los valores para cada solución.

Las mediciones se realizaron por triplicado, con el objetivo de determinar un valor medio y la obtención de datos más confiables.

Control de calidad de las mediciones: Entre cada medición, el electrodo fue enjuagado cuidadosamente con agua destilada y secado para evitar la contaminación cruzada entre las muestras. Además, se aseguraron condiciones constantes durante todo el proceso para evitar variaciones de temperatura o pH que pudieran afectar los resultados.

Comparación de las soluciones: Se compararon las conductividades de las soluciones de quitosano y embelina para observar diferencias en la capacidad de conducción eléctrica, influenciada por los disolventes y las características intrínsecas de cada sustancia. Este análisis brindó información sobre la interacción entre los compuestos y los solventes, así como sus posibles aplicaciones en sistemas biofuncionales.



Figura 22. Conductímetro serie EC700, Apera Instruments.

4.3.4 Análisis mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica fundamentalmente empleada en química, materiales y biología con el propósito de identificar y caracterizar compuestos químicos mediante la absorción de radiación infrarroja por las moléculas. En un espectrómetro FTIR, la radiación infrarroja atraviesa una muestra y se detecta mediante un detector. Previo a alcanzar el detector, la radiación pasa por un interferómetro, donde se divide en dos haces que viajan por caminos ópticos diferentes. Posteriormente, estos haces se vuelven a combinar y se transforman en una señal eléctrica procesada para generar un espectro de frecuencia.

Los espectros de FTIR representan la absorbancia de la muestra en relación con la frecuencia o el número de onda. Cada compuesto exhibe un patrón de absorción único en el rango de frecuencia infrarroja, lo que facilita la identificación de los grupos funcionales presentes en la muestra y la determinación de su estructura química.

Esta técnica es especialmente valiosa para detectar enlaces químicos, grupos funcionales y estructuras moleculares de compuestos orgánicos e inorgánicos. Además, el análisis de FTIR proporciona información sobre la pureza de los materiales, la presencia de impurezas, la composición de mezclas y la identificación de productos de reacción en química orgánica.

Por otro lado, la espectroscopía vibracional, particularmente la espectroscopía infrarroja, ofrece datos sobre la estructura molecular. La radiación infrarroja se origina por la absorción de radiación de frecuencia en resonancia con una transición vibracional específica. Las moléculas exhiben frecuencias características en las cuales experimentan movimientos de rotación y vibración con niveles de energía discretos. Estas frecuencias resonantes están determinadas por la forma de las superficies de energía potencial molecular, las masas de los átomos y otros factores asociados.

La reflectancia total interna atenuada (ATR-FTIR) es una aplicación de la espectroscopía infrarroja que permite observar superficies, restringiendo el volumen de análisis a la región superficial de la muestra. Mediante la irradiación del material con radiación electromagnética en el rango del infrarrojo, esta técnica, conocida como la "huella digital", facilita la identificación unívoca de sustancias. El haz infrarrojo se refleja en la cara interna de un prisma transparente y de alta reflectancia, mientras que la superficie a analizar se coloca en contacto directo con la cara del prisma, limitando así el volumen de análisis a la región superficial de la muestra.



Figura 23. Equipo de Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

El estudio de la composición química superficial de las materias primas y de las partículas de quitosano con y sin embelina se realizó utilizando un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ART) modelo Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.), tal como se representa en la Figura 23.

4.3.5 Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X proporciona información crucial sobre la estructura química y cristalina de los materiales. Los rayos X, con una longitud de onda de aproximadamente 1 \AA (10^{-10} m), son capaces de penetrar en la estructura atómica de los sólidos cristalinos y producir un patrón característico de difracción que es único para cada material.

En el caso de los materiales poliméricos, que pueden exhibir una estructura tanto amorfa como semicristalina, la difracción de rayos X es especialmente útil para determinar el grado de cristalinidad. Sin embargo, interpretar los resultados experimentales en polímeros es más complejo que en estructuras cristalinas más simples. Esto se debe a varios factores. En primer lugar, la obtención de cristales grandes y perfectos de polímeros es difícil, lo que limita la utilidad de ciertas técnicas de difracción modernas. En segundo lugar, debido a los enlaces débiles en ciertas direcciones, la intensidad de difracción disminuye rápidamente con el ángulo de difracción (2θ), lo que implica que el análisis debe basarse en unas pocas reflexiones, lo que reduce la precisión. Por último, la localización precisa de los grupos laterales dentro de la red cristalina tiene un efecto mínimo en las intensidades difractadas, lo que disminuye la sensibilidad de la técnica.

A pesar de estas dificultades, la difracción de rayos X sigue siendo una herramienta invaluable para la identificación y caracterización de polímeros semicristalinos. En algunos casos, esta técnica se utiliza para estudiar sistemas poliméricos con propiedades interesantes desde un punto de vista práctico. Por ejemplo, en una mezcla de polímeros, la separación de fases de los dos componentes puede observarse mediante DRX, lo que permite identificar si uno o ambos componentes cristalizan.

Se realizó el estudio de las materias primas y de las partículas con y sin embelina mediante difracción de rayos X (DRX) empleando un difractómetro (PANalytical X'Pert PRO, PANalytical BV, Almelo, The Netherlands) equipado con una unidad PW3710, sistema de sollar slits y

monocromador. Se empleó una fuente de rayos X (Philips PW 1830, PANalytical BV) con un ánodo de cobre, una tensión de 40 kV y una corriente de 40 mA. Los difractogramas se obtuvieron efectuando un barrido de 2θ en el rango entre 5° y 75° con una resolución de $2\theta = 0,02^\circ$ y una frecuencia de 1 s por paso.

4.4 Cuantificación del contenido de embelina

Con el objetivo de determinar la cantidad embelina incorporada en las partículas, se realizó la curva de calibración de embelina en la mezcla de solventes ácido acético glacial: diclorometano (AA:DCM) en relación 80:20. Se seleccionó esta mezcla de solventes dado que luego de ensayos de solubilidad, se determinó que es la mejor combinación para conseguir la solubilización de embelina y a su vez mantener la compatibilidad con la fase externa (quitosano en AA 1 M).

Las soluciones para la curva de calibración se prepararon a partir de 5 mg de embelina en 5 ml de la mezcla de solventes, obteniéndose una solución de concentración $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ a la que se denominó E1000. Posteriormente, se llevaron a cabo diluciones sucesivas, a partir de las cuales se determinaron los valores de absorbancia mediante espectroscopía UV/Visible, siendo el pico de absorbancia para la longitud de onda $\lambda = 285 \text{ nm}$.

En la Figura 24 puede observarse la curva de calibración resultante, a partir de la cual se obtuvo la ecuación:

$$y = 0,0453x + 0,2193 \quad \text{Ec.4}$$

donde y representa el valor de la Absorbancia (u.a), mientras que x representa el correspondiente valor de concentración en $\mu\text{g. ml}^{-1}$.

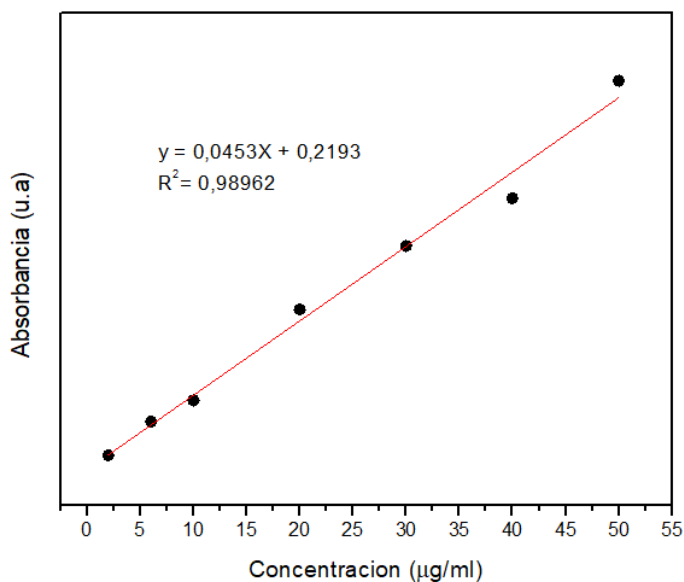


Figura 24. Curva de calibración de la embelina AA:DCM (80:20).

La cantidad de embelina incorporada en las partículas fue determinada a través de espectroscopía ultravioleta-visible, utilizando un equipo SQ 2800 Unico (Dayton, NJ, USA), como el

que se ilustra en la **Figura 25**. Para ello, se prepararon soluciones disolviendo 3 mg de partículas en una mezcla de solventes AA:DCM (80:20) y se analizaron para determinar los valores de absorbancia, teniendo en cuenta la intensidad de la banda de absorción a $\lambda = 285$ nm. Posteriormente se calculó su concentración a partir de la curva de calibración correspondiente (Figura 24) de embelina en la mencionada mezcla de solventes. Todos los estudios se realizaron por triplicado y los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar (d.e.).



Figura 25. Espectrofotómetro UV/Visible.

A partir de los valores obtenidos, se determinó la Capacidad de Carga y la Eficiencia de Encapsulación de embelina en las partículas de quitosano.

La capacidad de carga (CC) y eficiencia de encapsulación (EE) se calcularon mediante las Ec. 5 y Ec. 6 , respectivamente.

$$CC(\%) = \frac{m_{ef}}{m_{chf}} \cdot 100 \quad \text{Ec.5}$$

Donde m_{ef} representa la masa de embelina incorporada en la matriz y m_{chf} es la masa de partículas de quitosano.

$$EE(\%) = \frac{\left(\frac{m_{ef}}{m_{chf}}\right)}{\left(\frac{m_{ei}}{m_{chi}}\right)} \cdot 100 \quad \text{Ec.6}$$

Donde m_{ef} representa la masa de embelina incorporada y m_{ei} es la masa de embelina inicial, y m_{chf} y m_{chi} son las masas de quitosano inicial y final respectivamente.

4.5 Análisis de hinchamiento de las partículas de Quitosano en medio Buffer

Se realizó el estudio de hinchamiento de partículas de quitosano en condiciones fisiológicas simuladas, utilizando una solución buffer fosfato (PBS) pH 7.4 y una temperatura de 37 °C que replican el entorno del cuerpo humano. Mantener el pH constante resulta crucial, dado que afecta tanto el comportamiento del quitosano como su interacción con el entorno acuoso. La solución de PBS es ideal porque mantiene constantes las condiciones iónicas y de pH, esenciales para reproducir entornos biológicos. La temperatura a 37°C además de replicar la temperatura fisiológica normal en humanos, un factor crítico que afecta la tasa de hinchamiento y la interacción

de los polímeros con el medio ambiente. El estudio de hinchamiento se realizó a fin de evaluar cómo responderían las partículas de quitosano en un escenario fisiológico real, considerando sus aplicaciones potenciales como sistemas de liberación controlada de fármacos.

El ensayo fue realizado utilizando bolsas de diálisis de peso molecular de corte 14.000 kg.mol⁻¹ (Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA) selladas perfectamente en ambos extremos, que aseguran el paso de moléculas pequeñas como embelina, pero retiene las partículas de quitosano. Las bolsas de diálisis son frecuentemente empleadas en experimentos de hinchamiento y liberación controlada, ya que permiten que las partículas interactúen con la solución circundante mientras permanecen confinadas dentro de la bolsa, evitando la pérdida de muestra.

Las bolsitas con partículas se sumergieron en 100 ml de la solución PBS pH 7,4; y se colocaron en incubadora a 37 °C, y agitación orbital a 150 rpm. Se tomaron muestras de hinchamiento en intervalos de tiempo específicos: 15, 30, 45 minutos, 1 hora, 1 hora y media, y 2 horas. Aunque se tomaron mediciones adicionales a las 72 horas, estas no fueron consideradas para el análisis final. El estudio se realizó por triplicado

Tras cada intervalo de tiempo, las bolsas de diálisis fueron retiradas de la solución y se secó cuidadosamente la superficie con papel absorbente para eliminar cualquier exceso de solución que pudiera interferir con el pesaje. Este paso es crítico, ya que cualquier exceso de solución no absorbida podría resultar en un cálculo incorrecto del hinchamiento.

Una vez secas, las muestras fueron pesadas usando una balanza analítica de alta precisión. Este procedimiento es esencial para asegurar que los valores obtenidos reflejen con precisión el peso real de las partículas hinchadas y no de cualquier solución residual adherida a la superficie.

El porcentaje de hinchamiento se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de hinchamiento} = \frac{P_h - P_s}{P_s} \cdot 100 \quad \text{Ec.7}$$

Donde P_h represente el peso de las partículas en húmedo, y P_s es el peso inicial de las partículas secas. Esta fórmula estándar es ampliamente usada en estudios sobre materiales poliméricos y su capacidad para absorber soluciones.

4.6 Estudio del proceso de liberación de embelina a partir de las partículas core-shell

El estudio de liberación de embelina se llevó a cabo con nanopartículas de quitosano con fármaco. Los ensayos se realizaron en un medio de 100 ml de PBS a pH 7,4 y 37 °C, replicando condiciones similares a las del cuerpo humano. Las nanopartículas con embelina se colocaron en bolsa de diálisis (peso molecular de corte 14.000 g/mol, Aldrich Chemical Co.) selladas herméticamente en ambos extremos. En el interior de las bolsas se añadieron 5 ml de solución buffer adicional.

El ensayo se realizó por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Se realizaron un total de **10 extracciones** durante el primer día, con los siguientes intervalos de tiempo:

- **15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, y 7 horas.**

Posteriormente, se realizaron extracciones adicionales a las:

- **24 horas, 48 horas y 72 horas.**

Para cada extracción se retiró 1 ml de la solución de PBS, que fue reemplazado por 1 ml de PBS fresco para mantener constante el volumen total del medio.

La cantidad de embelina liberada se cuantificó mediante espectroscopía UV-Vis, evaluando la intensidad de la banda de absorción a $\lambda = 333$ nm, característica de la embelina en medio acuoso. A partir de estas mediciones, se calculó el porcentaje de embelina liberada acumulada en cada tiempo de muestreo, dividiendo la cantidad de embelina liberada por la cantidad inicial encapsulada en las nanopartículas.

El perfil de liberación obtenido permitió evaluar si la embelina se liberó de manera sostenida a lo largo del tiempo o si se produjo un burst inicial (liberación rápida) seguido de una liberación más controlada. Este estudio fue clave para determinar la viabilidad de las nanopartículas de quitosano como vehículo de liberación de embelina en aplicaciones terapéuticas.

4.7 Escalado

Para la producción de nanopartículas destinadas a la liberación controlada de embelina, se seleccionó el equipo Electrospinner YFlow 2.2D-350. Este equipo permite procesar soluciones de quitosano con una velocidad de procesamiento de 0,2 ml/h, lo que permite obtener una producción de partículas de 3 mg/h. El costo del equipo está valorado en USD 68.422, reflejando tanto su capacidad técnica como su avanzada tecnología de fabricación.

Considerando la necesidad de una rápida instalación de ingeniería (con un factor de 1,2) para un proceso de fluidos parcialmente automatizado en una pequeña unidad comercial cerrada, con mínimos servicios auxiliares y sin requerimientos de conexión a otras unidades, así como una reserva para situaciones imprevistas. Se utilizó el método de los factores directos e indirectos (adaptación de Chilton) para estimar la inversión necesaria. Este método permite calcular la inversión fija total del sistema a partir del costo de los principales equipos del proceso, con un margen de error del 10-15% respecto al valor real. (54, 55) La determinación de la inversión fija se basó en la siguiente ecuación:

$$If = IE \cdot (1 + \sum f_i) \cdot (1 + \sum f_a) \quad \text{Ec.8}$$

Donde:

If : Inversión Fija (sin considerar el terreno).

IE : Valor de los equipos principales instalados.

f_i : Factores para la estimación de los componentes de la inversión directa (cañerías, instrumentos, construcciones, etc).

f_a : factores de multiplicación para la estimación de los componentes de la inversión indirecta (ingeniería y supervisión, contingencias, etc).

La mayoría de los activos tienden a disminuir su valor con el tiempo, un proceso conocido en contabilidad como depreciación, el cual se registra como un gasto operativo. En lugar de contabilizar el costo total de un nuevo activo en el momento de la compra, este costo se distribuye a lo largo de su vida útil en los registros contables.

Los principales objetivos de la depreciación son los siguientes:

1. Recuperar el capital invertido a lo largo del tiempo.
2. Precisar los costos indirectos de producción a través de registros contables detallados.
3. Incluir el costo de depreciación en los gastos operativos para propósitos fiscales.

Las causas de depreciación de los equipos pueden clasificarse en varias categorías:

- **Desgaste físico:** Resulta del uso continuo del equipo durante las operaciones diarias.
- **Obsolescencia funcional:** Ocurre cuando aumentos en la capacidad de producción hacen que el equipo existente se vuelva ineficiente.
- **Avances tecnológicos:** Nuevas tecnologías que realizan las mismas funciones de manera más económica pueden hacer que el equipo actual quede obsoleto.
- **Depreciación monetaria:** Fluctuaciones en los niveles de precios que afectan el valor de los activos y las reservas de depreciación.

Existen diversos métodos para calcular la depreciación, todos ellos basados en el paso del tiempo. Es decir, un activo utilizado diariamente tendrá la misma carga de depreciación que uno usado una vez al año. Los métodos se dividen en dos categorías principales:

Métodos acelerados: Recuperan el capital invertido rápidamente al cargar más depreciación en los primeros años de vida del activo.

Métodos desacelerados: Aumentan la carga de depreciación hacia el final de la vida útil del activo, recuperando el capital de manera más tardía.

Un método de depreciación efectivo debe cumplir con varios criterios: debe permitir la recuperación del capital invertido, mantener el valor contable del activo cercano a su valor real durante su vida útil, ser fácil de aplicar y cumplir con la legislación vigente (como la Ley N° 20.628).

Los costos de depreciación anuales responden a la Ec.9:

$$\text{Costos de depreciación} = e \cdot (I_f - L) \quad \text{Ec.9}$$

Siendo:

e : Factor de depreciación anual

$$e = \frac{1}{n}$$

Siendo n el número de años de vida útil

I_f : Inversión Fija

L : Valor residual o de reventa al final de la vida útil del bien

Para esta estimación se utilizó el método de depreciación de línea recta, el cual asigna una cantidad constante de depreciación anual. En este caso, se asumió una vida útil del activo de 10 años y se estimó que su valor residual sería del 20% de la inversión fija inicial. De acuerdo con la normativa fiscal vigente, la depreciación se calcula mediante el método de línea recta para la declaración de impuestos.

4.7 Estudio de Mercado de Sistemas de Liberación Controlada de Embelina en el país

La embelina es un compuesto bioactivo con alto potencial terapéutico, pero su baja solubilidad y rápida eliminación limitan su uso clínico. Para abordar este problema, los sistemas de liberación controlada mejoran su biodisponibilidad y eficacia.

Uno de los objetivos de este proyecto fue realizar un **estudio de mercado** a nivel **nacional** para evaluar la viabilidad y el **potencial comercial** de los sistemas de liberación controlada de embelina encapsulada en quitosano en el **sector farmacéutico local**. A través de este estudio, se buscó entender el panorama actual de la industria, identificando las oportunidades y desafíos asociados con la introducción de esta tecnología en el mercado nacional. Los aspectos clave que se analizaron incluyen:

1. **Demanda del mercado local:** Se exploró la necesidad de nuevos tratamientos basados en liberación controlada, especialmente en sectores médicos que abordan enfermedades crónicas y complejas como el cáncer y enfermedades antimicrobianas.
2. **Innovación tecnológica en el país:** Se evaluaron las tecnologías de liberación controlada existentes en el mercado local, observando las tendencias en el uso de nanomateriales y la nanotecnología en la industria farmacéutica.
3. **Competencia y actores clave a nivel nacional:** Se investigaron las empresas y proyectos nacionales que ya están desarrollando tecnologías relacionadas con las nanopartículas **para administración** de fármacos y los sistemas de liberación controlada, con el fin de entender la competitividad del mercado.
4. **Regulaciones y barreras para la comercialización:** Se estudiarán las regulaciones locales que podrían influir en la introducción de la tecnología de liberación controlada de embelina, como los requisitos para la aprobación de nuevos tratamientos farmacéuticos y las restricciones en el uso de nanomateriales.

Este estudio permitió obtener una visión detallada sobre la **viabilidad comercial** de los sistemas de liberación controlada de embelina encapsulada en quitosano en el mercado nacional, proporcionando la información necesaria para diseñar estrategias de entrada y posicionamiento, así como posibles alianzas con actores clave de la industria farmacéutica local.

5 Resultados y discusión

5.2 Obtención de las partículas

Se estudiaron soluciones de quitosano con y sin embelina para identificar las condiciones óptimas para el procesamiento de partículas utilizando la técnica de *electrospray*, según lo descrito en los apartados 4.1 y 4.2, y las condiciones experimentales detalladas en la Tabla 2. En la Figura 26 se pueden observar las micrografías SEM de partículas de quitosano obtenidas bajo distintas condiciones de procesamiento mediante *electrospray*.

A partir de las micrografías SEM de la Figura 26, se realizó la medición del diámetro de las partículas mediante el software Image Pro Plus, de acuerdo al procedimiento detallado en la sección 4.3.1. Las micrografías SEM obtenidas a partir de muestras con distintas condiciones de procesamiento, permitieron observar variaciones morfológicas significativas en las Qp. Los resultados mostraron que las distancias menores, específicamente 10 cm y 12 cm, favorecieron una mayor eficiencia en la recolección de partículas. En las Figuras 26.a, 26.b, 26.e y 26.f, se puede observar que estas distancias produjeron partículas con una morfología más uniforme y con menos aglomeraciones. A mayores distancias, como 15 cm y 17 cm, la eficiencia de recolección disminuyó

significativamente, y se observaron partículas con formas menos definidas y con una distribución más dispersa.

La diferencia de potencial aplicada durante el proceso de *electrospray* también mostró un efecto significativo en la morfología de las partículas. Las figuras 26.c, 26.d, 26.h y 26.l muestran una deformación notable en la morfología esférica de las partículas, cuando la diferencia de potencial aplicada está por encima de los 22 kV. Este fenómeno se debe a la inestabilidad inducida por el alto voltaje, que genera una atomización irregular del quitosano y la consecuente evaporación del solvente residual en la superficie de las partículas con mayor velocidad.

Dos condiciones específicas demostraron ser particularmente favorables: la primera, con una distancia aguja-colector de 10 cm y una diferencia de potencial de 20 kV (Figura 26.c); y la segunda, con una distancia aguja-colector de 12 cm y una diferencia de potencia aplicado de 17 kV (Figura 26.f). Sin embargo, se determinó que las condiciones óptimas de procesamiento se lograron con una distancia aguja-colector de 12 cm y un voltaje de 17 kV, ya que esta condición permitió obtener partículas con una morfología esférica bien definida, diámetro promedio de 250 nm y desviación estándar de 30 nm, y una buena eficiencia de recolección. Aunque la condición de 10 cm y 20 kV produjo partículas con un diámetro promedio más pequeño (215 nm), la dispersión en el tamaño de las partículas fue mayor (80 nm), es por eso que no se continuó trabajando con estos parámetros de procesamiento.

Este análisis también consideró otros factores relevantes, como la tasa de flujo de la solución de quitosano y la concentración del polímero en la solución. Estos parámetros adicionales influyen en la formación de partículas y deben ser optimizados junto con la distancia aguja-colector y el voltaje aplicado para obtener los mejores resultados posibles. Se mantuvo una velocidad de flujo constante para asegurar una entrega uniforme de la solución de quitosano, lo que contribuyó a la formación de partículas de tamaño y forma consistentes. Además, se utilizó una concentración de quitosano que permitió la formación de partículas esféricas sin la presencia de fibras o aglomerados, optimizando así la calidad del producto final.

Para optimizar el procesamiento de las partículas de quitosano con embelina (Q-Ep), se tomó como referencia las condiciones obtenidas previamente para las partículas de quitosano puras (Qp). Inicialmente se evaluaron velocidades de flujo relativas de las soluciones externa (Φ_o) e interna (Φ_i) en dos relaciones ($\Phi_o:\Phi_i$): 4:1 y 2:1. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones se observan en las Figuras 26.e y 26.f, respectivamente. Tras un análisis detallado, se determinó que la mejor condición de procesamiento para las partículas Q-Ep se logró con una relación de flujo $\Phi_o:\Phi_i$ de 2:1, una distancia aguja-colector de 12 cm, y una tensión aplicada de 24 kV (Figura 26.r).

Es importante destacar que a diferencia del procesamiento de las partículas de quitosano, donde el voltaje óptimo fue de 17 kV, en el caso de las partículas de quitosano con embelina encapsulada fue necesario aumentar la diferencia de potencial a 24 kV. Esta diferencia se debe principalmente a las distintas características de conductividad y viscosidad de las soluciones procesadas, lo que afecta la atomización durante el procesamiento por *electrospray*. Por este motivo resulta de gran importancia la medición de la conductividad de las soluciones procesadas, dado que resulta un parámetro importante a tener en cuenta para la optimización de las condiciones de procesamiento.

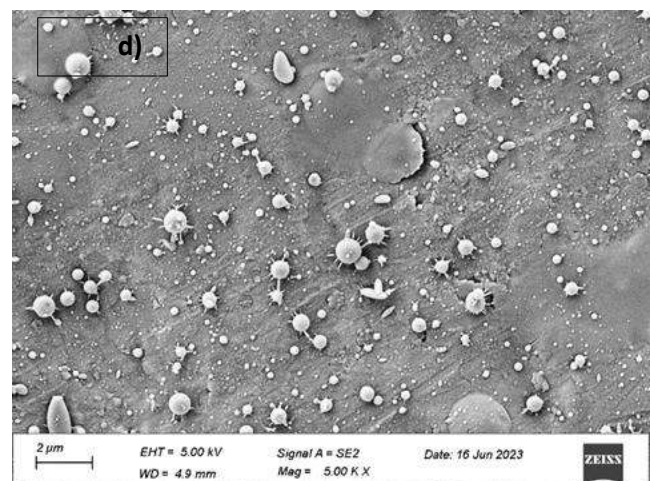
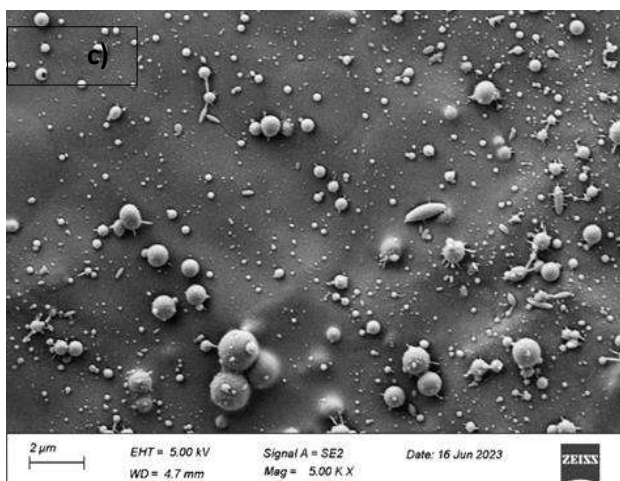
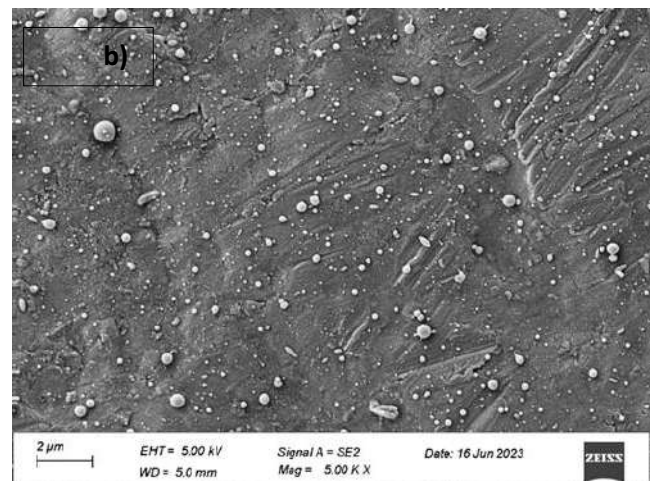
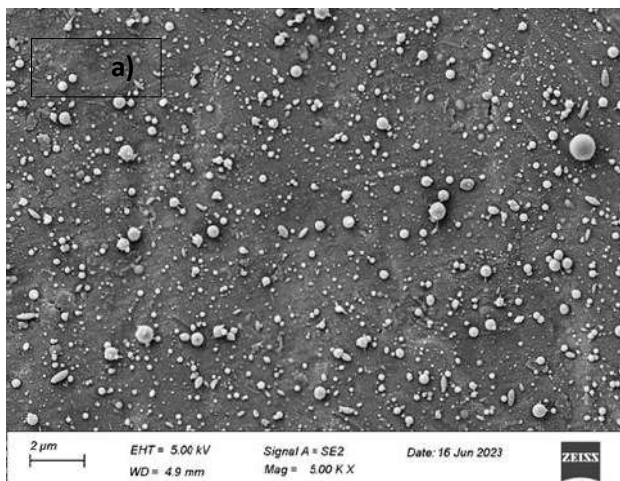
Además de ajustar las condiciones de voltaje y flujo, se controlaron otros parámetros importantes durante el procesamiento. Todas las muestras se procesaron a una temperatura constante de 22 °C y una humedad relativa de entre 35% y 38%. Estas condiciones ambientales

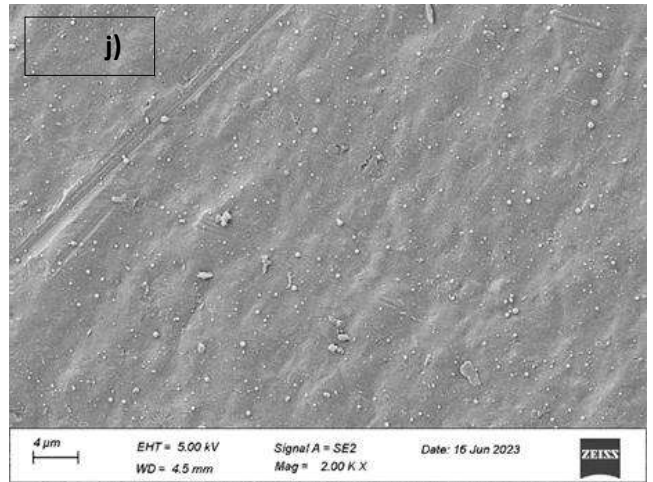
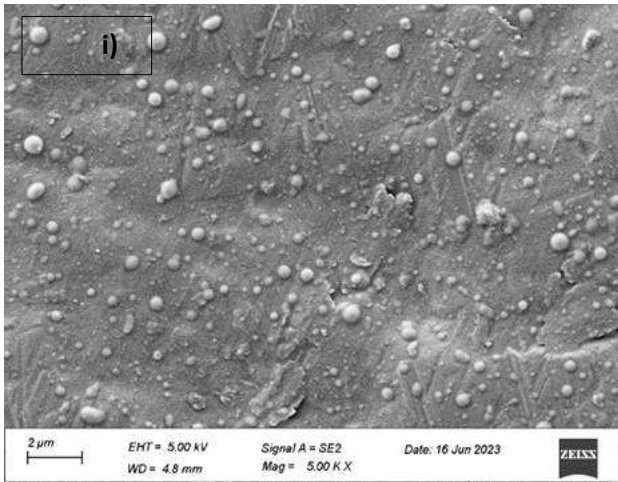
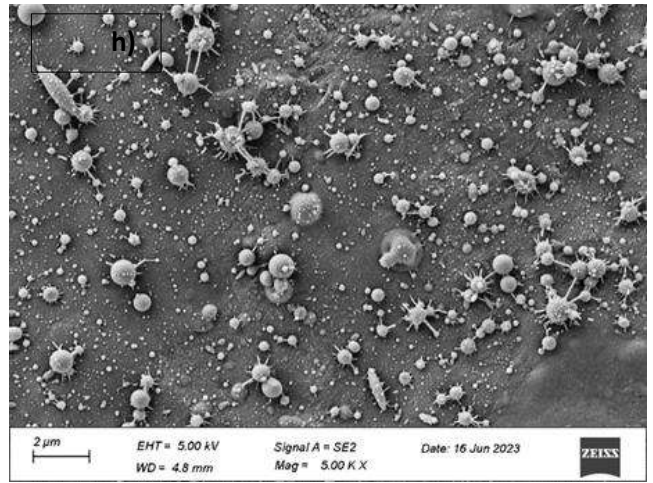
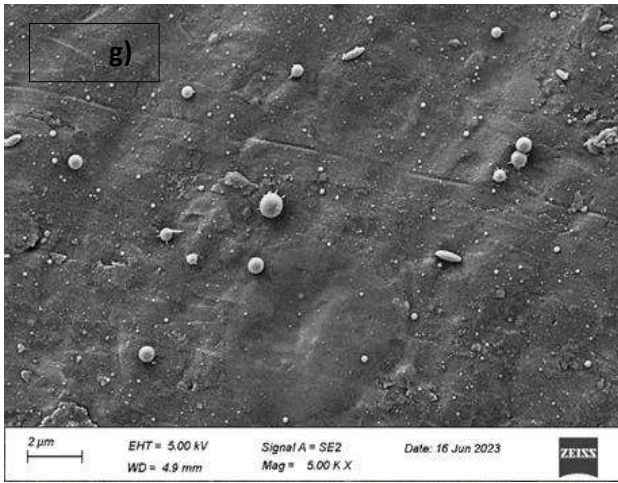
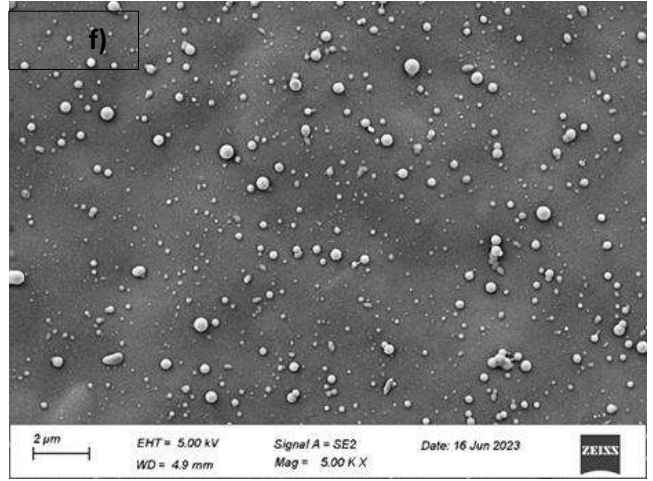
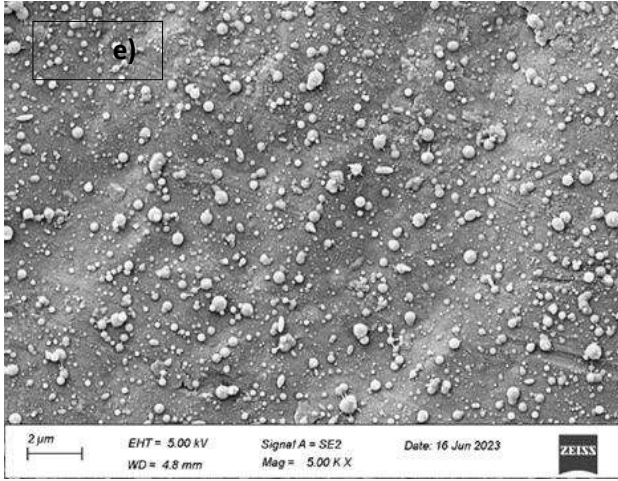
fueron críticas para mantener la consistencia en la formación de partículas y evitar variaciones en la morfología debido a cambios en la temperatura o la humedad.

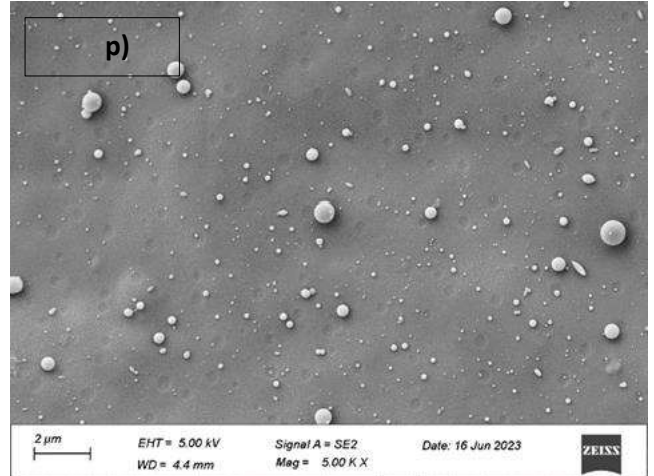
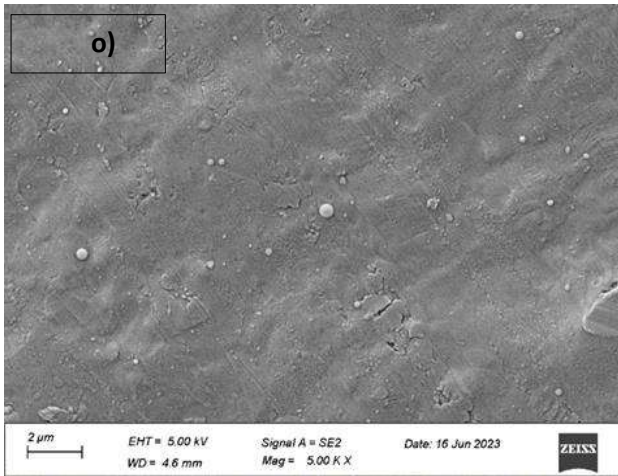
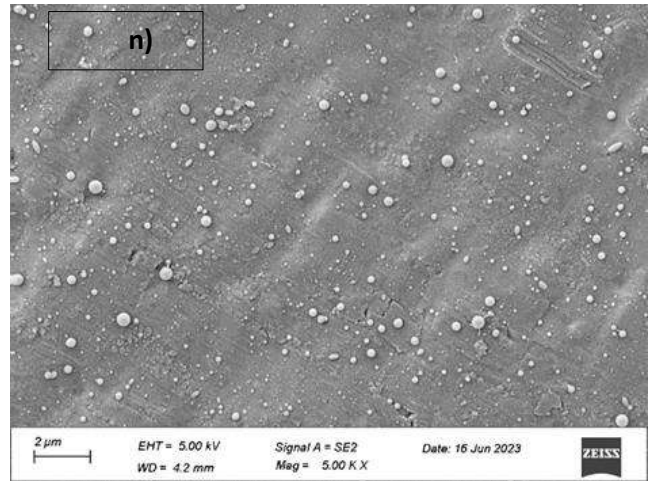
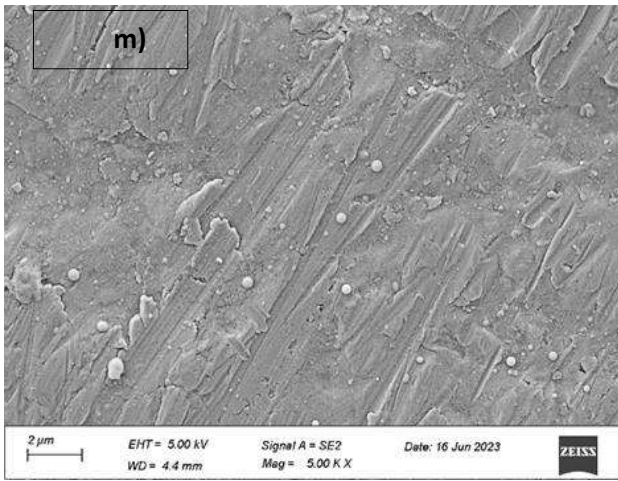
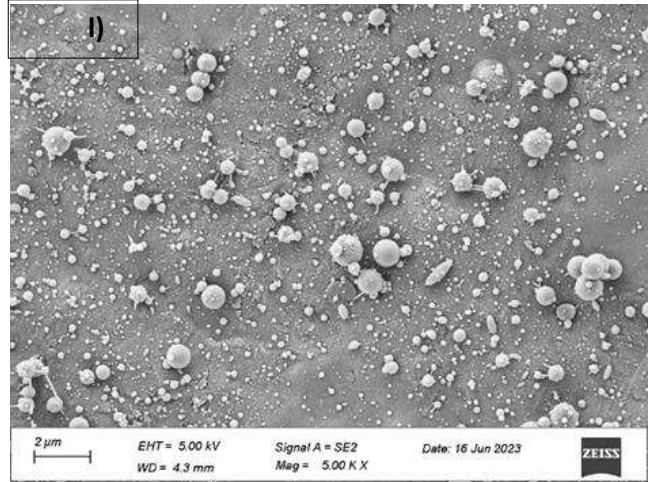
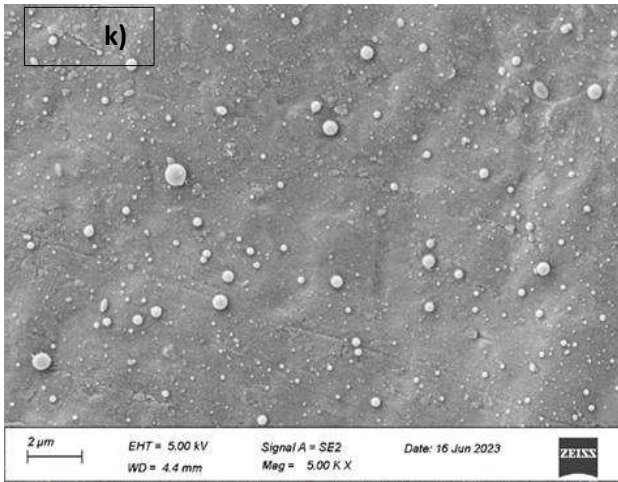
La medición del diámetro medio de partículas (D_m) y su dispersión (S_m) se determinó mediante el procesamiento digital de las micrográficas obtenidas empleando el software Image Pro Plus. En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos para las partículas Qp de quitosano, y Q-Ep de quitosano con embelina encapsulada. A partir de los valores de diámetro medio se observa una variación de 5 nm al incorporar la embelina en las nanocápsulas. Sin embargo, la dispersión en el diámetro medio de las partículas no mostró una variación significativa al incorporar el agente embelina, manteniéndose en alrededor del 12% respecto del diámetro medio. Esto indica una distribución de tamaño de partículas monodispersas tanto en las nanopartículas Qp como en las Q-Ep.

Tabla 3. Medición de diámetro medio de partícula y desviación estándar.

Muestra	D_m (nm)	S_m (nm)
Qp	250	30
Q-Ep	255	32







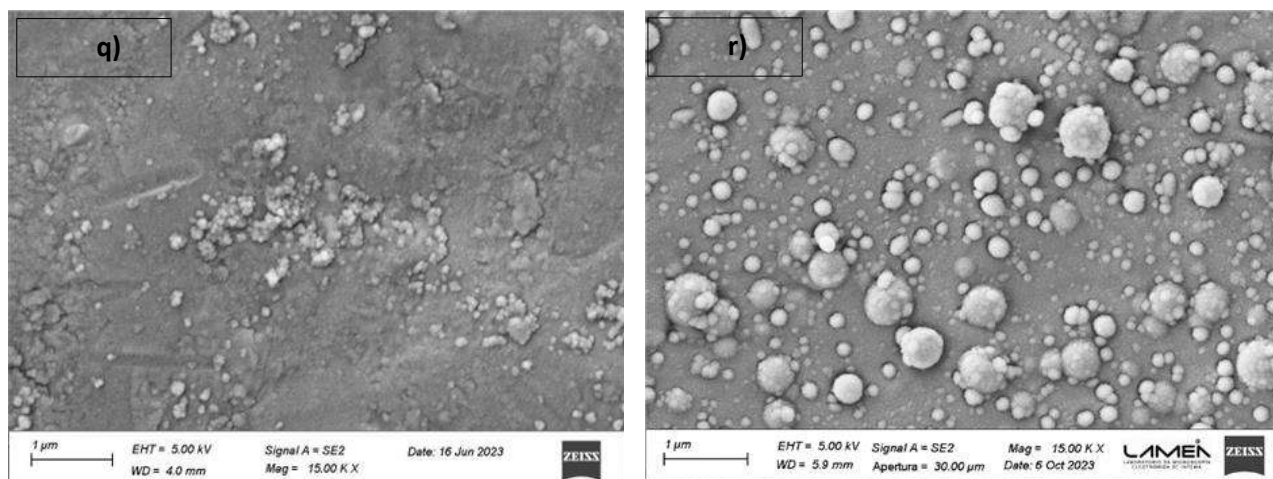


Figura 26. Imágenes SEM de partículas de quitosano obtenidas por electrospray: a) 10 cm – 15 kV, b) 10 cm – 17 kV, c) 10 cm – 20 kV, d) 10 cm – 22 kV, e) 12 cm – 15 kV, f) 12 cm – 17 kV, g) 12 cm – 20 kV, h) 12 cm – 22 kV, i) 15 cm – 15 kV, j) 15 cm – 17 kV, k) 15 cm – 20 kV, l) 15 cm – 22 kV, m) 17 cm – 15 kV, n) 17 cm – 17 kV, o) 17 cm – 20 kV, p) 17 cm – 22 kV. Partículas de quitosano con embelina: q) $\Phi_o:\Phi_i = 4:1$, $d = 12$ cm, $V = 24$ kV, r) $\Phi_o:\Phi_i = 2:1$, $d = 12$ cm, $V = 24$ kV.

5.3 Análisis de la caracterización fisicoquímica de las partículas Qp y Q-Ep

5.3.1 Propiedades térmicas y cristalinidad de las partículas.

Mediante el análisis por DSC se obtuvieron los termogramas del agente embelina, del quitosano comercial de bajo peso molecular, y de las partículas Qp y Q-Ep.

El termograma de la embelina (Figura 27) muestra la presencia de dos picos endotérmicos pequeños bien definidos a 77,17 °C y 84,74 °C, y un pico endotérmico mayor a 144,82 °C. Estos picos corresponden a la fusión de embelina, y se corresponden con los reportados previamente por Cortez Tornello y col. (11, 15). La presencia de estos picos indica que la embelina posee cierta estructura cristalina, lo que le permite experimentar transiciones térmicas específicas. La nitidez y la posición de estos picos sugieren que la embelina tiene una fase cristalina bien organizada y una estabilidad térmica definida dentro de este rango de temperaturas.

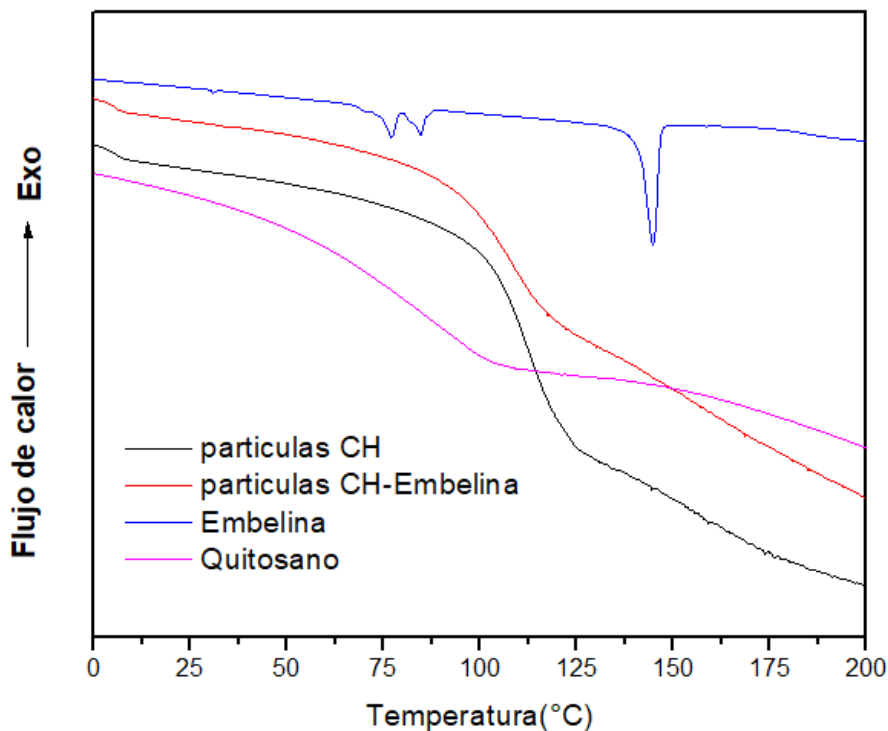


Figura 27. Termogramas del Quitosano comercial, partículas de quitosano, partículas de quitosano con embelina encapsulada y embelina comercial.

El termograma de quitosano comercial de bajo peso molecular (Figura 27) se observa una banda de fusión a partir de 60 °C hasta 117 °C, con una disminución gradual del flujo de calor sin picos endotérmicos definidos, lo cual es típico de un material mayormente amorfo o con baja cristalinidad. Esto sugiere que el quitosano comercial tiene poca organización cristalina, ya que no presenta transiciones de fase significativas ni fusiones de cristales evidentes.

Por otro lado, los termogramas de las partículas de quitosano Qp y Q-Ep (Figura 27) obtenidas a partir de la técnica de *electrospraying*, mostraron bandas de fusión similares a las del quitosano comercial, a partir de 73 °C hasta 134 °C y 75 °C hasta 138 °C, respectivamente. Se evidencia un corrimiento de la banda de fusión en las partículas Qp y Q-Ep hacia valores de temperatura mayores, lo que podría asociarse a un reordenamiento de las cadenas del polímero que produce mayor interacción intermolecular entre las cadenas de quitosano. La ausencia de picos endotérmicos definidos sigue indicando una naturaleza mayormente amorfa, pero el aumento en la temperatura de la banda de fusión sugiere una modificación estructural posiblemente inducida por el procesamiento de las partículas.

No fue posible observar los picos característicos de fusión de embelina en el termograma de las nanopartículas Q-Ep, lo que podría indicar que la embelina presente se encuentra íntimamente mezclada con las cadenas de quitosano durante la fusión, por encontrarse inicialmente encapsulada y protegida, o la cantidad de embelina presente en las partículas no pudo detectarse mediante esta técnica.

En la Figura 28 se muestran los difractogramas obtenidos mediante DRX, de embelina, quitosano de bajo peso molecular, y las partículas Qp y Q-Ep preparadas a partir de soluciones mediante la técnica de *electrospray*. El difractograma de embelina muestra picos agudos

característicos, en $2\theta = 5,81^\circ$; $11,70^\circ$; $14,63^\circ$; $17,59^\circ$; $29,53^\circ$; $32,63^\circ$ y $35,69^\circ$. Los picos están bien definidos, lo que confirma la presencia de diferentes formas polimórficas o grados de cristalización, algo que también se vio reflejado en los múltiples picos endotérmicos de DSC.

Por su parte el difractograma de quitosano de bajo peso molecular muestra una banda ancha con un pico principal alrededor de $2\theta = 20^\circ$, lo que es típico de un material mayormente amorfo o de baja cristalinidad. Esta banda de forma amplia indica que el quitosano comercial tiene una estructura desordenada, lo que concuerda con lo observado en el análisis de DSC donde no se evidenciaron transiciones de fase importantes.

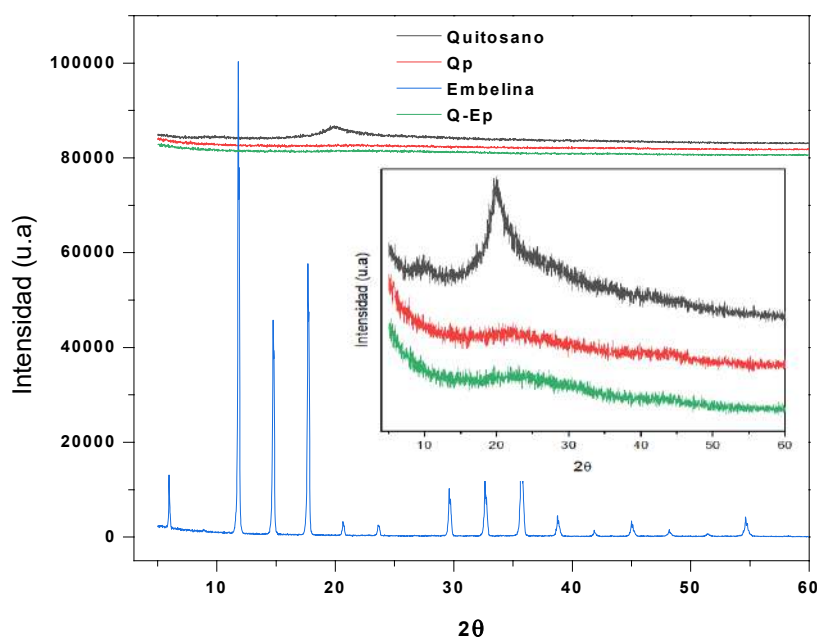


Figura 28. Difracción de Rayos X (DRX): Comparación de patrones para quitosano, embelina comercial, partículas de quitosano y partículas de quitosano con embelina. El insert muestra una ampliación de los picos de quitosano comercial y en las partículas Qp y Q-Ep.

Las partículas de quitosano procesadas por *electrospraying* muestran un difractograma muy similar al quitosano comercial, con una banda amplia en la región de $2\theta = 20^\circ$ pero con una menor definición en el pico. Esto podría indicar una reorganización de las cadenas poliméricas debido al procesamiento de las nanopartículas, lo refuerza la idea de que el *electrospraying* introduce una reorganización en las cadenas poliméricas.

El difractograma de las nanopartículas con embelina encapsulada Q-Ep es similar al de las nanopartículas de quitosano Qp. No se observan los picos agudos característicos de la embelina pura, lo que indicaría que la embelina no se encuentra en la superficie de las partículas, o se encuentra en forma de agregados amorfos, tal como se observó en el análisis térmico efectuado por DSC.

5.3.2 Análisis de conductividad

El estudio de la conductividad de las soluciones permite medir la capacidad de estas para conducir electricidad, lo que está directamente relacionado con la presencia y movilidad de iones en la solución. En el procesamiento por *electrospraying*, la conductividad es un parámetro clave que influye en la estabilidad del proceso, y en la formación y morfología de las nanopartículas.

En la Tabla 4 se muestran los valores de conductividad medidas para los solventes y mezcla de solventes usados en este trabajo, como así también los valores de conductividad de las soluciones del polímero quitosano y de embelina que se emplearon para la preparación de las nanopartículas.

Tabla 4. Conductividad de las soluciones utilizadas en el estudio.

SOLUCIÓN	CONDUCTIVIDAD
AA (1 M)	569 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Solución de quitosano	1122 $\mu\text{S}/\text{cm}$
AA Glacial:DCM (80:20)	6,7 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Solución de Embelina	3 $\mu\text{S}/\text{cm}$

Como se observa a partir de la Tabla 4, el AA 1M presentó una conductividad alta (569 $\mu\text{S}/\text{cm}$), lo que indica una considerable cantidad de iones en solución. Este valor de conductividad sugiere que esta solución tiene capacidad para generar una nube de carga eléctrica durante el procesamiento por *electrospraying* que permite la formación de pequeñas gotas. Por otro lado, la solución de quitosano en AA 1M mostró una conductividad aún mayor que la del solvente (1122 $\mu\text{S}/\text{cm}$), lo que se debe a la presencia de quitosano disuelto. Este polímero catiónico permite obtener una solución cuya conductividad favorece la atomización mediante *electrospraying*, y sugiere buena capacidad para la obtención de pequeñas gotas que formen nanopartículas uniformes luego de la evaporación del solvente.

La mezcla de solventes AA:DCM (80:20) mostró una conductividad muy baja (6,7 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Esto era esperado, ya que el DCM es un solvente aprótico débilmente polar, por lo que no contribuye significativamente a la conductividad de la solución. Esta baja conductividad puede presentar desafíos en el proceso de *electrospraying*, ya que las cargas disponibles en la solución no son suficientes para estabilizar el chorro de fluido y crear partículas bien formadas. Podría generar una atomización menos eficiente y un aumento en el tamaño de las gotas.

La solución de embelina en la mezcla de solventes AA:DCM (80:20) mostró un valor de conductividad extremadamente bajo (3 $\mu\text{S}/\text{cm}$), lo que indica baja ionización en la solución. Esta baja conductividad podría dificultar el proceso de atomización.

En la sección 5.1 se mencionó que fue necesario aumentar la diferencia de potencial aplicada para la obtención de partículas coaxiales a 24 KV, cuando se incluyó la solución de embelina como solución interna. Esto puede deberse probablemente a la disminución de la conductividad de la solución, luego de infundir de manera simultánea la solución externa de quitosano junto con la solución interna de embelina. Sin embargo, como muestran los resultados obtenidos de la caracterización morfológica, el aumento de la diferencia de potencial aplicada, permitió la atomización de las soluciones infundidas de manera coaxial y la obtención de nanocápsulas de quitosano con embelina.

5.3.3. Estudio de la composición química superficial

El estudio de la superficie de las partículas se realizó con el objetivo de determinar su composición química superficial y comprender su interacción con el medio. En la Figura 29 se muestran los espectros de FTIR-ATR característicos de embelina, quitosano de bajo peso molecular, y las partículas Qp y Q-Ep.

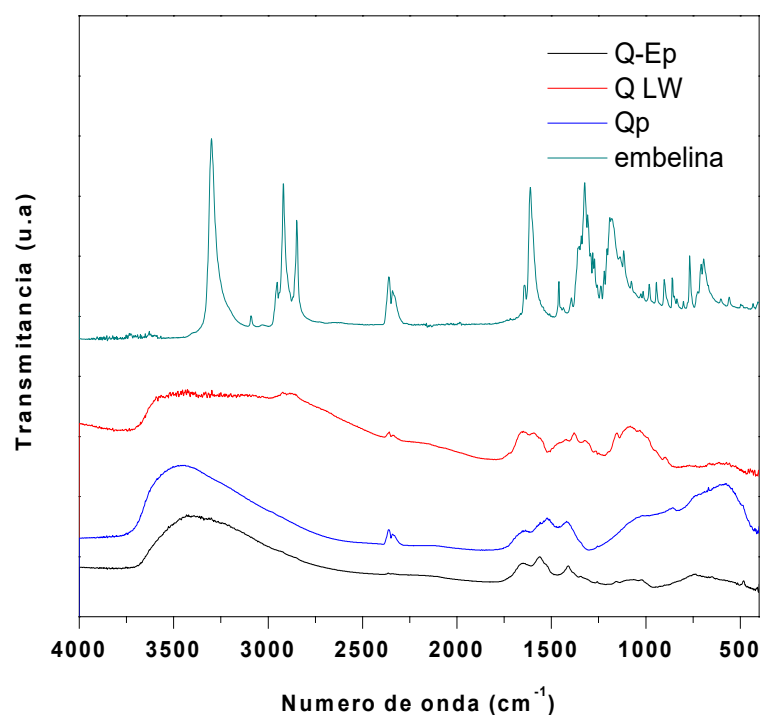


Figura 29. Espectros FTIR de quitosano de bajo peso molecular, embelina, partículas Qp y Q-Ep.

El espectro de embelina muestra picos característicos a 3300 cm^{-1} (O-H); 2918 cm^{-1} y 2848 cm^{-1} (C-H y C-H en CH_2), y 1612 cm^{-1} (C=C), 1462 cm^{-1} (C-H en $-\text{CH}_2$), 1375 cm^{-1} (C-H en $-\text{CH}_3$), 1219 cm^{-1} (C=O). Estos picos observados son consistentes con la estructura química de la embelina, reportada en la bibliografía. (11, 15).

Por otro lado, el espectro del quitosano comercial de bajo peso molecular muestra una banda ancha alrededor de 3400 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones de estiramiento de grupos OH y NH, picos cerca de 2900 cm^{-1} (C-H) y 1650 cm^{-1} (C=O de amida I), 1550 cm^{-1} (N-H de amida II), y en la región de $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C y C-N).

El espectro de las nanopartículas Qp muestran bandas similares al quitosano comercial, aunque algunas presentan cambios en la intensidad, particularmente en las bandas asociadas a los grupos OH y NH. Por último, las nanopartículas Q-Ep presentan las bandas características de quitosano, aunque los picos característicos del agente embelina no se observan en el espectro. Esto puede deberse a que la embelina no se encuentra presente en la superficie, posiblemente por encontrarse encapsulada en el interior de las nanocápsulas de quitosano, o que la cantidad de embelina presente no puede ser detectada por esta técnica.

5.3.4. Capacidad de carga y eficiencia de encapsulación

La cantidad de embelina encapsulada y los valores de eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de embelina en las nanopartículas de quitosano, resultan de gran importancia para evaluar la eficiencia como sistema de administración del agente bioactivo. De acuerdo a lo descrito en la sección 4.4, se determinó la cantidad de embelina encapsulada en una masa de partículas Q-Ep. En la Tabla 5, se muestran los valores obtenidos de masa de embelina encapsulada por gramo de partícula (Me, mg/g), la eficiencia de encapsulación porcentual (EE, %) y la capacidad de carga (CC, %).

La capacidad de carga (CC) obtenida fue del 9,13%, resultando un valor muy cercano a la cantidad de embelina colocada inicialmente (10% respecto de la masa de quitosano). Esta diferencia mínima sugiere que hubo pérdidas menores de embelina durante el proceso de preparación de las nanopartículas mediante *electrospraying*, probablemente relacionadas con la formación de pequeños cristales en la punta de la aguja que no lograron ser encapsulados. Por otro lado, el valor de CC refleja que la mayor parte de la embelina se incorporó en las nanopartículas de quitosano, lo que indica que prácticamente la totalidad de embelina de la solución inicial fue encapsulada.

En cuanto al contenido total de embelina, los resultados indican que se encapsularon aproximadamente 91,33 mg de embelina por gramo de partículas, lo que indica que las nanopartículas de quitosano resultan un sistema adecuado para la encapsulación de agentes bioactivos pobremente solubles en agua. Esto resulta de gran importancia desde una perspectiva tanto funcional como económica, ya que el sistema maximiza el uso del fármaco encapsulado, optimizando su eficacia en potenciales aplicaciones de liberación controlada. Además, esta cantidad de embelina contenida en un gramo de nanopartículas indica la viabilidad del sistema como medio de administración del agente bioactivo, dado que los valores reportados de concentración inhibitoria mínima (MIC) se encuentran alrededor de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en actividades contra *Trypanosoma cruzi tripomastigotes* (56).

Los valores de eficiencia de encapsulación (EE) indican que el 91,33% de la embelina inicialmente colocada en la solución fue efectivamente incorporada en las nanopartículas. Este valor superior al 90% en la eficiencia de encapsulación indica que el proceso de encapsulación presenta una gran eficiencia, y que las nanopartículas de quitosano poseen un gran potencial como sistema de administración del agente embelina.

Los valores obtenidos de **Me**, **EE** y **CC** indican que las nanopartículas de quitosano son un sistema eficaz para la incorporación de embelina, con una mínima pérdida de material y una alta eficiencia en su encapsulación. Estos resultados indican una gran potencialidad de las nanopartículas de quitosano como sistema para la encapsulación y administración de embelina.

Tabla 5. Características fisicoquímicas y rendimiento de encapsulación de nanopartículas.

Muestra	Me (mg/g)	EE (%)	CC (%)
Q-Ep	91,33 \pm 0,20	91,33 \pm 0,17	9,13 \pm 0,07

5.4 Estudio del hinchamiento de las partículas Qp

Los resultados del estudio de hinchamiento de las nanopartículas de quitosano Qp se muestran en la Figura 30. A partir de los datos obtenidos puede observarse que el hinchamiento de las partículas de quitosano alcanza el equilibrio **luego de 0.75 horas (45 minutos)**, con un promedio de hinchamiento del 10689%. Esto indica que, a partir de este punto, las partículas alcanzaron una **saturación** en su capacidad de absorber agua bajo las condiciones del medio buffer fosfato pH= 7,4.

La ligera fluctuación posterior (valores a 1.5 y 2 horas) podría deberse a la heterogeneidad en la estructura interna de las partículas o a pequeñas variaciones experimentales, pero estas no afectan significativamente la tendencia general, que muestra un comportamiento estabilizado después de 0.75 horas. El aumento a las 72 horas sugiere procesos secundarios, como reestructuración interna de las redes poliméricas, pero estas no se consideraron para el análisis final.

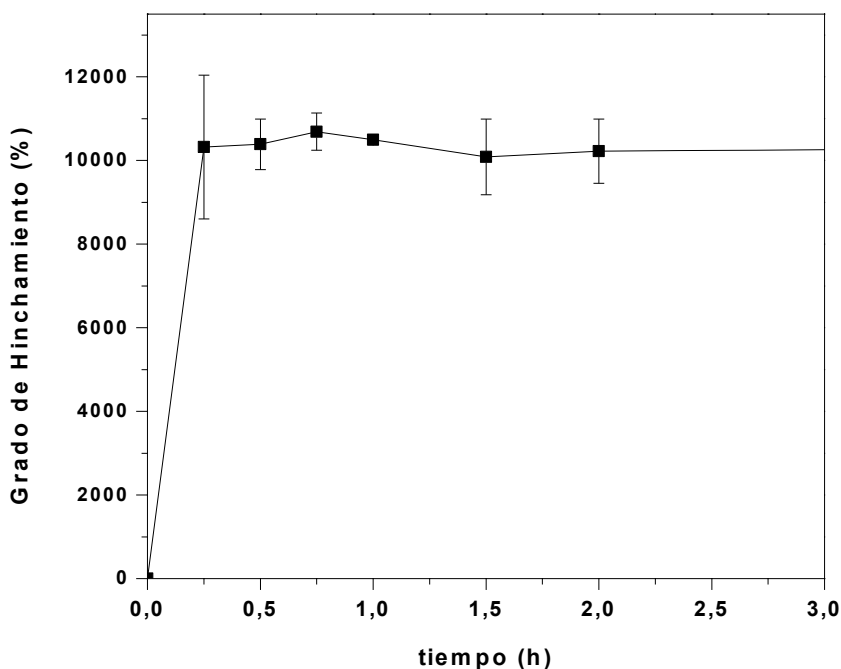


Figura 30. Perfil de hinchamiento de las nanopartículas Qp.

El comportamiento observado puede explicarse considerando las propiedades del **quitosano**, un polímero natural derivado de la desacetilación de la quitina. Su estructura contiene **grupos funcionales amino (-NH₂)** y **grupos hidroxilo (-OH)**, responsables de su comportamiento en contacto con soluciones acuosas.

El mecanismo de hinchamiento en el medio podría describirse en varias etapas:

1. **Absorción inicial y velocidad de hinchamiento:**

- Al sumergir las partículas de quitosano en el PBS, ocurre un rápido intercambio de agua con el medio, gracias a la alta afinidad de sus grupos hidrofílicos (-NH₂ y -OH) por las moléculas de agua. Estos grupos forman enlaces de hidrógeno con el agua, lo que facilita la hidratación del material.
- En los primeros 45 minutos, el hinchamiento es especialmente rápido debido a la presencia de una red de poros abiertos en el quitosano, que permite la difusión del agua hacia el interior del material.

2. Saturación del hinchamiento a 0.75 horas:

- El punto en el que se alcanza el equilibrio **de hinchamiento** corresponde al equilibrio entre las fuerzas de absorción del agua (enlaces de hidrógeno e interacciones poliméricas) y las fuerzas internas de la red polimérica que resisten la expansión.
- A medida que el agua ocupa los poros internos y las cadenas de polímero alcanzan su máxima elongación, el material entra en una **fase de saturación**, y cualquier incremento posterior es mínimo.

3. Estructura del quitosano y su interacción con el agua:

- El quitosano posee una estructura semicristalina, lo que implica que tiene regiones amorfas y cristalinas. Las regiones amorfas son responsables de la mayor parte de la absorción inicial, ya que permiten la entrada y difusión de agua.
- A medida que las regiones amorfas se saturan, las regiones más ordenadas (cristalinas) presentan una mayor resistencia al hinchamiento, limitando la capacidad total de absorción.
- En medio buffer fosfato (pH 7.4), el quitosano no está completamente protonado, por lo que sus cadenas poliméricas tienden a mantener su estructura, contribuyendo a estabilizar el hinchamiento.

4. Cambios a largo plazo (72 horas):

- El aumento observado en el hinchamiento tras periodos prolongados podría deberse a una **relajación lenta de la red polimérica** o a una reestructuración interna, donde las moléculas de agua penetran lentamente en regiones menos accesibles.

El estudio del hinchamiento demostró que las partículas de quitosano alcanzan su máxima capacidad de hinchamiento dentro de un período de 0.75 horas en medio buffer fosfato. Este comportamiento puede ser determinante en la liberación de embelina, ya que afecta directamente los mecanismos por los cuales la embelina difunde a través de la matriz polimérica y hacia el exterior de la misma.

5.5 Proceso de liberación

5.4.1 Influencia del medio liberación y del recubrimiento en los sistemas de nanopartículas

En el proceso de preparación de nanopartículas mediante electrospray, es crucial seleccionar de manera adecuada el solvente o mezcla de solventes, considerando propiedades como el momento dipolar, la conductividad, y la temperatura de evaporación, entre otros. Estas

propiedades no sólo determinan las condiciones de procesamiento, sino también afectan la solubilidad del sistema y del agente terapéutico, su capacidad de carga, y la velocidad de secado de las partículas. Estas variables son determinantes para el tamaño y las características morfológicas finales de las partículas. La velocidad de secado, por ejemplo, está inversamente relacionada con la temperatura de evaporación del solvente, lo que influye directamente en la morfología final de las partículas que alcanzan el colector. Adicionalmente, la velocidad de evaporación también afecta el ordenamiento de las cadenas poliméricas en las partículas, condicionando la cristalinidad de la matriz polimérica. Esto a su vez, tiene un impacto directo en los perfiles de liberación del agente encapsulado, en este caso, embelina.

En la Figura 31 se observa el perfil de liberación de embelina a partir de las nanopartículas de quitosano, empleando como medio de liberación una solución buffer fosfato (PBS, pH = 7,4). A partir de este perfil de liberación es posible identificar tres etapas bien definidas.

✓ **Primera etapa (0 a 1 h):** Liberación inicial rápida

Durante la primera hora, se observa una liberación acelerada de embelina, alcanzando aproximadamente el 28,49 % del agente encapsulado (Figura 32). Este comportamiento inicial podría atribuirse al fenómeno conocido como *burst effect*, que implica una rápida liberación del agente presente en las capas superficiales de las partículas. La embelina más expuesta al medio de liberación se difunde fácilmente debido a la limitada resistencia que ofrece la matriz polimérica en esta etapa inicial. A partir de los datos obtenidos del estudio de hinchamiento de las partículas, es en este período de tiempo en el que las nanopartículas de quitosano experimentan un marcado hinchamiento hasta alcanzar su equilibrio. Este gran hinchamiento de las nanopartículas de quitosano podría favorecer la migración de embelina hacia el medio de liberación y la posible formación de poros superficiales durante el contacto inicial con el medio acuoso.

✓ **Segunda etapa (1 a 7 h):** Liberación controlada

En esta etapa se observa una disminución de la tasa de liberación de embelina, alcanzando luego de 7 h un porcentaje de liberación de 74,85 % (Figura 32). Este fenómeno podría explicarse por la difusión del agente terapéutico desde las regiones internas de la matriz de quitosano hacia el medio de liberación. En este período y luego del hinchamiento de las partículas, el proceso de liberación estaría dominado por la interacción de las cadenas poliméricas del quitosano, que pueden formar una red más densa al hincharse, limitando parcialmente la difusión de la embelina. La posible presencia de microcanales generados durante el hinchamiento del quitosano también puede contribuir a regular la velocidad de liberación.

✓ **Tercera etapa (7 a 72 h):** Liberación sostenida

Finalmente, entre las 7 y 72 horas se observa una etapa de liberación más lenta y sostenida, alcanzando un valor final de embelina liberada del 97,48 % (Figura 31). Esta etapa puede estar relacionada con la disminución de la cantidad de embelina presente en el interior de las partículas, lo que reduce el gradiente de concentración, y, por ende, la fuerza impulsora para la difusión. Además, la degradación parcial de las partículas de quitosano podría facilitar la liberación de las últimas fracciones de embelina atrapadas en la matriz, aunque a una tasa mucho menor que en las etapas anteriores. De acuerdo al valor final de embelina liberada, una pequeña porción de embelina (2,52 %) permanece retenida y asociada a las cadenas de quitosano.

La diferenciación clara de estas tres etapas destaca la capacidad de las nanopartículas de quitosano para modular la liberación de embelina, ofreciendo un perfil inicial rápido seguido por

una liberación más controlada y sostenida. Estas características posicionan a este sistema como un candidato prometedor para aplicaciones terapéuticas que requieran una liberación regulada del agente activo.

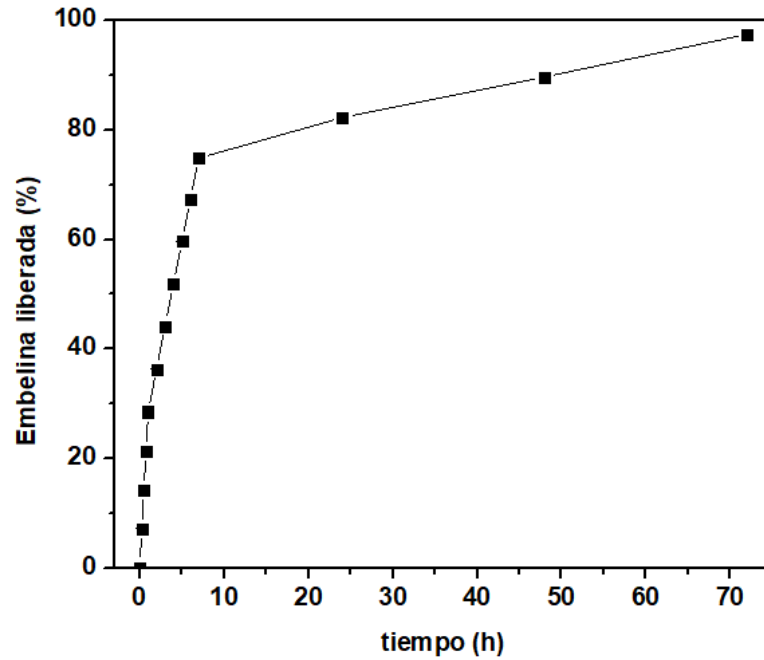


Figura 31. Cinética de liberación de embelina: Evaluación del porcentaje liberado en función del tiempo.

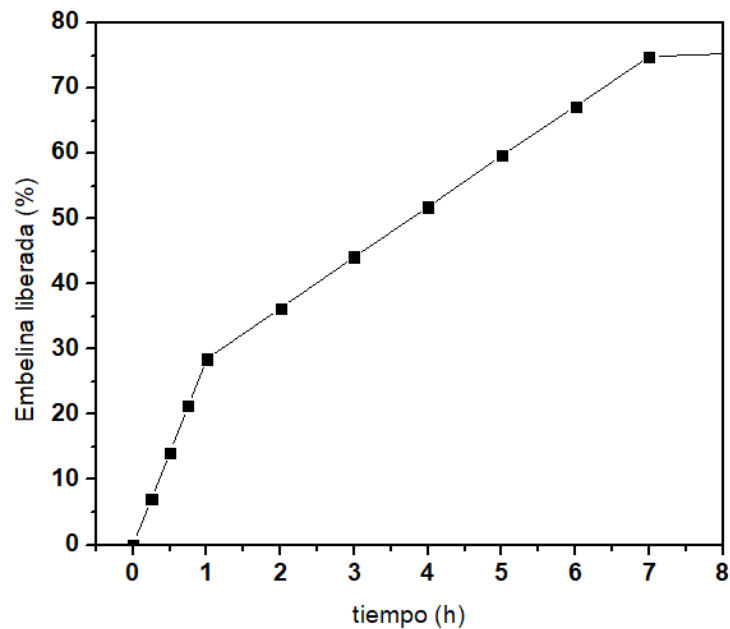


Figura 32. Cinética inicial de liberación de embelina: Evaluación detallada durante las primeras 8 horas.

5.4.2 Estudio de la cinética de liberación de embelina a partir de Q-Ep

Se evaluaron los perfiles de liberación de embelina a lo largo de 72 horas, dividiendo el proceso en tres etapas: inicial (0-1 hora), intermedia (1-7 horas) y final (7-72 horas). Se emplearon los modelos matemáticos de Orden Cero, Higuchi y Korsmeyer-Peppas para analizar los mecanismos involucrados en cada etapa del perfil de liberación. Los parámetros ajustados y coeficientes de correlación (R^2) se resumen en la Tabla 6, junto con los mecanismos predominantes en cada intervalo.

Tabla 6. Parámetros de Ajuste de los Modelos de Liberación en las Distintas Etapas.

Tiempo (h)	Orden Cero		Higuchi		Korsmeyer y Peppas			Mecanismos de Liberación
	K_c	R^2	K_h (n=1/2)	R^2	K_{kp}	n	R^2	
0-1	-	-	-	-	-	-	-	Difusión rápida
1-7	7,73	0,999	27,00	0,977	33,37	1,95	0,948	Modelo Orden Cero
7-72	0,34	0,992	13,57	-10,09	70,45	0,77	0,998	Difusión anómala

Primera etapa (0 a 1 hora)

En esta etapa inicial, no se realizó ajuste matemático debido al comportamiento característico de liberación rápida observado, donde se liberó aproximadamente un 28.5% del agente terapéutico. Este fenómeno puede explicarse por:

- **Difusión rápida superficial:** Una porción de embelina podría estar localizada en zonas cercanas a la superficie de las nanopartículas o en zonas poco protegidas por la matriz de quitosano, lo que permite su rápida disolución y difusión al entrar en contacto con el medio acuoso (PBS, pH 7,4).
- **Hinchamiento inicial:** El hinchamiento que experimentan las nanopartículas de quitosano durante la primera hora podría facilitar el acceso del medio a las moléculas más expuestas del agente terapéutico. Este fenómeno es típico en sistemas poliméricos hidrofílicos.

Aunque no se ajustaron modelos en esta etapa, este comportamiento corresponde al fenómeno conocido como "*burst effect*", que es común en sistemas de liberación controlada con agentes encapsulados en superficies poliméricas.

Segunda etapa (1 a 7 horas)

En este intervalo, la liberación de embelina se vuelve más uniforme y controlada, alcanzando aproximadamente un 74.8% del total de embelina liberada al final del periodo. Los resultados obtenidos muestran que:

1. **Orden Cero** presentó un ajuste excelente ($R^2= 0,999$), indicando que la liberación ocurrió a una velocidad constante. Esto sugiere un control cinético dominado por la erosión gradual de la matriz de quitosano, lo que permite una liberación sostenida.

2. **Korsmeyer-Peppas** también mostró un buen ajuste ($R^2= 0,948$) aunque inferior al obtenido a partir del ajuste con el modelo de orden cero, con un coeficiente $n= 1,95$. Este valor sugiere que la liberación en este periodo está dominada por la erosión de la matriz polimérica, lo que es consistente con los sistemas donde el material encapsulante es degradable o sufre procesos de disolución paulatina.
3. **Higuchi** mostró un ajuste razonable ($R^2= 0,977$), pero inferior al de los otros modelos, sugiriendo que la liberación en esta etapa no está puramente dominada por difusión, sino que incluye efectos de relajación o degradación de las cadenas de quitosano.

El comportamiento observado podría deberse a la penetración progresiva del medio acuoso dentro de las nanopartículas, lo que facilita tanto la difusión de las moléculas de embelina como la relajación de las cadenas poliméricas.

Tercera etapa (7 a 72 horas)

En la última etapa, la velocidad de liberación disminuye considerablemente, alcanzando aproximadamente el 97.5% de embelina liberada al final del periodo. Los ajustes mostraron:

1. **Higuchi** no resultó adecuado ($R^2= -10,09$), lo que indica que este modelo, basado en difusión simple, no describe correctamente esta etapa. Esto podría explicarse por la disminución de la concentración de embelina dentro de las partículas y la complejidad del sistema polimérico de quitosano, que no se comporta como una matriz homogénea.
2. **Orden Cero** mostró un ajuste bueno ($R^2= 0,992$), sugiriendo que la liberación sigue siendo relativamente constante, aunque más lenta en comparación con la etapa intermedia.
3. **Korsmeyer-Peppas** fue el modelo más adecuado ($R^2= 0,998$), con un coeficiente $n= 0,77$. Este valor indica un mecanismo de **difusión anómala**, en el que coexisten:
 - **Difusión de las moléculas de embelina** desde el interior de la matriz hacia el medio.
 - **Relajación de las cadenas poliméricas**, que puede estar asociada al proceso de degradación o hinchamiento progresivo del quitosano.

La disminución de la velocidad de liberación en esta etapa podría deberse a una menor cantidad de embelina disponible dentro de las partículas, lo que reduce la fuerza impulsora para la difusión. Además, es posible que el hinchamiento progresivo del quitosano haya generado microestructuras más rígidas o menos accesibles para la difusión.

En la Figura 33 puede observarse el efecto de "*burst effect*" en la primera etapa (0 a 1 h) del perfil de liberación. La Figura 34 se observa el ajuste matemático realizado en la etapa intermedia del perfil de liberación con los modelos de Orden Cero, Modelo de Higuchi y Modelo de Korsmeyer-Peppas. Finalmente, en la Figura 35 se muestra el ajuste matemático realizado en la Ajuste matemático en la etapa final de liberación.

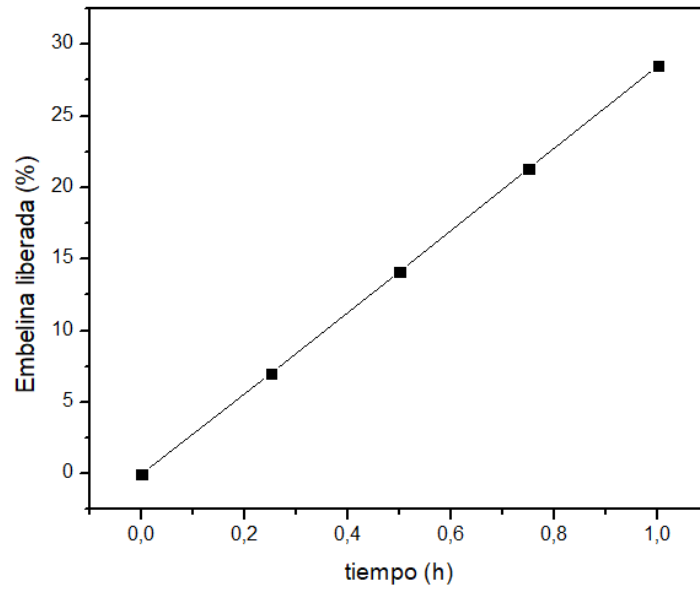


Figura 33. Etapa de liberación inicial rápida “burst effect”.

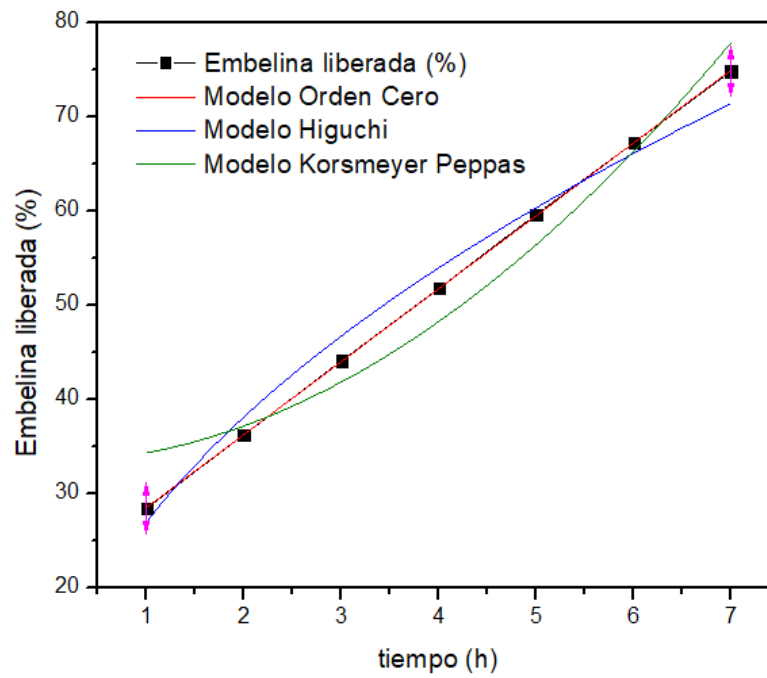


Figura 34. Ajuste matemático en la etapa intermedia de liberación con los tres modelos: Modelo de Orden Cero, Modelo de Higuchi y Modelo de Korsmeyer-Peppas.

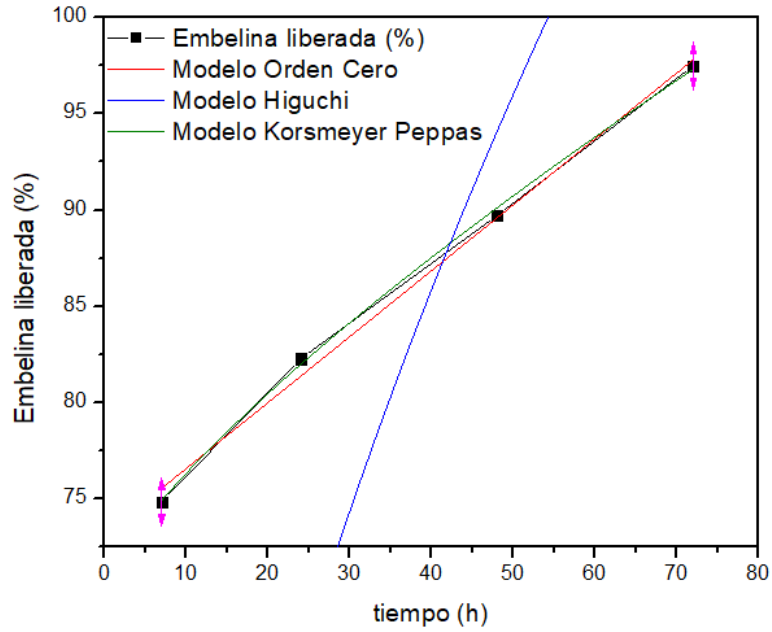


Figura 35. Ajuste matemático en la etapa final de liberación con los tres modelos: Modelo de Orden Cero, Modelo de Higuchi y Modelo de Korsmeyer-Peppas.

5.5 Análisis de costos, escalado y normativa del sistema de producción de partículas core-shell mediante electrospray

Utilizando el método descrito en la sección 4.6, se evaluó la ampliación del sistema de producción de partículas a través de *electrospraying*. Se consultaron los datos de la Tabla 7 y 8 que incluyen los diversos factores directos e indirectos. Estos datos fueron utilizados para calcular la estimación de la inversión, junto con el costo del equipo principal involucrado en el proceso.

Tabla 7. Factores directos.

Valor del equipo instalado I_E (USD)	82106,4
Factores de estimación directa	f_d
Tuberías de proceso	0,45
Instrumentación	0,075
Edificio de fabricación	0,8
Planta de servicios	0,025
Conexión entre unidades	0
Inversión directa $I_E(1 + \sum f_d)$	192950

Tabla 8. Factores indirectos.

Factores para la inversión indirecta	f_i
Ingeniería y Construcción	0,275
Factores de tamaño	0,025
Contingencias	0,25
Factor de inversión directa $f_I = (1 + \sum f_i)$	1,55
Inversión Fija (USD) $I_F = I_E(1 + \sum f_d) \cdot f_I$	299072

Una vez obtenida la estimación de la inversión fija según los precios de los equipos instalados, se procedió al cálculo de los costos fijos de producción. Para ello, se tomaron en consideración los costos de las materias primas especificados en la Tabla 9.

Tabla 9. Costo de las materias primas.

Materia Prima	Marca	Precio (USD)
Quitosano Bajo PM (50 g)	Aldrich	249,26
Embelina $\geq 98\%$ (HPLC), powder (1 g)	Aldrich	12240
Ácido Acético (1 l)	Anedra	18
Diclorometano (1 l)	Biopack	14

A partir de los costos de mercado de las diferentes materias primas se estimó el costo de producción para obtener 1 gramo de partículas (Tabla 10).

Tabla 10. Costo de las materias primas por gramo de partícula.

Materia Prima	Precio (USD)
Quitosano Bajo PM (0,9 g)	4,49
Embelina $\geq 98\%$ (HPLC), powder (0,1 g)	1224
Ácido Acético (113,36 ml)	2
Diclorometano (13,34 ml)	0,19
Total	1230,68

Empleando las cotizaciones del mercado actual de las materias primas se estimaron los costos variables y fijos de producción de partículas, que se observan en la Tabla 11.

Tabla 11. Costos variables y costos fijos.

Costos variables	USD/año
Materia Prima	7679
Mano de Obra	8500
Servicios	1200
Mantenimiento	6500
Suministros	1700
Costos Fijos	
Depreciación de equipamiento	23926
Impuestos	4500
Seguros	1500
Total	55505

Del análisis económico realizado para alcanzar el volumen requerido de partículas, se determinó un costo anual total de USD 55.505. Este cálculo se basó en una producción a escala de laboratorio, considerando una jornada laboral de 8 horas diarias y 40 horas semanales.

Actualmente, el número de empresas dedicadas al diseño y fabricación de equipos de **electrospinning/electrospraying**, así como a la prestación de servicios relacionados, ha crecido significativamente. Este fenómeno responde al auge de estas técnicas de procesamiento, que están ganando popularidad debido a su versatilidad y a su potencial en una amplia variedad de sectores, como la **bioingeniería y biotecnología, medicina, farmacia, agricultura, remediación ambiental, industria textil**, entre otros. En la **Tabla 12**, se detallan algunas de las empresas más destacadas que desarrollan equipos comerciales y servicios relacionados.

Tabla 12. Empresas que comercializan equipos de electrospaying en el mundo.

Empresa	Producto/Servicio
Elmarco (República Checa)	Elmarco es uno de los principales fabricantes de equipos de electrospinning a nivel industrial. Ofrecen máquinas para producción de nanofibras de alta calidad y escalabilidad
Nanoscience Instruments (USA)	Esta empresa distribuye equipos para electrospinning, incluyendo sistemas como Spinbox y Fluidnatek, enfocados en aplicaciones de laboratorio y producción en pequeña escala.
Inovenso (Turquía)	Inovenso fabrica sistemas de electrospinning y electrospaying avanzados para aplicaciones en

	investigación, producción de nanofibras y recubrimientos funcionales.
Fluidnatek (Francia)	Fluidnatek, que forma parte de la empresa Bioinicia, se enfoca en electrospinning y electrospaying, ofreciendo soluciones para la creación de partículas y fibras a nanoescala.
Intercovamex (México)	Intercovamex se especializa en la venta de equipos de electrospinning y electrospaying para aplicaciones industriales y de investigación. La compañía ofrece soluciones personalizadas y soporte técnico, adaptándose a las necesidades de cada cliente.

5.6 Estudio de mercado

La embelina es un compuesto natural con diversas propiedades biológicas, y se encuentra disponible en el mercado en diferentes formas, principalmente para investigación y como suplementos dietéticos, aunque también se investiga su aplicación en formulaciones más complejas:

- **Para Investigación:** La embelina se comercializa como reactivo químico de alta pureza por proveedores como Fisher Scientific y VWR. Estos productos, generalmente en forma de polvo, se utilizan en entornos de laboratorio para estudiar las propiedades de la embelina y sus posibles aplicaciones terapéuticas, incluyendo sus efectos antiinflamatorios y anticancerígenos. No están destinados al consumo directo ni se presentan en formulaciones clínicas como tabletas, inyectables o medicamentos de venta libre.
- **Suplementos Dietéticos:** La embelina también se encuentra en el mercado como ingrediente de suplementos dietéticos, disponibles en cápsulas, tabletas y polvos. Estos suplementos se promocionan por sus propiedades antioxidantes y sus posibles beneficios para la salud digestiva y metabólica, así como para el bienestar general.
- **Investigación y Desarrollo de Formulaciones Complejas:**
 - **Tratamiento del Alzheimer:** Se están desarrollando sistemas de nanopartículas lipídicas estructuradas que combinan embelina con otros fármacos para mejorar la entrega de medicamentos al cerebro, con el objetivo de abordar enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.
 - **Cicatrización de Heridas:** Se ha desarrollado un hidrogel medicinal con embelina que ha demostrado propiedades antimicrobianas y cicatrizantes, lo que lo convierte en una opción prometedora para el tratamiento de heridas cutáneas.
 - **Activador de la Apoptosis:** La embelina se ofrece comercialmente como un activador de la apoptosis, útil en investigación oncológica por su capacidad para inhibir el inhibidor de la apoptosis XIAP y promover la muerte celular programada.

Si bien la embelina se encuentra en el mercado principalmente como reactivo para investigación y como suplemento dietético, existe una activa investigación en curso para desarrollar formulaciones más complejas y específicas para diversas aplicaciones terapéuticas, como el tratamiento del Alzheimer, la cicatrización de heridas y terapias contra el cáncer.

Por otro lado, actualmente, no se ha encontrado información específica sobre productos comerciales que utilicen **tanto quitosano como embelina** en su formulación. Sin embargo, hay investigaciones en curso que exploran el uso combinado de estos compuestos en aplicaciones médicas y farmacéuticas debido a sus propiedades complementarias. El quitosano, conocido por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y actividad antimicrobiana, se investiga en combinación con embelina para desarrollar nuevos sistemas de liberación de fármacos y terapias antimicrobianas avanzadas.

En cuanto al **quitosano** se utiliza en varios productos comerciales en diferentes industrias debido a sus propiedades versátiles. Algunos ejemplos de productos que utilizan quitosano:

1. Aplicaciones Médicas y Farmacéuticas:

- Vendajes para Heridas:

El quitosano se utiliza en productos como *HemCon® Bandage PRO* y *HemCon ChitoFlex®*. Estos vendajes aprovechan las propiedades hemostáticas del quitosano para detener el sangrado rápidamente y promover la cicatrización de heridas. El quitosano también actúa como un agente antimicrobiano, ayudando a prevenir infecciones en heridas abiertas (57).

- Suplementos Dietéticos:

KiOtransine® es una fibra prebiótica diseñada para consumo humano que favorece la salud digestiva y metabólica. Es una fibra insoluble que se fermenta lentamente en el colon, produciendo ácidos grasos de cadena corta (como butirato y propionato) con una baja generación de gases. Sus principales beneficios incluyen:

- Restaurar la microbiota intestinal.
- Mejorar el tránsito intestinal.
- Apoyar los sistemas antioxidantes naturales del cuerpo.
- Reducir los niveles de colesterol LDL oxidado.

Se utiliza en productos de nutrición médica, como *Gastrap® Direct*, y en desarrollos dirigidos a tratar enfermedades intestinales crónicas. Es ideal para personas con desequilibrios digestivos o metabólicos y contribuye al bienestar general (59).

2. Cosméticos:

- La colección **Dyson Chitosan** introduce una nueva era en el cuidado y estilizado del cabello mediante el uso del **chitosan**. Este ingrediente, conocido por sus aplicaciones en otras industrias, se incorpora en productos diseñados para proporcionar una fijación flexible que mantiene el peinado sin comprometer el movimiento ni el brillo natural del cabello. La tecnología **Dyson Triodetic™** potencia esta fijación, evitando la rigidez o el efecto “crunchy” típico de otros productos. La gama incluye una **crema de peinado**, que reduce

el encrespamiento en un 50% y transforma su textura de cremosa a un sérum ligero, y un **sérum capilar**, que hidrata y define el cabello hasta por 12 horas, incluso en ambientes con un 80% de humedad.

Cada fórmula está personalizada con ingredientes específicos para distintos tipos de cabello, desde aceites ligeros como el de semilla de uva hasta aceites ricos como el de argán. Dyson combina innovación y cuidado capilar, ofreciendo productos que aseguran estilos duraderos sin comprometer la salud del cabello (58).

3. Industria agrícola:

PRODUCTOS DE CONTROL DE PLAGAS Y ENFERMEDADES PARA LA HUERTA Y JARDIN.

- RAISAN es un producto natural a base de **quitosano** extraído de la cáscara de crustáceos, utilizado para inducir la **resistencia sistémica adquirida (SAR)** en plantas. Actúa fortaleciendo los mecanismos de defensa naturales de las plantas, lo que las hace más resistentes a enfermedades y favorece su crecimiento. Entre sus principales efectos, RAISAN estimula la producción de raíces, actúa como un fungistático frente a hongos patógenos como *Phytophthora* y *Botrytis*, y protege contra enfermedades aéreas. Además, mejora la eficiencia en el uso del agua y tiene un efecto **nematostático**, controlando nematodos fitopatógenos. Este producto es ideal para cultivos intensivos como uva de mesa, vides viníferas y cítricos, así como cultivos extensivos como soja, maíz y trigo (60).
- **Quitosano MSO** es un regulador de crecimiento orgánico y bioestimulante formulado como concentrado soluble a base de quitosano, un polímero natural extraído de la quitina de crustáceos. Estimula el crecimiento de raíces y follaje, mejora el vigor y rendimiento de los cultivos, y activa los mecanismos de defensa de las plantas contra enfermedades, estrés ambiental y patógenos como hongos y nematodos. También desencadena una respuesta inmune en las plantas, formando una barrera bioquímica contra agentes externos. Su acción es rápida, visible en 24 horas, y dura hasta 6 semanas.

El producto es versátil, recomendado para diversos cultivos como vid, agave, piña, chile, tomate, aguacate, cítricos, espárrago, fresas y hortalizas de hoja verde, con dosis y modos de aplicación específicos para cada uno. Se puede aplicar al suelo húmedo, en riego por goteo, por aspersión o mediante inmersión de raíces y plántulas (61).

- Control Microbiológico:

Bactiless™: Se utiliza para controlar las poblaciones de bacterias lácticas y acéticas en el vino durante la fermentación. Ayuda a evitar la contaminación bacteriana que podría afectar la calidad del vino, sin alterar las levaduras necesarias para el proceso de fermentación.

NO BRETT INSIDE™: Está diseñado para eliminar específicamente las células de **Brettanomyces**, una levadura que puede alterar el perfil sensorial del vino, dando lugar a sabores indeseados. Este producto ayuda a mejorar la calidad del vino sin dejar residuos ni afectar su sabor (62).

6 Conclusiones

En este trabajo se optimizó el proceso de obtención de nanopartículas de quitosano monoaxiales y nanocápsulas con embelina encapsulada mediante la técnica de *electrospraying* coaxial. Las nanopartículas obtenidas presentaron un diámetro medio de alrededor de 250 nm, con una distribución de tamaños monodispersa. El procesamiento mediante *electrospraying* permitió un control preciso sobre la preparación de las nanopartículas de quitosano, y la estabilidad durante el procesamiento.

La eficiencia de encapsulación de embelina mostró valores superiores al 90%, y su capacidad de carga valores de 9,13%, lo que demuestra la efectividad de la técnica para encapsular principios activos pobremente solubles en agua, en matrices poliméricas hidrofílicas de origen natural, como el quitosano.

El análisis térmico mediante DSC mostró los picos de fusión característicos de la embelina, y bandas de fusión para el quitosano y las nanopartículas Qp y Q-Ep, lo que evidencia la naturaleza mayormente amorfa del polímero. Sin embargo, los termogramas de las partículas evidenciaron un aumento en la temperatura de la banda de fusión que sugiere una modificación estructural posiblemente inducida por el procesamiento mediante *electrospraying*. No se observaron picos característicos de fusión de embelina en las nanopartículas Q-Ep, lo que podría indicar que la embelina presente se encuentra íntimamente mezclada con las cadenas de quitosano durante la fusión, por encontrarse inicialmente encapsulada y protegida, o la cantidad de embelina presente en las partículas no pudo detectarse mediante esta técnica.

Los resultados del estudio mediante DRX evidenció difractogramas de las nanopartículas Qp y Q-Ep similares al del quitosano comercial, sin presencia de picos característicos de embelina en las partículas Q-Ep, lo que indicaría que la embelina no se encuentra en la superficie de las partículas, o se encuentra en forma de agregados amorfos.

El estudio mediante FTIR evidenció que las nanopartículas Qp y Q-Ep presentaron las bandas características de quitosano, mientras que no se observaron los picos característicos del agente embelina, lo que puede deberse a que la embelina no se encuentra presente en la superficie, posiblemente por encontrarse encapsulada en el interior de las nanocápsulas de quitosano, o que la cantidad de embelina presente no puede ser detectada por esta técnica.

En cuanto al perfil de liberación, se observó un comportamiento trifásico en condiciones de pH fisiológico (7,4). En la primera fase (1 h) se liberó un 28,49% del agente, lo que indica una liberación rápida o *burst effect*, probablemente a partir de la embelina presente en las capas externas de las partículas. En la segunda fase (1 a 7 h) la liberación fue más sostenida, alcanzando un 74,85% de liberación acumulada. Finalmente, en la tercera fase (7 a 72 h) se alcanzó un 97,48% de embelina total liberada, lo que sugiere que las partículas continúan liberando el compuesto de manera gradual posiblemente debido a la difusión del compuesto desde el núcleo de las partículas, influenciada por el hinchamiento y degradación del quitosano.

El análisis cinético del perfil de liberación mostró una segunda fase que se ajustó perfectamente al modelo de Orden Cero, lo que indica una liberación constante del compuesto activo durante este período. Mientras que, en la tercera y última fase, el modelo de Korsmeyer-Peppas describió mejor el proceso de liberación, sugiriendo un mecanismo de difusión anómala influenciado por el hinchamiento progresivo del polímero y las interacciones con el medio circundante.

Los resultados obtenidos evidencian a las nanopartículas de quitosano con embelina encapsulada, con una gran potencialidad como sistemas de liberación controlada de agentes bioactivos pobremente solubles en agua, con una cinética de liberación propicia para aplicaciones antimicrobianas.

A pesar de los resultados favorables obtenidos, se identificaron algunas limitaciones en el procesamiento mediante *electrospraying*, como la baja velocidad de producción y la gran sensibilidad a factores ambientales como la temperatura y la humedad relativa. Estos desafíos técnicos destacan la necesidad de optimizar las condiciones operativas del proceso para mejorar la reproducibilidad, la eficiencia y la escalabilidad de la producción de nanopartículas.

Este trabajo proporciona una base sólida para futuras investigaciones que se centren en la optimización del proceso de *electrospraying*, y en la evaluación de la biocompatibilidad y eficacia terapéutica de las nanopartículas desarrolladas. El potencial de estas nanopartículas para mejorar la administración de compuestos bioactivos pobremente solubles en agua abre nuevas posibilidades en la preparación de sistemas avanzados de liberación controlada, que podrían revolucionar el campo de la farmacoterapia y la medicina a la medida de las necesidades de cada paciente.

6. Dificultades

A lo largo del desarrollo de esta tesis, se encontraron con varias dificultades que, aunque representaron desafíos, brindaron valiosas oportunidades para mejorar y optimizar los procesos, así como para aprender más sobre el área de biomateriales.

Una de las principales dificultades fue el bajo rendimiento de la técnica de *electrospraying*, empleando una sola aguja. Dado que se necesitaba una gran cantidad de partículas para realizar los estudios de caracterización, el proceso resultaba lento debido a la tasa de producción de aproximadamente 3 mg/h. Esto requirió de largas horas de procesamiento para obtener un volumen adecuado de partículas, lo cual representó un desafío logístico importante al no contar con mayores cantidades de material en un tiempo más corto. Este bajo rendimiento afectó, por un lado, la eficiencia del trabajo, pero por otro, también sirvió para replantear posibles mejoras en el proceso.

Por otro lado, la recolección de las partículas presentó un problema adicional. Las nanopartículas producidas a menudo quedaban adheridas al papel de aluminio utilizado en el equipo de electrospray, lo que dificultaba la recolección efectiva del material. Esta dificultad se resolvió implementando una modificación en la técnica de recolección. Se utilizó un paralelepípedo de acrílico para concentrar mejor las partículas y facilitar su recolección, mejorando así la eficiencia del proceso y optimizando la cantidad de material disponible para los análisis posteriores.

Además, el manejo de equipos de alta complejidad, como el equipo de *electrospray*, representó otro desafío. Aprender a trabajar con estos equipos y comprender los parámetros críticos del procesamiento de nanopartículas fue una curva de aprendizaje importante. La necesidad de calibrar y ajustar adecuadamente los parámetros, como el voltaje y el flujo, para obtener partículas de tamaño y morfología adecuadas requirió de mucha dedicación y paciencia, así como de una comprensión profunda de los procesos involucrados.

Finalmente, la incorporación de nuevos conceptos y el aprendizaje en el área de biomateriales representaron también un desafío, dado que no habían sido abordados directamente durante la carrera en ingeniería. Sin embargo, esta experiencia fue fundamental para mi formación, ya que

me impulsó a profundizar en conocimientos y técnicas fuera de mi ámbito habitual. Esto no solo amplió mi perspectiva, sino que también fortaleció mi capacidad de aprendizaje autónomo y mi habilidad para adaptarme a nuevas áreas del conocimiento.

7. Trabajos futuros

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se plantean diversas líneas de investigación para profundizar y expandir el conocimiento sobre las nanopartículas de quitosano con embelina encapsulada, así como para optimizar su producción y evaluar su aplicabilidad en el ámbito biomédico. Los trabajos futuros incluirán las siguientes actividades:

1. **Análisis de escalabilidad con multicabezal:** Se evaluará la viabilidad de escalar el proceso de producción mediante el uso de un sistema multicabezal en el equipo de electro spraying. Este enfoque permitirá analizar el impacto de variables operativas en la productividad y reproducibilidad del proceso, además de explorar su potencial para la producción industrial de nanopartículas. Los estudios incluirán la comparación de las características morfológicas, de tamaño y estabilidad de las partículas producidas con el sistema multicabezal frente a las obtenidas con un cabezal único.
2. **Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro:** Se realizará una caracterización detallada del efecto antimicrobiano de las nanopartículas con embelina frente a cepas bacterianas y fúngicas. Este estudio se llevará a cabo en colaboración con investigadores del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de San Juan (UNSJ) y se estructurará en varias etapas:
 - **Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Se empleará la técnica de microdilución en caldo, siguiendo las normativas CLSI (2015 y 2008), para evaluar la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Escherichia coli*) y levaduras del género *Candida*. Se utilizarán cepas tipificadas ATCC y aislados clínicos del Hospital Marcial Quiroga (San Juan).
 - **Sinergia con agentes antimicrobianos comerciales:** Se estudiará el efecto combinado de las nanopartículas con antibióticos y antifúngicos mediante el método del tablero de ajedrez, evaluando su potencial como coadyuvantes en terapias combinadas frente a microorganismos resistentes.
 - **Participación en investigaciones cooperativas:** Se prevé la realización de una estadía de investigación de corta duración en el Instituto de Biotecnología (FI-UNSJ), donde se participará en los estudios de evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas core-shell con embelina.
3. **Caracterización mediante Dynamic Light Scattering (DLS):** Se empleará la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar el tamaño hidrodinámico y el potencial zeta de las nanopartículas. Estas mediciones permitirán evaluar su estabilidad coloidal y tendencia a la agregación en diferentes condiciones ambientales. Los análisis se realizarán utilizando un equipo Zetasizer (Nano-ZS, Malvern Instruments) y se complementarán con pruebas adicionales para monitorear cambios en la morfología y propiedades físico-químicas de las partículas.
4. **Estrategias avanzadas de encapsulación:** Se explorarán nuevas estrategias para la encapsulación de embelina con el objetivo de desarrollar sistemas que ofrezcan distintos

perfiles de liberación. Estas estrategias incluirán el uso de entrecruzantes físicos y químicos, los cuales permitirán modular la interacción entre el quitosano y la embelina, afectando tanto la cinética de liberación como la estabilidad del sistema. Se evaluará también la influencia de estos entrecruzantes en las propiedades mecánicas y térmicas de las nanopartículas, así como su impacto en la eficiencia de encapsulación.

5. **Caracterización mediante potencial Z:** Se prevé continuar con el estudio de la cubierta superficial y la funcionalización de las nanopartículas mediante la caracterización de su potencial Z o potencial de superficie. Este análisis será fundamental para evaluar la estabilidad de las partículas a lo largo del tiempo, ya que el potencial Z es un indicador clave de la estabilidad coloidal, que permite conocer el grado de repulsión entre las partículas en suspensión. Mediante estas mediciones, se podrá ajustar la formulación y optimizar las características físico-químicas de las nanopartículas, garantizando su comportamiento estable y efectivo para aplicaciones biomédicas.

Estas actividades contribuirán al desarrollo de nuevas aplicaciones biomédicas de las nanopartículas, abriendo posibilidades para su implementación en el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas.

Bibliografía

1. *Pharmaceutical and biomaterial Engineering via electrohydrodynamic atomization technologies*. **P. Mehta, R. Haj-Ahmad, M. Rasekh, M.S. Arshad, A. Smith, S.M. Van Der Merwe, X. Li, M-W. Chang, Z. Ahmad**. 2016, *Drug Discov. Today*, págs. 157–165.
2. *Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release*. **N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O. C. Farokhzad**. 2016, *Chem. Rev*, págs. 2602–2663.
3. *Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization*. **G.A. Islan, P.R. Cortez Tornello, G.A. Abraham, N. Duran, G.R. Castro**. 2016, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, págs. 143, 168-176.
4. *Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A systematic review*. **Tischendorf, J**. 2016, *American Journal of Infection Control*, págs. 539–543.
5. *A Prognostic Model of Persistent Bacteremia and Mortality in Complicated Staphylococcus aureus Bloodstream Infection*. **Guimaraes**. 2018, *Clinical Infectious Diseases*, págs. 1502–1511.
6. *Antibacterial and Anti-Inflammatory Activity of an Antimicrobial Peptide Synthesized with D Amino Acids*. **Brunetti**. 2020, *Antibiotics*, pág. (9) 840.
7. *Production of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles by Electro spraying Technology*. **Sosnik, A**. 2014, *J. Biomed. Nanotechnol*, págs. 2200 - 2217.
8. *How to improve R&D productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge*. **S. M. Paul, D. S. Mytelka, C. T. Dunwiddie, C. C. Persinger, B. H. Munos, S. R. Lindborg, and A. L. Schacht**. 2010, *Nature Rev. Drug Discov*, pág. 203.
9. *Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of art*. **N. Bock, T.R. Dargavilleb, M.A. Woodruff**. *Prog. Polym. Sci*, págs. 1510 – 1551.
10. *Electrospraying: a facile technique for synthesis of chitosan-based micro/nanospheres for drug delivery applications*. **N. Arya, S. Chakraborty, N. Dube, D.S. Katti**. 2009, *J Biomed Mater Res B*, págs. 17-31.
11. *Effect of processing techniques on new poly(ϵ -caprolactone)-embelin microparticles of biomedical interest*. **P.R. Cortez Tornello, G.E. Feresin, A. Tapia, M. Dzieciuch, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham**. 2017, *Adv. Polym. Techno*, págs 1-11.
12. *Folic Acid-Conjugated Chitosan Nanoparticles Enhanced Protoporphyrin IX Accumulation in Colorectal Cancer Cells*. **Y. Shu-Yuan, L. Feng-Huei, T. Kun-Che, W. Ming-Feng, T. Han-Min, W. Jau-Min, S. Ming-Jium**. 2010, *Bioconjugate Chem*, págs. 679–689.
13. *Evaluation of Factors Affecting Size and Size Distribution of Chitosan-Electrosprayed Nanoparticles*. **A. Morteza, A. A. Karimi Zarchi, M. A. Faramarzi, A. Amani**. 2017, *Avicenna J Med Biotech*, págs. 126-132.
14. *Aliphatic polyesters: synthesis, properties and applications*. **A. C. Albertsson, I. K. Varma**. 2002, *Adv. Polym. Sci*, págs. 1-40.
15. *Dispersion and release of embelin from electrospun biodegradable, polymeric, membranes*. **P.R. Cortez Tornello, G.E. Feresin, A. Tapia, I.G. Veiga, .M. Moraes, G.A. Abraham, T.R. Cuadrado**. 2012, *Polym. J*, págs. 1105-1111.

16. *New compounds from the seeds of Embelia ribes burm.* **K. Haq, M. Ali, A.W. Siddiqui.** 2005, Pharmazie, págs. 69 - 71.
17. *Bioactive alkyl phenols and embelin from Oxalis erythrorhiza.* **G.E. Feresin, A. Tapia, M. Sortino, S. Zacchino, A.R. de Arias, A. Inchausti, G. Yaluff, J. Rodriguez, C. Theoduloz, G. Schmeda-Hirschmann.** 2003, J. Ethnopharmacol, págs. 241 - 247.
18. *Determination of embelin in Embelia ribes and Embelia tsjeriam-cottam by HPLC.* **S. Raja, K.P. Unnikrishnan, P.N. Ravindran, I. Balachandran.** 2005, Indian J. Pharm. Sci, págs. 734 - 736.
19. *Anticonvulsant activity of embelin isolated from Embelia ribes.* **S. Mahendran, B.S. Thippeswamy, V.P. Veerapur,.** 2011, Phytomed, págs. 186 - 188.
20. *Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol.* **H.M. Kumara Swamy, V. Krishna, K. Shankarmurthy, B. Abdul Rahiman K.L. Mankani , K.M. Mahadevan, B.G. Harish, H. Raja Naika.** 2006, Elsevier.
21. *HYDROXYBENZOQUINONES FROM MYRSINACEAE PLANTS-II. DISTRIBUTION AMONG MYRSINACEAE PLANTS IN JAPAN.* **NATOR, H. OGAWA and S.** 1967, Phytochemistry, págs. 773-782.
22. *Embelin a drug of antiquity. Shifting the paradigm towards modern medicine.* **Poojari, R.** 2014, Expert Opinion on Investigational Drugs, págs. 427-444.
23. *Bioactive alkyl phenols and embelin from Oxalis erythrorhiza.* **Gabriela Egly Feresina, Alejandro Tapia, Maximiliano Sortino, Susana Zacchino, Antonieta Rojas de Arias, Alba Inchausti, Gloria Yaluff, Jaime Rodriguez, Cristina Theoduloz , , Guillermo Schmeda-Hirschmann.** 2003, Elsevier, págs. 242-247.
24. *Pharmacognosy of indigenous drugs.* **Anonymous.** New Delhi : s.n., 1999, Central Council for Research in Ayurveda and Siddha, págs. 1046-1061.
25. *Biomaterials Science: An introduction to materials in Medicine.* **Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons.** 2020, Society For Biomaterials.
26. *Definitions in biomaterials.* **D.F, Williams.** 1987, Elsevier.
27. *¿Qué entiende por "Biomaterial" la comunidad científica.académica internacional?* **A.Abraham, Gustavo.** 2023, Asociación Argentina de Materiales, págs. 97-99.
28. *Definitions of Biomaterials for the twenty-first century.* **Xingdong Zhang, David Williams.** 2019, Elsevier.
29. *Biomaterials.* **Williams, David F.** 2009, ELSEVIER, págs. 5897-5909.
30. *Third-Generation Biomedical Materials.* **POLAK, LARRY L. HENCH AND JULIA M.** 2002, Science, págs. 1014-1017.
31. *Biomaterials: Principles and Applications.* **Park, J.B., Bronzino, J.D.** 2003, CRC PRESS.
32. *Disintegration of water drops in electric field.* **Taylor, G. I.** 1964, Proc. R. Soc. Lond. A, 280, 383-397.
33. *A review of chitin and chitosan applications.* **Kumar, Majeti N.V. Ravi.** 2000, Reactive & Functional Polymers , págs. 1-27.
34. *Collagen structure and stability.* **Shoulders, M. D., & Raines, R. T.** 2009, Annual Review of Biochemistry, págs. 929-958.

35. *Chitin and chitosan: Properties and applications*. **Rinaudo, Marguerite**. 2006, Prog. Polym. Sci., págs. 603-632.
36. *Hydrogels for Tissue Engineering: Addressing Key Design Needs Toward Clinical Translation*. **Fei Xu, Chloe Dawson, Makenzie Lamb, Eva Mueller, Evan Stefanek, Mohsen Akbari, Todd Hoare**. 2022, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.
37. *Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications*. **Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S. V., Tokura, S., Tamura, H., & Selvamurugan, N.** 2010, Biotechnology Advances, págs. 142-150.
38. *Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical*. **M. Dasha, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini**. 2011, Progress in Polymer Science, págs. 981-1014.
39. *New compounds from the seeds of Embelia ribes Burm.* **K. Haq, M. Ali, A.W. Siddiqui**. 2004, Pharmazie, págs. 60-69.
40. *Chemopreventive effects of embelin and curcumin against N-nitrosodiethylamine/phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats.*] **M. Sreepriya, G. Bali**. 2005, Fitoterapia, págs. 549-555.
41. *Anti-fertility effects of embelin in female Sprague-Dawley rats may be due to suppression of ovarian function*. **Wango, E**. 2005, Acta Biologica Hungarica, págs. 1-9.
42. *Cytotoxic activity of embelin from Lysimachia punctata.*] **I. Podolak, A. Galanty, Z. Janeczko**. 2005, Fitoterapia, págs. 333-335.
43. *Evaluation of antidiabetic effect of embelin from Embelia ribes in alloxan induced diabetes in rats*. **S. Mahendran, S. Badami, V. Maithili**. 2010, Biomed. Pharmacother.
44. *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines: A guide for their design, Preparation and Development*. **Ponchel, Christine Vauthier • Gilles**. 2016, Springer.
45. *Nanoparticles in Drug Delivery: From History to Therapeutic Applications*. **Obaid Afzal, Abdulmalik S. A. Altamimi, Muhammad Shahid Nadeem, Sami I. Alzarea, Waleed Hassan Almalki, Aqsa Tariq, Bismillah Mubeen, Bibi Nazia Murtaza, Saima Iftikhar, Naeem Riaz, Imran Kazmi**. 2022, Nanomaterials.
46. *Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation*. **Kevin W. Powers, * Scott C. Brown, Vijay B. Krishna, Scott C. Wasdo, Brij M. Moudgil, Stephen M. Roberts**. 2005, TOXICOLOGICAL SCIENCES, págs. 296-303.
47. *Chitosan-based Biogenic Nanoparticles for Wastewater Remediation: Synthesis, Characterization, and Applications - A Review*. **Usman Lawal Usman, S. Ellumalai, Anandh, Venkatesan Madha Suresh**. 2024, JOURNAL OF ISAS VOLUME 2, págs. 56-95.
48. *Principles of Electrospray Ionization*. **Wilm, Matthias**. 2011, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
49. *Coaxial electrospray of microparticles and nanoparticles for biomedical applications*. **Leilei Zhang, Jiwei Huang, Ting Si, Ronald X Xu**. 2012, n Expert Review of Medical Devices, págs. 595-612.
50. *Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)*. **J. Siepmann, N.A. Peppas**. 2000, ELSEVIER, págs. 163-174.

51. *Drug release modulation by physical restrictions of matrix swelling*. **P. Colombo, U. Conte, A. Gazzaniga, L. Maggi, M.E Sangalli, N.A Peppas and La Manna**. 1990, International Journal of Pharmaceutics, págs. 43-48.

52. *Overall mechanism behind matrixsustained release (SR) tablets prepared with hydroxypropyl methylcellulose 2910*. **Koichiro Tahara, Ken Yamamoto, Toshiaki Nishihata**. 1995, Journal of Controlled Release, págs. 59-66.

53. *Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs*. **PEPPAS, RICHARD W. KORSMEYER and NIKOLAOS A.** Amsterdam : s.n., 1981, Elsevier Scientific Publishing Company, págs. 211-227.

54. *Costos de Producción*. **Zugarramurdi, A., Parin, M.A.** 2003.

55. *Estrategias en ingeniería de procesos*. **Rudd, D., Watson, Ch.** 1976, Ed. Alhambra, págs. 139-148.

56. Bioactive alkyl phenols and embelin from *Oxalis erythrorhiza*. **G.E. Feresin, A. Tapia, M. Sortino, S. Zacchino, A.R. de Arias, A. Inchausti, G. Yaluff, J. Rodriguez, C. Theoduloz, G. Schmeda-Hirschmann**. 2003, J. Ethnopharmacol, 88, págs. 241-247.

57. HemCon. Mermaid Medical. Dinamarca: s.n. [En línea]. Disponible en: <https://www.mermaidmedical.com/products/hemcon/>

58. Kitozyme. Kitozyme. Bélgica: s.n. [En línea]. Disponible en: <https://www.kitozyme.com/en/ingredients/chitin-glucan/>.

59. Dyson incluye chitosan en su innovación para el cuidado capilar. Belleza Pura. Dyson. 2024, 11 de septiembre. Belleza Pura. [En línea]. Disponible en: https://www.bellezapura.com/2024/09/11/dyson-incluye-chitosan-en-su-innovacion-para-el-cuidado-capilar/?utm_source=chatgpt.com.

60. Raisan Quitosano. Huerta Orgánica Ba. s.n. [En línea]. Disponible en: <https://huertaorganicaba.com/productos/raisan-QUITOSANO/>.

61. Quitosano MSO: Bioestimulante y control de patógenos. Mountainside Orgánicos. s.n. [En línea]. Disponible en: <https://mountainsideorganicos.com/products/QUITOSANO-MSO-bioestimulante-y-control-de-patogenos?variant=40329586507812>.

62. Quitosano. Lallemand Wine. s.n. [En línea]. Disponible en: <https://www.lallemandwine.com/es/south-america/productos/QUITOSANO/?filter=QUITOSANO&page=1#products>.