

OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS Y/O LIPÍDICAS CON POTENCIAL USO EN TERAPIAS FRENTE AL CÁNCER

DAVID LEYTON CIFUENTES

Trabajo de grado para optar al título de
INGENIERO BIOMÉDICO

DIRECTORA:

Ph.D MARTHA ELENA LONDOÑO LÓPEZ



**UNIVERSIDAD EIA
INGENIERÍA BIOMÉDICA
ENVIGADO
2018**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a mi mentora y directora de tesis, Martha Elena Londoño López, quien, con su constante entrega y acompañamiento en esta investigación, permitió que se pudiesen alcanzar los objetivos propuestos. Los agradecimientos se quedan cortos, para dedicarle a ella este y todos los demás logros que llegasen a venir, pues ha sido Martha la persona que me permitió entender que era en la investigación, la oportunidad de cambiar el mundo desde lo más pequeño, la nanotecnología. Aquí nació toda mi inspiración y gusto por la biotecnología. No podría dejar pasar la oportunidad también de agradecerle a Martha, ser una cómplice de mi paso por la Universidad de Harvard. Espacio donde recibí un sinnúmero de herramientas que me permitió desarrollar, de una mejor manera, y con más experiencia, este trabajo de grado.

Igualmente quiero agradecer a mis padres, que, sin ellos, no hubiese podido concluir de manera exitosa, este recorrido por la ingeniería biomédica. Gracias por todo el apoyo brindado, fue un aliento que me impulsó siempre a ser mejor persona y mejor profesional.

Quiero agradecer también a mis compañeros del departamento de Biomateriales de la Universidad EIA y compañeros de Ingeniería Biomédica, quienes, con sus conocimientos, aportaron en gran medida al desarrollo de esta investigación.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	12
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	13
1.1 Contexto y Caracterización del Problema.....	13
1.2 Planteamiento del problema.....	14
1.3 Objetivos del proyecto.....	14
1.3.1 Objetivo General.....	14
1.3.2 Objetivos Específicos.....	14
1.4 Marco de referencia.....	14
1.4.1 Antecedentes.....	14
1.4.2 Marco teórico.....	16
1.4.2.1 Cáncer.....	16
1.4.2.2 Resveratrol.....	18
1.4.2.3.1 Formas farmacéuticas de liberación modificada.....	20
1.4.2.4 Nanopartículas poliméricas.....	21
1.4.2.5 Nanopartículas lipídicas.....	22
1.4.2.11.2 Caracterización morfológica.....	31
1.4.2.11.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	31
2 METODOLOGÍA.....	33
2.1 Síntesis y encapsulación del resveratrol en las nanopartículas alginato/quitosano.....	33
2.1.1 Análisis morfológico y químico del resveratrol.....	33
2.1.2 Síntesis de los hidrogeles de alginato/quitosano.....	33

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

2.1.3	Caracterización morfológica y química para las nanopartículas de alginato/quitosano.....	35
2.1.4	Encapsulación de resveratrol en los hidrogeles de alginato/quitosano	38
3	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	39
3.1	Espectro infrarrojo del resveratrol	39
3.2	Microscopía electrónica de barrido (SEM) para resveratrol.....	42
3.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM) para hidrogeles alginato/quitosano	43
3.4	Análisis FTIR para el alginato.....	44
3.5	Análisis FTIR para el quitosano	46
3.6	Análisis FTIR para el tripolifosfato de sodio	49
3.7	Análisis FTIR para hidrogeles alginato/quitosano con tripolifosfato como agente entrecruzante.....	51
3.8	Análisis FTIR para hidrogeles alginato/quitosano-TPP-resveratrol	54
3.9	Estabilidad de los hidrogeles alginato/quitosano	56
4.	CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES	59
	REFERENCIAS	61

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Código de las muestras para cada uno de los dos grupos de hidrogeles alginato/quitosano.....	36
Tabla 2. Detalle de las muestras para elaboración de hidrogeles alginato/quitosano y posterior encapsulación del resveratrol.....	36
Tabla 3. Detalle de la identificación de grupos funcionales del resveratrol en la gráfica de FTIR	40
Tabla 4. Detalle de la identificación de grupos funcionales del alginato en la gráfica de FTIR	45
Tabla 5. Detalle de la identificación de grupos funcionales del quitosano en la gráfica de FTIR	48
Tabla 6. Detalle de la identificación de grupos funcionales del tripolifosfato en la gráfica de FTIR	50

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Estructuras químicas del resveratrol y resveratrol glucósido (piecido) (Oregon State University, 2015).....	19
Figura 2. Estructuras químicas de los bloques de ácidos urónicos relacionados con la composición del alginato (Rinaudo, 2014).	25
Figura 3. Representación del entrecruzamiento del alginato cuando se encuentra en presencia de contraiones de calcio (Rinaudo, 2014).....	26
Figura 4. Estructura química del quitosano (Chemical Book, 2017).	28
Figura 5. Representación de la interacción química entre el quitosano y el alginato (Nnamonu, Ato, & Onyido, 2012).....	28
Figura 6. Representación esquemática del tripolifosfato pentasódico (Gurses, Erkey, Kizilel, & Uzun, 2018).	29
Figura 7. Representación de la interacción química entre el quitosano y el tripolifosfato (Vandana & Sahoo, 2009).	30
Figura 8. Imágenes obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Swapp, 2017).	32
Figura 9. Esquema de la elaboración de los hidrogeles para el grupo 1: (a) adición del alginato al quitosano en proporción 1:1, (b) adición del tripolifosfato a la solución alginato/quitosano, (c) centrifugación a 120 rpm y (d) proceso de lavado de los hidrogeles con acetona.....	34
Figura 10. Esquema de la elaboración de los hidrogeles para el grupo 1: (a) adición del alginato al quitosano en proporción 3:1, (b) adición del tripolifosfato a la solución alginato/quitosano, (c) centrifugación a 120 rpm y (d) proceso de lavado de los hidrogeles con acetona.....	35
Figura 11. Estructura química del resveratrol (Duan, y otros, 2016).....	39
Figura 12. Gráfica FTIR experimental para el resveratrol e identificación de sus bandas características	40
Figura 13. Microscopía electrónica de barrido: a) resveratrol con un aumento de 1000X y b) resveratrol con un aumento de 5000X.....	42
Figura 14. Microscopía electrónica de barrido para los hidrogeles elaborados experimentalmente (imágenes con aumento a 5000X) para los grupos G1 (a, b y c)	

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

(proporción alginato/quitosano 1:1) y G2 (d, e y f) (proporción alginato/quitosano 3:1).): (a) M0 y (d) M3 son las muestras blanco para los grupos correspondientes; (b) M1 y (e) M4 son hidrogeles con la adición de resveratrol en estado sólido, junto con el tripolifosfato (TPP); (c) M2 y (f) M5 son hidrogeles a los que se les adicionó el polifenol disuelto en el TPP.	43
Figura 15. Estructura química del alginato de sodio (Szekalska, PuciBowska, Szymańska, Ciosek, & Winnicka, 2016).....	44
Figura 16. Gráfica FTIR experimental para el alginato e identificación de sus bandas características	45
Figura 17. Estructura química del quitosano (Jiang, James, Kumbar, & Laurencin, 2014)	47
Figura 18. Gráfica FTIR experimental para el quitosano e identificación de sus bandas características	47
Figura 19. Estructura molecular del tripolifosfato de sodio (Fahim, Kheireddine, & Belaaouad, 2013)	49
Figura 20. Gráfica FTIR experimental para el tripolifosfato de sodio e identificación de sus bandas características.....	50
Figura 21. Interacción química entre el alginato y el quitosano (Nnamonu, Ato, & Onyido, 2012).	51
Figura 22. Interacción química entre el quitosano y el tripolifosfato (Liu, Bai, & Nan, 2004)	52
Figura 23. Gráfica FTIR experimental de hidrogeles alginato/quitosano-tripolifosfato e identificación de bandas características para el grupo 1 (G1) (espectroscopía color negro) y para el grupo 2 (G2) (espectroscopía color naranja)	52
Figura 24. Gráfica FTIR experimental de hidrogeles alginato/quitosano-tripolifosfato con resveratrol e identificación de bandas características para el grupo 1 (G1) y para el grupo 2 (G2)	55
Figura 25. Muestras elaboradas para los grupos G1 (a, b y c) (proporción alginato/quitosano 1:1) y G2 (d, e y f) (proporción alginato/quitosano 3:1): (a) M0 y (d) M3 son las muestras blanco para los grupos correspondientes; (b) M1 y (e) M4 son hidrogeles con la adición de resveratrol en estado sólido, junto con el tripolifosfato (TPP); (c) M2 y (f) M5 son hidrogeles a los que se les adicionó el polifenol disuelto en el TPP.	57

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Relación entre la absorbancia y la transmitancia.....	31

LISTA DE ANEXOS

pág.

Anexo 1. Protocolo síntesis de nanopartículas poliméricas de alginato/quitosano para encapsulación de resveratrol**¡Error! Marcador no definido.**

RESUMEN

Con la identificación de las propiedades antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenas del resveratrol, nace una alternativa a los tratamientos convencionales, como la quimioterapia y la radioterapia, que buscan combatir el cáncer, pero que generan diversos efectos secundarios. El resveratrol junto con el desarrollo que se está generando en los métodos de liberación de principios activos en nanopartículas, permite divisar una prometedora propuesta de encapsulación de dichos principios, que permitiría atacar tumores, dejando mínimos efectos nocivos en el organismo. En diferentes artículos científicos, es posible identificar diversos mecanismos de liberación de principios activos, donde el tamaño y la geometría de las nanopartículas, son algunas de las características más importantes a tener en consideración.

Este trabajo de grado tiene por objetivo general, proponer un sistema de encapsulación para el resveratrol en nanopartículas lipídicas y/o poliméricas con potencial uso en terapias frente al cáncer. Es por esta razón que se sugiere una metodología basada en 3 etapas. Las dos primeras, consisten en la obtención y caracterización morfológica y química del resveratrol y de las nanopartículas poliméricas y/o lipídicas. Realizando, finalmente, el proceso de encapsulación del resveratrol en las nanopartículas.

Se presenta en este trabajo, un mecanismo de encapsulación del resveratrol elaborado a partir de alginato/quitosano, con tripolifosfato como agente entrecruzante. Para conocer las características químicas del resveratrol, de los hidrogeles sin resveratrol y con el polifenol encapsulado, fue necesario utilizar la técnica de espectroscopía de infrarrojo (FTIR). Para el análisis morfológico, se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM). El análisis FTIR para los hidrogeles, comprobó las interacciones alginato/quitosano, como también las interacciones entre el quitosano y el agente entrecruzante (tripolifosfato), garantizando la composición del sistema. Una vez adicionado el resveratrol, se comprobó por medio de la ausencia de determinadas bandas características del polifenol, su encapsulación al interior de la matriz polimérica. El SEM, arrojó para el resveratrol morfologías granulares y amorfas, con diámetros inferiores a $2\mu\text{m}$. Para los hidrogeles, se detectaron tamaños micro y nano, presentándose tamaños de partícula inferiores a 500nm.

Para analizar la estabilidad del sistema, se observó la solución que contenía los hidrogeles, durante un mes, en donde no se notó ningún precipitado ni agregado, por lo que se consideró estable, por lo menos durante este periodo.

ABSTRACT

Identifying the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of resveratrol, has become an opportunity to create an alternative to conventional treatments, such as chemotherapy and radiotherapy, which seek to fight cancer, but generating various side effects. Resveratrol along with the current development of release methods of active ingredients in nanoparticles, allows us to see a promising proposal of encapsulation of these principles, which would attack tumors, leaving minimal harmful effects in the body. In different scientific articles, it is possible to identify various mechanisms of release of active principles, where the size and geometry of the nanoparticles are some of the most important characteristics to be taken into consideration.

The purpose of this work is to propose an encapsulation system for resveratrol in lipid and / or polymeric nanoparticles with potential use in therapies against cancer. It is for this reason that a methodology based on 3 stages is suggested. The first two consist in the fabrication and the posterior morphological and chemical characterization of resveratrol and the polymeric and / or lipid nanoparticles. Finally, the encapsulation process of resveratrol in nanoparticles is developed.

A mechanism of resveratrol encapsulation elaborated from alginate-chitosan, with tripolyphosphate as a cross-linking agent, is proposed. To know the chemical characteristics of resveratrol, the hydrogels without resveratrol and with the polyphenol, it was necessary to use the infrared spectroscopy technique (FTIR). For the morphological analysis, scanning electron microscopy (SEM) was used. The FTIR analysis for the hydrogels, verified the alginate-chitosan interactions, as well as the interactions between the chitosan and the cross-linking agent (tripolyphosphate), guaranteeing the composition of the system. Once the resveratrol was added, it was verified by the absence of certain characteristic bands of the polyphenol, its encapsulation inside the polymeric matrix. The SEM showed granular and amorphous morphologies for resveratrol, with diameters less than 2 μ m. For the hydrogels, micro and nano sizes were detected, with particle sizes below 500 nm.

To analyze the stability of the system, the solution containing the hydrogels was observed, during one month, where no precipitate or aggregate was noticed, so it was considered stable, at least during this period.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es considerado en la actualidad, como una de las principales causas de muerte. Actualmente se utilizan diferentes tratamientos clínicos con el fin de atacar tumores en paciente que enfrentan esta patología. Entre estos procedimientos clínicos, se encuentran la quimioterapia y la radioterapia, de los cuales se han reportado efectos secundarios a mediano y largo plazo. Es por esto que se requieren desarrollar tratamientos alternativos a dichos procedimientos, con el fin de enfrentar estas dificultades y poder combatir el cáncer de manera efectiva.

El resveratrol se postula como un principio activo prometedor para combatir procesos cancerígenos, debido a que se ha demostrado, *in vitro* su capacidad antiinflamatoria y anticancerígena. Sin embargo, este polifenol presenta desventajas respecto a su biodisponibilidad, solubilidad en agua y en general su inestabilidad química, no permite potencializar las propiedades de dicha molécula. Es por esto que se hace necesario, desarrollar un sistema de encapsulamiento que permita mejorar sus propiedades de bioactividad y biodisponibilidad, una vez que el compuesto se encuentra en el organismo.

Con esta investigación se desarrolló la síntesis de hidrogeles alginato/quitosano, como sistema de encapsulación del resveratrol para una potencial aplicación en tratamientos cancerígenos. En el desarrollo del presente trabajo, se describe la metodología utilizada para la síntesis de dichos hidrogeles y la implementación del sistema de encapsulación del polifenol al interior de los mismos. Adicionalmente, se presenta un análisis de su caracterización morfológica y química.

El resultado de esta investigación está centrado en el desarrollo del sistema polimérico de encapsulación alginato/quitosano para el resveratrol, donde se obtuvieron hidrogeles de tamaño micro y nanométrico, potencializando así su biodisponibilidad al interior del cuerpo humano. Esta contribución realizada, requiere de iniciativas de investigación *in vitro* e *in vivo* que contribuyan a que, en un futuro, pueda ser llevado a un ambiente clínico.

PRELIMINARES

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.1 CONTEXTO Y CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA.

Se estima que, a nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de muerte. En el 2014, el informe mundial sobre el cáncer de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) menciona que en el 2012 se identificaron 14 millones nuevos casos y 8.2 millones de muertes causadas por el cáncer. Adicionalmente, ésta agencia prevé que, para los próximos 20 años, los casos relacionados con personas que padecen esta patología, aumentarán en, aproximadamente, un 70%. Más de la mitad de la población que es diagnosticada con cáncer a nivel mundial, se encuentra en África, Asia, América Central y Suramérica (“OMS | Cáncer,” n.d.).

En Colombia, de acuerdo a datos entregados por Globocan, en el 2012 se presentaron 196 casos de personas con cáncer en el país y 104 personas fallecieron por día debido a esta enfermedad (Ospina, Huertas, Montaña y Rivillas, 2015). En un artículo del Ministerio colombiano de Salud y Protección social publicado en 2014, se menciona que aproximadamente 8686 casos de cáncer de mama son detectados en el país, de los cuales 2649 corresponden a mujeres que fallecen cada año. Bogotá, Medellín y Cali, entre otras, son las ciudades donde se han identificado la mayor cantidad de personas con esta patología (“Cáncer de mama, una enfermedad en ascenso en Colombia,” n.d.). La realidad es que existe una tendencia al incremento del número de muertes causadas por esta enfermedad, tanto en infantes como en adultos (Ospina, Huertas, Montaña y Rivillas, 2015).

Actualmente se aplican diversos tratamientos clínicos para atacar diferentes tipos de cánceres en pacientes que presentan esta patología. Procedimientos tales como la quimioterapia y la radioterapia, producen efectos secundarios a mediano y largo plazo (“Efectos secundarios a largo plazo del tratamiento del cáncer,” 2012). Es así como en el primer tratamiento oncológico mencionado anteriormente, se utilizan medicamentos que circulan por todo el cuerpo y destruyen no sólo a células cancerosas sino a las demás células que se encuentran en el organismo; llegando a afectar principalmente a las células encargadas de la producción de sangre de la médula ósea (“Efectos secundarios de la quimioterapia,” n.d.). Identificar y evitar los efectos tardíos o a mediano plazo en el tratamiento del cáncer y desarrollar métodos alternativos a dichos procedimientos, es un tema fundamental en el cuidado de aquellos que presentan esta patología (“Efectos secundarios a largo plazo del tratamiento del cáncer,” 2012).

El campo de la nanotecnología, presenta una propuesta prometedora a la situación anteriormente planteada. Esto se debe a la capacidad multifuncional de las nanopartículas de poder transportar altas concentraciones de un principio activo con propiedades anticancerígenas, en el lugar o target específico donde está el tumor. Esto representa un aumento en la eficacia del principio activo utilizado para combatir el cáncer, al necesitarse una dosis menor del fármaco para poder disminuir el volumen del tumor.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Igualmente, al actuar en el sitio específico permite disminuir la cantidad de efectos secundarios, al no tener que circular por diferentes estructuras biológicas del cuerpo humano y así evitar causar un efecto indeseado en las mismas (“Instantánea de nanotecnología”).

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se requiere contar con sistemas para encapsular principios activos utilizados en terapias contra el cáncer, que tengan dimensiones nanométricas para que puedan emplearse en tratamientos que generen menos efectos secundarios respecto a los convencionales.

1.3 OBJETIVOS DEL PROYECTO

1.3.1 Objetivo General

Proponer un sistema de encapsulación para el resveratrol en nanopartículas lipídicas y/o poliméricas con potencial uso en terapias frente al cáncer.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar morfológica y químicamente el resveratrol
- Sintetizar y caracterizar morfológica y químicamente nanopartículas lipídicas y/o poliméricas.
- Encapsular el resveratrol en nanopartículas lipídicas y/o poliméricas.

1.4 MARCO DE REFERENCIA

1.4.1 Antecedentes

El resveratrol es un polifenol natural que presenta una gran capacidad anti-inflamatoria. Se analizó dicha actividad en un estudio *in vivo* en ratas con artritis inducida. Se co-encapsuló el polifenol en núcleos de nanocápsulas lipídicas en un adyuvante completo de Freund. Luego de haber dosificado a los animales con una cantidad determinada de esta sustancia, se pudo comprobar que las nanocápsulas no pudieron reducir efectivamente un edema que presentaban estos animales de laboratorio. No obstante, se observó que el proceso de nanoencapsulación mejoró la capacidad antiedematogénica de los polifenoles a una misma dosis. Adicionalmente, este tratamiento con resveratrol mostró unas reducciones significativas en determinados cambios histológicos que se presentan con la artritis, como pérdida de hueso. No se observaron efectos hepatotóxicos (Coradini et. al., 2015).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Se han sintetizado análogos de polifenol que pueden presentar cambios en algunas de sus propiedades dependiendo de la molécula original de la cual fueron extraídos o de los grupos funcionales fenólicos que estos tengan. Se ha podido deducir a partir de varios estudios experimentales, que existe una relación importante entre la estructura y la actividad de la molécula. Por ejemplo, existen análogos que presentan una actividad antioxidante más débil y un efecto inhibitorio menos relevante sobre determinadas moléculas (Antus et. al., 2015).

Esta capacidad antiinflamatoria del resveratrol también ha sido estudiada como una capacidad antitumoral. En 2011, *Soto y coinvestigadores* encontraron que esta sustancia inhibe la proliferación de las células cancerosas, bloquea la síntesis de material genético (ADN) y detiene la fase inducida G1 en el tumor y células inmunes. Se ha determinado también que el resveratrol inhibe el anticuerpo dependiente de células encargadas de la citotoxicidad en células tumorales. Al parecer, esta sustancia realiza su actividad antitumoral sin afectar el número de células sanguíneas, esplenocitos o la función normal de los macrófagos. Se ha demostrado que el polifenol anteriormente mencionados presenta un camino prometedor en la búsqueda de mejorar el rendimiento de los medicamentos utilizados para tratar enfermedades basadas en el estrés oxidativo (Soto et. al, 2011).

El resveratrol también ha sido combinado con otros antioxidantes naturales como la curcumina para el desarrollo de nanocápsulas lipídicas que contengan en sus núcleos dichas sustancias. Estudios han demostrado que la nanoencapsulación aumenta la estabilidad del resveratrol y la curcumina cuando se utilizan conjuntamente. Por otro lado, la encapsulación mejora la estabilidad, específicamente, del resveratrol. Este resultado encontrado por *Barjot y coinvestigadores* de la facultad federal de Rio Grande y la Universidad Federal de Santa Marí en Brasil, muestra un camino prometedor en la búsqueda de mejorar el rendimiento de los medicamentos utilizados para el tratamiento de enfermedades generadas por estrés oxidativo (Barjot et. al., 2007).

Un estudio realizado en Francia en agosto de 2007 por *Coradini y coinvestigadores*, demostró que, a partir de una serie de ensayos de proliferación en células mieloides y linfoides, el resveratrol inhibió el crecimiento de todos los tipos de células que fueron sometidas a ensayos. Un estudio más detallado demostró que el compuesto modifica el ciclo celular de las células atacadas por él. El resveratrol altera específicamente la actividad del crecimiento celular en la fase S (Coradini et. al., 2014).

En 2014, un estudio realizado por *Jose y coinvestigadores*, encontró que la vida media de la molécula de resveratrol es muy baja; menor a 0,25 horas. Es por esto que se analizó la capacidad de las nanopartículas sólidas lipídicas a base de behenato de glicerilo para mejorar la estabilidad de la molécula. Resultados de diferentes pruebas realizadas, mostraron que las moléculas sólidas presentaron una estructura en la fase cristalina desordenada. Los resultados del estudio mostraron un aumento significativo en la concentración del resveratrol con las nanopartículas, respecto a la que se encuentra normalmente si esta sustancia permaneciese libre en el organismo (Jose et. al., 2014).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Como la bioestabilidad es trascendental para el correcto funcionamiento de este antioxidante en el cuerpo humano. En el 2011, *Kim y coinvestigadores* desarrollaron nanopartículas de trans-resveratrol (t-RTV) a través de la utilización de un antiodisolvante por medio de un proceso con temperatura controlada. Como estabilizante se usó la hidroxipropil metilcelulosa. El tamaño promedio de la partícula se redujo, gracias a la disminución de la temperatura cuando ocurre precipitación. Se demostró que este proceso mejoró la biodisponibilidad de la molécula de t-RTV (Kim, Dong, Das & Tan, 2012).

Sin embargo, según *Singh y coinvestigadores*, a pesar de haberse identificado algunos de los efectos que tiene el resveratrol en el tratamiento de tumores, su aplicación en el ámbito clínico aún está lejos de la realidad. Los investigadores mencionan que no se han realizado los esfuerzos suficientes para poder llevar estos beneficios del laboratorio a las clínicas. Los autores de este estudio mencionan que aún se requieren de más estudios para poder garantizar la biodisponibilidad *in vivo* de la sustancia (Singh, Ndiaye & Ahmad, 2015).

A pesar de esto, como se ha comentado anteriormente, la utilización de nanopartículas para transportar el antioxidante, proyecta convertirse en una solución prometedora a esta situación. Otro de los desafíos que existen en cuanto a la implementación de un tratamiento clínico con resveratrol es, según *Novelle y coinvestigadores*, la falta de evidencia de una defensa contra trastornos metabólicos y otras patologías. Según este estudio existen mecanismos biológicos que pudieran afectar el resultado de la investigación clínica, como consecuencia de efectos colaterales, generados por la administración de esta sustancia en el organismo (Novelle, Wahl, Diéguez, Bernier & De Cabo, 2015).

Algo que también debe de analizarse, según *Park & Pazzuto*, es el efecto que podría presentar la combinación entre el antioxidante y otros fármacos o compuestos, en el organismo. Estos autores mencionan que, si bien ya existen muchas publicaciones sobre propiedades benéficas que tiene el resveratrol, no se ha analizado a profundidad, este tema farmacéutico (Park & Pezzuto, 2015)

1.4.2 Marco teórico

1.4.2.1 Cáncer

Con este nombre se relaciona a una serie de enfermedades en donde algunas de las células del cuerpo se empiezan a reproducir sin control y se esparcen a los tejidos circundantes. Esta situación puede darse prácticamente en cualquier parte del organismo. Cuando el proceso de división celular es normal, las células que mueren son reemplazadas por nuevas células. Sin embargo, cuando hablamos de cáncer, es porque el proceso mencionado anteriormente, no ocurre así (“¿Qué es el cáncer?”). Cuando las células se empiezan a envejecer o presentan defectos, no se mueren para ser reemplazadas y otras células se crean sin necesitarse. Son precisamente estas nuevas células las que se reproducen descontroladamente y pueden formar tumores (“¿Qué es el cáncer?”). El cáncer es una enfermedad causada por alteraciones en genes encargados

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

de realizar procesos de control de división y crecimiento celular. Estas mutaciones pueden haber sido heredadas por padre o madre. Sin embargo, pueden generarse por el ambiente al cual fue expuesto una persona determinada. Algunas de las condiciones ambientales que pueden favorecer el surgimiento del cáncer son: los rayos UV del sol y sustancias como la radiación o el humo del cigarrillo (“¿Qué es el cáncer?”).

○ **Tratamientos frente al cáncer:**

En la actualidad existen diversos tratamientos para combatir el cáncer que se emplean de acuerdo al tipo de tumor y a su grado de crecimiento.

⇒ **Cirugía**

Procedimiento realizado por un doctor capacitado como cirujano, encargado de extirpar un tumor del cuerpo de un determinado paciente (“Tipos de tratamiento”).

⇒ **Radioterapia**

Tratamiento por medio del cual se le aplica a un paciente altas dosis de radiación para eliminar células cancerosas y disminuir el tamaño de tumores (“Tipos de tratamiento”).

⇒ **Quimioterapia:**

Tratamiento que utiliza medicamentos para eliminar las células causantes de cáncer (“Tipos de tratamiento”).

⇒ **Inmunoterapia**

Procedimiento que contribuye a que el sistema inmunitario de los pacientes combata el cáncer de una forma más efectiva (“Tipos de tratamiento”).

⇒ **Terapia Dirigida**

Tratamiento que actúa directamente sobre las alteraciones que provocan que las células cancerosas crezcan, se dividan y se distribuyan a otros tejidos del cuerpo de los pacientes (“Tipos de tratamiento”).

⇒ **Terapia Hormonal**

Tratamiento que provoca que el cáncer dependiente de hormonas para su desarrollo, se expanda más lentamente o se detenga por completo (“Tipos de tratamiento”).

⇒ **Trasplantes de Células Madre**

Cuando se aplican procedimientos para combatir el cáncer a dosis elevadas, tales como la quimioterapia o la radioterapia, las células madre se ven afectadas. Es por eso que este tratamiento busca la restauración de dichas células, encargadas principalmente, de la producción de sangre (“Tipos de tratamiento”).

1.4.2.2 Resveratrol

El resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) pertenece a la familia de compuestos polifenólicos, denominados estilbenos. Diversas investigaciones han arrojado que el resveratrol y otros estilbenos son producidos por determinadas plantas, cuando estas se encuentran ante situaciones de estrés, lesión, infección micótica o radiación en el espectro ultravioleta. Este compuesto es soluble en soluciones lipídicas, y presenta dos tipos de configuraciones diferentes, la cis y la trans (figura 1). Estas configuraciones también pueden encontrarse unidas a una molécula de glucosa, denominándoseles glucósidos. Existen diferentes derivados del resveratrol, siendo el resveratrol-3-O- β -glucósido, también llamado piceido, uno de los más importantes (Figura 1) (Oregon State University, 2015).

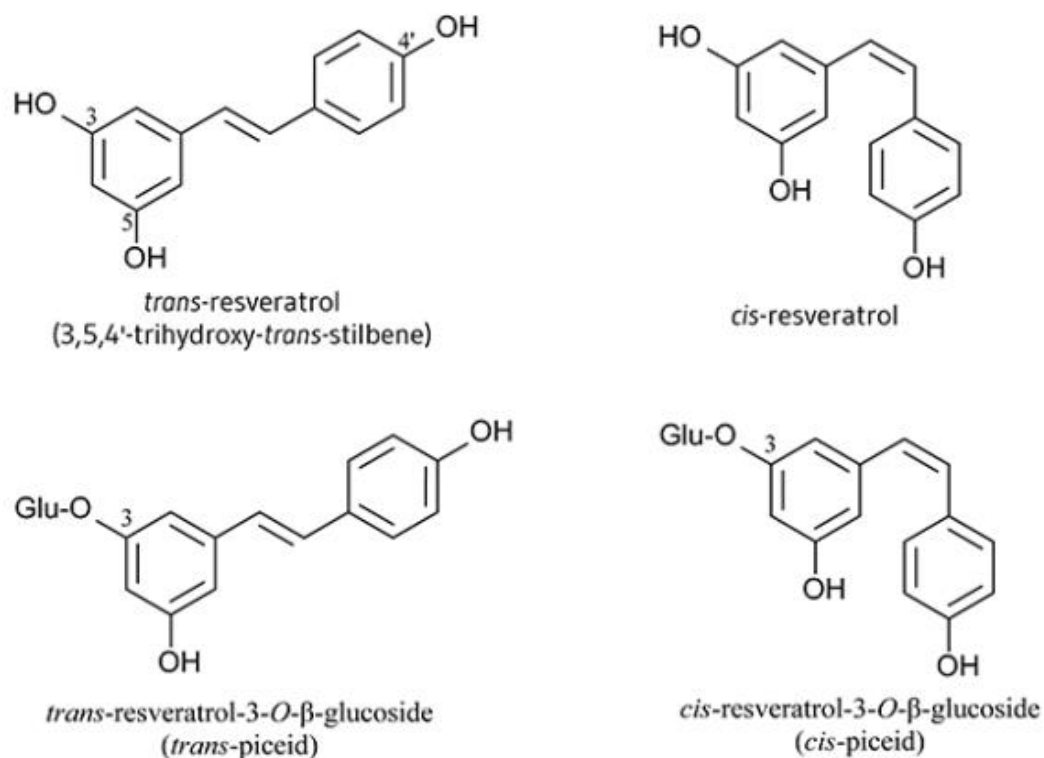


Figura 1. Estructuras químicas del resveratrol y resveratrol glucósido (piceido) (Oregon State University, 2015).

El resveratrol es un compuesto antimicrobiano presente en las uvas y otros productos, que según *Jang y coinvestigadores*, ha demostrado tener actividad anticancerígena importante en tres etapas de su desarrollo. Estos investigadores encontraron que el resveratrol es un compuesto que sirve como antioxidante, evita la mutación genética y permite inducir enzimas de fase II encargadas de metabolizar fármacos. Adicionalmente, se ha encontrado como éste compuesto interviene en procesos antiinflamatorios, inhibe la actividad de la ciclooxigenasa y de la hidroxidasa (Jang et al., 1997).

1.4.2.3 Encapsulación del resveratrol:

El resveratrol presenta desventajas respecto a su limitada biodisponibilidad, poca solubilidad en agua y fácil desestabilización, restringiendo su uso en farmacología y en el campo de la medicina en general. Es por esto que existe la necesidad de encapsular el resveratrol para combatir con los problemas anteriormente mencionados. *Karthikeyana y coinvestigadores*, publicaron un artículo científico donde utilizaron nanopartículas de gelatina para encapsular el componente y estudiaron su eficacia combatiendo células cancerosas presentes en el pulmón. Estos investigadores identificaron que las partículas

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

tenían forma esférica y un diámetro aproximado de 294 nm (Karthikeyan, Rajendra Prasad, Ganamani, & Balamurugan, 2013).

1.4.2.3.1 Formas farmacéuticas de liberación modificada

Las formas farmacéuticas de liberación modificada (FLM) son aquellos procedimientos en los que es posible controlar tanto la velocidad como el sitio de liberación del principio activo. Se han identificado dos tipos: liberación retardada y liberación controlada (Sacyl, 2004).

- **Liberación retardada**

En este caso la administración y la liberación del principio activo, no ocurren de manera simultánea, sin embargo, esto no provoca que el efecto terapéutico se prolongue (no hay alteraciones en ningún otro principio terapéutico) (Sacyl, 2004).

Estas son formas farmacéuticas que se alteran fácilmente en presencia de cambios de pH o pueden presentar una cubierta entérica que permite su tránsito por el estómago para luego liberar al principio activo en el intestino delgado (Sacyl, 2004).

- **Liberación controlada**

Este sistema, así como su nombre lo indica, controla la concentración por largo tiempo, del fármaco dentro de niveles que se encuentran en la ventana terapéutica y con dosificaciones bajas (Xia & Pack, 2014).

Detallando un poco más este sistema, se puede decir que lo que se busca, esencialmente, es extender en el tiempo el efecto terapéutico del principio activo a través su liberación lenta y gradual. Una de las características más relevantes que presenta esta forma de liberación controlada es que la velocidad de liberación del principio es constante y no depende de la concentración. Los métodos usados comúnmente en farmacología para liberación de medicamentos siguen un principio diferente donde la concentración de los mismos afecta la velocidad de liberación del principio (Fuentes G, Isaza M, Isaza M, & Marulanda M, 2014).

1.4.2.3.2 Polímeros utilizados en sistemas de liberación controlada

Según *Park, coinvestigadores y Uhrich y coinvestigadores*, los poliésteres, polianhídridos, poli-orto-ésteres, polifosfacenos y poliamidas, son tipos de polímeros naturales que han sido ampliamente utilizados para microencapsulación de fármacos. (Park et al., 2005; Liu, Jiang, Jiang, & Uhrich, 1999).

Los poliésteres han sido ampliamente estudiados y actualmente, existe una amplia documentación al respecto. Dentro de este grupo, el más empleado en diversas aplicaciones es el PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico), ya que la frecuencia con la cual se

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

desintegra al interior del organismo y sus propiedades mecánicas, pueden ser configuradas de acuerdo a la cantidad de ácido láctico y ácido glicólico que éste tenga. También son comúnmente usados los poliésteres: PLA (ácido láctico), PGA (ácido glicólico), PCL (poliprolactona) y sus copolímeros (Park et al., 2005).

1.4.2.4 Nanopartículas poliméricas

Actualmente, los polímeros son utilizados en una gran variedad de aplicaciones como, por ejemplo, servir como biomateriales. Esto es posible debido a propiedades tales como su biocompatibilidad, su fácil síntesis y diseño, su amplia gama de estructuras químicas y su importante carácter biomimético. Específicamente en el campo farmacológico, los polímeros cumplen un rol muy importante, ya que permiten suministrar medicamentos directamente en el lugar donde tienen que cumplir con su función, permitiendo una efectividad mayor (Bennet & Kim, 2014).

Las partículas a base de polímeros pueden ser esféricas o en forma de cápsulas. La gran mayoría de nanopartículas poliméricas con tensioactivos, le ofrecen a los medicamentos, una mayor estabilidad química. A parte de esta interesante propiedad, se han descubierto numeras aplicaciones de las micro y nanopartículas poliméricas, como su capacidad de llegar, directamente, a su sitio de acción y mejorar la biodisponibilidad de fármacos hidrofóbicos al interior del organismo.

Adicionalmente, se ha identificado como éstas nanopartículas, mantienen las características biológicas de las proteínas y péptidos presentes en el medicamento.(Bennet & Kim, 2014).

1.4.2.4.1 Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas

Los métodos nombrados a continuación se realizan a partir de polímeros preformados.

- **Emulsión evaporación de disolvente**

Este método consiste en la formación de dos fases inmiscibles, una fase dispersa con el principio activo y la otra con el polímero para elaborar la matriz, a partir de la formación de una emulsión. Se requiere de una fuente de energía, como una sonda de ultrasonido, para la obtención de gotas pequeñas en la fase dispersa. Cuando se obtiene la emulsión, el solvente orgánico, que debe ser lo suficientemente volátil, es evaporado. Las nanoesferas se forman a partir de la precipitación del polímero y de la encapsulación que ocurre entre éste y el fármaco (Gómez-Gaete, 2014).

- **Nanoprecipitación por inyección**

Para la nanoprecipitación por inyección se requiere la utilización de dos solventes miscibles. La principal característica de este método es la difusión atómica entre ambos solventes al estar en contacto. En el primero (orgánico), el fármaco y el polímero deben

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

ser disueltos, mientras que el segundo debe ser seleccionado de acuerdo a su capacidad de mezclarse con el primero. Este último debe no ser un solvente para el polímero. Generalmente consiste en una solución acuosa que contribuye a la estabilización de las partículas sintetizadas.

1.4.2.5 Nanopartículas lipídicas

Müller y coinvestigadores afirman que las nanopartículas lipídicas sólidas, representan un mecanismo alternativo a los transportes coloidales tradicionales, tales como emulsiones, liposomas, micro y nanopartículas poliméricas. Estas partículas son utilizadas al igual que las poliméricas en el transporte de fármacos para que éstos actúen en un sitio específico del organismo (Müller, Mäder, & Gohla, 2000).

Uno de los requerimientos para analizar la idoneidad de un sistema de transporte de medicamentos es su capacidad de carga. Las características que brindan una mayor o menor capacidad de carga a las partículas son: la solubilidad del fármaco en el lípido cuando éste se encuentra fundido, capacidad de fusión entre el medicamento y el lípido fundidos, la estructura química y física de la matriz de la nanopartícula y la capacidad que tienen las partículas de formar diferentes estructuras cristalinas (Müller et al., 2000).

1.4.2.5.1 Mecanismos de preparación de nanopartículas lipídicas

- **Método de homogenización a alta presión**

Este método puede realizarse bajo condiciones ambientales de alta temperatura o a temperatura ambiente (Garzón, Hernández, Vásquez, Villafuerte, & García, 2008).

Según *Garzón y coinvestigadores*, se requieren grandes cantidades energía para que se generen nanopartículas con un índice relativamente bajo de polidispersión (IP), por medio de la generación de turbulencias, cavitaciones en el material oleoso y fuertes fuerzas de corte. La obtención de un mayor número de partículas se ve favorecido por aumento de variables como: la temperatura, la presión y el número de ciclos de homogenización (Garzón, Hernández, Vásquez, Villafuerte, & García, 2008). Estos ciclos pueden ocurrir en caliente o en frío. Se ha identificado que cuando este procedimiento ocurre en caliente, una importante cantidad de nanopartículas obtiene un tamaño de 500nm con una baja cantidad de micropartículas. Sin embargo, este proceso trae desventajas como favorecer la destrucción de los activos y favorecer cambios conformacionales en las proteínas (Garzón, Hernández, Vásquez, Villafuerte, & García, 2008).

- **Método de emulsificación- evaporación**

Un factor muy importante en este método de preparación de las partículas lipídicas es el establecimiento del equilibrio termodinámico en ambas fases. Esto se realiza a partir de la

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

saturación del disolvente con el agua y viceversa. En la fase de emulsificación- evaporación, los constituyentes del lípido y del fármaco, se disuelven en un disolvente inmiscible en agua, como el cloroformo (Garzón, Hernández, Vásquez, Villafuerte, & García, 2008). Para trabajar con este, se debe realizar un proceso de saturación previo, para que luego pueda ser emulsificado a altas temperaturas con disolución de tensioactivo en agua saturada. Posteriormente, la evaporación del disolvente se realiza a baja presión. Este proceso genera una separación de fases, donde el lípido se precipita y las nanopartículas lipídicas con un tamaño aproximado de 100 nm y poca dispersión, quedan suspendidas (Garzón, Hernández, Vásquez, Villafuerte, & García, 2008).

- **Método de microemulsificación**

Las nanopartículas lipídicas preparadas a partir de este método son termodinámicamente estables e isotrópicas. El tamaño de las partículas es controlado durante el proceso de emulsificación. Para este procedimiento no se requieren equipos especializados. Luego de la emulsificación, las nanopartículas que se sintetizan adquieren una gran concentración de tensioactivos y cotensioactivos. La concentración de éstos componentes determina el tamaño de las partículas (Garzón, Hernández, Vásquez, Villafuerte, & García, 2008).

La microemulsificación es posible gracias a la cristalización de gotas del lípido al interior de un medio acuoso. Para optimizar este proceso se requiere de experimentaciones de solubilidad del medicamento en los lípidos y solubilizantes (Garzón, Hernández, Vásquez, Villafuerte, & García, 2008).

1.4.2.6 Alginato

1.4.2.6.1 Generalidades sobre el alginato

El alginato es un polímero aniónico que puede ser extraído de algas pardas, el cual ha sido extensamente investigado y utilizado en diversas aplicaciones biomédicas. Esto es debido a sus propiedades de biocompatibilidad, baja toxicidad y asequibilidad en el mercado. Como también, por presentar la característica química de poder generar un proceso de gelación suave, gracias a la interacción de cationes divalentes como Ca^{2+} . Los hidrogeles elaborados a partir de alginato, pueden ser obtenidos a través de diferentes técnicas de entrecruzamiento de tipo iónico, covalente, térmico y celular.

La morfología que presenta este polímero es similar a matrices extracelulares pertenecientes a tejidos vivos, convirtiendo al alginato en un potencial cicatrizante de heridas, administrador de fármacos y proteínas pequeñas, destacándose de igual forma, su papel en el trasplante de células (Lee & Mooney, 2012).

Los fármacos que pueden ser liberados de forma controlada, a partir de geles de alginato, van desde pequeñas moléculas de medicamentos hasta proteínas macromoleculares. Esta liberación depende del tipo de entrecruzante y del mecanismo de entrecruzamiento que se esté empleando (Lee & Mooney, 2012).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

En cuanto a la administración de los geles de alginato, diferentes investigaciones lo han realizado por vía oral o inyectados en el cuerpo, de forma poco invasiva, abriendo la puerta para un sinnúmero de aplicaciones en el área farmacéutica. Respecto a ingeniería de tejidos, estos geles también han desempeñado un papel relevante. De forma general, podríamos decir, que la ingeniería de tejidos tiene como objetivo, reemplazar órganos o tejidos que han sufrido fallas o se encuentran ausentes en determinados pacientes. En esta área, los hidrogeles se utilizan para transportar células al lugar deseado, generando un espacio adecuado para la renovación del tejido, controlando su estructura y función del mismo (Lee & Mooney, 2012).

Sistemas de nanopartículas de alginato incluyen: Nanoagregados, nanocápsulas y nanoesferas con rangos que varían desde 10 a 1000nm. Este tipo de partículas pueden contener desde enzimas hasta fármacos y otros compuestos, al momento de disolverlos, atraparlos o enlazarlos a la matriz de la molécula. Dependiendo del método utilizado para obtener las nanopartículas, se pueden obtener los diferentes sistemas mencionados anteriormente. Dos de los principales métodos utilizados incluyen la complexación y la emulsificación de alginato en aceite. El primero está relacionado con la formación de complejos, en un ambiente de solución acuosa donde pueden formarse nanoagregados de alginato. Esto ocurre gracias a la adición de un entrecruzante, como el calcio (que puede ser obtenido a partir de cloruro de calcio). Este procedimiento también puede generarse a partir de la adición de un polielectrolito con carga opuesta, como el quitosano. A partir del método de emulsificación en aceite, junto con mecanismos de gelificación, se pueden formar nanoesferas de alginato (Paques, Linden, Rijn, & Sagis, 2014).

1.4.2.6.2 Estructura química del alginato

El alginato es un polímero lineal, compuesto por bloques de ácido (1→4)-α-gulurónico (GG) (Figura 2a), ácido (1→4)-β-D-manurónico (MM) (Figura 2b) y, además, por secuencias heteropoliméricas de bloques M y G (denominados como bloques MG) (Figura 2c) (Rinaudo, 2014).

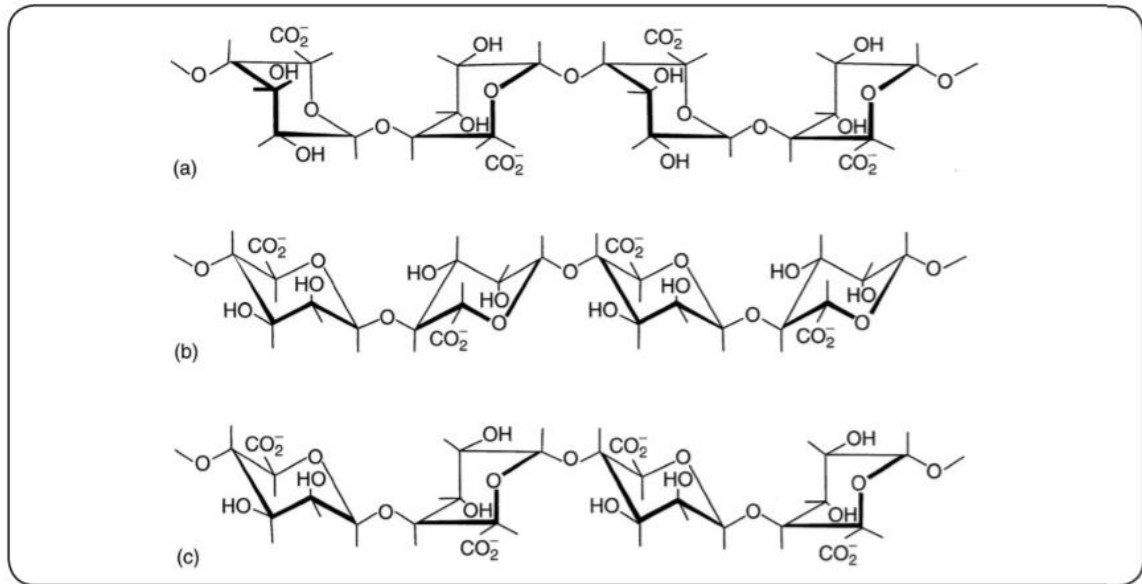


Figura 2. Estructuras químicas de los bloques de ácidos urónicos relacionados con la composición del alginato (Rinaudo, 2014).

Las propiedades biológicas y químicas que presenta el alginato en medios acuosos, no depende únicamente de la relación existente entre los bloques M/G, sino también de la distribución que estas estructuras presentan a lo largo de la cadena. El alginato purificado tiene una amplia gama de aplicaciones industriales debido a la capacidad que presenta para formar hidrogeles, fibras o láminas, cuando se encuentra en contacto con el calcio, gracias a la presencia de regiones abundantes en bloques GG, siguiendo el modelo de caja de huevos. Sin embargo, es importante aclarar que los bloques MM y MG también interactúan con los contraiones de calcio (Rinaudo, 2014).

Una representación del proceso de formación geles, debido a la fijación de calcio, se presenta en la figura 3.

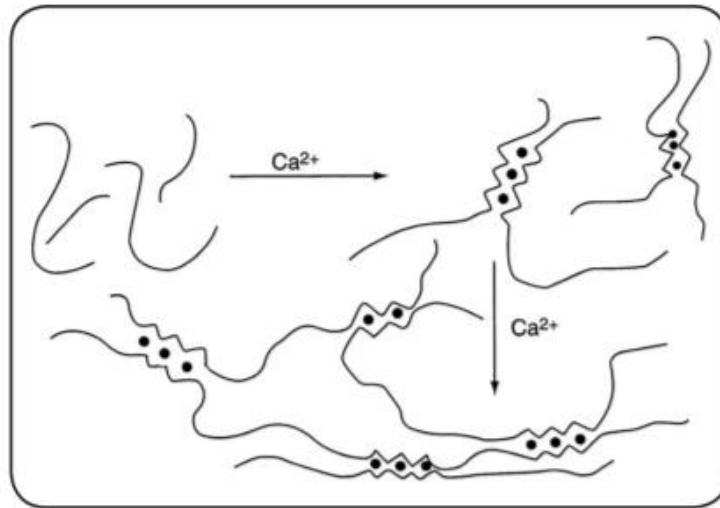


Figura 3. Representación del entrecruzamiento del alginato cuando se encuentra en presencia de contraiones de calcio (Rinaudo, 2014).

1.4.2.7 Quitosano

1.4.2.7.1 Generalidades sobre el quitosano

El quitosano es un polisacárido que se extrae mediante un proceso de desacetilación de la quitina, siendo esta, el mayor componente del exoesqueleto de los crustáceos. El interés en el uso del quitosano para nuevas aplicaciones biomédicas, no sólo reside en el hecho de que sea un polisacárido natural, sino en sus propiedades de no-toxicidad y biodegradabilidad. En la literatura, existen reportes en los que se menciona que la quitina y el quitosano, han sido encontrados en paredes celulares de fungi (Li, Dunn, Grandmaison, & Goosen, 1992).

Una de las propiedades más importantes del quitosano, está relacionada con el proceso de quelación. Este mecanismo se basa en la afinidad que presenta el polímero hacia una serie de cationes metálicos, debido a la estructura del quitosano, que presenta una serie de grupos amino e hidroxilo. Los cationes metálicos pueden ser absorbidos por quelación debido al doblete de electrones libres de nitrógeno de los grupos amino; los grupos hidroxilo (especialmente en la posición C-3) también pueden contribuir a este proceso. Además de esta interacción entre iones metálicos a nivel molecular, se ha reportado que la adición de estos iones, puede modificar la estructura del hidrogel de quitosano elaborado *in situ*. La influencia de este mecanismo se detecta en la detección de una morfología más sofisticada, respecto al quitosano puro. A pesar de esto, se necesita una mayor investigación en la influencia del proceso de quelación y el mecanismo que este realiza en el cambio morfológico del polímero (Qin, 1993).

Adicionalmente, este polisacárido puede unirse a determinados materiales, de forma selectiva, como por ejemplo al colesterol, grasas, proteínas y células de tumor. Este proceso de quelación, ha sido utilizado en diferentes áreas, como en el cuidado médico,

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

mejoramiento de la calidad del agua y en la industria farmacéutica. El quitosano ha sido reportado como un biomaterial que ha demostrado tener afinidad con proteínas tales como, la aglutinina de germen de trigo y la tripsina. Otras características que ha sido documentada sobre este polímero es la capacidad que posee para inhibir células tumorales, acelerar el proceso de cicatrización de heridas y estimular el proceso inmune (Li, Dunn, Grandmaison, & Goosen, 1992).

Adicionalmente, el quitosano tiene la propiedad de formar membranas, debido a su naturaleza como polímero catiónico. En 1984 se publicó el primer procedimiento acerca de la utilización de este biomaterial para encapsulación celular. De la misma forma se han reportado partículas alginato/quitosano con núcleo de alginato líquido. A partir de estas publicaciones, se han generado otras relacionadas con la inmovilización de células de plantas y de hibridada, a partir de la utilización de copolímeros del quitosano (Li, Dunn, Grandmaison, & Goosen, 1992).

Por otro lado, la elaboración de nanopartículas de quitosano se reporta desde 1994, donde Ohya y colaboradores, desarrollaron un sistema de transporte de un fármaco anticancerígeno, 5-fluorouracilo. Estas partículas fueron obtenidas a partir de un proceso de emulsificación y entrecruzamiento. Desde ese entonces, este tipo de sistemas ha sido extensamente estudiado como transportador de medicamentos. Se han reportado diferentes métodos de elaboración de las nanopartículas, donde se incluye mecanismos tales como gelificación iónica y entrecruzamiento con un polielectrolito. Es importante tener en cuenta, que diferentes autores han mencionado que en un sistema de partículas polidesperso, las nanopartículas más grandes pueden tener la capacidad de transportar mayor cantidad de fármaco; mientras que nanopartículas más pequeñas pueden presentar una mayor eficacia, a la hora de entregar el medicamento a tejidos o células del organismo. Lo que pudiera comprometer la eficacia terapéutica del sistema desarrollado (Grenha, 2012).

1.4.2.7.2 Estructura química del quitosano

El quitosano es un polímero lineal de la forma $\alpha(1\rightarrow4)$ -unido 2-amino-2-desoxy- β -D-glucopiranososa (figura 4), siendo fácilmente obtenido por un proceso de desacetilación. Este biomaterial es un copolímero de la N-acetilglucosamina y la glucosamina.

El proceso de desacetilación de la quitina que genera la estructura del quitosano, genera un porcentaje residual de grupos amino de aproximadamente 10 a 30%. Este polisacárido presenta una estructura que posibilita la formación de películas; viéndose este proceso afectado por diferentes parámetros como el peso molecular y el grado de desacetilación (Dutta, Dutta, & Tripathi, 2004).

El proceso de desacetilación de la quitina que genera la estructura del quitosano, genera residuos de grupos amino de aproximadamente 10 a 30%, respecto a los encontrados en la primer forma mencionada del polímero. Este polisacárido presenta una estructura que posibilita la formación de películas; viéndose este proceso afectado por diferentes

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

parámetros como el peso molecular y el grado de desacetilación. (Dutta, Dutta, & Tripathi, 2004).

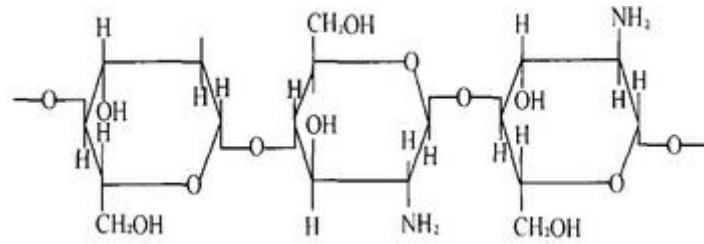


Figura 4. Estructura química del quitosano (Chemical Book, 2017).

1.4.2.8 Interacción química entre el alginato y quitosano

Al mezclar los polímeros, alginato y quitosano, se ha documentado la formación espontánea de un complejo polielectrolítico. Esto se genera, gracias a un proceso de entrecruzamiento iónico, el cual no solo disminuye la tendencia al hinchamiento, sino también contribuye a mejorar propiedades tales como, la resistencia estructural y la estabilidad térmica y mecánica.

Químicamente, el complejo iónico formado gracias a la interacción alginato/quitosano, ocurre debido a la interacción del grupo aniónico ($-\text{COO}^-$) del alginato de sodio y el grupo catiónico protonado ($-\text{NH}_3^+$) del quitosano (Figura 5) (Smitha, Sridhar, & Khan, 2005).

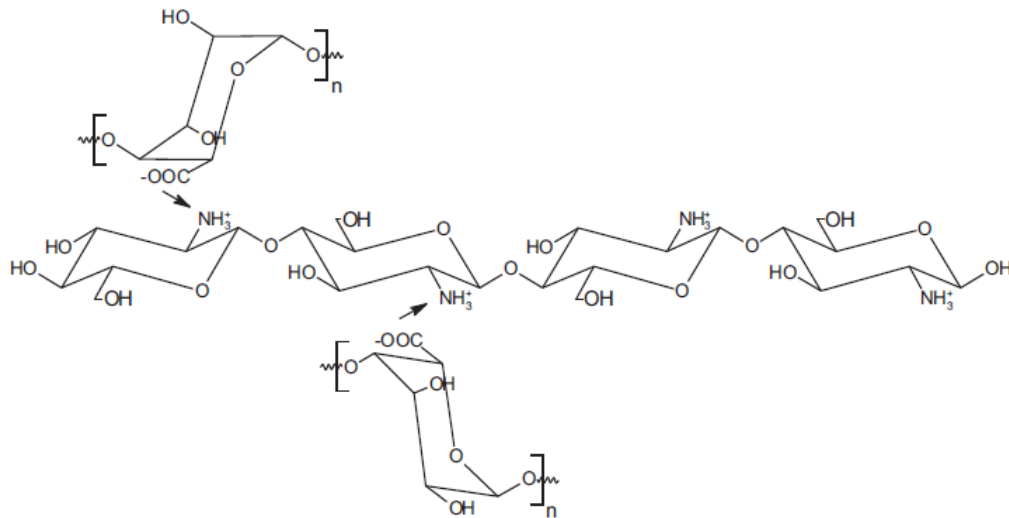


Figura 5. Representación de la interacción química entre el quitosano y el alginato (Nnamonu, Ato, & Onyido, 2012).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

1.4.2.9 Tripolifosfato de sodio

El tripolifosfato de sodio o TPPS es obtenido a partir de un proceso de neutralización del ácido fosfático con carbonato de sodio (figura 6). Este compuesto inorgánico ha sido utilizado en una gran variedad de aplicaciones industriales, como por ejemplo en la fabricación de productos de limpieza, alimentos, comida para animales o procesos industriales de limpieza (Gurses, Erkey, Kizilel, & Uzun, 2018).

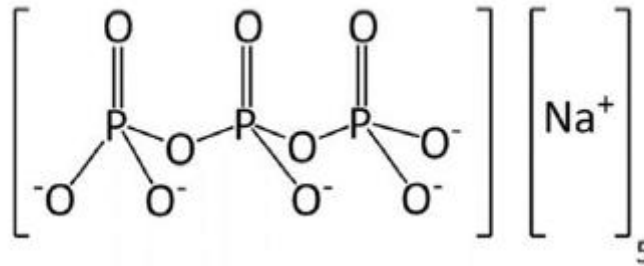


Figura 6. Representación esquemática del tripolifosfato pentasódico (Gurses, Erkey, Kizilel, & Uzun, 2018).

El quitosano junto con el tripolifosfato permiten la formación de microesferas biocompatibles entrecruzadas, a partir de interacciones electroestáticas, las cuales presentan una potencial aplicación en la entrega de compuestos farmacológicos. Las propiedades tales como la densidad, cristalinidad e hidrofobicidad del entrecruzamiento con el quitosano, permiten modular la liberación de fármacos; permitiendo su aplicación a otros campos relacionados con sistemas de liberación (Bhumkar & Pokharkar, 2006).

1.4.2.10 Interacción química entre el tripolifosfato y el quitosano

Como se mencionaba en los apartados anteriores, el quitosano es policatiónico en medios ácidos (pK_a 6.5) y puede interactuar con especies cargadas negativamente como el tripolifosfato. Este mecanismo ha sido utilizado para la elaboración de nanopartículas de quitosano entrecruzado (Liu, Bai, & Nan, 2004).

El tripolifosfato de sodio, una vez se disuelve en agua, se disocia, exponiendo iones hidroxilo e iones fosfóricos. Como el entrecruzamiento del quitosano, depende de los sitios catiónicos y de las especies cargadas negativamente, se espera que el pH que presenta el tripolifosfato desempeñe un papel importante en el tipo y la extensión del proceso de entrecruzamiento. Se ha demostrado que cuando se presenta un pH de 3, sólo pueden presentarse iones fosfóricos (P₃O₅⁻), quienes interactuarían con los grupos amino protonados del quitosano (-NH₃⁺). Mientras que con un pH de 9, tanto los grupos OH como los iones fosfóricos (P₃O₅⁻), pueden estar presentes y competir por la unión a los grupos amino (-NH₃⁺) del quitosano (Liu, Bai, & Nan, 2004). Estas interacciones se ilustran en la figura 7.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

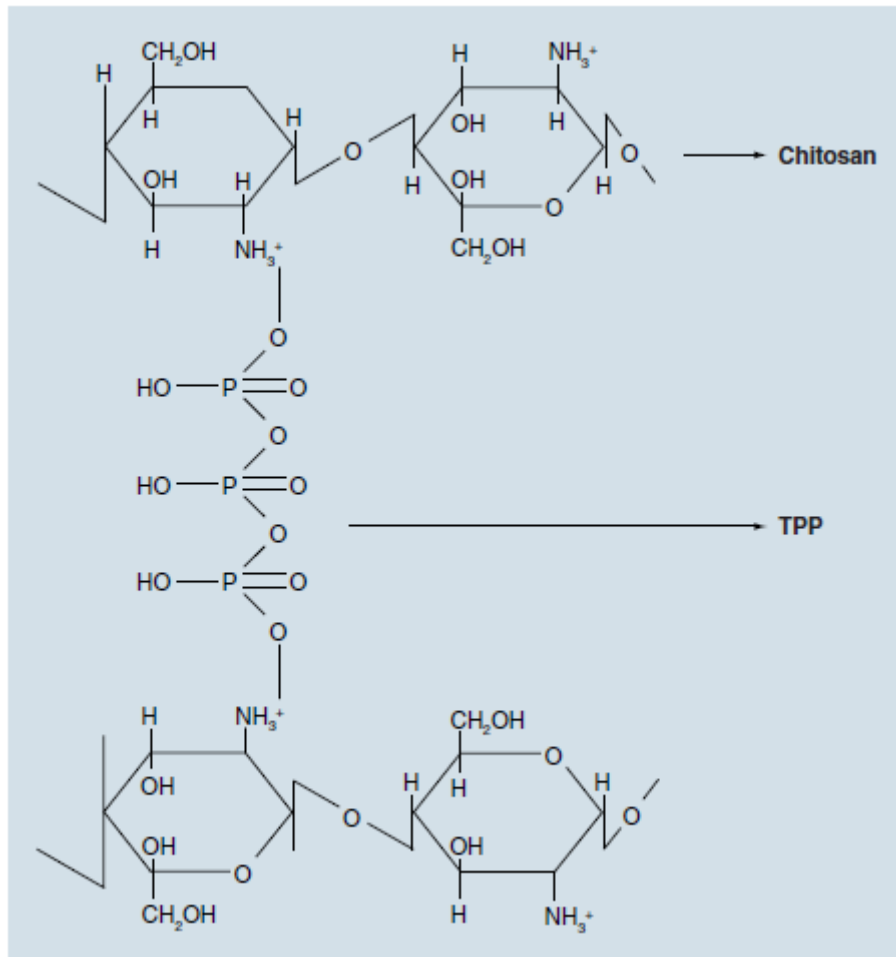


Figura 7. Representación de la interacción química entre el quitosano y el tripolifosfato (Vandana & Sahoo, 2009).

1.4.2.11 Técnicas de caracterización utilizadas

1.4.2.11.1 Caracterización química

1.4.2.11.1.1 Espectroscopia Infrarroja (FTIR)

La espectroscopia de absorción infrarroja (IR) es un mecanismo empleado para identificar la estructura de moléculas que presenten características de absorción de la radiación infrarroja, de acuerdo a su vibración molecular característica. En términos generales, podemos mencionar que la región de absorción infrarroja, se define desde 12.800 a 10 cm^{-1} y puede dividirse en diferentes segmentos o regiones tales como el IR cercano (NIR),

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

que va desde 12.800 a 4000 cm^{-1} , el IR medio, desde 4.000 a 400 cm^{-1} y el IR lejano o FAR-IR, que se presenta desde 50 a 400 cm^{-1} . El espectro vibracional de una molécula en particular, se define como una propiedad física única y por ende característica de la misma. Es así como a partir de la información que nos brinde un espectro IR, se puede identificar muestras desconocidas, sirviendo como “huella dactilar”, a través de comparación con espectros de referencia o reportados en la literatura.

El uso de esta técnica de espectroscopia ha sido documentada en campos como la síntesis orgánica, ciencia de polímeros, industria farmacéutica y estimación de contaminantes atmosféricos que provengan de procesos industriales.

En las gráficas relacionadas con el espectro infrarrojo de las diferentes moléculas, el eje x está relacionado con la extensión en la frecuencia, comúnmente denominado como número de onda (cm^{-1}). Mientras que el eje y, está relacionado con cantidad de energía IR que es absorbida, representándose generalmente en la gráfica a través del porcentaje de transmitancia (%T) (Mayo, Miller, & Hannah, 2004). Absorbancia y transmitancia se relacionan a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} = -\log(\text{transmitancia})$$

Ecuación 1. Relación entre la absorbancia y la transmitancia

1.4.2.11.2 Caracterización morfológica

1.4.2.11.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Un instrumento convencional de SEM, presenta una columna de electrones, una cámara de muestras, un detector EDS, una consola electrónica y monitores que permiten visualizar los resultados obtenidos. El principio general de funcionamiento del SEM, consiste en un haz de electrones de alta energía que es direccionado a muestras sólidas, generando una serie de señales en la superficie de los mismos. Estas señales producidas a partir de interacciones electrón-muestra, brindan información relacionada con la textura de la muestra (morfología externa), la composición química, estructura cristalina y orientación de los materiales que hacen parte de la muestra. En muchas aplicaciones, el análisis se centra en un área específica a partir de la cual se obtienen datos, generándose con estos una imagen bidimensional, donde se pueden observar variaciones importantes relacionadas con las propiedades de la muestra. Utilizando técnicas de escaneo convencional se pueden generar imágenes en modo escaneo a partir de áreas que pueden comprender un rango desde, 1cm, aproximadamente, hasta un área de 5 micrómetros de ancho (esto está relacionado con el rango de aumento desde 20X, hasta aproximadamente, 30000X, con una resolución especial desde 50 a 100nm) (Swapp, 2017).

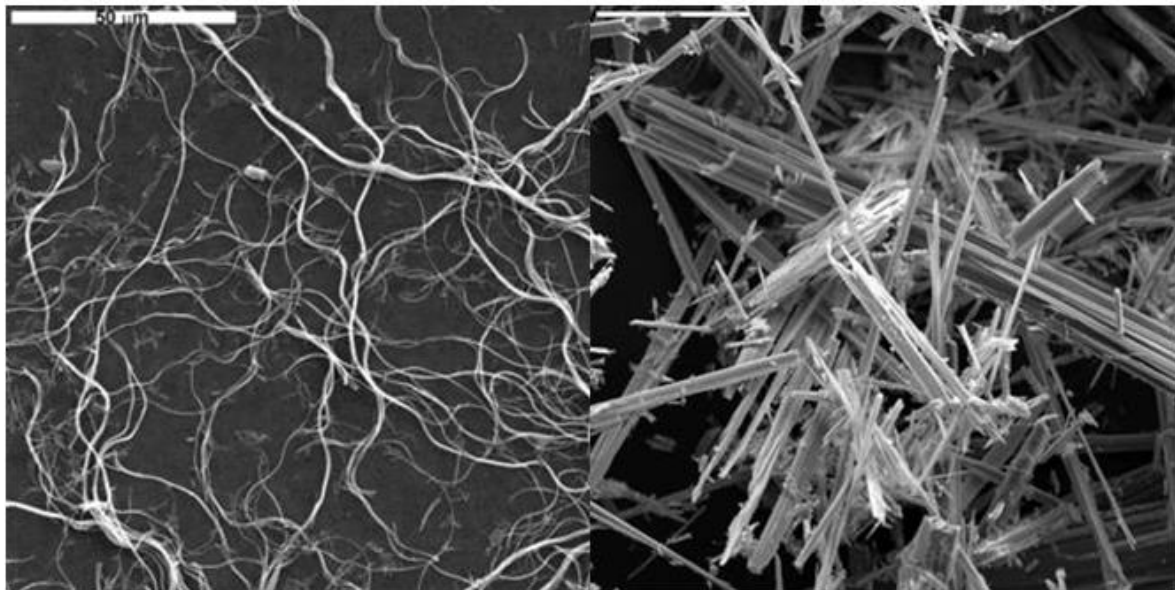
Por medio de esta técnica, también es posible analizar puntos específicos presentes en la muestra, con el objetivo de analizar la composición química, esto relacionado con el análisis cualitativo o semicuantitativo (usando EDS), la estructura cristalina y la orientación del cristal (utilizando EBSD).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Entre las ventajas que posee esta técnica se encuentra la relativamente fácil operatividad de la mayoría de SEM. Existen muchas aplicaciones que sólo requieren la preparación de una pequeña cantidad de la muestra. En la actualidad, los equipos SEM generan datos que se almacenan en formato digital, facilitando así su portabilidad y almacenamiento y en general la obtención de datos es rápida (Swapp, 2017).

Dependiendo de la naturaleza de la muestra y los datos que se quieran obtener a partir de ella, esta puede requerir una mínima o compleja preparación para posteriormente ser analizada. Una mínima preparación puede requerir de un simple ajuste de la muestra a la cámara SEM y algunas otras modificaciones para impedir la acumulación de carga, en muestras que presentes un aislamiento eléctrico. Para la mayoría de estas, se les realiza un recubrimiento con una fina capa de material conductor, que en muchos casos es elaborada a partir de carbono, oro u otro metal de aleación. La elección del material de recubrimiento, está relacionada con el tipo de análisis que se requiera realizar a partir de esta técnica. Por ejemplo, los recubrimientos metálicos son más efectivos en análisis donde la adquisición de imágenes electrónicas de alta resolución, sean una prioridad. De forma alternativa, una muestra que presente aislamiento eléctrico, puede observarse sin la necesidad de un recubrimiento con capacidad conductiva, en instrumentos que utilicen “bajo vacío” como mecanismo de funcionamiento (Swapp, 2017).

Estas son algunas imágenes, encontradas en la literatura, obtenidas a partir de la técnica SEM:



UICC Asbestos Chrysotile 'A' standard

Anthophyllite asbestos, Georgia

Figura 8. Imágenes obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Swapp, 2017).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

2 METODOLOGÍA

2.1 Síntesis y encapsulación del resveratrol en las nanopartículas alginato/quitosano

2.1.1 Análisis morfológico y químico del resveratrol

- **Objetivo específico:** caracterizar morfológica y químicamente el resveratrol

La morfología del resveratrol fue caracterizada a partir de la técnica SEM, por medio del microscopio Phenon ProX. Para realizar este análisis, el polifenol fue disuelto en agua hasta obtener una concentración de 500 μM . Posteriormente, una gota de esta solución fue adicionada a un fragmento de cinta conductiva y observada a una aceleración de voltaje de 15 kv. Se obtuvieron imágenes con un acercamiento de 1000X y 5000X. Se utilizó resveratrol de la marca Carbosynth.

El resveratrol fue sujeto a un análisis de FTIR para identificar sus grupos funcionales en la región de 4000 a 500 cm^{-1} , utilizando un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum 100.

2.1.2 Síntesis de los hidrogeles de alginato/quitosano

- **Objetivo específico:** sintetizar y caracterizar morfológica y químicamente nanopartículas lipídicas y/o poliméricas.

Se preparó una solución de alginato (Sigma-aldrich), al 1% en un rango de pH de 6,10 - 6,5 y quitosano, de la misma marca, al 1% (p/v) en un rango de pH de 3,0 - 3,5. Para este proceso de síntesis, se prepararon dos grupos de muestras con el objetivo de comparar tamaño de partícula y estabilidad del sistema, entre ambos y a partir de este análisis, seleccionar la preparación que presentase las mejores propiedades morfológicas y químicas, para la posterior encapsulación del resveratrol.

Para el primer grupo de muestras (G1) se mezcló el alginato y el quitosano en una misma proporción de volumen (1:1), mientras que para el segundo grupo (G2), se mezcló alginato y quitosano en una proporción 3:1 de volumen. Esta mezcla se realizó sonicando 3 veces la solución alginato/quitosano, utilizando el equipo Sonics Vibra Cell VCX 500, a una potencia de 200 W. Cada proceso de sonicación consistía en pulsos de 15 segundos y lapsos de 10 segundos entre pulsos, durante 1 minuto. La proporción 1:1 alginato/quitosano, fue seleccionada como un sistema a evaluar, debido a que esta relación de masa ha sido empleada en diferentes estudios, como por ejemplo, en la

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

elaboración de microesferas, como mecanismo portador de fármacos para la tuberculosis, con potencial uso quimioterapéutico (Pandey & Khuller, 2004). La proporción 3:1 fue seleccionada como otra opción de relación de masa alginato/quitosano, bajo un criterio similar, en donde se encontraron estudios que utilizaban esta misma proporción, como en la fabricación de hidrogeles para liberación controlada de fármacos en tratamiento de enfermedades relacionadas con una mala regulación del hierro (Rassu, y otros, 2016).

A partir de este punto, se continuó con el siguiente protocolo tanto para G1 como para G2: Luego de haber adicionado el alginato al quitosano, se dejaron las muestras en agitación constante a 120 rpm, aproximadamente, durante 24 horas; posteriormente se adicionó gota a gota 35% del volumen total de tripolifosfato de sodio y agitando constantemente el sistema a 120 rpm, durante 1 hora. Posteriormente, se centrifugaron las muestras tres veces a 2000 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Luego, se filtró para cada solución, tanto el sobrenadante como el decantado, para luego ser lavada 6 veces con acetona, para su posterior análisis morfológico y químico. Es procedimiento se ilustra en la figura 10 para el grupo 1 (G1) y en la figura 11 para el grupo 2 (G2).

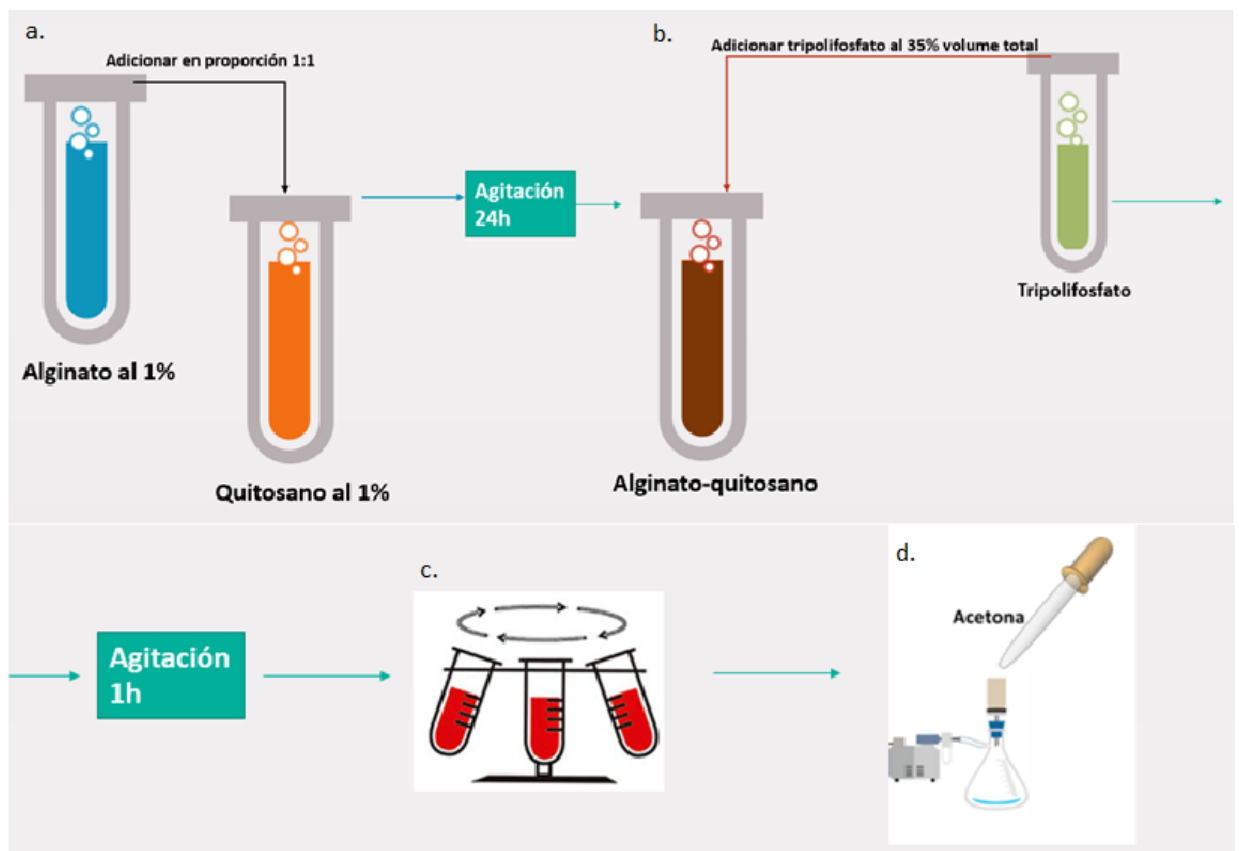


Figura 9. Esquema de la elaboración de los hidrogeles para el grupo 1: (a) adición del alginato al quitosano en proporción 1:1, (b) adición del tripolifosfato a la solución alginato/quitosano, (c) centrifugación a 120 rpm y (d) proceso de lavado de los hidrogeles con acetona

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

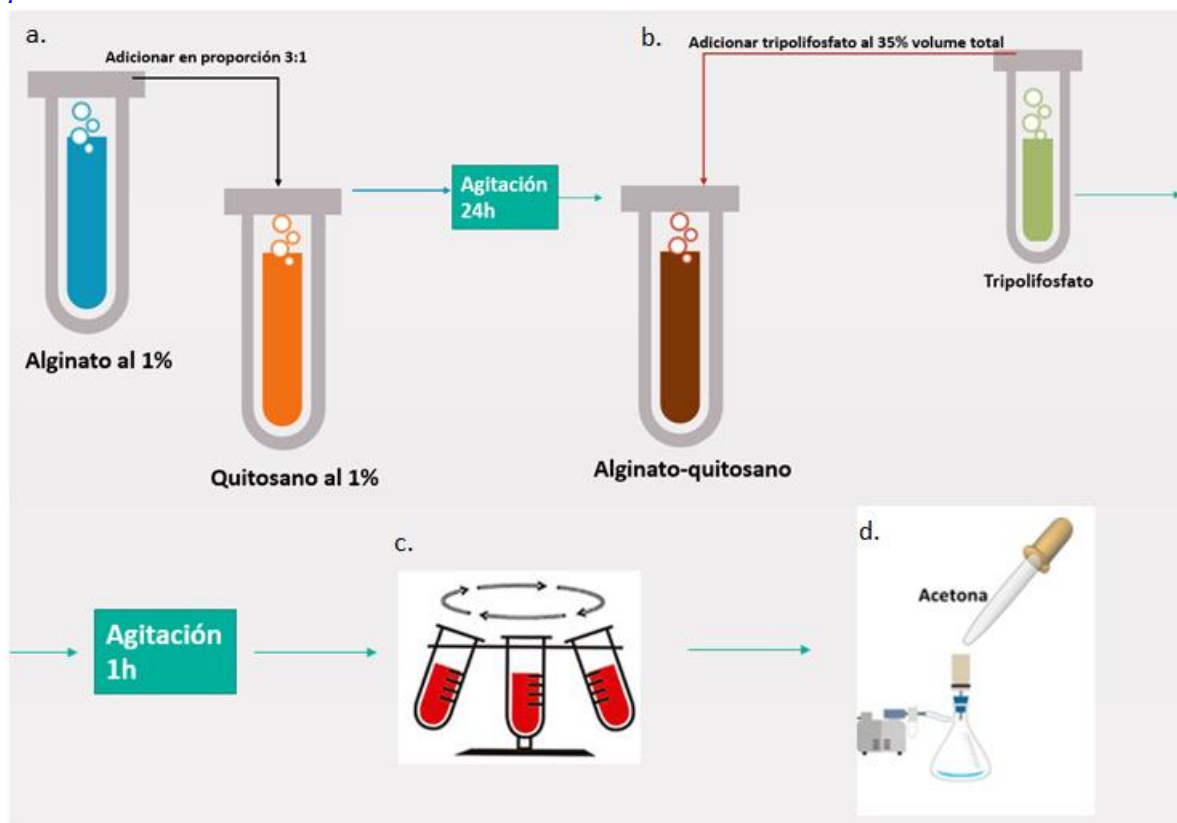


Figura 10. Esquema de la elaboración de los hidrogeles para el grupo 1: (a) adición del alginato al quitosano en proporción 3:1, (b) adición del tripolifosfato a la solución alginato/quitosano, (c) centrifugación a 120 rpm y (d) proceso de lavado de los hidrogeles con acetona

2.1.3 Caracterización morfológica y química para las nanopartículas de alginato/quitosano

La morfología de los hidrogeles alginato/quitosano, fue caracterizada a través de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), a través del uso del microscopio Phenon ProX. Una pequeña gota de solución donde los hidrogeles estaban dispersas, fue adicionada a un pequeño trozo de cinta conductiva adhesiva. Luego las muestras fueron analizadas a una aceleración de voltaje de 15 kv bajo un alto vacío. Para conocer el detalle de la composición de cada una de las muestras, con el fin de seleccionar el sistema de encapsulación más adecuado, referirse a la tabla 1, que se presenta a continuación.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Tabla 1. Código de las muestras para cada uno de los dos grupos de hidrogeles alginato/quitosano.

Concentración alginato-quitosano	Grupo de muestras	Código de muestra	Mecanismo de encapsulación
1:1	G1	M0	Blanco
		M1	1
		M2	2
3:1	G2	M3	Blanco
		M4	1
		M5	2

Nota: El mecanismo de encapsulación 1 del principio activo, está relacionado con la adición del Resveratrol en forma sólida al Alginato/quitosano, al mismo tiempo que se adicionó el tripolifosfato. Mientras que en el mecanismo de encapsulación 2, el polifenol se disolvió en el Tripolifosfato con la posterior adición de dicha solución al Alginato/quitosano.

Tabla 2. Detalle de las muestras para elaboración de hidrogeles alginato/quitosano y posterior encapsulación del resveratrol.

Siendo RSV: Resveratrol, TPP: Tripolifosfato

MUESTRA	VARIABLES	QUITOSANO	ALGINATO	TPP	RSV	RVT+ TPP
M0	Concentración	1%	1%	10mM	---	----
	Proporción	1	1	35%		
M1	Concentración	1%	1%	10mM	$\frac{1mg (RSV)}{ml (TPP)}$	---

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

	Proporción	1	1	----	----	
M2	Concentración	1%	1%	10mM	---	$\frac{1mg}{ml}$
	Proporción	1	1	35%	---	
M3	Concentración	1%	1%	----	---	
	Proporción	3	1	35%	----	
M4	Concentración	1%	1%	----		
	Proporción	3	1	----	$\frac{1mg (RSV)}{ml (TPP)}$	
M5	Concentración	1%	1%	10mM	----	
	Proporción	3	1	0.7 ml	----	$\frac{1mg}{ml}$

Nota: La columna RSV corresponde al primer mecanismo de encapsulación del principio activo, donde el resveratrol se adicionó, en forma sólida, al alginato/quitosano, al mismo tiempo que se adicionó el tripolifosfato. Mientras que la columna RSV + TPP corresponde al segundo mecanismo de encapsulación, donde el polifenol se disolvió en el tripolifosfato (disuelto en agua) con la posterior adición de dicha solución al alginato/quitosano.

Para identificar la presencia e interacción del alginato y quitosano en los hidrogeles, se realizó análisis FTIR para las muestras blanco (M0, del grupo 1 y M3, del grupo 2). Para realizar este análisis se dejó en agitación constante, alginato/quitosano de acuerdo a las proporciones indicadas para cada grupo de muestras (1:1 para la muestra M0 del grupo 1 y 3:1 para la muestra M3 del grupo 2) durante 24 horas. Posteriormente, se adicionó tripolifosfato a las muestras. Inmediatamente, luego de haber adicionado estas soluciones, se dejaron secando ambas muestras durante 72 horas. Esto con el fin de obtener una lámina sólida, que pudiese ser utilizada en el análisis FTIR. Para este objetivo se trabajó con el espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum 100.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

2.1.4 Encapsulación de resveratrol en los hidrogeles de alginato/quitosano

Objetivo específico: Encapsular el resveratrol en nanopartículas lipídicas y/o poliméricas.

Elaborando nuevamente el protocolo descrito en el numeral 2.1.1, se fabricaron dos diferentes mecanismos de encapsulación con el objetivo de seleccionar el sistema que presentase mejores características morfológicas y químicas. En uno de los procedimientos de encapsulación se disolvió el resveratrol en el tripolifosfato para luego adicionarlo a las muestras (Muestras M2 y M5 para grupos G1 y G2 respectivamente, ver tabla 1). Mientras que, en la otra variación del mecanismo, el polifenol se suministró de forma sólida a las muestras, al mismo tiempo que se adicionaba el tripolifosfato a las mismas (Muestras M1 y M4 para los grupos G1 y G2 respectivamente).

Las muestras se elaboraron, siguiendo la tabla 1. Las muestras M0 (blanco), M1 y M2 se elaboraron bajo el protocolo con el que se fabricaron los hidrogeles para el grupo 1 (G1) y M3 (blanco), M4 y M5 se elaboraron bajo el protocolo del grupo 2 (G2).

2.1.2 Caracterización morfológica y química de los hidrogeles alginato/quitosano con resveratrol encapsulado

La morfología de los hidrogeles alginato/quitosano con resveratrol, fue caracterizada a través de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), utilizando microscopio Phenon ProX. Con el fin de lograr este objetivo, una gota con la solución donde las nanopartículas se encontraban dispersas, fue adicionada a un pequeño trozo de cinta conductiva adhesiva. Luego las muestras fueron analizadas a una aceleración de voltaje de 15kv bajo un alto vacío.

Para identificar la presencia de resveratrol encapsulado, se realizó análisis FTIR para las para las muestras que contenían resveratrol (M2, del grupo 1 y M4, del grupo 2). Para realizar este análisis se dejó en agitación constante, alginato/quitosano de acuerdo a las proporciones indicadas para cada grupo de muestras (1:1 para la muestra M2 del grupo 1 y 3:1 para la muestra M4 del grupo 2) durante 24 horas. Posteriormente, se adicionó resveratrol disuelto en tripolifosfato a las muestras. Inmediatamente, luego de haber adicionado estas soluciones, se dejaron secando ambas muestras durante 72 horas. Esto con el fin de obtener una lámina sólida, que pudiese ser utilizada en el análisis FTIR. Para este objetivo se trabajó con el espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum 100.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

3 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Espectro infrarrojo del resveratrol

La técnica FTIR se realizó con el objetivo de estudiar la estructura química del resveratrol, identificando sus grupos funcionales a partir de la obtención de sus bandas características, tal como se observa en la figura 13.

Análisis FTIR para el resveratrol

Estructura química del resveratrol

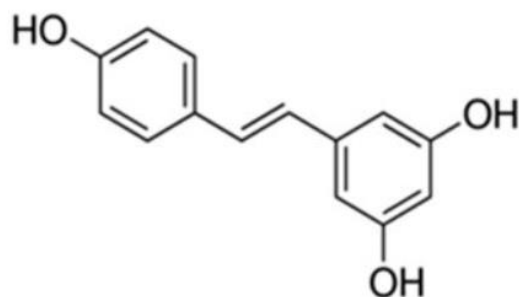


Figura 11. Estructura química del resveratrol (Duan, y otros, 2016).

Gráfica FTIR experimental para resveratrol

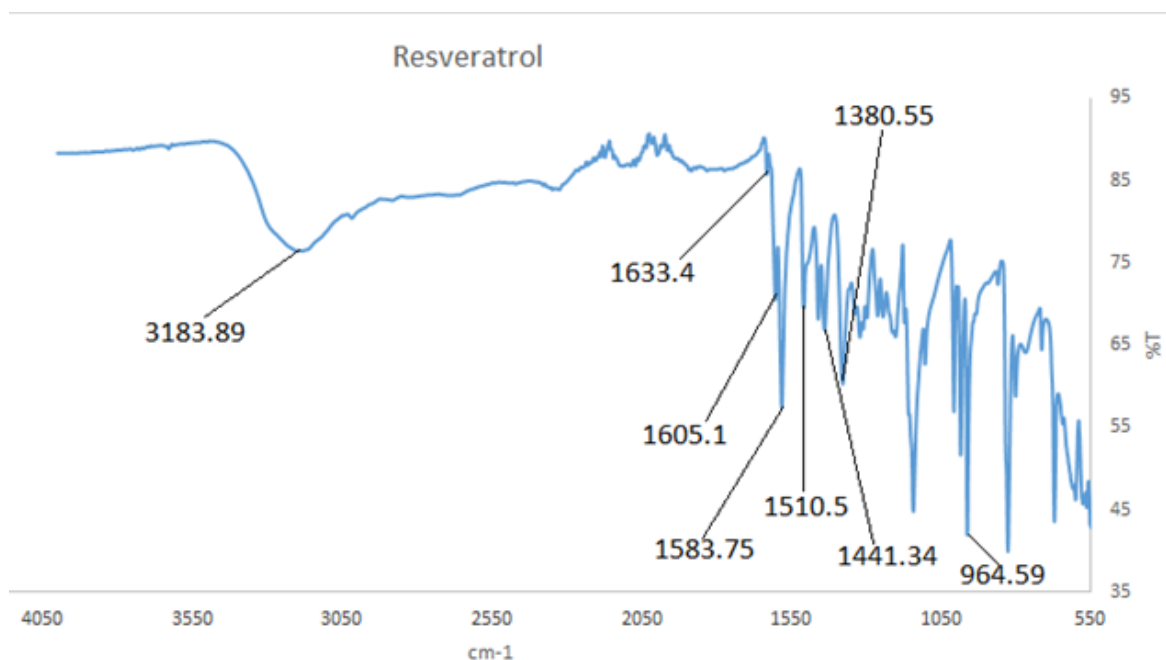


Figura 12. Gráfica FTIR experimental para el resveratrol e identificación de sus bandas características

Tabla 3. Detalle de la identificación de grupos funcionales del resveratrol en la gráfica de FTIR

Grupo funcional	Frecuencia I.R para resveratrol estándar (cm-1) (Reportadas en literatura)	Frecuencia I.R para resveratrol extraído (cm-1) (Reportadas en literatura)	Frecuencia I.R experimental (cm ⁻¹)	Referencia
Estiramiento de grupos fenólicos -OH	3294.19	3427.62	3294.19	(Al-Jumaily, Hamid, & Karima, 2014)
Aromático C=C (absorción relacionada con)	1649.50	1689.70	1633.40	

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

anillo bencénico)				
Alifático C=C	1589.23	1664.02	1605.1	
Bandas relacionadas con anillos bencénicos	1578	--	1583.75	(Davidov-Pardo, Joye, & McClements, 2014)
	1514	--	1510.5	
	1443	--	1441.34	
Enlaces C-C	1380	--	1380.55	(Kumpugdee-Vollrath, Ibold, & Sriamornsak, 2012)
Banda olefínica característica del trans-resveratrol	988	--	986.67	(Zhou, Wang, Guo, & Zhao, 2011)
Vibraciones C=C-H	965		964.59	(Aguiar, y otros, 2016)

Como se observa en la tabla anterior, se comprobó la presencia de los grupos funcionales del resveratrol a partir de la identificación de las bandas de acuerdo a la gráfica de FTIR obtenida, siendo la banda a $964,59\text{cm}^{-1}$ la que caracteriza al trans-resveratrol (Aguiar, y otros, 2016). Las bandas características con mayor intensidad se presentaron en 1583.75 , 1380.55 y 964.59 cm^{-1} (Davidov-Pardo, Joye, & McClements, 2014).

3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) para resveratrol

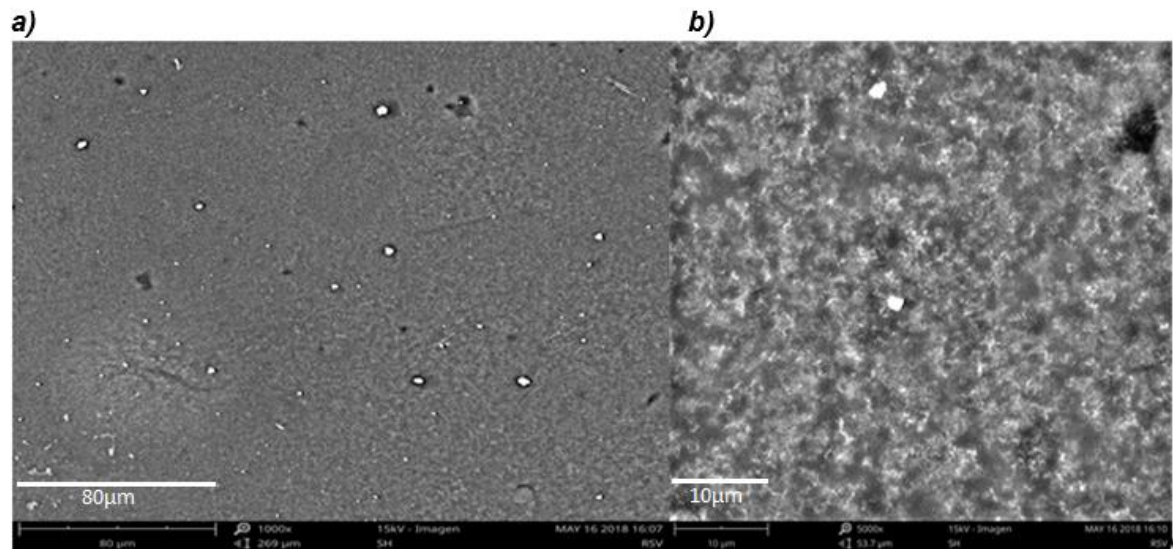


Figura 13. Microscopía electrónica de barrido: a) resveratrol con un aumento de 1000X y b) resveratrol con un aumento de 5000X

Según las imágenes obtenidas a través de la técnica SEM, se presenta tanto una morfología granular, como también una morfología de característica amorfa. En general las partículas del polifenol se observan con un tamaño inferior a $2\mu\text{m}$, aproximadamente y dispersas a lo largo de la superficie.

3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) para hidrogeles alginato/quitosano

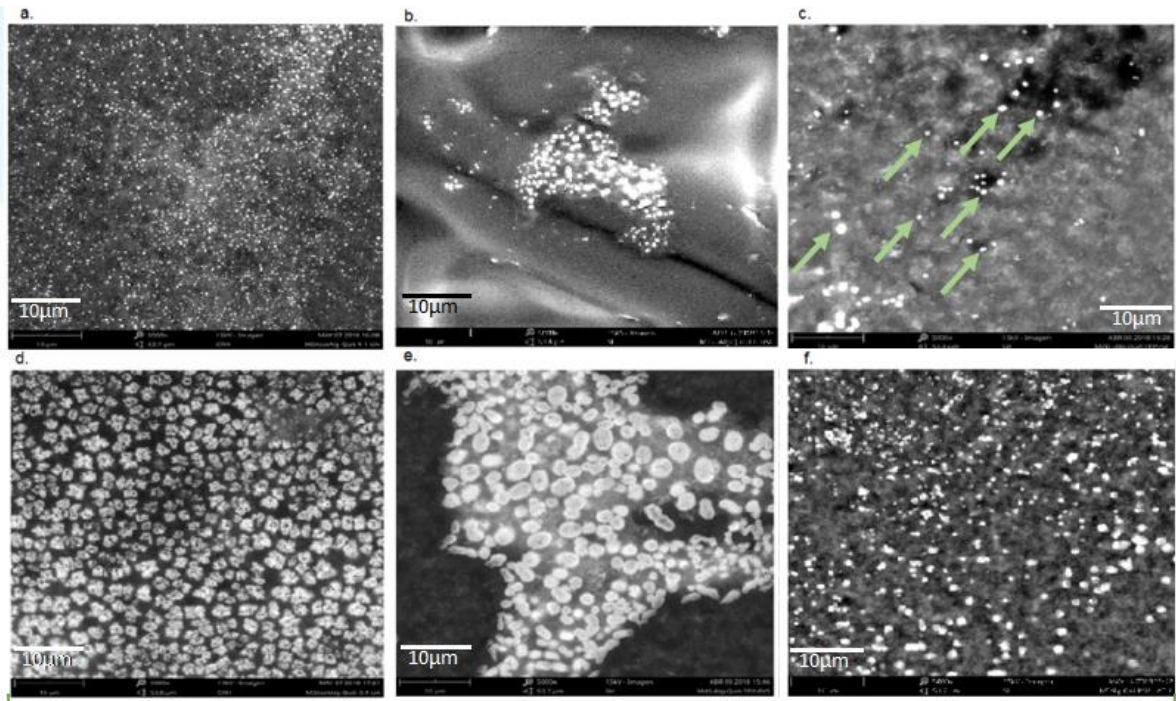


Figura 14. Microscopía electrónica de barrido para los hidrogeles elaborados experimentalmente (imágenes con aumento a 5000X) para los grupos G1 (a, b y c) (proporción alginato/quitosano 1:1) y G2 (d, e y f) (proporción alginato/quitosano 3:1).): (a) M0 y (d) M3 son las muestras blanco para los grupos correspondientes; (b) M1 y (e) M4 son hidrogeles con la adición de resveratrol en estado sólido, junto con el tripolifosfato (TPP); (c) M2 y (f) M5 son hidrogeles a los que se les adicionó el polifenol disuelto en el TPP.

La figura 15 (a), (b), (c), (d), (e) y (f) representa las micrografías obtenidas SEM a 5000X. La figura 15 (a), (b) y (c) representa los hidrogeles para el grupo G1 (proporción alginato/quitosano 1:1) para las muestras M0, M1 y M2 respectivamente. En la imagen para la muestra M0, se observan hidrogeles homogéneamente dispersos, con una morfología circular bien definida. En la figura 15 (b), se observa que existen grupos de partículas que conservan la forma circular, con otros grupos que presentan formas similares a hexágonos. Para la figura 15 (c) se observa una distribución morfológica similar a la anteriormente descrita. Para las imágenes (a), (b) y (c) se obtuvieron partículas con tamaños inferiores a 500nm, lo que significa que se obtuvieron nanohidrogeles. Las imágenes (d), (e) y (f) corresponden al grupo G2 (proporción alginato/quitosano 3:1) para las muestras M3, M4 y M5 respectivamente. En la figura 15(d) se presenta una morfología similar a unas “rosetas”, debido a su semejanza con esta forma que se presenta en la naturaleza, en donde a partir de una disposición circular, sobresalen hojas a una misma altura. Las partículas más grandes, se pueden identificar con un tamaño de 2µm, aproximadamente, mientras que partículas más pequeñas, se

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

detectan con tamaños inferiores a 500nm. Para la figura 15 (e) se identifican partículas más grandes que las anteriormente descritas, con diámetros de 4 μm , aproximadamente, como también partículas de tamaños inferiores a 500nm. Lo que da a entender que para el grupo G2 se obtuvieron nano y microhidrogeles. Igualmente, para la figura 15 (e) se presentan morfologías esféricas y en mayor medida, estructuras en forma de barras o *rods* (como es su término en inglés) anchas y porosas. En cuanto a la figura 15 (f) se observan morfologías similares a hidrogeles en forma de roseta. Se detectan tamaños inferiores a los observados en los hidrogeles de la imagen anteriormente nombrada, en donde se presentan estructuras inferiores a 500nm. Es así como para este caso, se obtuvieron nanohidrogeles.

Con una microscopía de transmisión que presente una resolución más alta, se podría identificar los nanohidrogeles que no se pudieron observar en detalle en las imágenes presentadas anteriormente.

3.4 Análisis FTIR para el alginato

Se realizó una espectroscopía FTIR para poder identificar los grupos funcionales del alginato (el cual se analizó en estado sólido), a partir de las bandas obtenidas por esta técnica, como se observa en la figura 17.

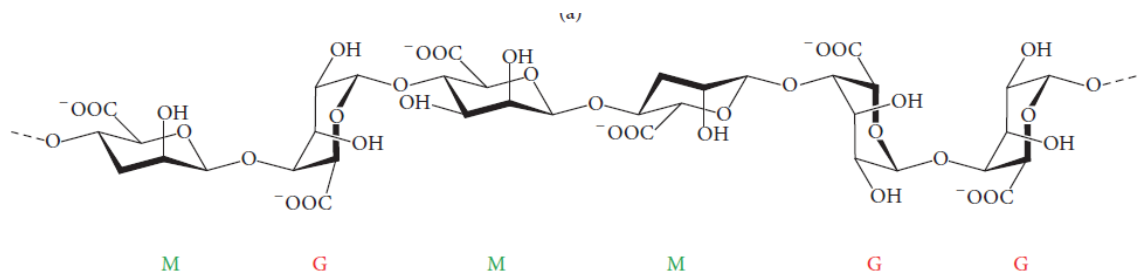


Figura 15. Estructura química del alginato de sodio (Szekalska, PuciBowska, Szymańska, Ciosek, & Winnicka, 2016)

Gráfica FTIR experimental para alginato

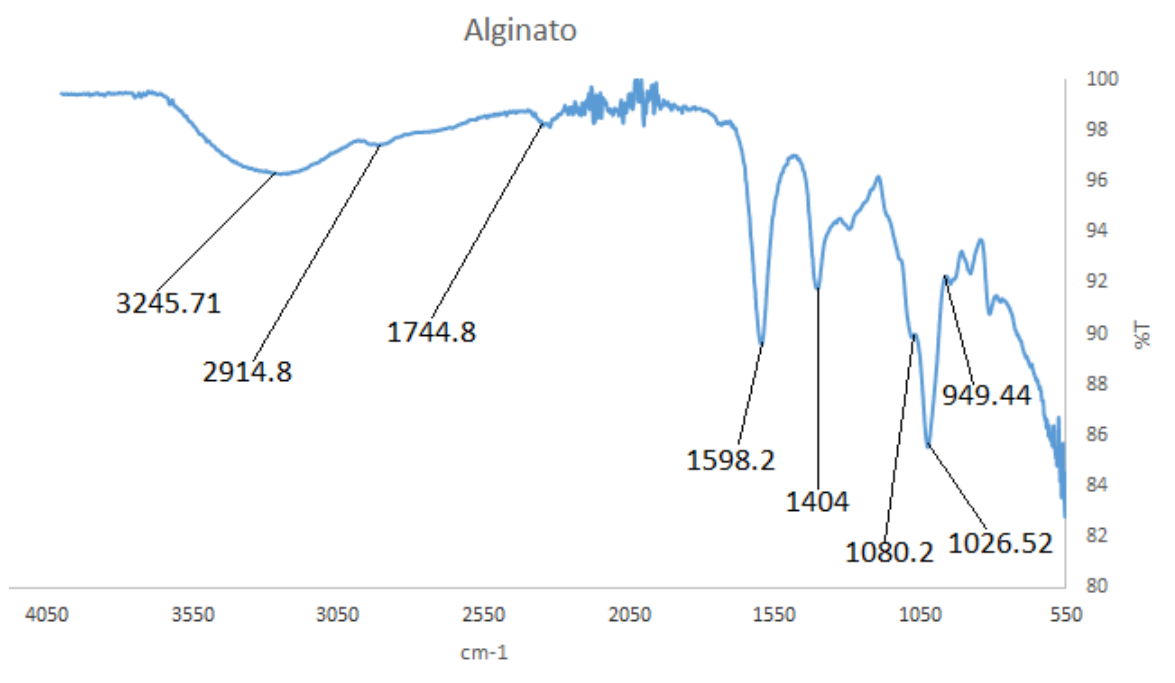


Figura 16. Gráfica FTIR experimental para el alginato e identificación de sus bandas características

Tabla 4. Detalle de la identificación de grupos funcionales del alginato en la gráfica de FTIR

Grupo funcional	Frecuencia I.R para alginato (cm ⁻¹)	Frecuencia I.R para literatura (cm ⁻¹)	Frecuencia I.R experimental (cm ⁻¹)	Referencia
Vibraciones de enlaces O-H	3000-3600		3245.71	(Barikani & Daemi, 2012)
C-H alifático	2920-2850		2914.8	
Estiramiento C=O	1700-1400		1744.8	(Sarei, Dounighi, Zolfagharian, Khaki, & Bidhendi, 2013)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Vibraciones simétricas del ion carboxilato (-COO-)	1601	1598.2	(Li, Dai, Zhang, Wang, & Wei, 2008)
Vibraciones asimétricas del ion carboxilato (-COO-)	1407	1404	
Estiramiento de C-O en el anillo piranosa	1107	1080.2	(Barikani & Daemi, 2012)
Las bandas alrededor de 1030 cm ⁻¹ (estiramiento C-O-C) presentadas en el espectro IR son atribuidas a la estructura sacárida del alginato	1030	1026.52	(Li, Dai, Zhang, Wang, & Wei, 2008)
Vibraciones de C-O a partir de deformaciones de C-C-H y C-O-H	935	949.44	(Barikani & Daemi, 2012)

A partir de la identificación de las bandas características del alginato, según la gráfica FTIR obtenida experimentalmente, se comprueba la presencia de los grupos funcionales de dicho componente. Es importante resaltar, que las bandas a 1080.52 y 946.44 cm⁻¹ son muy significativas del ión carboxilato del alginato de sodio y permiten su diferenciación de derivados e ingredientes (Barikani & Daemi, 2012) .

3.5 Análisis FTIR para el quitosano

Se realizó una espectroscopía FTIR para identificar los grupos funcionales del quitosano, a partir de las bandas obtenidas por esta técnica, como se observa en la figura 19.

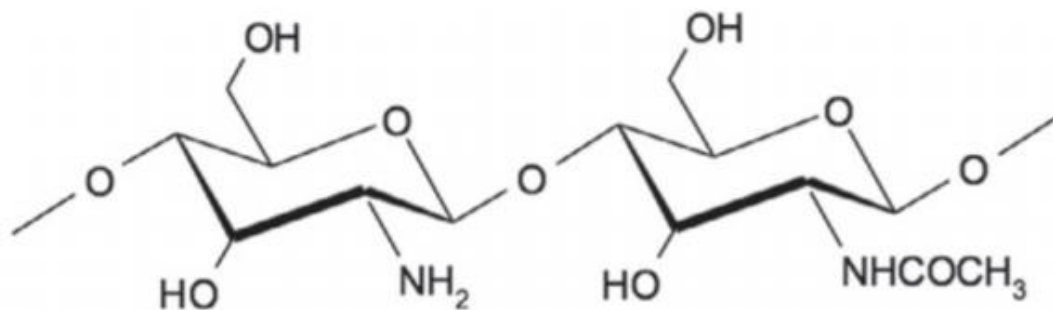


Figura 17. Estructura química del quitosano (Jiang, James, Kumbar, & Laurencin, 2014)

Gráfica FTIR experimental para quitosano

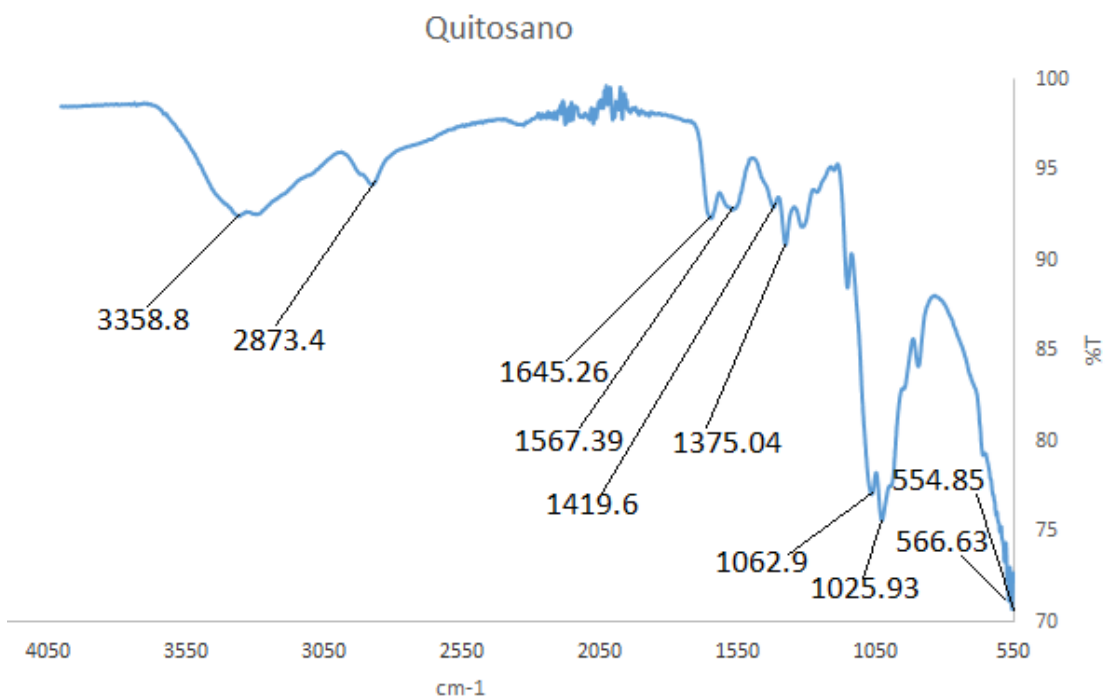


Figura 18. Gráfica FTIR experimental para el quitosano e identificación de sus bandas características

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Tabla 5. Detalle de la identificación de grupos funcionales del quitosano en la gráfica de FTIR

Grupo funcional	Frecuencia I.R para quitosano en literatura (cm⁻¹)	Frecuencia I.R experimental (cm⁻¹)	Bibliografía
N-H de la amida y de la amina y -OH	3424	3358.8	(Li, Dai, Zhang, Wang, & Wei, 2008)
Vibración de -OH	2876	2873.4	
Carbonilo (C=O) de la amida secundaria (banda I)	1655	1645.26	
Vibraciones de flexión de uniones N-H (Residuos N-acetilados banda amida II)	1599	1567.39	
Vibración del enlace N-H de la amida y enlace éter (banda amida III)	1423	1419.6	
Estiramiento N-H (banda amida III)	1381	1375.04	
Estiramiento C-O de alcohol secundario	1081	1062.9	
Estiramiento C-O de alcohol primario	1033	1025.93	
Bandas atribuidas a la presencia de estructura sacárida del quitosano, gracias a la variedad de enlaces C-O	530-540	554.85 y 566.63	(Dennis, Harrison, Agnes, & Erastus, 2016)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

De acuerdo a las bandas características del quitosano, obtenidas de manera experimental, se comprueba la presencia de los grupos funcionales del mismo, reportados en la literatura. La presencia de las bandas a 554.85 y 566.63cm^{-1} comprueban la naturaleza polisacárida del quitosano (Dennis, Harrison, Agnes, & Erastus, 2016).

3.6 Análisis FTIR para el tripolifosfato de sodio

Se realizó una espectroscopía para poder identificar los grupos funcionales del tripolifosfato, a partir de las bandas obtenidas por esta técnica, como se observa en la figura 21.

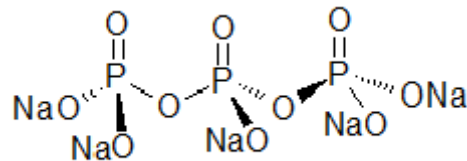


Figura 19. Estructura molecular del tripolifosfato de sodio (Fahim, Kheireddine, & Belaouad, 2013)

Gráfica FTIR experimental para tripolifosfato de sodio

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

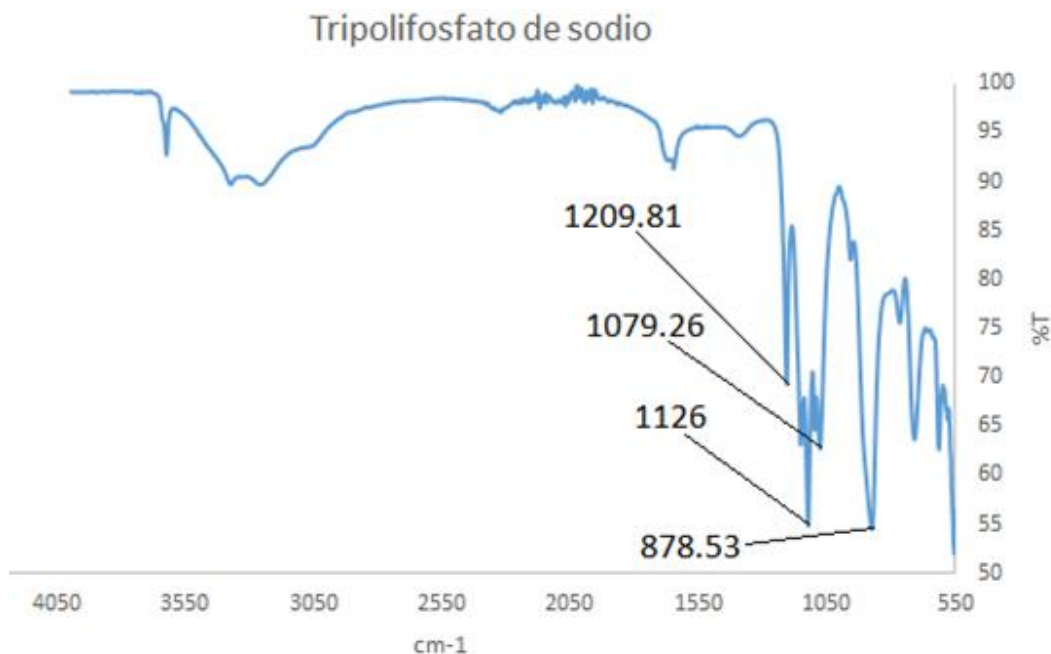


Figura 20. Gráfica FTIR experimental para el tripolifosfato de sodio e identificación de sus bandas características

Tabla 6. Detalle de la identificación de grupos funcionales del tripolifosfato en la gráfica de FTIR

Grupo funcional	Frecuencia I.R para en literatura (cm ⁻¹)	Frecuencia I.R experimental (cm ⁻¹)	Referencia
Vibraciones de estiramientos de P=O	1210	1209.81	(Loutfy, y otros, 2016)
Estiramientos simétricos y asimétricos en el grupo O-P=O	1130	1126	
Estiramientos simétricos y asimétricos en PO ₃	1090	1079.47	

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Estiramientos simétricos y asimétricos en P-O-P	888	878.53	
---	-----	--------	--

El espectro del tripolifosfato obtenido a través del espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum 100 y la posterior identificación de bandas del compuesto, demuestran la obtención de las vibraciones características asignadas a grupos funcionales del tripolifosfato, reportados en la literatura (Loutfy, y otros, 2016).

3.7 Análisis FTIR para hidrogeles alginato/quitosano con tripolifosfato como agente entrecruzante

Se realizó la técnica de FTIR para poder identificar bandas características para las muestras que contenían alginato/quitosano, sin resvertrol, para los grupos G1 y G2. Esto con el objetivo de detectar la presencia de ambos biopolímeros en las muestras, como también interacciones entre ellos. Adicionalmente, a partir de este análisis, es posible identificar interacciones entre el quitosano y el tripolifosfato (compuesto que fue utilizado como agente entrecruzante).

En la figura 22 se representa la formación del complejo iónico alginato/quitosano, que ocurre entre el grupo aniónico (-COO) del alginato de sodio y el grupo catiónico protonado del quitosano (-NH₃⁺) (Smitha, Sridhar, & Khan, 2005).

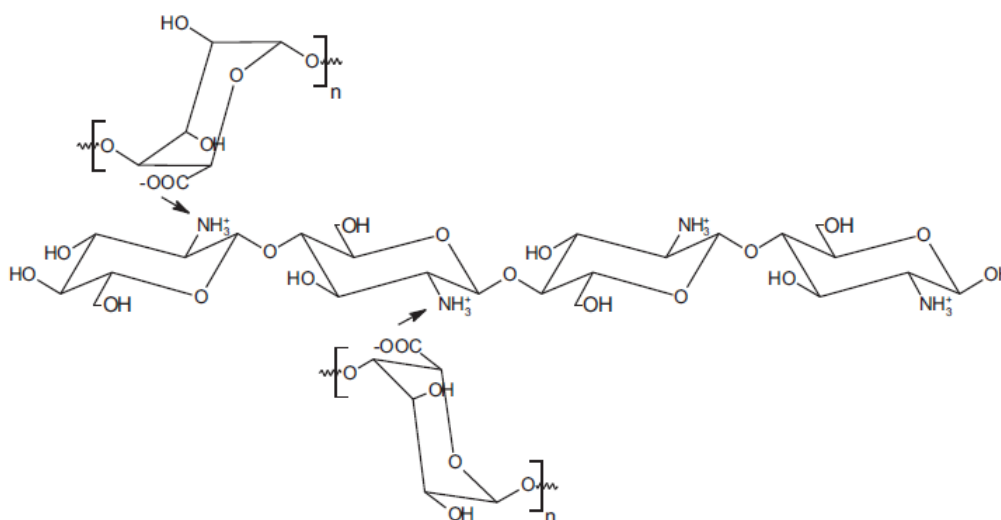


Figura 21. Interacción química entre el alginato y el quitosano (Nnamonu, Ato, & Onyido, 2012).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

En la figura 23, se ilustra la interacción entre grupos amino protonados en el quitosano con iones multivalentes del TPP ($P_3O_{10}^{5-}$), cargados negativamente.

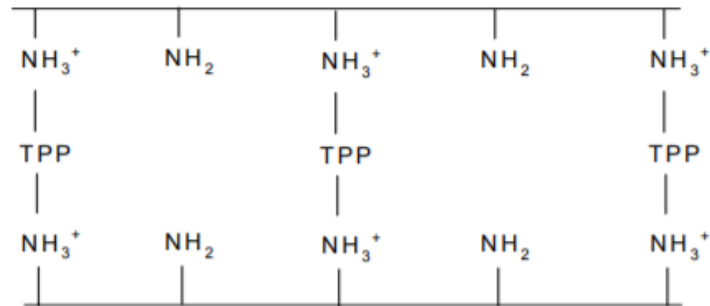


Figura 22. Interacción química entre el quitosano y el tripolifosfato (Liu, Bai, & Nan, 2004)

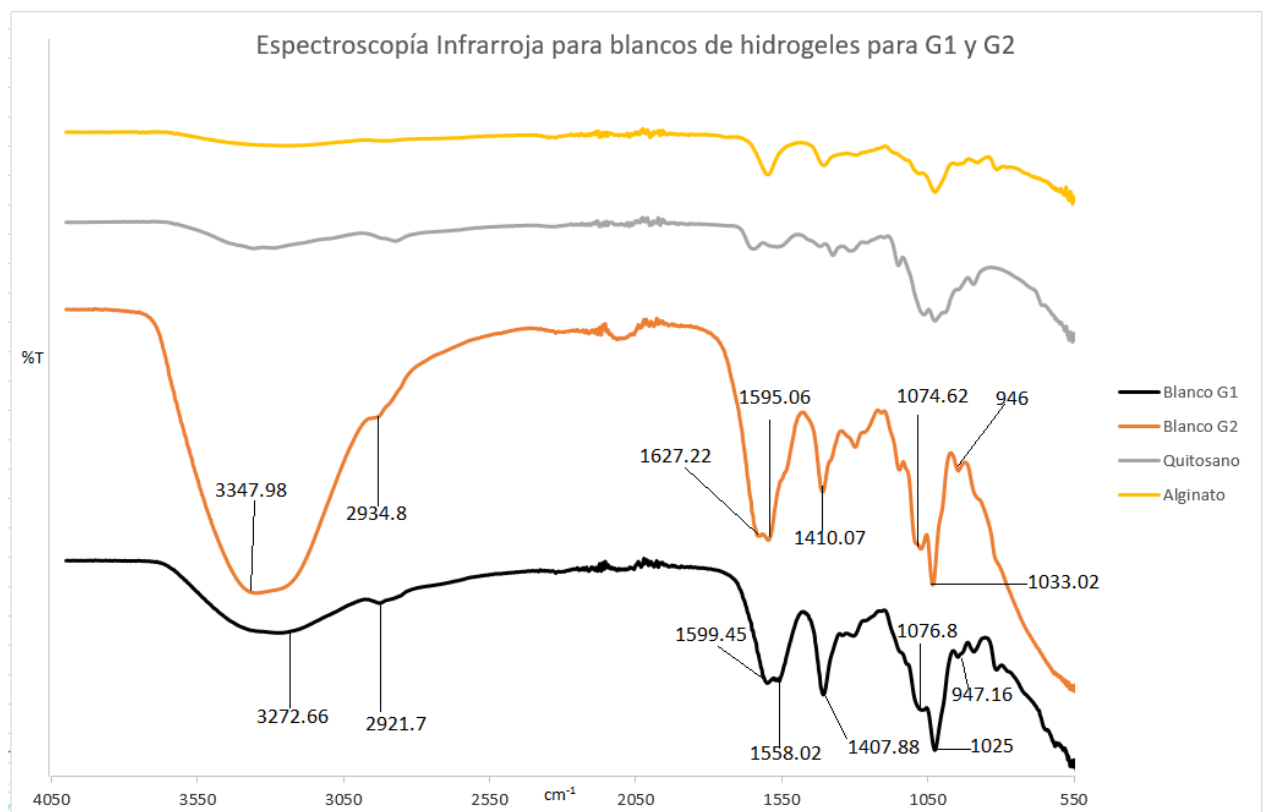


Figura 23. Gráfica FTIR experimental de hidrogel alginato/quitosano-tripolifosfato e identificación de bandas características para el grupo 1 (G1) (espectroscopía color negro) y para el grupo 2 (G2) (espectroscopía color naranja)

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Los hidrogeles elaborados a partir de alginato/quitosano, presentan bandas características que podrían asignarse a cada uno de los biopolímeros en ambos grupos de muestras. Es importante notar que la banda a 3347.98 cm^{-1} para el grupo G1 podría estar relacionada con la vibración de la amina (sin embargo esta banda también podría derivarse de la amida) y grupos hidroxilo, mientras que la banda a 3272.66 cm^{-1} para el grupo G2, podría relacionarse con vibraciones de puentes -OH . Igualmente se identifican posibles desplazamientos en determinadas bandas, que indican interacción química entre el alginato y el quitosano. Es así como en el grupo G2, el alginato al interactuar con el quitosano podría presentar el desplazamiento de la banda relacionada con vibraciones simétricas del ion carboxilato de 1598.2 a 1627 cm^{-1} (Li, Dai, Zhang, Wang, & Wei, 2008). Sin embargo, también se reporta en la literatura, que la aparición de esta banda, podría estar relacionada con el grupo -NH_3^+ del complejo polielectrolítico (Smitha, Sridhar, & Khan, 2005). De la misma forma, para el grupo G1 como para el grupo G2, el quitosano presenta posibles desplazamientos en su banda de vibraciones de flexión de uniones N-H (Residuos N-acetilados banda amina II). Para el grupo G1, este desplazamiento va desde 1567.39 a 1558.02 cm^{-1} y de 1567.39 a 1595.06 cm^{-1} para el grupo G2 (Li, Dai, Zhang, Wang, & Wei, 2008). También se observa un posible desplazamiento para la banda de vibraciones asimétricas de sal iónica carboxílica del alginato. Para el grupo G1, este desplazamiento va desde 1404 a 1407.88 cm^{-1} y para el grupo G2, esto ocurre desde 1404 a 1410.67 cm^{-1} . Esta interacción entre el alginato y el quitosano, es explicada a partir de la formación de un complejo iónico que se da gracias a la interacción de los dos polímeros con presencia de estructuras polielectrolíticas con cargas opuestas. Es así como esta atracción electrolítica, ocurre por la interacción del grupo aniónico (-COO) del alginato de sodio con el grupo catiónico protonado ($\text{-NH}_3\text{C}$) del quitosano. Es precisamente en estos grupos en los que se identifican desplazamientos en sus bandas características, garantizando la identificación de la interacción de ambos biopolímeros en la formación experimental de los hidrogeles (Smitha, Sridhar, & Khan, 2005).

La interacción del tripolifosfato, como agente entrecruzante, y el quitosano, podría manifestarse en la ampliación de la banda a 3347.98 para el grupo G2, que podría explicar la superposición de las vibraciones generadas por estiramientos N-H y -OH (Loutfy, y otros, 2016). Se ha reportado que la desaparición de la banda característica del tripolifosfato a 1126 cm^{-1} , es debida a interacciones intermoleculares entre esta y el quitosano (Cho, Chun, Kim, & Park, 2014). Estas interacciones ocurren gracias a que en soluciones de TPP, iones de H^+ como de tripolifosfato están en la solución. (Vandana & Sahoo, 2009).

Para este trabajo de grado, se propusieron dos sistemas de adición del resveratrol en los hidrogeles alginato/quitosano para su posterior encapsulación. Un sistema consistía en la adición del resveratrol, en estado sólido al mismo tiempo que se adicionaba el entrecruzante (tripolifosfato). La otra opción propuesta, consistía en la adición del resveratrol disuelto en el tripolifosfato. Se decidió continuar con el proceso de disolución del polifenol en el tripolifosfato. Esto debido a que en el análisis morfológico de los microhidrogeles generados, se observaban tamaños de partículas más pequeñas. Adicionalmente, se encontró que durante el proceso de adición del resveratrol en estado sólido, pequeñas cantidades del compuesto permanecían en la superficie de la solución sin disolverse, durante varias horas, por lo que se optó no seleccionar este sistema,

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

debido a que se consideraba que este sistema no presentaría un mecanismo de encapsulación tan eficiente como el seleccionado. (Davidov-Pardo, Joye, & McClements, 2014).

3.8 Análisis FTIR para hidrogeles alginato/quitosano-TPP-resveratrol

Se realizó la técnica de FTIR para poder identificar bandas características para las muestras que contenían alginato/quitosano con resveratrol, para los grupos G1 y G2. Esto con el objetivo de identificar los dos biopolímeros en la muestra, como también la ausencia de bandas características del resveratrol, lo que podría indicar la formación de complejos que reducen el doblamiento o estiramiento de enlaces en el resveratrol, ocasionados por la encapsulación de este polifenol al interior de los hidrogeles. De la misma forma, a partir de este análisis se identifican interacciones alginato/quitosano y quitosano-tripolifosfato. (Davidov-Pardo, Joye, & McClements, 2014).

Espectroscopía Infrarroja para hidrogeles con resveratrol encapsulado para G1 y G2

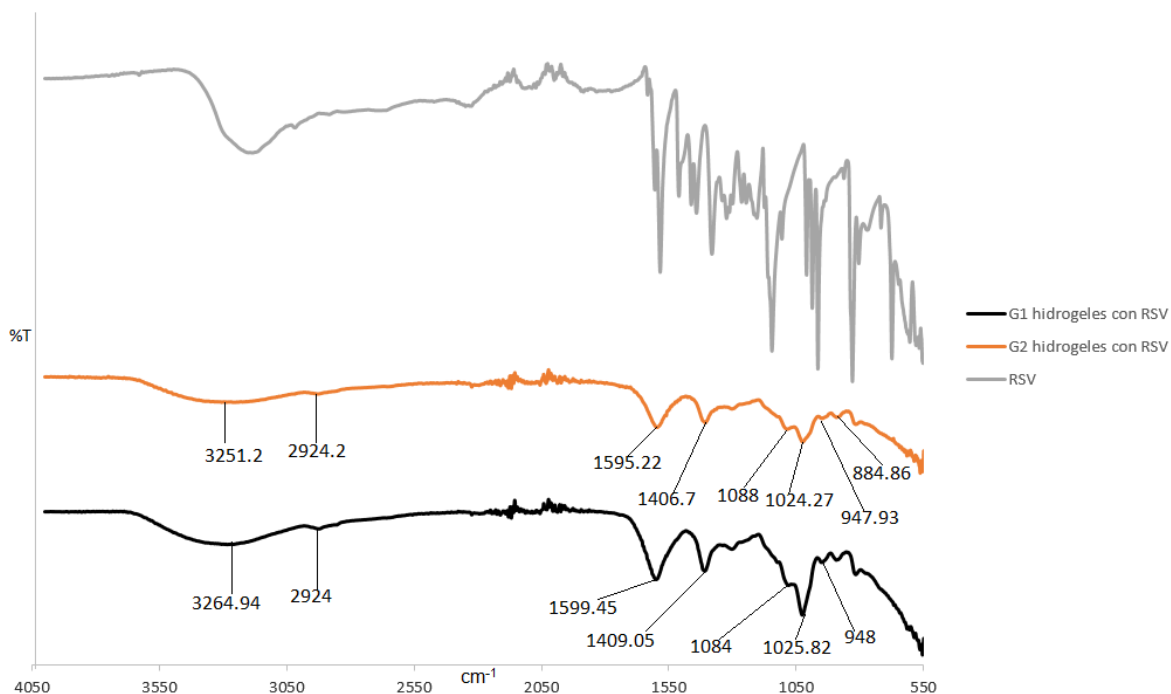


Figura 24. Gráfica FTIR experimental de hidrogeles alginato/quitosano-tripolifosfato con resveratrol e identificación de bandas características para el grupo 1 (G1) y para el grupo 2 (G2)

Para ambos grupos se detecta una banda alrededor de 3200 cm⁻¹ y que podría estar relacionada con la amina y los grupos hidroxilos, característica del quitosano. Se identifica la posible presencia de la banda de C-H alifático, característica del alginato alrededor de 2900 cm⁻¹.

Es importante recordar que el resveratrol es un polifenol que presenta desventajas debido a su limitada biodisponibilidad y su poca solubilidad en agua, lo que genera procesos de desestabilización de la molécula, como también usos restringidos en el área farmacológica. A partir de este punto, es que podemos detectar que existe una necesidad de encapsular dicho polifenol, potenciando sus propiedades y evitando la aparición de los problemas anteriormente mencionados (Karthikeyan, Rajendra Prasad, Ganamani, & Balamurugan, 2013).

La literatura reporta diversos estudios, en los que se ha detectado la encapsulación del resveratrol, a partir de la disminución o desaparición de picos característicos de dicha molécula, por medio de la técnica de FTIR, cuando se es adicionada a esponjas o hidrogeles poliméricos (Zhou , Wang, Guo, & Zhao, 2011). Con fines de demostrar la

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

encapsulación del resveratrol en el sistema alginato/quitosano, desarrollado en el presente trabajo, se seguirá una metodología similar, comparando el espectro del resveratrol con el obtenido cuando este se adiciona a dicho sistema, detectando la ausencia de bandas característica de dicho polifenol, para así garantizar la encapsulación del mismo en la matriz polimérica.

No se identifica la presencia o se presentan con muy poca intensidad, las siguientes bandas que caracterizan al resveratrol en el análisis FTIR, tanto para el grupo G1 como G2: estiramiento de grupos aromáticos C-H, aromático C=C (absorción relacionada con anillo bencénico), bandas relacionado con anillos bencénicos, enlaces C-C y la banda característica del trans-resveratrol. Como se puede observar, la mayoría de picos característicos del resveratrol desaparecieron cuando este se adicionó a las partículas biopoliméricas. Situación que podría indicar la formación de complejos que ocasionan el doblamiento o estiramiento de puentes en el resveratrol, ocasionados por la inclusión de este polifenol en el interior de los hidrogeles de alginato/quitosano (Davidov-Pardo, Joye, & McClements, 2014).

La desaparición de las bandas de resveratrol, relacionadas con el anillo bencénico de dicha molécula, en el rango de 1441.34 a 1605.1 cm^{-1} y la desaparición de los picos de absorción del resveratrol en 986.67 y 964.59 cm^{-1} , indican que la formación del complejo alginato/quitosano-tripolifosfato-resveratrol, genera una limitación vibracional en la molécula, sugiriendo que el benceno en el resveratrol, podría ser insertado en la matriz polimérica por medio de interacciones, como doblamiento de puentes de hidrógeno entre el resveratrol y el complejo polimérico (Zhou , Wang, Guo, & Zhao, 2011). Una publicación relacionada con el estudio del resveratrol y su interacción con ciclodextrinas, confirma que la desaparición o disminución de estas bandas características del polifenol, podrían estar relacionadas con la formación de complejos de inclusión (Bertacche, Lorenzi, Nava, & Pini, 2006). Por lo que estos resultados estarían en concordancia con otros reportados en la literatura.

Se necesitan técnicas de caracterización adicionales, tales como difracción de rayos X (XRD), con el fin de analizar cambios estructurales, relacionados con la encapsulación del resveratrol. Adicionalmente se sugiere realizar una calorimetría diferencial de barrido (DSC) para poder caracterizar la estabilidad térmica del resveratrol y de los hidrogeles elaborados (Cho, Chun, Kim, & Park, 2014).

3.9 Estabilidad de los hidrogeles alginato/quitosano

La estabilidad en un sistema de microhidrogeles, es muy importante durante su proceso de almacenamiento. Esto es debido a que cuando se desee utilizar en algún procedimiento terapéutico, como en tratamientos para combatir el cáncer, esta debe tener una buena estabilidad. La inestabilidad de estos sistemas puede generar precipitados, coalescencia entre partículas y finalmente agregaciones y separación de los componentes de los microhidrogeles (Ishii & Nii, 2014).

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Se realizó un análisis cualitativo de estabilidad por medio de la observación de las soluciones (figura 26), almacenadas a 4°C, que contenían los hidrogeles para cada una de las muestras, durante un mes. Durante este seguimiento no se encontró agregados, ni precipitados; las soluciones se mantuvieron transparentes durante el tiempo. Sin embargo, se especula que este sistema puede ser estable por períodos más prolongados.

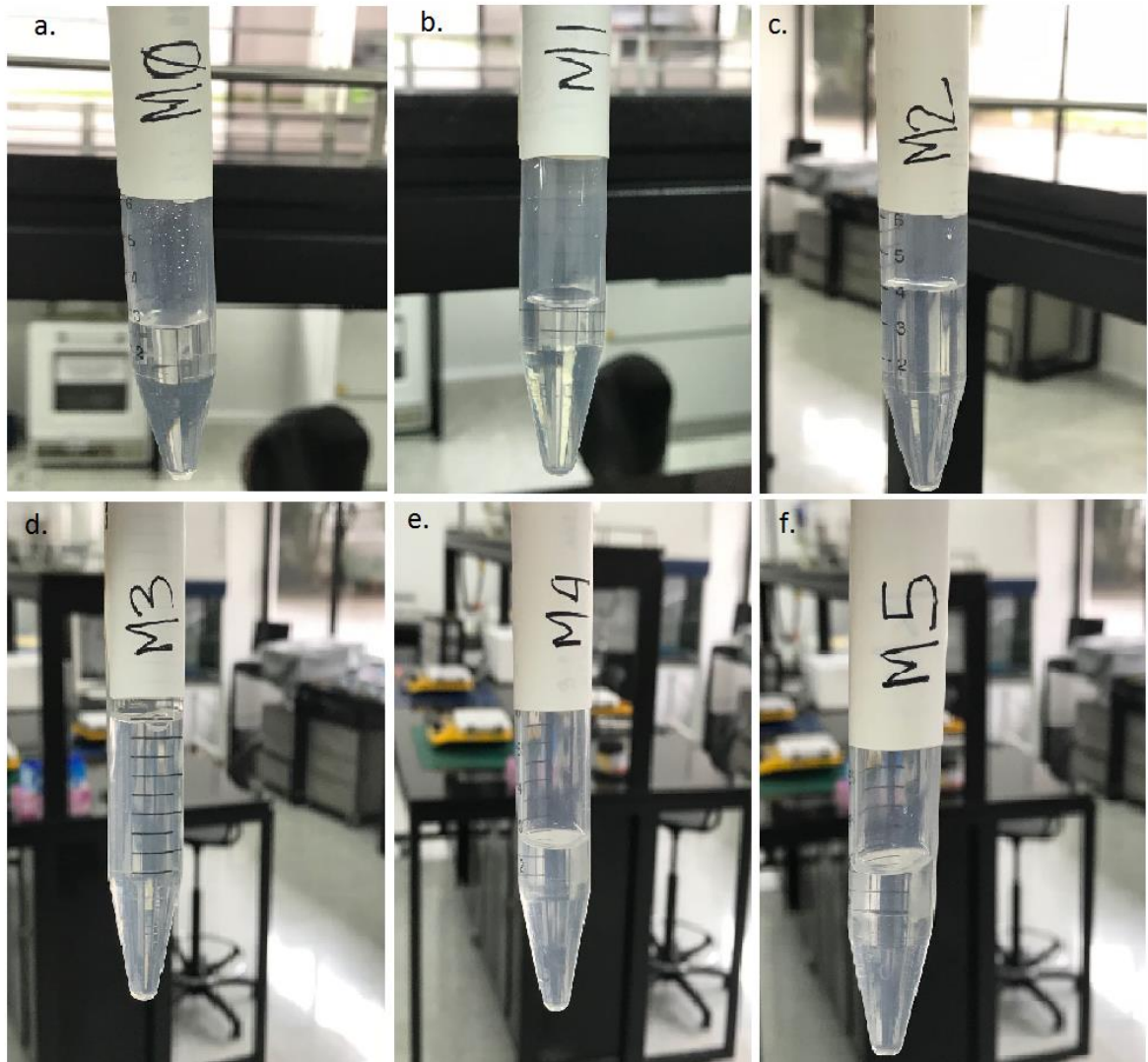


Figura 25. Muestras elaboradas para los grupos G1 (a, b y c) (proporción alginato/quitosano 1:1) y G2 (d, e y f) (proporción alginato/quitosano 3:1): (a) M0 y (d) M3 son las muestras blanco para los grupos correspondientes; (b) M1 y (e) M4 son hidrogeles con la adición de resveratrol en estado sólido, junto con el

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

tripolifosfato (TPP); (c) M2 y (f) M5 son hidrogeles a los que se les adicionó el polifenol disuelto en el TPP.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

4. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

A partir de la técnica de espectrometría infrarroja, se identificaron los grupos funcionales del resveratrol como los enlaces aromáticos C-H, aromático C=C, alifático C=C, bandas relacionadas con anillos bencénicos, enlaces C-C, banda característica del *trans*-resveratrol e identificación de enlace C=C-H. Adicionalmente por medio de microscopía electrónica de barrido se detectó para el resveratrol, morfologías granulares y amorfas, dispersas a lo largo de la superficie, con un tamaño de partícula inferior a 2µm.

Con el método implementado para elaboración de hidrogeles alginato/quitosano, en donde se elaboraron dos grupos de muestras, con proporciones 1:1 (G1) y 3:1 (G2), se identificó a partir de la técnica de FTIR, interacciones entre el alginato y el quitosano, que garantizaban la formación de la matriz polimérica por medio de la identificación de posibles desplazamientos o aparición de bandas específicas relacionadas con vibraciones simétricas y asimétricas del ion carboxilato y vibraciones de flexión de enlaces N-H. Igualmente, se detectó una posible interacción entre el quitosano y el tripolifosfato por medio de la ampliación de la banda a 3347,98 cm⁻¹ para el grupo G2, que podría demostrar la superposición de las vibraciones generadas por estiramientos N-H y -OH. Igualmente se reportó la desaparición de la banda característica del tripolifosfato a 1126 cm⁻¹ (para ambos grupos de muestras), suceso que se ha relacionado en la literatura con interacciones intermoleculares entre este compuesto y el quitosano. Para el grupo 1 (G1), se obtuvieron hidrogeles con morfologías circulares y hexagonales con tamaños no superiores a 500 nm, por lo que se concluye que se obtuvieron nanohidrogeles para dicho grupo (en esta descripción se incluyen las muestras que contenían resveratrol). En cuanto al grupo G2, se presentaron morfologías en forma de “rosetas”, como también hidrogeles en forma de barras o rods anchas; obteniéndose nano y microhidrogeles (en esta descripción también están incluidos los hidrogeles que contenían el polifenol). Para futuros análisis morfológicos, se aconseja realizar SEM en equipos que brinden imágenes con resoluciones más altas, que el utilizado en la presentación de este trabajo de grado.

Se decidió seleccionar el sistema de adición del resveratrol disuelto en el tripolifosfato, para luego ser adicionado a los hidrogeles. Esto, debido a que se consideró que este método presentó tamaños más pequeños de hidrogeles, para ambos grupos, adicionalmente se encontró que cuando se estaba trabajando con el otro sistema de adición del resveratrol sólido junto con el tripolifosfato, se observaba pequeñas cantidades de resveratrol no disuelto luego de varias horas de agitación. Adicionalmente la literatura aconsejaba, en su mayoría, la dilución del resveratrol en algún medio, antes de ser adicionado al sistema de encapsulación

Para analizar la encapsulación del resveratrol, se realizó un análisis FTIR, para los hidrogeles alginato/quitosano que contenían el polifenol. Esto para ambos grupos (G1 y G2). Se detectó la ausencia de estas bandas características del resveratrol: estiramiento de grupos aromáticos C-H, aromático C=C (absorción relacionada con anillo bencénico), bandas relacionado con anillos bencénicos, enlace C-C y la banda característica del *trans*-resveratrol. A partir del soporte que daba la literatura, se determinó que esta ausencia de picos característicos, estaría relacionada con la formación de complejos que ocasionan el doblamiento o estiramiento de puentes en el resveratrol, generados por la

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

inclusión de este polifenol al interior de los hidrogeles de alginato/quitosano. También se identificó que la ausencia de las bandas del polifenol relacionadas con el anillo bencénico, y otras dos más debidas a vibraciones en enlaces C=C-H, tendría relación con la inserción del benceno en la matriz polimérica. Se recomienda caracterizar los hidrogeles por medio de otras técnicas como difracción de rayos X (XRD) para analizar cambios estructurales en las partículas, relacionadas con el proceso de encapsulación y ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para analizar la estabilidad térmica de los hidrogeles elaborados.

Se encontró que el sistema no presentaba precipitados o agregados en la solución que contenía los hidrogeles, para todas las muestras fabricadas. Se requieren análisis durante periodos más extensos, para conocer el alcance de la estabilidad del sistema desarrollado.

REFERENCIAS

33 mil personas al año mueren de Cáncer en Colombia. (s/f). Recuperado el 15 de marzo de 2016, a partir de <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/33-mil-personas-al-a%C3%B1o-mueren-de-C%C3%A1ncer-en-Colombia.aspx>

¿Qué es el cáncer? (s/f). [cgvArticle]. Recuperado el 15 de marzo de 2016, a partir de <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.

Aguiar, G., Boschetto, D., Chaves, L., Arcari, B., Piato, A., Oliveira, J., & Lanza, M. (2016). Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. *Industrial Crops and Products*, 350-355.

Al-Jumaily, E. F., Hamid, G., & Karima, F. (2014). Synthesis and Total Phenol Content of New Resveratrol Derivative. *American Journal of Advanced Drug Delivery*, 320-329.

Barikani, M., & Daemi, H. (2012). Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. *Scientia Iranica*, 2023-2028.

Bennet, D., & Kim, S. (2014). Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery. En A. D. Sezer (Ed.), *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. InTech. Recuperado a partir de <http://www.intechopen.com/books/application-of-nanotechnology-in-drug-delivery/polymer-nanoparticles-for-smart-drug-delivery>.

Bertacche, V., Lorenzi, N., Nava, D., & Pini, E. (2006). Host–Guest Interaction Study of Resveratrol With Natural and Modified Cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 279–287.

B. L. Soto, J. A. Hank, S. R. Darjatmoko, A. S. Polans, E. M. Yanke, A. L. Rakhmilevich, S. Seo, K. Kim, R. A. Reisfeld, S. D. Gillies, y P. M. Sondel, «Anti-tumor and immunomodulatory activity of resveratrol in vitro and its potential for combining with cancer immunotherapy», *International Immunopharmacology*, vol. 11, n.º 11, pp. 1877-1886, nov. 2011.

Bhumkar, D., & Pokharkar, V. (2006). Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*, 1-6.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Cáncer de mama, una enfermedad en ascenso en Colombia. (s/f). Recuperado el 15 de marzo de 2016, a partir de <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/-Cancer-de-mama,-una-enfermedad-en-ascenso-en-Colombia.aspx>.

C. Antus, B. Radnai, P. Dombovari, F. Fonai, P. Avar, P. Matyus, B. Racz, B. Sumegi, y B. Veres, «Anti-inflammatory effects of a triple-bond resveratrol analog: Structure and function relationship», *European Journal of Pharmacology*, vol. 748, pp. 61-67, feb. 2015.

C. Barjot, M. Tournaire, C. Castagnino, C. Vigor, J. Vercauteren, y J.-F. Rossi, «Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: Comparison with resveratrol», *Life Sciences*, vol. 81, n.º 23-24, pp. 1565-1574, nov. 2007.

Chemical Book. (2017). *CAS Database List*. Obtenido de Chitosan: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1479274.htm

Cho, A., Chun, Y., Kim, B., & Park, D. J. (2014). Preparation of Chitosan-TPP Microspheres as Resveratrol Carriers. *Journal of Food Science*, 568-576.

C. K. Singh, M. A. Ndiaye, y N. Ahmad, «Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1852, n.º 6, pp. 1178-1185, jun. 2015

Davidov-Pardo, G., Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles liquid antisolvent precipitation. Part 1: Preparation and Characterization. *Food Hydrocolloids*, 309-316.

Dennis, G., Harrison, W., Agnes, K., & Erastus, G. (2016). Effect of Biological Control Antagonists Adsorbed on Chitosan Immobilized Silica Nanocomposite on *Ralstonia solanacearum* and Growth of Tomato Seedlings. *Advances in Research*, 1-23.

Duan, J., Yue, W., E, J., Malhotra, J., Lu, S.-e., Gu, J., . . . Tan, X.-L. (2016). In vitro comparative studies of resveratrol and triacetylresveratrol on cell proliferation, apoptosis, and STAT3 and NFκB signaling in pancreatic cancer cells. *Scientific Reports*, 1-10.

Dutta, P. K., Dutta, J., & Tripathi, V. (2004). Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 20-31.

E.-J. Park y J. M. Pezzuto, «The pharmacology of resveratrol in animals and humans», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1852, n.º 6, pp. 1071-1113, jun. 2015.

Efectos secundarios a largo plazo del tratamiento del cáncer. (2012, junio 21). Recuperado el 15 de marzo de 2016, a partir de

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

<http://www.cancer.net/es/sobrevivencia/efectos-secundarios-largo-plazo-del-tratamiento-del-c%C3%A1ncer>

Efectos secundarios de la quimioterapia. (s/f). Recuperado el 15 de marzo de 2016, a partir de

<http://www.cancer.org/espanol/servicios/tratamientosyefectossecundarios/quimioterapia/fragmentado/quimioterapia-una-guia-para-los-pacientes-y-sus-familias-chemo-side-effects>
Fahim, I., Kheireddine, A., & Belaaouad, S. (2013). Sodium tripolyphosphate (STPP) as a novel corrosion inhibitor for mild steel in 1 M HCl. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 451 - 456.

Fuentes G, J., Isaza M, C. A., Isaza M, G., & Marulanda M, T. (2014). Fundamentos de Farmacología en Terapéutica (Sexta, pp. 10–13). Pereira

Garzón S., María; Hernández L., Alejandra; Vázquez R., María; Villafuerte R., Leopoldo; García F., Beatriz (2008). Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), y de Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC). Recuperado el 15 de marzo de 2016, a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57911113008>

Gómez-gaete, C. (2014). Nanopartículas poliméricas : tecnología y aplicaciones farmacéuticas. *Sociedad de Farmacología de Chile*, 7, 7–16.

Gurses, M., Erkey, C., Kizilel, S., & Uzun, A. (2018). Characterization of sodium tripolyphosphate and sodium citrate dehydrate residues on surfaces. *Talanta*, 8-16.

Grenha, A. (2012). Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting*, 1-38.

Instantánea de nanotecnología. [cgvArticle]. Retrieved April 18, 2016, from <http://www.cancer.gov/espanol/investigacion/progreso/instantaneas/nanotecnologia>

Ishii , F., & Nii, T. (2014). Lipid emulsions and lipid vesicles prepared from various phospholipids as drug carriers. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*, 469–501.

Karthikeyan, S., Rajendra Prasad, N., Ganamani, A., & Balamurugan, E. (2013). Anticancer activity of resveratrol-loaded gelatin nanoparticles on NCI-H460 non-small cell lung cancer cells. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3(1), 64–73.
<http://doi.org/10.1016/j.bionut.2012.10.009>

K. Coradini, F. O. Lima, C. M. Oliveira, P. S. Chaves, M. L. Athayde, L. M. Carvalho, y R. C. R. Beck, «Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects», *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 88, n.º 1, pp. 178-185, sep. 2014.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

- Kumpugdee-Vollrath, M., Ibold, Y., & Sriamornsak, P. (2012). Solid state characterization of trans resveratrol complexes with different cyclodextrins. *AASP*, 125-136.
- Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., & Grøndahl, L. (2007). Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, 2533-2541.
- Lee, K., & Mooney, D. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *NIH-PA Author Manuscript*, 106–126.
- Li, P., Dai, Y.-N., Zhang, J.-P., Wang, A.-Q., & Wei, Q. (2008). Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(3), 221–228.
- Li, Q., Dunn, E., Grandmaison, E., & Goosen, M. (1992). Applications and Properties of Chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 370-397.
- Liu, C., Bai, R., & Nan, L. (2004). Sodium Tripolyphosphate (TPP) Crosslinked Chitosan Membranes and Application in Humic Acid Removal. *AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings*, 7147-7160.
- Liu, H., Jiang, A., Jiang, G., & Uhric, K. (1999). Unimolecular Micelles: Synthesis and Characterization of Amphiphilic Polymer Systems. *Polymer Chemistry*, 703-711.
- Loutfy, S., Alam El-Din, H., H Elber, M., Allam, N., Hasanin, M., & Abdellah, A. (2016). Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 1-9.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., ... Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5297), 218–220.
- Jiang, T., James, R., Kumbar, S., & Laurencin, C. (2014). Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, 91-113.
- Junta Editorial de Cancer.Net. (Julio de 2015). Cancer.net. Obtenido de <http://www.cancer.net/es/sobrevivencia/efectos-secundarios-largo-plazo-del-tratamiento-del-c%C3%A1ncer>
- Mayo, D., Miller, F., & Hannah, R. (2004). *Course Notes on the Interpretation of Infrared and Raman Spectra*. John Wiley & Sons, Inc.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

M. G. Novelle, D. Wahl, C. Diéguez, M. Bernier, y R. de Cabo, «Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go?», *Ageing Research Reviews*, vol. 21, pp. 1-15, may 2015.

Michigan State University . (2004). *Honors Cell and Molecular Biology Laboratory*.
Obtenido de Using the Spectrophotometer:
<https://msu.edu/course/lbs/159h/Spectrophotometry04.pdf>

Ministerio de Salud, Colombia. (2012, marzo). Plan Nacional para el control del cáncer en Colombia 2012-2020. Recuperado el 15 de marzo de 2016, a partir de
<https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Plan%20nacional%20para%20el%20control%20del%20c%C3%A1ncer%20en%20Colombia.pdf>

M.L. Ospina, J.A. Huertas, J.I. Montaña, J.C. Rivillas. «Observatorio Nacional de Cáncer Colombia», *Salud Pública*, vol. 33, n°2, pp. 1-15, mayo. 2015.

Müller, R. H., Mäder, K., & Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 161–177.

Nnamonu, L., Ato, R., & Onyido, I. (2012). Alginate Reinforced Chitosan and Starch Beads in Slow Release Formulation of Imazaquin Herbicide—Preparation and Characterization. *Scientific Research*, 566-574.

OMS | Cáncer. (s/f). Recuperado el 15 de marzo de 2016, a partir de
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.

Oregon State University. (6 de 11 de 2015). *Micronutrient Information Center*. Obtenido de Resveratrol:
<http://ipi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/resveratrol>

Pandey , R., & Khuller, G. (2004). Chemotherapeutic potential of alginate–chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 635-640.

Paques, J., Linden, E., Rijn, C., & Sagis, L. (2014). Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1-27.

Qin, Y. (1993). The Chelating Properties of Chitosan Fibers . *Applied Polymer* , 727-731.

Rassu, G., Salisa, A., Porcu, E., Giunchedia, P., Roldo, M., & Gavinia, E. (2016). Composite chitosan/alginate hydrogel for controlled release of deferoxamine: A system to potentially treat iron dysregulation diseases. *Carbohydrate Polymers*, 1338–1347.

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Rinaudo, M. (2014). Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 92-96.

Sacyl. (2004). Especialidades Farmacéuticas de liberación modificadas y estereoisómeros. *Boletín de Información Terapéutica*, 2-7.

Sarei, F., Dounighi, N., Zolfagharian, H., Khaki, P., & Bidhendi, M. (2013). Alginate Nanoparticles as a Promising Adjuvant and Vaccine Delivery System. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 442-449.

S. Jose, S. S. Anju, T. A. Cinu, N. A. Aleykutty, S. Thomas, y E. B. Souto, «In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery», *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 474, n.º 1-2, pp. 6-13, oct. 2014

S. Kim, W. K. Ng, Y. Dong, S. Das, y R. B. H. Tan, «Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation», *Journal of Food Engineering*, vol. 108, n.º 1, pp. 37-42, ene. 2012.

Smitha, B., Sridhar, S., & Khan, A. (2005). Chitosan–sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *European Polymer Journal*, 1859–1866.

Swapp, S. (26 de Mayo de 2017). *Geochemical Instrumentation and Analysis*. Obtenido de Scanning Electron Microscopy (SEM): https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html

Szekalska, M., PuciBowska, A., Szymańska, E., Ciosek, P., & Winnicka, K. (2016). Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *International Journal of Polymer Science*, 1-17.

Tipos de tratamiento. (s/f). [InciGeneral]. Recuperado el 15 de marzo de 2016, a partir de <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>

Universidad de Alicante. (2006). *Servicios Técnicos de Investigación*. Obtenido de Espectroscopía Ultravioleta Visible: <https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-rayos-x-de-monocristal-y-espectroscopias-vibracional-y-optica/espectroscopia-ultravioleta-visible.html>

La información presentada en este documento es de exclusiva responsabilidad de los autores y no compromete a la EIA.

Vandana, M., & Sahoo, S. (2009). Optimization of physicochemical parameters influencing the fabrication of protein-loaded chitosan nanoparticles. *Nanomedicine*, 773-785.

Xia, Y., & Pack, D. W. (2014). Uniform biodegradable microparticle systems for controlled release. *Chemical Engineering Science*, 125, 129–143. doi:10.1016/j.ces.2014.06.049

Zhou , R., Wang, F., Guo, Z., & Zhao, Y. (2011). Preparation and characterization of resveratrol/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent technology. *Journal of Food Process Engineering*, 1-10.