

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ORIZABA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“Análisis fenomenológico de la interacción de quitosano
como recubrimiento biopolimérico de liposomas”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

I.Q. Citlali Gutiérrez Bacilio

DIRECTOR DE TESIS:

Prof. Dr. Denis Cantú Lozano



Orizaba, Veracruz, México.

Junio 2016



FECHA: 23/06/2016
DEPENDENCIA: POSGRADO
ASUNTO: Autorización de Impresión
OPCIÓN: I

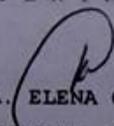
C. CITLALI GUTIERREZ BACILIO
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN:
CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"ANÁLISIS FENOMENOLÓGICO DE LA INTERACCIÓN DE QUITOSANO COMO RECUBRIMIENTO BIOPOLÍMÉRICO DE LIPOSOMA".

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E


M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO



ggc





FECHA : 22/06/2016

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACION.
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis
del (la) C. :

CITLALI GUTIERREZ BACILIO

la cual lleva el título de:

"ANÁLISIS FENOMENOLÓGICO DE LA INTERACCIÓN DE QUITOSANO COMO
RECUBRIMIENTO BIOPOLÍMÉRICO DE LIPOSOMA".

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : DR. DENIS CANTU LOZANO

SECRETARIO : DRA. GUADALUPE LUNA SOLANO

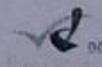
VOCAL : M.I. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTU

VOCAL SUP. : M.I. ADRIAN REYES BENITEZ

EGRESADO(A) DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

OPCION: I Tesis

[Handwritten signature]
FIRMA
[Handwritten signature]
FIRMA
[Handwritten signature]
FIRMA
[Handwritten signature]
FIRMA



RECONOCIMIENTOS

Muchas han sido las personas que han hecho posible la realización de este trabajo. Quiero agradecer sinceramente a todos ellos.

En primer lugar, quiero agradecer al **Dr. Denis Cantú Lozano** por haberme brindado su confianza y amistad, por compartir sus conocimientos, experiencias y por sus consejos que contribuyeron a mi formación.

A la Dra. **Lucimara Gaziola de la Torre** por recibirme en su laboratorio y compartir su conocimiento y su apoyo total durante el desarrollo de este trabajo de investigación

A mis compañeros de estudio y amigos, por su colaboración en el desarrollo de este Trabajo, por su compañía durante todo este camino y por brindarme la oportunidad de formar una pequeña familia, especialmente a: **Alma Lucero, Nicolás Alejandro, Karla Ávila, Kevin Ángel** y **José Roberto** quienes me han soportado, motivado y por estar siempre dispuesto a prestarme su ayuda.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, los que están y los que ya no están, le doy las gracias por haberme apoyado y hecho pasar muchos ratos agradables: **Miguel Ángel Viera Coello, Sheila Rubí Ginés Palestino** y **Citlali Gutiérrez Bacilo**. De forma especial quiero agradecerle a: **Lázaro Elionai Hernández Ariza**, con el que he compartido la mayor parte de este camino, por su inestimable apoyo tanto en lo referente al trabajo como en el plano personal. **Aracely Cortes, Paola Reyes** y **Alejandra Buendía** quienes me apoyaron en los momentos difíciles de mi trabajo.

Gracias chicas por su apoyo y su ayuda incondicional.

A **CONACyT** por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo de investigación y culminación de estudios de maestría.

A mi jurado por tomar un espacio de su tiempo para revisar este trabajo **Dra. Guadalupe Luna Solano, MC. Adrián Reyes Benítez** y **MC. María Elena**.

RESUMEN

Análisis fenomenológico de la interacción de quitosano como recubrimiento biopolimérico de liposoma

Elaborada por: Ing. Citlali Gutiérrez Bacilio

Dirigida por: Prof. Dr. Denis Cantú Lozano

Profa. Dra. Lucimara Gaziola de la Torre

Los liposomas son vesículas de bicapas lipídicas, han llamado la atención en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, Sin embargo las aplicaciones de los liposomas se encuentran limitadas por presentar tiempos de circulación en periodos muy cortos. Uno de los principales medios de estabilización de los liposomas consiste en su recubrimiento con polímeros para su aplicación. Biopolímeros tales como el quitosano han sido utilizados en la fabricación y estabilización de liposomas recubiertos. El principal objetivo de este trabajo es la fabricación de liposomas recubiertos de quitosano para posibles aplicaciones en la industria alimenticia mediante la producción de liposomas por el método inyección de etanol, éste presenta una fácil aplicación, operación y bajo costo de implementación para la industria. El método consiste en la inyección de dispersiones lipídicas en una fase acuosa contenida en un reactor, los lípidos usados para la producción de liposomas fueron fosfatidilcolina de soya y fosfatidilcolina de huevo, posterior a esto se realizó la interacción liposoma-quitosano, este nuevo sistema fue caracterizado de acuerdo a: diámetro medio, potencial zeta, polidispersidad y morfología. Los resultados obtenidos mostraron una producción de sistema liposoma-quitosano de diámetro, polidispersidad y potencial zeta, estables y controlados, demostrando para la relación másica de trabajo 0.25 para ambos lípidos mayor estabilidad confirmado con las pruebas de monocapas de Langmuir.

ABSTRACT

Análisis fenomenológico de la interacción de quitosano como recubrimiento biopolimérico de liposoma

By: Ing. Citlali Gutiérrez Bacilio

Advisor(s): Prof. Dr. Denis Cantú Lozano

Profa. Dra. Lucimara Gaziola de la Torre

Liposomes are vesicles lipid bilayers, have drawn attention to the food, cosmetic and pharmaceutical applications, however you will find the liposomes to present limited circulation times very short periods. One of the main means of stabilizing liposomes is its polymer coating to be applied. Biopolymers such as chitosan have been used in the production and stabilization of liposomes coated. The main objective of this work is the manufacture of liposomes coated with chitosan for possible applications in the food industry by producing liposomes by ethanol injection methods this presents an easy implementation and low cost of implementation and operation for the industry. The method involves the injection of lipid dispersions in an aqueous phase contained in a reactor, the lipids used for the production of liposomes were phosphatidylcholine from soy and egg phosphatidylcholine, after this the chitosan liposome interaction was performed, this new system was characterized according to average diameter, zeta potential, polydispersity and morphology. The results showed a production of stable liposome diameter chitosan system, stable and controlled polydispersity and zeta potential, showing the mass ratio to 0.25 to work both lipids greater stability tests confirmed Langmuir monolayers.

ÍNDICE

OBJETIVOS	
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	3
CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
1.1 Lípidos	5
1.2 Temperatura de transición de los liposomas.....	8
1.3 Liposomas.....	9
1.4 Liposomas Cargados	10
1.5 Métodos de obtención de liposomas.....	11
1.5.2 Métodos convencionales para la preparación de pequeños y largas vesículas unilamelares (SUVs y LUVs).....	11
1.6 Caracterización fisicoquímica de liposomas	13
1.6.1 Carga superficial.....	13
1.6.2 Tamaño.....	13
1.6.3 Permeabilidad.....	14
1.7 Aplicación de los liposomas	14
1.8 Polímero.....	15
1.9 Polímeros naturales o biopolímeros.....	16
1.10 Quitina y quitosano	19
1.11 Aplicación de quitina y quitosano	21
1.12 Degradación del quitosano	22
1.13 Interacción liposoma-quitosano.....	22
1.14 Microencapsulación	23
1.14.1 Técnicas de encapsulación con quitosano	23
1.15 Caracterización de la asociación biopolímero-liposoma	24
1.15.1 Potencial zeta	24
1.15.2 Dispersión dinámica de luz.....	25
1.15.3 Monocapas de Langmuir	25

1.16 Reología.....	28
1.17 Parámetros reológicos	30
1.18 Reología de quitosano.....	31
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1 Materiales	34
2.2 Equipos	34
2.3 Métodos	35
2.3.1 Elaboración de dispersiones de quitosano	35
2.3.2 Preparación de liposomas	35
2.3.3 Preparación de la asociación quitosano-liposoma	36
2.3.4 Caracterización de liposomas, quitosano y quitosomas	37
2.3.5 Determinación de monocapas de Langmuir.	38
2.3.6 Análisis Reológico de quitosano y su interacción con liposomas	34
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
3.1 Caracterización reológica de quitosano en dispersión acuosa	41
3.1.1 Análisis reológico de dispersiones de quitosano	42
3.2 Modelación del desempeño reológico de la asociación liposoma-quitosano ...	45
3.3 Determinación de la influencia de la relación masa/volumen en la interacción liposomas-quitosano teniendo como variable de respuesta el comportamiento fenomenológico.....	47
3.3.1 Método de inyección de etanol	47
3.3.2 Caracterización de liposomas, quitosano y quitosomas	48
3.3.3 Análisis de la asociación liposoma quitosano	53
3.3.4 Determinación de monocapas de Langmuir	56
3.3.5 Microscopía electrónica de barrido	61
3.4 Comparar el desempeño de la interacción de quitosano-Liposoma con ácido hialurónico-liposoma aniónico.....	62
CONCLUSIONES.....	64
RECOMENDACIONES	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pag.
1.1 Representación de la fosfatidilcolina conformada con una cabeza hidrófila unida con dos colas hidrocarbonadas hidrófobas	5
1.2 Lípidos anfipáticos en medio acuoso forman A: micela, B: liposoma C: Bicapa	7
1.3 Representación esquemática de la estructura de liposomas	12
1.4 Clasificación de biopolímeros según las principales vías de obtención	18
1.5 Estructura molecular de quitina	19
1.6 Estructura molecular de quitosano	20
1.7 Representación esquemática de una molécula anfifílica y su monocapa ordenada en la interfase aire-agua	26
1.8 Gráfico de una isoterma que presenta la evolución de la presión superficial con respecto al área media ocupada por cada molécula	27
2.1 Diagrama general de la metodología propuesta	33
2.2 Formación de liposomas (Laboratorio de Desarrollo de Procesos)	36
2.3 Malvern ZetaSizer (Laboratorio de Desarrollo de Procesos)	37
2.4 Cuba de Langmuir (Laboratorio Nacional de la Luz SINCROTRON)	38
2.5 Reómetro Anton Paar MCR Modelo 301	39
3.1 Potencial Z obtenido para las concentraciones de (0.10-1.00% m/v)	41
3.2 Comportamiento de la Viscosidad en función de la velocidad de corte Denotando el incremento de la viscosidad al aumentarla velocidad de corte	42
3.3 Efecto de la temperatura en la viscosidad y en la concentración de sólidos	44
3.4 Curva de flujo de comportamiento reológico de la interacción liposoma fosfatidilcolina de huevo (EPC) y fosfatidilcolina de soya (SPC) quitosano	46
3.5 Dispersiones de quitosano	47
3.6 Dispersiones de (A) SPC Y (B) EPC	47
3.7 Quitosomas de 0.20 (A), 0.25 (B) y 0.30 (C) relación másica	47
3.8 Quitosomas de 0.20 (A), 0.25 (B) y 0.30 (C) relación másica	47
3.9 Distribución de tamaño de partícula por intensidad para EPC	50
3.10 Distribución de tamaño de partícula por intensidad para SPC	50
3.11 Distribución de tamaño de partícula por número para EPC	51
3.12 Distribución de tamaño de partícula por número para SPC	51

3.13 Índice de polidispersidad para cada lípido	52
3.14 Tamaño de partícula para cada lípido	52
3.15 Distribución de tamaño de partícula por número para fosfatidilcolina de soya	54
3.16 Distribución de tamaño de partícula por número para fosfatidilcolina de huevo	
3.17. Isotermas de compresión para SPC teniendo como subfase agua y ácido acético	57
3.18 Isotermas de compresión para SPC teniendo como subfase quitosano	57
3.19. Isotermas de compresión para EPC teniendo como subfase quitosano	60
3.20. Isotermas de compresión para EPC teniendo como subfase agua y ácido acético	60
3.21 microfotografías obtenidas mediante microscopia electrónico de barrido A: Quitosano, B: SPC, C: EPC, D: EPC-0.10, E: EPC-0.25, F: EPC-0.30, G: SPC-0.10, H: SPC-0.25, I: SPC 0.30	61

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pag.
1.1	Efecto de la forma molecular de la estructura del agregado anfifílico (Lassic et al., 1998)	8
1.2	Nombres y estructuras de las cabezas polares de fosfolípidos	10
1.3	Composición química proximal en porcentaje (%v/v) en base seca del exoesqueleto de crustáceos (Pacheco-López, 2010)	20
2.1	Temperatura de transición y masa molecular de lípidos utilizados en este estudio	35
2.2	Concentraciones de quitosano y liposomas utilizados	36
3.1	Valores de los parámetros reológicos del modelo Herchel-Bulkley para dispersiones de quitosano a 5,25 y 37 °C	43
3.2	Parámetros reológicos para el modelo de Carreau	45
3.3	Tabla de resultados de la caracterización de liposomas fosfatidilcolina de huevo (EPC) y fosfatidilcolina de soya (SPC)	48
3.4	Caracterización de interacción liposoma-quitosano	53
3.5	Resumen de datos obtenidos de las isotermas para lípido SPC	58
3.6	Resumen de datos obtenidos de las isotermas para lípido EPC	59

NOMENCLATURA

Símbolo	Definición	Unidades
ADN	Ácido desoxirribonucleico	[-]
ARN	Ácido ribonucleico	[-]
DLS	Dispersión dinámica de luz	[-]
EIV	Inyección de éter vesículas	[-]
EPC	Fosfatidilcolina de huevo	[-]
FPV	Prensa francesa vesículas	[-]
G'	Modulo de almacenamiento o elástico	[Pa]
G''	Modulo de pérdida o viscoso	[Pa]
K	Índice de consistencia	[MPa s ⁿ]
T_m	Temperatura de transición	[°C]
K	Índice de consistencia	[Pa s ⁿ]
K_{HB}	Índice de consistencia de Herschel- Bulkley	[Pa s ⁿ _{HB}]
LUV	vesículas unilamelares grandes	[-]
MLV	vesículas multilamelares	[-]
PA	Ácido fosfatídico	
PC	Fosfatidilcolina	
PE	Fosfatidiletanolamina	
PG	Fosfatidilglicerol	
PI	Fosfatidilinositol	
PS	Fosfatidilserina	
REV	Preparación fase inversa vesículas de evaporación	
SUV	vesículas pequeñas unilamelares	
SPC	Fosfatidilcolina de soya	

LETRAS GRIEGAS

τ_0	Tensión de corte inicial	[Pa]
$\dot{\gamma}$	Tasa de corte o de deformación	[s ⁻ⁿ]
τ_{HB}	Tensión de corte	[Pa]
η_a	Viscosidad aparente	[Pa s]
η_0	Viscosidad inicial	[Pa s]
λ_1	Tiempo de relajación	[s]
λ_2	Tiempo retardado	[s]
μ	Viscosidad	[Pa s]
ζ	Potencial Zeta	[mV]

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el comportamiento fenomenológico del quitosano y su interacción con liposomas aniónicos.

Objetivos específicos

- Caracterizar reológicamente el quitosano en dispersión acuosa.
- Modelar el desempeño reológico de la asociación liposoma-quitosano
- Determinar la influencia de la relación masa/volumen en la interacción liposoma-quitosano teniendo como variable de respuesta el comportamiento fenomenológico.
- Comparar el desempeño de la interacción de quitosano-Liposoma con ácido hialurónico-liposoma aniónico.

INTRODUCCIÓN

Los liposomas constituyen hoy en día uno de los sistemas de administración más atractivos debido a su funcionalidad y versatilidad de empleo. Una de las ventajas de estos sistemas vesiculares es su composición, ya que los fosfolípidos son los constituyentes principales de todas las membranas celulares y son metabolizados por vía enzimática haciendo que su uso sea seguro desde el punto de vista inmunitario (Martínez-Ramírez, 2013).

Los lípidos forman estructuras membranosas cuando están en disolución acuosa; estas estructuras vesiculares altamente organizadas están constituidas por lamelas o bicapas lipídicas éstas fueron observadas en 1961 por Bangham y colaboradores. La ampliación de las aplicaciones en las que se utilizan liposomas es debido a que son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también las de carácter anfífilico. Además algunas de sus propiedades físicas como carga superficial, tamaño, permeabilidad y rigidez de la pared, o su capacidad de carga son fácilmente modulables (Ruano, 2013).

Existen diversos métodos para la producción de liposomas, como son el método hidratación de película delgada, evaporación inversa de fase, disolvente de inyección técnica, y la diálisis detergente. Las técnicas que han sido empleadas para ayudar a reducir el tamaño de las vesículas, son por ejemplo, sonicación, la extrusión a alta presión y microfluidización. Sin embargo muchos de estos métodos no son de fácil escalamiento industrial.

El método inyección de etanol es una técnica que ofrece ventajas como simplicidad, fácil implementación, reproducibilidad y no causa degradación y alteraciones oxidativas al lípido.

Recientes investigaciones han llevado a la utilización de nuevas tecnologías en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética para mejorar y prolongar los efectos terapéuticos mediante el uso de polímeros biodegradables que se han utilizado con éxito para encapsular proteínas, péptidos y liposomas.

Los polímeros biodegradables o biopolímeros se sintetizan generalmente por un organismo o planta y tienen una estructura química más compleja que la de los polímeros sintéticos. Muchas compañías farmacéuticas ahora, utilizan tecnologías de administración sostenida-controlada para mejorar los agentes terapéuticos existentes, simplemente mediante el control de la velocidad a la que entran en contacto con el torrente sanguíneo.

JUSTIFICACIÓN

Los liposomas son vesículas de bicapas lipídicas, han llamado la atención como transporte de drogas farmacéuticas, redes alimenticias y cosméticos teniendo como característica la capacidad de reducir la toxicidad e incrementar los efectos terapéuticos de algunos fármacos. Sin embargo las aplicaciones de los liposomas en liberación de fármacos se encuentran limitadas por presentar tiempos de circulación en sangre en periodos muy cortos. Uno de los principales medios de estabilización de los liposomas consiste en su recubrimiento con polímeros para su aplicación en diferentes terapias. Biopolímeros tales como el quitosano han sido utilizados en la fabricación y estabilización de liposomas recubiertos (Madrigal-Carballo et al., 2010)

El Quitosano derivado de la quitina es un biopolímero único que exhibe propiedades sobresalientes de biocompatibilidad y biodegradabilidad. La mayoría de estas propiedades peculiares surgen de la presencia de aminas primarias a lo largo de la columna vertebral de éste (Florence y Christine, 2013).

En la última década, muchos investigadores están tratando de modular las interacciones, desarrollar derivados de quitosano compatibles, que amplíen sus aplicaciones (Balan y Verestiuc, 2014).

Por lo anterior se considera importante realizar un estudio de la interacción entre el biopolímero Quitosano con el liposoma aniónico fosfatidilcolina de huevo (EPC por sus siglas en inglés) y fosfatidilcolina de soya (SPC por sus siglas en inglés) para evaluar el comportamiento fenomenológico de la nueva molécula generada (quitosoma).

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Lípidos

Los lípidos presentes en las membranas celulares combinan propiedades muy diferentes en una misma corriente molecular: cada lípido posee una cabeza hidrófila (que atrae agua) y una o dos colas hidrocarbonadas hidrófobas (que repelen el agua). Los lípidos más abundantes en las membranas celulares son los fosfolípidos, moléculas que se caracterizan por tener una cabeza hidrófila unida al resto del lípido mediante un grupo fosfato.

El tipo más frecuente de fosfolípido en la mayor parte de las membranas celulares es la fosfatidilcolina (PC, por sus siglas en inglés), que posee una pequeña molécula de colina unida a un grupo fosfato que actúa como cabeza hidrófila y dos cadenas hidrocarbonadas largas que actúan como colas hidrófoba (Fig. 1.1). Las moléculas con propiedades hidrófilas e hidrófobas se denominan anfipáticas. Esta característica química es compartida por otros tipos de lípidos de membrana, como los esteroides y los glucolípidos.

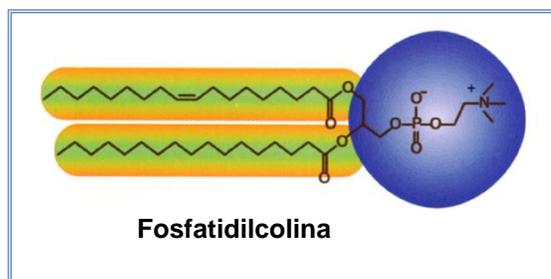


Figura.1.1 Representación de la fosfatidilcolina conformada con una cabeza hidrófila unida con dos colas hidrocarbonadas hidrófoba.

Las moléculas hidrófilas se disuelven con rapidez en el agua debido a que contienen átomos cargados o grupos polares, es decir grupos con una distribución desigual de cargas positivas y negativas; estos átomos pueden formar uniones electrostáticas o uniones hidrogenadas con moléculas de agua, las que también son insolubles en agua debido a que la totalidad (o casi la totalidad) de sus átomos están desprovistos de carga y son no polares (Aberts et al., 2004).

En función de las condiciones precisas y de la naturaleza de los lípidos se forman tres tipos de agregados lipídicos cuando los lípidos antipáticos se mezclan con agua, las miscelas son estructuras esféricas que contienen entre pocas docenas y algunos miles de moléculas antipáticas ordenadas con sus regiones hidrofóbicas hacia el interior, excluyendo el agua de sus grupos de cabeza hidrofílicos en la superficie, en contacto con el agua (Fig. 1.2).

La formación de miscelas esta favorecida cuando el área de sección transversal del grupo de cabeza mayor que las de las cadenas laterales acilo, tales como las de los ácidos grasos libres, lisofosfolípidos (fosfolípidos a los que les faltan un solo ácido graso) y detergentes como el dodecilsulfato de sodio.

Un segundo tipo de agregado lipídico en agua es la bicapa en la cual dos monocapas de lípidos forman una hoja bidimensional (Fig. 1.2). La formación de la bicapa tiene lugar fácilmente cuando la sección transversal del grupo de cabeza y las cadenas laterales acilo son similares, como en el caso del glicerolfosfolípidos y esfingolípidos. Las porciones hidrofóbicas de cada monocapa, excluidas del agua, interaccionan entre sí. Los grupos de cabeza hidrofílicas interaccionan con el agua en cada superficie de la bicapa. Dado que las regiones hidrofóbicas de sus extremos están en contacto transitorio con el agua, la hoja en bicapa es relativamente inestable y forma espontáneamente.

Un tercer tipo de agregado: se repliega sobre si misma formando una esfera vacía llamada vesícula o liposoma (Fig. 1.2). En la formación de vesículas, la bicapa lipidica pierde sus regiones extremas hidrofóbicas expuestas al agua, consiguiendo

máxima estabilidad dentro del entorno acuoso. Estas vesículas en bicapa encierran agua, creando un compartimiento acuoso (Nelson et al., 2005).

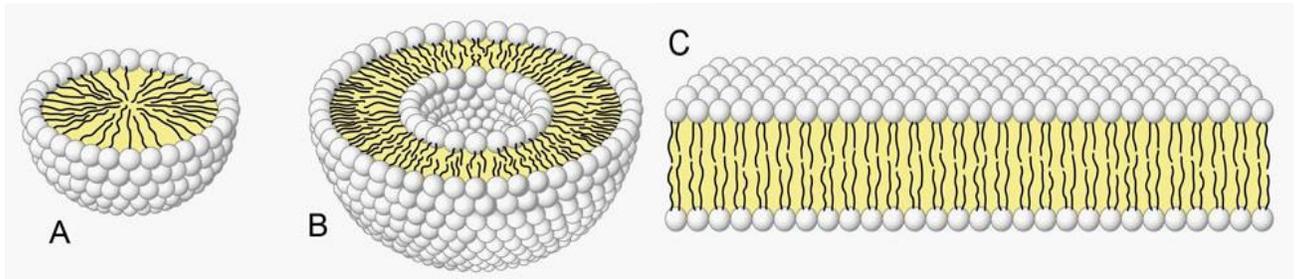
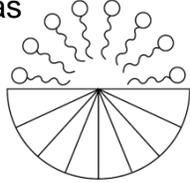
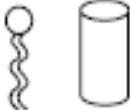
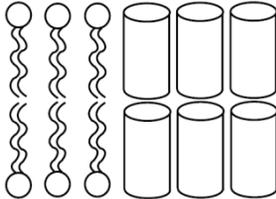
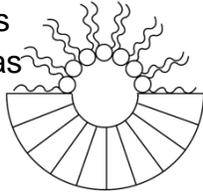


Figura 1.2 Lípidos anfipáticos en medio acuoso forman A: micela, B: liposoma C: Bicapa (Nelson et al., 2005).

Dependiendo de las configuraciones de los fosfolípidos o la mezcla de fosfolípidos los liposomas tenderán a formarse espontáneamente en determinados tamaños haciendo que el empaquetamiento en la membrana minimice las fuerzas hidrofóbicas de las colas del fosfolípido.

En la Tabla 1.1 se pueden observar las estructuras que forman las moléculas anfifílicas de acuerdo al tipo de lípido. Las moléculas de cono tienden a empaquetarse en estructuras con altos radios de curvatura, y en cono invertido las moléculas forman estructuras con gran curvatura negativa y las moléculas cilíndricas se organizan en bicapas planas. La combinación de las molecular cono y cono invertido puede resultar en la formación de una bicapa plana, esta bicapa puede ser inestable.

Tabla 1.1 Efecto de la forma molecular de la estructura del agregado anfifílico (Lassic, 1998)

ESPECIE DE FOSFOLIPIDO	FORMA	ORGANIZACIÓN
Jabones Detergentes Liso-fosfolipidos	Cono invertido 	Micelas 
Fosfatidilcolina Fosfatidilserina Esfingomiolina Dicetilfosfato	cilindro 	biliares 
Ácido Fosfatidico Colesterol Fosfatidiletanolamina Cardiolipin	cono 	Micelas Inversas 

1.2 Temperatura de transición de los liposomas

La temperatura de transición de fases o T_m [°C] de las membranas de los liposomas es un factor importante que determina el empaquetamiento de los fosfolípidos y su fluidez, en esta temperatura se tiene el mismo número de moléculas de fosfolípidos y su estado gel-sólido que en estado líquido-cristal.

Cuando se tienen bajas temperaturas los lípidos se encuentra en un estado (gel-sólido) a un estado desorganizado (líquido-cristal) donde las moléculas se mueven con mayor libertad.

La temperatura de transición depende de la naturaleza de la cabeza polar y la longitud de la cadena hidrocarbonada, un aumento en esta y el grado de saturación tiene como consecuencia un incremento en la temperatura de transición de fase T_m

1.3 Liposomas

Las vesículas esféricas cerradas llamadas liposomas, se obtienen mediante el agregado de fosfolípidos puros a un medio acuoso, la carga de los fosfolípidos puede ser neutro, aniónico o catiónico; el tamaño de los liposomas varía entre alrededor de 25 nm y 1 μm de diámetro. Los liposomas tienen un núcleo acuoso aislado por una o más bicapas de fosfolípidos o lamelas (Patil y Jadhav, 2014).

A continuación se presenta diferentes clasificaciones de los liposomas.

Clasificación de liposomas en función del número de bicapas:

- vesículas unilaminares (ULV, por sus siglas en inglés) con un tamaño aproximado 0.025-0.1 μm
- vesículas multilamelares (MLV, por sus siglas en inglés) con un tamaño aproximado 0.05-10 μm

Clasificación de liposomas en función del método

- Preparación fase inversa vesículas de evaporación (REV, por sus siglas en inglés) 0.5 μm
- prensa francesa vesículas (FPV, por sus siglas en inglés) 0.05 μm
- inyección de éter vesículas (EIV, por sus siglas en inglés) 0.02 μm

Clasificación de liposomas se describe en función de su tamaño

- vesículas unilamelares grandes (LUV, por sus siglas en inglés) 0.1 μm
- vesículas pequeñas unilamelares (SUV, por sus siglas en inglés) 0.025-0.05 μm .

Clasificación de liposomas según la carga de fosfolípidos:

- liposoma neutro
- liposoma aniónico

- liposoma catiónico

La descripción de los liposomas por el lamelaridad y tamaño son más comunes que por el método de su preparación (Vemuri y Rhodes, 1995).

1.4 Liposomas cargados

La carga superficial de un liposoma crea un campo eléctrico que afecta a la estructura de la bicapa, a su fluidez y al transporte de molecular a través de la membrana, esta carga superficial es muy importante en la estabilidad coloidal de los liposomas ya que los procesos de agregación y fusión de estos sistemas están controlados, en gran parte por la repulsión o atracción de sus superficies lipídicas.

La composición fosfolipídica de la bicapa marca la carga superficial de los liposomas. En la Tabla 1.2 se muestra la carga de las cabezas polares que es lo que proporciona la carga del mismo.

La agregación de liposomas neutros se produce por interacción de Van der Waals.

Tabla 1.2 Nombres y estructuras de las cabezas polares de fosfolípidos

Región polar	Nombre	Abreviatura	Carga
$-OH$	Ácido fosfatídico	PA	Negativa
$-CH_2CH_2N(-CH_3)_3$	Fosfatidilcolina	PC	Zwiteriónico
$-CH_2CH_2NH_3^+$	Fosfatidiletanolamina	PE	Zwiteriónico
$-CH_2CH_2NH_3^+ COO^-$	Fosfatidilserina	PS	Negativa
$-CH_2CHOHCH_2OH$	Fosfatidilglicerol	PG	Negativa
$-HC_6H_5(OH)_5$	Fosfatidilinositol	PI	Negativo

1.5 Métodos de obtención de liposomas

Existe una variedad de métodos reportados en literatura para la preparación de liposomas entre ellos el método hidratación de película delgada, evaporación inversa de fase, disolvente de inyección técnica, y la diálisis detergente. Algunas técnicas que han sido empleadas para ayudar a reducir el tamaño de las vesículas, son por ejemplo, sonicación, la extrusión a alta presión y microfluidización (Huang et al., 2014)

1.5.1 Métodos convencionales para la preparación de vesículas multilamelares (MLVs por sus siglas en inglés)

- Hidratación de una película de fosfolípidos bajo flujo hidrodinámico. Las MLVs se forman cuando una película seca de fosfolípidos de bicapas apiladas, es depositada sobre un sustrato, y se rehidrata bajo un flujo hidrodinámico por 2 de horas. La suspensión resultante contiene vesículas que son heterogéneas en tamaño y lamelaridad.
- Método disolvente de esfera. Mezclar fosfolípidos con un solvente orgánico con agua por 1 hora a bajo vacío, esto produce una emulsión de aceite-agua que contiene pequeñas esferas de disolventes que contienen lípidos. La fase orgánica es posteriormente se elimina por evaporación que resulta en la conversión de las esferas en MLVs con una distribución de tamaño estrecha.

1.5.2 Métodos convencionales para la preparación de pequeños y largas vesículas unilamelares (SUVs y LUVs por sus siglas en inglés).

- Método de evaporación inversa de fase. Implica la hidratación de fosfolípidos disueltos en un solvente orgánico, mediante la adición de agua con mezclado vigoroso., en este caso se forma una emulsión de agua en aceite y la evaporación del solvente orgánico resulta en una suspensión acuosa que contiene LUVs, así como MLVs. Concentraciones bajas de fosfolípidos en la

suspensión acuosa tiene una producción mayor de LUVs en comparación con MVLs

- Inyección de un solvente orgánico con una disolución de fosfolípidos en fase acuosa. Cuando un solvente orgánico (etanol o éter) contiene fosfolípidos disueltos es inyectado en un buffer acuoso a gran velocidad, forma espontáneamente SUVs.
- Método inyección de etanol una solución de etanol contenida con lípidos es inyectada en un medio acuoso de manera rápida sometido a agitación el etanol es disuelto en agua dispersando las moléculas de fosfolípidos, que se auto organizan en liposomas este procedimiento no presenta efectos de degradación ni de oxidación en los fosfolípidos (Pons et al., 1992).
- Diálisis de detergentes. Este métodos es comúnmente empleado para la preparación de LUVs, en este métodos los fosfolípidos son solubilizados en por las micelas de los detergentes en fase acuosa, posteriormente se remueve el detergente por diálisis y resulta en la fusión de fosfolípidos ricos en micelas y formación de LUVs (Patil y Jadhav, 2014).

Los tres tipos de liposomas, definidas como vesículas unilamelares, se muestran en la Figura 1.3, donde se puede observar que los SUVs (tamaño oscila entre los 25 y 50 nm) y los LUVs (alcanza hasta varios cientos de nm de tamaño), tienen en su bicapa lipídica una sola capa acuosa central. En cambio los MVL encierran entre sus bicapas diferentes espacios y cuentan con un espacio central compuesto por poblaciones heterogéneas. El diámetro de éstas oscila entre 0.4 μm y 10 μm . Estos últimos son los más sencillos de obtener y a partir de ellos se consiguen los unilamelares.

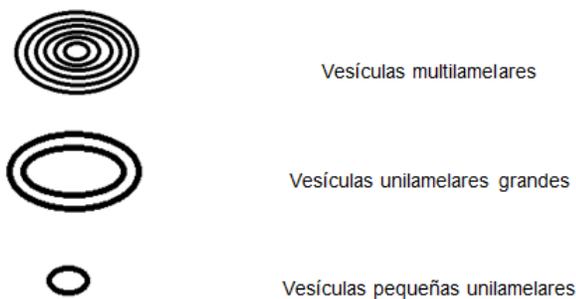


Figura 1.3 Representación esquemática de la estructura de liposomas

1.6 Caracterización fisicoquímica de liposomas

1.6.1 Carga superficial

La carga superficial de los liposomas es un parámetro importante que afectan a las interacciones electrostáticas entre liposomas y moléculas, partículas y superficies que lo rodean. Está controlado por la estructura cabeza del grupo de los lípidos y la composición de la fase acuosa tampón, incluyendo el pH y la fuerza iónica, de las dispersiones de liposomas. La carga de la superficie del liposoma es importante para determinar la estabilidad coloidal. También interacciones entre liposomas, biomoléculas y células, que define en gran medida bioestabilidad liposomal y rendimiento *in vivo*, se ven afectados por la carga superficial. El potencial zeta, definido como la caída de potencial electrocinético a través de la parte móvil de la doble capa eléctrica que rodea una esfera cargada en un campo eléctrico, se utiliza a menudo como una medida de la carga superficial.

1.6.2 Tamaño

El tamaño y la distribución de tamaño de los liposomas son características clave cuando los liposomas se aplican como sistemas de administración de fármacos. El tiempo de circulación de la sangre de liposomas depende del tamaño del liposoma y composición. El Tamaño de los liposomas se ha correlacionado con la acumulación de estos en tumores, debido a la permeabilidad mejorada y retención, efecto procedente de la vasculatura permeable así como la falta de drenaje linfático eficaz en ciertos tumores.

Los métodos más comúnmente utilizados para la investigación de tamaño liposomal y distribución de tamaño incluyen estática y dinámica, dispersión de la luz, cromatografía de exclusión por tamaños, fraccionamiento campo-flujo y ultra centrifugación. Diversas técnicas de microscopía, también han encontrado un uso para las mediciones de los liposomas de tamaño.

1.6.3 Permeabilidad

La permeabilidad de la bicapa lipídica es crítica cuando la aplicación de liposomas como vehículos de administración de fármacos dado que la permeabilidad influye en la liberación de fármacos solubles en agua; también es una propiedad clave cuando se usan liposomas como modelos de membranas biológicas. La permeabilidad se ve afectada por los factores de composición de lípido del liposoma y externos que abarcan temperatura, *pH* y fuerza iónica.

La máxima permeabilidad de liposomas se ha observado a la temperatura de transición de fase y la mayor eficiencia para la liberación de fármaco se encontraron para los liposomas en estado cristalino líquido en comparación con el estado de gel, La presencia de colesterol en la membrana de bicapa disminuye la permeabilidad (Franzen y Ostergaard, 2012).

1.7 Aplicación de los liposomas

Las aplicaciones de los liposomas han sido ampliamente investigadas en el área de encapsulación de fármacos, cosméticos etc. Dada su versatilidad como vía de encapsulación de moléculas y principios activos ya sean hidrosolubles o liposolubles los ha convertido en sistemas de gran interés, en el sector farmacéutico los liposomas utilizados están formados principalmente por fosfatidilcolinas. Este lípido es el principal componente de la membrana celular, por lo que los liposomas se difunden en los tejidos con mucha facilidad.

La liberación de fármacos constituye un campo importante tanto por la relación dosis/actividad, como la aplicación puntual del medicamento sin tener que recurrir a la invasión generalizada del organismo cuando solo sea necesario en un determinado punto del organismo. En principio, un sistema de liberación de fármacos

debe controlar el lugar apropiado para el principio activo y el momento adecuado de dosificación. En la actualidad, los nuevos sistemas de liberación de fármacos incluyen la optimización en la acción hacia los tejidos y de las formas de dosificación para conseguir una respuesta adecuada con mínimo efecto no deseable. Además se intenta que cubran otras necesidades como conseguir una liberación lenta de fármacos hidrosolubles, mejorar la biodisponibilidad de medicamentos poco solubles en disoluciones acuosas, desarrollar unos contenedores biodegradables y controlar la liberación de medicamentos tóxicos. Para conseguir este tipo de sistemas, las investigaciones actuales siguen tres criterios independientes: el tiempo de dosificación, el punto de aplicación y la sensibilidad al estímulo-respuesta. Además de tener en cuenta cualquiera de los criterios comentados, hay que tener en cuenta varios aspectos referentes a sus componentes y al método de preparación que se pueden resumir en los siguientes:

- Cuanto más elevada es la concentración del lípido, mayor es la proporción de la fase acuosa atrapada y además su vida media aumentará.
- El índice de encapsulación aumenta al realizar la hidratación lentamente.
- La adición de fosfolípidos cargados que hace más grande la distancia entre las membranas lipídicas, aumenta la cantidad de sustancia liposoluble que puede ser encapsulada en entre la bicapa lipídica

1.8 Polímero

Un polímero está hecho de miles de pequeñas unidades repetidas de monómeros. En una reacción de polimerización, los primeros productos son los dímeros (dos partes), después los trímeros, los tetrámeros, y finalmente, después de una serie de pasos de reacción los polímeros.

1.9 Polímeros naturales o biopolímeros

Los polímeros naturales pueden clasificarse en tres categorías:

1. Proteínas

Las proteínas son sustancias macromoleculares presentes en todas las células vivas. Alrededor del 50 % del peso seco del cuerpo humano se compone de proteínas. Las proteínas son los componentes estructurales principales de los tejidos animales; son parte fundamental de la piel, uñas, cartílagos y músculos. Otras proteínas catalizan reacciones, transportan oxígeno, sirven como hormonas para regular procesos corporales específicos y llevan a cabo otras tareas. Todas las proteínas se componen de los mismos bloques básicos de construcción, llamados amino ácidos.

2. Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son una clase de biopolímeros que son los portadores químicos de la información genética de un organismo. Los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) son moléculas cuyo peso molecular puede ir desde 6 hasta 16 millones de uma (unidad de masa atómica). Los ácidos ribonucleicos (ARN) son moléculas más pequeñas con PM del orden de 20,000 a 40,000 uma.

3. Polisacáridos

Carbohidratos son una clase importante de sustancias naturales que se encuentran en la materia tanto vegetal como animal. El nombre *carbohidrato* (hidrato de carbono) proviene de las fórmulas empíricas de casi todas las sustancias de esta clase.

Los polisacáridos están formados por la unión de muchos monosacáridos, sus enlaces son O-glucosídicos con pérdida de una molécula de agua por enlace. Estos polímeros pueden ser producidos por microorganismos (xantanas y dextranas), por plantas (ácido algínico, goma arábiga, celulosa, almidón), por mamíferos y crustáceos (heparina, glicógeno, quitina). Los polisacáridos más

importantes son el almidón, el glucógeno y la celulosa, que están formados de unidades de glucosa que se repiten.

Los polisacáridos también llamados *glucanos*, difieren en la naturaleza por sus unidades monosacáridas repetidas, la longitud de sus cadenas y el grado de ramificación.

Por lo cual estos polímeros pueden ser agrupados en:

- Homopolisacáridos: constituidos por un solo tipo de unidad monomérica. Unidos por enlace α tenemos el almidón y el glucógeno. Unidos por enlace β tenemos la celulosa y la quitina.
- Heteropolisacárido: esta clase de polímeros están formados por más de un tipo de monosacárido. Unidos por enlace α tenemos a la pectina, goma arábica y el agar.

Las funciones biológicas de los polisacáridos pueden ser de 2 tipos:

- Reserva energética (enlace α -Glucosídico)
Como almidón, el glucógeno y pectina (plantas.)
- Estructurales (enlace β -Glucosídico)
Como la quitina (insectos, crustáceos, hongos) y celulosa.

Los polisacáridos estructurales sirven esencialmente de elementos estructurales en las paredes y en las cubiertas de las células, en los espacios intercelulares y en el tejido conjuntivo, en donde dan forma y confieren elasticidad o rigidez a los tejidos animales y vegetales, así como protección y soporte a los organismos unicelulares.

De igual forma los polisacáridos se encuentran constituyendo los compuestos principales del exoesqueleto de muchos invertebrados. Por ejemplo, el polisacárido quitina, que es un homopolímero de N-acetil-D-glucosamina, con enlaces β (1-4), es el elemento orgánico principal en el exoesqueleto de los insectos y de los crustáceos. (Brown et al., 2014).

En la Figura 1.4 se clasifican los principales biopolímeros de acuerdo a sus principales vías de obtención a partir de: bacterias, microorganismos, animal, plantas.

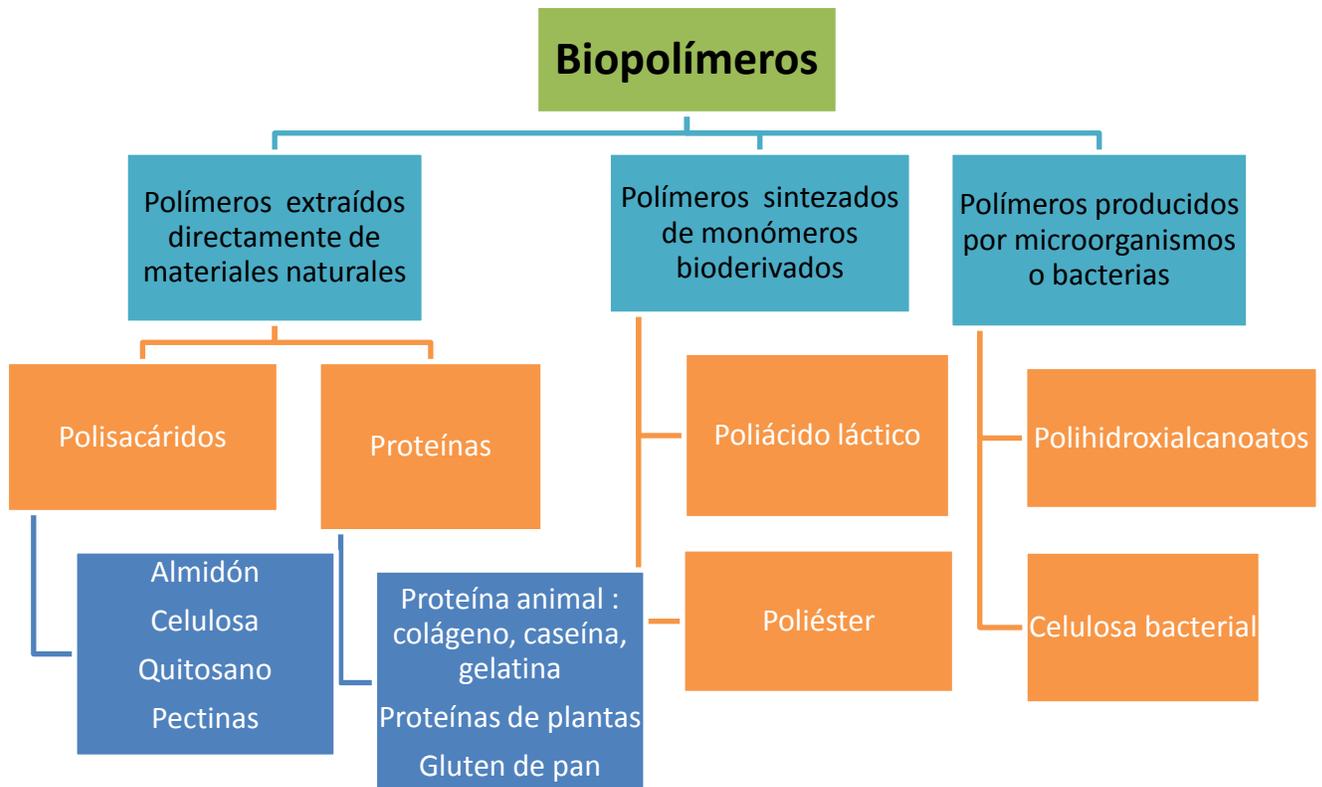


Figura 1.4 Clasificación de biopolímeros según las principales vías de obtención (Johansson et al., 2012)

1.10 Quitina y Quitosano

La quitina se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza. Sus fuentes principales son el exoesqueleto (caparazón) de muchos crustáceos, alas de insectos (escarabajos, cucarachas), paredes celulares de hongos, y algas, sin embargo el exoesqueletos de artrópodos es la fuente más accesible, en especial los crustáceos marinos como cangrejos y camarones ya que se encuentran disponibles como desecho de la industria marisquera presentando un peso molecular 1×10^6 a $2.5 \times 10^6 \frac{g}{mol}$, La estructura molecular de la quitina (Fig. 1.5). Presenta un grupo acetamida es un polímero de cadena lineal formado por poli[β -(1-4)-2 acetamida-2-desoxi-D-glucopirinoso].

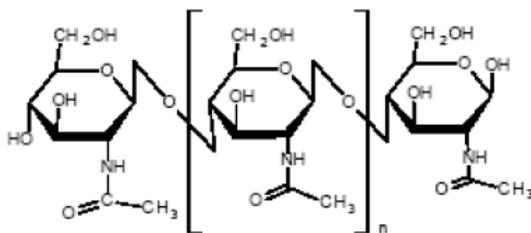


Figura 1.5 Estructura molecular de quitina

En la Tabla 1.3 se muestra la composición química proximal en porcentaje (%v/v) en base seca del exoesqueleto de crustáceo

Tabla 1.3 Composición química proximal en porcentaje (%v/v) en base seca del exoesqueleto de crustáceos (Pacheco-López, 2010).

Fuente de quitina	Especie	Proteína	Quitina	Ceniza	Lípidos
Cangrejo	<i>Collinectes sapidus</i>	25.1	13.5	58.6	2.1
	<i>Chionoecetes opilio</i>	29.2	26.6	40.6	1.3
	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	22.0	31.0	46.0	1.0
Camarón	<i>Pandalus borealis</i>	41.9	17.0	34.2	5.2
	<i>Cragon cragon</i>	40.6	17.8	27.5	9.9
	<i>Penaeus monodon</i>	47.4	40.4	23.0	1.3
Langosta	<i>Procamborus clarkii</i>	29.8	13.2	46.6	5.6
krill	<i>Euphausia superba</i>	41.0	24.0	23.0	11.6
Gamba		61.6	33.0	29.4	1.4

El quitosano es un polímero artificial de base biológica derivado de la quitina con un peso molecular de 5×10^3 a $1 \times 10^5 \frac{g}{mol}$, biodegradable, no tóxico y biocompatibles en la naturaleza, es el producto parcialmente desacetilado de la quitina, es un polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades de β -(1-4)-2desoxi-2-amino-D-glucopiranososa (D-glucosamina) y β -(1-4)-2-desoxi-2-acetomido-D-glucopiranososa (N-acetil-D-glucosamina) en la Figura 1.6 se presenta la estructura molecular; esta presenta una configuración helicoidal tridimensional estabilizada mediante enlaces de hidrogeno entre los monómeros que lo forman.

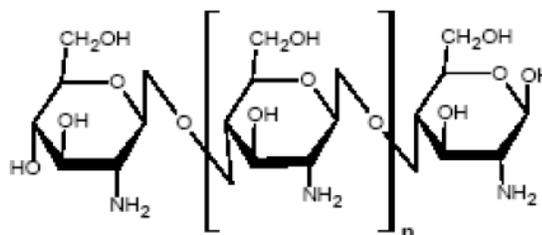


Figura 1.6 Estructura molecular de quitosano

Las ventajas de este biomaterial es tal que, puede ser fácilmente procesado para una variedad de aplicaciones biomédicas tales como la administración de fármacos.

La quitina y el quitosano son polímeros naturales amino-polisacáridos las características como su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad y baja toxicidad con versátiles actividades biológicas tales como actividad antimicrobiana y baja inmunogenicidad han proporcionado amplias oportunidades para un mayor desarrollo. Se ha convertido de gran interés no sólo como un recurso subutilizado, sino también como un nuevo biomaterial funcional de alto potencial en varios campos (Pillai et al., 2009).

1.11 Aplicación de quitina y quitosano.

La quitina y el quitosano poseen múltiples aplicaciones en diversas áreas como se enlistan a continuación:

- Alimentación/nutrición: conservación de alimentos, suplementos alimenticio, antioxidantes, prebióticos, clarificación de bebidas, agente emulsificante, agente estabilizante, fibra dietética, agente antigastritis, y encapsulador de lípidos.
- Ciencia de los materiales: hidrocoloides, electroquímicos, empaques, fibras textiles, membranas poliméricas, matrices de inmovilización y geles.
- Ciencia y medicina farmacéutica: encapsulamiento de medicamentos de liberación controlada contra enfermedades terminales, uso peridontal, anticoagulante regenerador de piel y hueso, suturas y lentes de contacto.
- Microbiología: antibacterial, antifúngico y bactericida.
- Inmunológica: modificación de respuesta biológica, inmunosupresor y estimulante.
- Agricultura: mecanismo de defensa en plantas, estimulación de crecimiento, recubrimiento de semillas fertilizantes y nutrientes del suelo.

- Tratamiento de aguas: remoción de iones metálicos, reductor de olores, eliminación de polímeros sintéticos fraccionadores.
- Cosméticos: humectante, tratamiento de acné y suplemento en tratamientos de cabello (Salazar-Alpuche, 2001).

1.12 Degradación del quitosano

La biodegradabilidad de la quitina y el quitosano está basada en que ambos son polisacáridos de origen natural. Se considera que existe una gran variedad de microorganismos en suelo y agua capaces de degradarlos. Algunos solamente degradan el quitosano mientras que otros degradan ambos polisacáridos. Los microorganismos degradadores de quitina son extremadamente comunes en el suelo. Se ha estudiado la degradación de películas de quitosano al ser expuestas al medio ambiente midiendo la pérdida en peso del mismo, resultando esta una degradación más rápida que la del celofán.

La quitina es degradada por quitinasas, las cuales se encuentran distribuidas en la naturaleza y en el sistema digestivo de muchos animales. La bacteria *Serratia marcescens* y *Enterobacter liquefaciens* son 10 veces más activas que *Aspergillus fumigatus* y *Streptomyces*. La quitinasa producida por *Serratia marcescens* puede ser purificada fácilmente.

1.13 Interacción liposoma-quitosano

Los liposomas, han ganado atención como portadores de fármacos, ya que pueden reducir la toxicidad y aumentar la eficacia terapéutica de varios medicamentos. Sin embargo, las aplicaciones de los liposomas en los sistemas de suministro de fármacos están bastante limitadas debido al tiempo de acción muy corto en la circulación sanguínea.

Recientemente, muchas investigaciones han demostrado que algunos polisacáridos como el quitosano, un homopolímero de (1,4) -unido 2-amino-2-desoxi- β -glucano hidrófobamente modificados se pueden asociar sus grupos hidrófobos modificados en la bicapa de fosfolípidos de los liposomas por interacción hidrófoba y formar una envoltura hidrofílica en la superficie del liposoma. Este nuevo tipo de liposoma, denominado polisacárido asociado con liposoma, ha atraído interés para sus siguientes ventajas en sistemas de administración de fármacos: la superficie del polisacárido hidrofílico no sólo puede aumentar la estabilidad física de los liposomas, sino también proporcionar una protección estérica para liposomas para escapar de la adsorción de opsoninas y la fagocitosis de macrófagos mono nucleares, prolongando así su tiempo de circulación en la sangre (Wang et al., 2010).

1.14 Microencapsulación

La micro encapsulación es una técnica mediante la cual pequeñas gotas líquidas, partículas gaseosas o solidas, se recubren con una pared polimérica porosa contenida una sustancia activa. El término micro encapsulación en la industria se refiere a la encapsulación de sustancias de bajo peso molecular, la selección de la técnica de micro encapsulación adecuada se rige por las propiedades físicas y químicas de núcleo y el recubrimiento. Los materiales de recubrimiento normalmente son materiales capaces de formar películas dependiendo del compuesto a encapsular.

1.14.1 Técnicas de encapsulación con quitosano

Las técnicas de micro encapsulación se dividen en dos, química y mecánicas.

- Procesos químicos: coacervación, co-cristalización, polimerización interfacial, gelación iónica, incompatibilidad polimérica Atrapamiento por liposomas, inclusión molecular
- Procesos mecánicos: secado por atomización, secado por congelamiento enfriamiento y extrusión

Las técnicas que han reportado resultados favorables son el secado por atomización y la extrusión.

El secado por atomización es el método de microencapsulación comúnmente empleado en la industria de los alimentos, este procedimiento implica la dispersión del material del núcleo en una solución de polímero, la cual puede ser una emulsión o dispersión posteriormente la mezcla es atomizada en una cámara de secado, procedimiento que conduce a la evaporación del solvente y por lo tanto, a la formación e microcápsulas sólidas.

La microencapsulación por extrusión es una técnica de múltiples etapas. Mediante esta técnica se obtienen partículas esféricas de tamaño uniforme. El procedimiento inicia con una etapa de granulación en donde se mezclan un agente bioactivo, estabilizadores y otros ingredientes con un aglutinante líquido normalmente agua, para formar una masa húmeda o pasta. Posteriormente se procede a la extrusión, los filamentos formados se vuelven esferas al cortarlos en longitudes iguales. Para concluir el procedimiento se procede a recoger las esferas húmedas para secarlas en un lecho fluidizado la temperatura y la presión empleadas en este procedimiento son normalmente menos de 100 *psi* y alrededor de 115°C. La funcionalidad de este técnica se basa en la capacidad del material encapsulante de solidificarse al contacto con los líquidos formando así una matriz que atrapa fácilmente al contenido del núcleo. En la industria de los alimentos este método es usualmente empleado para la encapsulación de sabores y prebióticos (Flores et al., 2013).

1.15 Caracterización de la asociación biopolímero-liposoma

1.15.1 Potencial Zeta

El potencial zeta es la medida electrocinética que envuelve efectos de movimiento y fenómenos electrónicos en dos capas de contra iones alrededor de la superficie coloidal para equilibrar de forma dinámica la distribución de cargas entre la superficie de la partícula y de la solución, mide la estabilidad de las partículas e indica que potencial se requiere para poder penetrar la capa de iones que rodea la partícula

para estabilizarla. Éste es una potencia electrostática que se localiza entre la separación de las capas que rodea la partícula. El modelo de la doble capa es usado para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y explica de qué manera actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. Este modelo se entiende como una secuencia de etapas que ocurren alrededor de un coloide negativo, si los iones que neutralizan sus cargas son repentinamente separados.

1.15.2 Dispersión dinámica de luz

Los liposomas se caracterizan determinando el diámetro medio y distribución de tamaño. Para llevar a cabo esta caracterización se emplea la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS, por sus siglas en inglés) se basa en la dependencia de fluctuaciones de intensidad de dispersión de la luz en función del tiempo, debido al movimiento Browniano de las partículas en suspensión, donde las partículas menores se difunden más rápido que las mayores haciendo que la velocidad de difusión varíe la intensidad de la luz. Las medidas son realizadas con un ángulo de 173° en relación al radio del laser incidente. Por medio de esta técnica se puede estimar el diámetro medio a través de la media ponderada entre diámetros hidrodinámicos y el total de la población de las partículas

1.15.3 Monocapas de Langmuir

La técnica de monocapas de Langmuir-Blodgett permite obtener películas delgadas homogéneas, de un determinado orden y espesor a nivel molecular, lo cual implica que se obtienen películas en las cuales se puede controlar su estructura a una escala de nanómetros. La técnica consiste en la deposición de monocapas ordenadas de un material orgánico formadas en la superficie de una subfase líquida sobre un soporte sólido, dando lugar a una multicapa de moléculas perfectamente ordenadas.

Funcionamiento de la técnica Para ello se dispone de una fase acuosa dispuesta en una balanza (cubeta rectangular construida en un material hidrofóbico) en cuya superficie se deposita una disolución de una sustancia orgánica anfifílica en un disolvente orgánico volátil.

Las moléculas de la sustancia anfifílica presentan grupos polares que se encuentran inmersos en la superficie de la fase acuosa y tienen colas hidrofóbicas que estarán fuera de dicha superficie dispuestas de forma aleatoria.

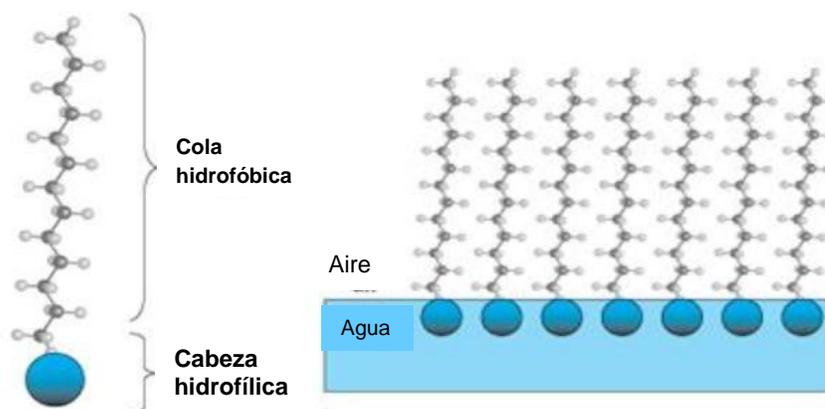


Figura 1. 7 Representación esquemática de una molécula anfifílica y su monocapa ordenada en la interfase aire-agua (González-Gutiérrez, 2012)

El disolvente se evapora y la sustancia orgánica se dispersa por toda la superficie de la fase acuosa, dando lugar a lo que se conoce como “gas bidimensional” debido a que las interacciones entre las moléculas son muy pequeñas y se puede considerar que cada molécula está aislada con respecto al resto como se observa en la Figura 1.7.

La balanza dispone en sus extremos de unas barreras que al cerrarse sobre la superficie de la fase acuosa comprimen las moléculas que se encuentran dispersas, de tal forma que se van ordenando dando lugar a lo que se conoce como monocapa de Langmuir. Al reducirse el área de la superficie disponible por la monocapa, las

moléculas se aproximan unas a otras de tal forma que empiezan a aparecer interacciones entre ellas. Estas interacciones intermoleculares laterales de tipo Van der Waals permiten que las moléculas se ordenen en la interfase aire-agua dando lugar a la monocapa de Langmuir. Cuando aparecen interacciones entre las colas hidrofóbicas, se produce un cambio en la pendiente de la isoterma, y se dice que se forma un “líquido bidimensional”.

Si las barreras continúan cerrándose, la presión superficial sigue aumentando llegando un momento en el cual se produce un nuevo cambio de pendiente de la recta de la isoterma (Figura 1.8) dando lugar a un estado conocido como “sólido bidimensional”.

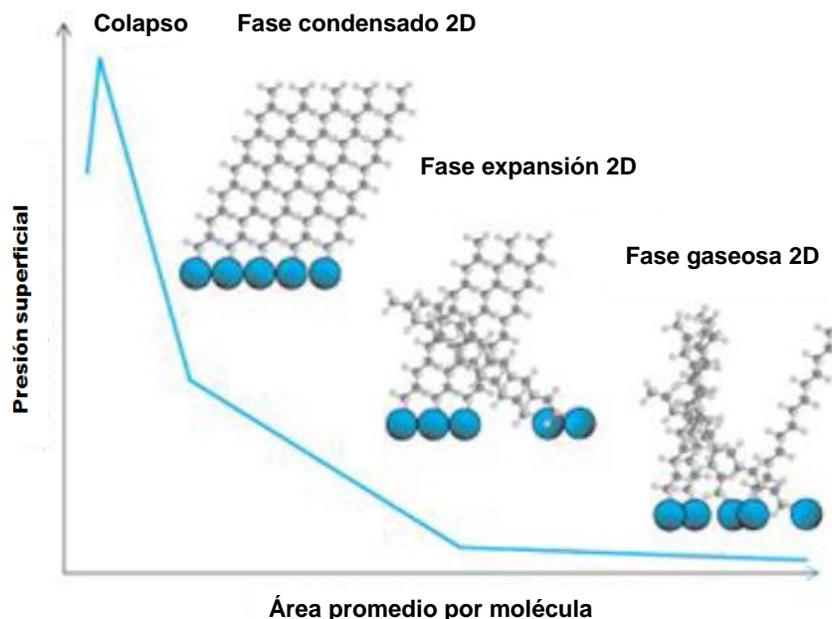


Figura 1. 8 Gráfico de una isoterma que presenta la evolución de la presión superficial con respecto al área media ocupada por cada molécula (González-Gutiérrez, 2012)

Si se continúa cerrando las barreras de la balanza se llega a un momento en el cual la compresibilidad se hace infinita, dicho fenómeno se conoce como colapso molecular. En esta fase de colapso las capas de moléculas se solapan, montándose unas encima de otras y dando lugar a capas desordenadas.

Cuando se ha formado la monocapa y se mantiene la presión dentro del rango de valores para los cuales la monocapa se encuentra en estado de sólido bidimensional, en la superficie de la fase acuosa se introduce perpendicularmente un sustrato sólido, de tal forma que se produce una transferencia de moléculas ordenadas desde la superficie de la fase acuosa a al sustrato sólido, manteniendo el orden.

Hay que tener en cuenta que dependiendo del carácter hidrofílico o hidrofóbico del material que constituye el sustrato la transferencia tiene lugar de una u otra forma. Si la superficie del soporte es hidrofílica, la fase acuosa moja la superficie sólida y se forma un menisco hacia arriba. Al sumergirse el soporte no se produce deposición, pero cuando sube, el menisco se va secando, dejando detrás una monocapa en la cual los grupos hidrofílicos están colocados de cara a la superficie hidrofílica. Al volver a sumergirse, el soporte será ahora hidrofóbico, con lo cual el menisco aparece hacia abajo y la segunda monocapa se depositará con las cadenas hidrofóbicas en contacto con las cadenas hidrofóbicas que se habían depositado en el sustrato, de tal forma que la cabeza hidrofílica queda hacia afuera

1.16 Reología

La ciencia de la reología incluye todos los aspectos del estudio de la deformación y el comportamiento del flujo de sólidos y líquidos, existen dos tipos de flujos:

- flujos newtonianos: la viscosidad es constante e independiente del esfuerzo de corte al cual se somete el fluido.

- flujos no newtonianos: la viscosidad depende del esfuerzo de corte aplicado. Se clasifican en:
 - *Fluidos pseudoplásticos*. Este tipo de fluidos se caracteriza por una disminución de su viscosidad al aumentar el gradiente de velocidad
 - *Fluidos dilatantes*. Son aquellos donde existe un aumento de viscosidad con el aumento de gradiente de velocidad

Dependiendo del tipo de fluido el comportamiento reológico puede ser estudiado en flujo estacionario y en flujo oscilatorio o dinámico:

- Comportamiento del flujo estacionario de los fluidos. Un sistema físico se encuentra en estado estacionario cuando las características del mismo no varían con el tiempo. Para un fluido newtoniano, a una presión y temperatura dado, únicamente es necesario conocer la viscosidad, en el caso de un fluido no newtoniano se debe obtener una curva de flujo o reograma, es decir, la dependencia funcional entre el esfuerzo de corte y la tasa de corte, y puede ser representados a través de los modelos de las ecuaciones 1,2 y 3:
 - *Modelo de Bingham*.

$$\tau = \tau_0 + \eta\dot{\gamma} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde τ_0 [Pa] es el esfuerzo limite necesario para producir fluencia. Por debajo de este esfuerzo, la viscosidad se considera infinita

- *Ley de potencia*.

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad \text{Ec. 2}$$

Donde K [Pa sⁿ] es el índice de consistencia y n es el índice de comportamiento reológico del flujo. Si n es menor que la unidad el fluido es pseudoplástico, y la viscosidad aparente disminuye con el aumento del esfuerzo. Si n es mayor que la unidad el fluido es dilatante y su viscosidad aparente aumenta al aumentar el esfuerzo.

- *Modelo de Herschel- Bulkley.*

$$\tau = \tau_{0_{HB}} + K_{HB} \dot{\gamma}^{n_{HB}} \quad \text{Ec.3}$$

Donde $\tau_0 [Pa]$ es el esfuerzo de corte inicial o punto cedente, el subíndice HB, indica para el modelo de Herschel-Bulkley.

- *Modelo de Carreau*

Este modelo contempla el comportamiento de toda la curva de flujo incorporando el concepto de tiempo característico, el índice de flujo y los valores de η_0 y η_∞ a valores γ muy pequeños y muy grandes

$$\frac{\eta}{\eta_0} = [1 + (\lambda\dot{\gamma})^2]^{\frac{n-1}{2}} \quad \text{Ec.4}$$

El modelo de Carreau representa acertadamente el comportamiento viscoso real de una solución polimérica.

1.17 Parámetros reológicos

Esfuerzo de Corte, $\tau [Pa]$: Resistencia del fluido al movimiento deslizante de sus capas cuando se aplica una fuerza en forma tangencial a su superficie laminar

Tasa de Corte, $\dot{\gamma} [s^{-1}]$: Diferencia entre las velocidades de dos capas dividida por la distancia que las separa.

Viscosidad, $\mu [Pa s]$: Resistencia que opone un fluido a ser deformado. En términos matemáticos es la relación de proporcionalidad entre el esfuerzo de corte y la tasa de corte. Cuando un fluido es no newtoniano y no lineal presenta una viscosidad

diferente para cada tasa de corte, esta es llamada viscosidad absoluta o aparente. La viscosidad plástica es generalmente explicada como la parte de la resistencia al flujo causada por fricción mecánica y es afectada por la concentración de sólidos, el tamaño y la forma de las partículas solidas y la viscosidad de la fase fluida.

Índice de Comportamiento, $n[-]$: Indica la desviación del comportamiento reológico del fluido con respecto a los fluidos newtonianos, es decir, mientras más se aleje el valor de n de la unidad más pronunciadas serán las características no newtonianas del fluido.

Índice de Consistencia, $K [Pa s^n]$: Caracterización numérica de la consistencia del fluido, es decir, es una medida indirecta de la viscosidad, pero sus unidades dependen de n . A medida que K aumenta el fluido se hace más espeso o viscoso (Bedoya, 2009).

1.8 Reología de quitosano

De acuerdo a los estudios realizados se determinó el comportamiento reológico de quitosano obtenido a partir de residuos de langosta determinando así que dicho biopolímero mostró un comportamiento Newtoniano esto se vio influenciado por la concentración de polímero, reflejando su utilidad para uso farmacéutico (De la Paz et al, 2013).

La modificación hidrofóbico de quitosano es una de las nuevas alternativas para determinar y manipular el comportamiento reológico como lo es una viscosidad reforzada, endurecimiento por deformación, etc. Estas propiedades brindan una variedad de aplicaciones tecnológicas como en la industria de productos farmacéuticos, textiles, papel entre otros. La variación de la concentración de biopolímero juega un papel importante en la el comportamiento reológico ya que a mayor concentración de este se presenta mayor interacción molecular y un incremento de la viscosidad (Shedge et al. 2014)

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos planteados, en este capítulo se describe la metodología empleada para llevar a cabo la interacción de liposomas con el biopolímero quitosano. En la Figura 2.1 se representa de manera esquemática la metodología experimental.

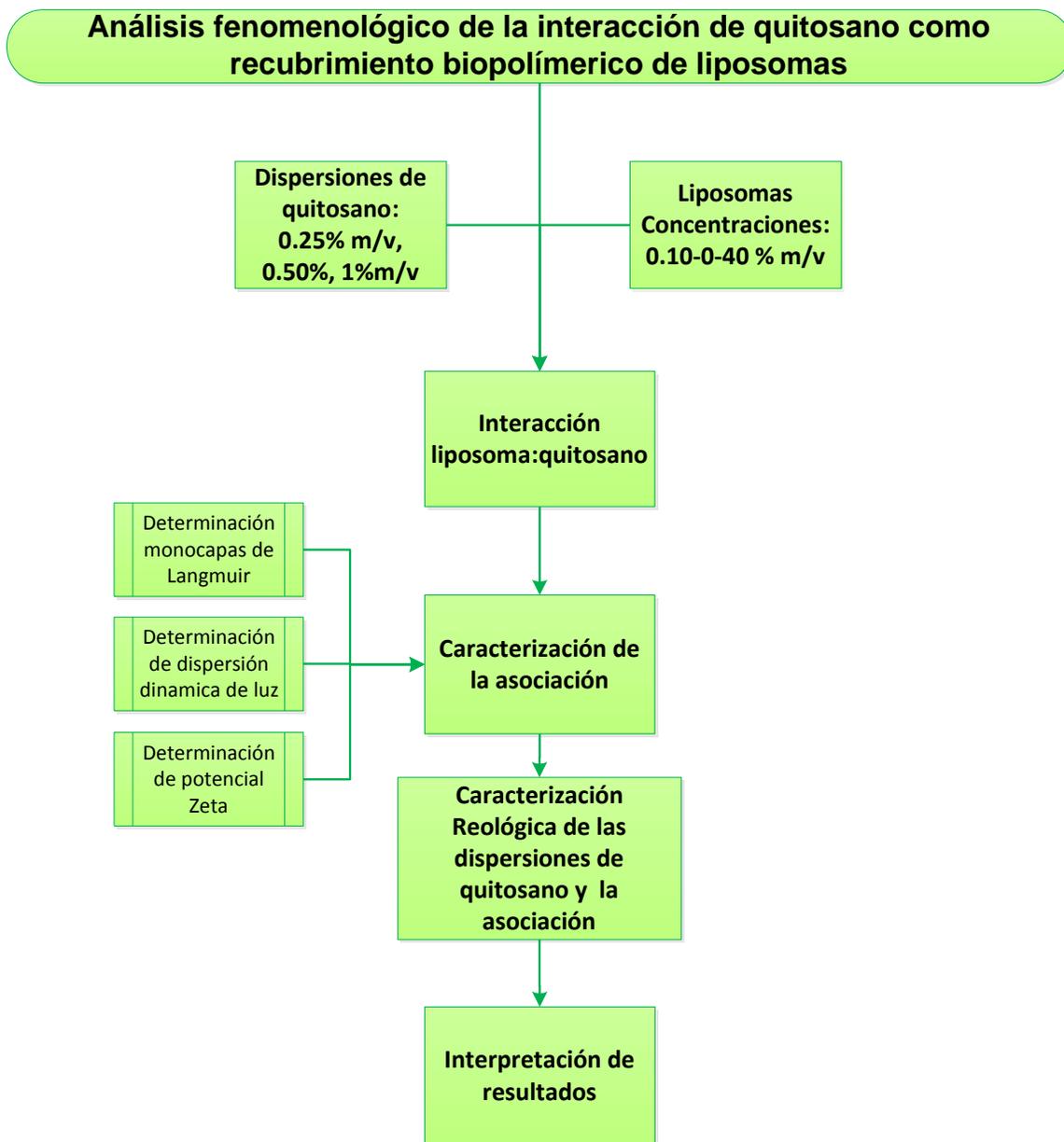


Figura 2.1 Diagrama general de la metodología propuesta

2.1 Materiales

Los materiales empleados para elaborar los liposomas fueron:

- LIPOID E80 (Lecitina de huevo) fosfolípido derivado de huevo con 80 % de fosfatidilcolina.
- LIPOID EPC-3 (3-ethylphosphocholine) fosfolípido derivado de huevo.

La elaboración y caracterización de los liposomas, dispersiones de quitosano y quitosomas se llevaron a cabo en la Facultad de Ingeniería Química en el Laboratorio de Nano y Biotecnología para Desarrollos Avanzados, y la Facultad de Ingeniería de Alimentos Laboratorio de Tecnología de Alimentos en el Laboratorio de Desarrollo de Procesos, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, los análisis de monocapas de Langmuir fueron realizados en el Laboratorio Nacional de la Luz SINCROTRON.

2.2 Equipos

Los equipos utilizados para la producción de liposomas por el método inyección de etanol, y la asociación fueron:

- Reactor de vidrio enchaquetado con tapa (Fabricado en el Instituto de Química/UNICAMP), de 140 mL.
- Baño ultratermostático Quimis
- Bomba Harvard
- Agitador mecánico IKA RW20 digital

Para la caracterización de los liposoma, quitosano y quitosomas producidos se utilizaron los siguientes equipos:

- Malvern ZetaSizer, modelo Nano-ZS
- Reómetro Anton Paar MCR 301.
- Cuba automatizada de Langmuir

2.3 Métodos

2.3.1 Elaboración de dispersiones de quitosano

Las soluciones de quitosano fueron preparadas a 3 concentraciones propuestas por Porras et al., 2008 0.25, 0.50 y 1.00 % relación masa volumen (m/v), en ácido acético 0.5% (v/v) y su pH se ajustó a 5.5 con una solución de NaOH 3 mol/L sometidos a agitación constante durante 24 horas a temperatura de 25° C.

2.3.2 Preparación de liposomas

Método de inyección de etanol

Los liposomas se obtuvieron a partir del método de inyección de etanol, disolviendo en etanol el fosfolípido, el sistema etanol agua se mantuvo a una proporción 10:90 v/v, posteriormente se sometió a sonicación durante 30 minutos a una temperatura superior a la temperatura de transición de lípido, esta solución fue bombeada mediante una bomba Harvard a un caudal de $10 \frac{mL}{min}$, a un reactor enchaquetado adaptado con deflectores y un agitador mecánico contenido con agua ultrapura a una velocidad de 1240 r.p.m., durante 5 minutos, las muestras se almacenaron durante 24 horas para su posterior caracterización. En la Tabla 2.1 se muestra la temperatura de transición de los lípidos utilizados para cada ensayo. Rodríguez-justo et al. (2011), Laouini A et al. (2013), Pham et al. (2011) utilizaron el método obteniendo resultados positivos.

Tabla 2.1 Temperatura de transición y masa molecular de lípidos utilizados en este estudio.

Lípido	Temperatura de transición [°C]	Masa molecular [g/mol]
LIPOID E 80	-8	~762
LIPOID EPC	-7	~770
PHOSPHOLIPON 80 H	55	~700



Figura 2.2 Formación de liposomas (Laboratorio de Desarrollo de Procesos-UNICAMP Brasil)

2.3.3 Preparación de la asociación Quitosano-Liposoma

La asociación Liposoma-Quitosano se realizó adicionando liposomas a quitosano gradualmente y agitando vigorosamente, en un reactor enchaquetado con deflectores se mantuvo una relación volumétrica equivalente, la temperatura fue una variable constante para cada ensayo siendo para cada liposoma superior a la temperatura de transición. En la Tabla 2.2 se muestra las concentraciones utilizadas para cada ensayo.

Tabla 2.2 Concentraciones de quitosano y liposomas utilizados

Concentración de quitosano	Concentración de liposomas
1% m/v	0.10 % m/v
	0.50 % m/v
	1.00 % m/v
0.5% m/v	0.10 % m/v
	0.50 % m/v
	1.00 % m/v
0.25% m/v	0.10 % m/v
	0.50 % m/v
	1.00 % m/v

2.3.4 Caracterización de liposomas, quitosano y quitosomas

- El potencial zeta es una medida dependiente de la movilidad electroforética de la partícula, que muestra una densidad de carga superficial y la estabilidad coloidal. Se determinó el potencial zeta de los liposomas obtenidos a partir de ensayos de inyección de etanol, de quitosano y de los quitosomas se utilizó Malvern Zetasizer Nano ZS equipos Figura 2.3.
- Determinación de dispersión dinámica de luz
Las partículas de liposomas y quitosomas fueron caracterizadas mediante la determinación de la distribución del tamaño y la polidispersidad por espectroscopía de correlación de fotones usando el equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS. Para todas las lecturas ángulo de incidencia se determinó a 173° y cuba DTS1060C. En todos los casos, la distribución del diámetro fueron evaluados por la intensidad de luz dispersada. Para cada partícula se especificó el material, agente dispersante, índice de refracción y temperatura.



Figura 2.3 Malvern ZetaSizer (Laboratorio de Desarrollo de Procesos)

2.3.5 Determinación de monocapas de Langmuir.

Monocapas de Langmuir es la determinación del espesor de película mono molecular formada en la superficie de una solución acuosa. Cuando se añaden pequeñas cantidades de moléculas anfifílicas disueltas en un solvente orgánico a la superficie acuosa, que se organizan en la interfaz agua-aire, el mantenimiento de la parte hidrófila inmerso en la molécula de agua y la parte hidrófoba dirigida al aire. Este espesor de la película mono molecular se produce en un recipiente poco profundo conocido como cuba de Langmuir, que está provisto de un sensor de tensión superficial y dos barreras móviles comprimiendo la monocapa formada en la superficie. Mediante la compresión de la monocapa formada en la interfaz, la densidad superficial de moléculas aumenta, así como el de la interacción entre ellos provocando el aumento de la tensión superficial generando isothermas de presión de la superficie y, a través de ellos, y las conclusiones sobre cómo se puede establecer la interacción entre las moléculas de monocapa.

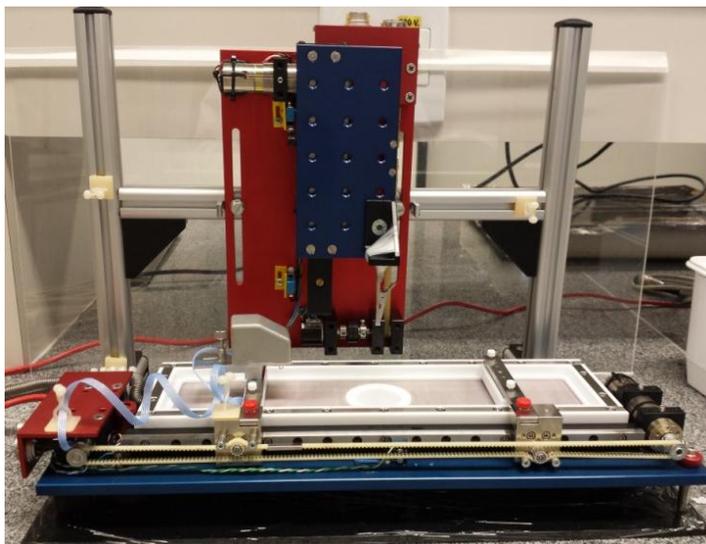


Figura 2.4 Cuba de Langmuir (Laboratorio Nacional de la Luz SINCROTRON)

2.3.6 Análisis Reológico de quitosano y su interacción con liposomas

Se realizó un seguimiento reológico en estado estacionario con una velocidad de corte de $0 \leq \dot{\gamma} \leq 100 \text{ s}^{-1}$, utilizando un reómetro Anton Paar MCR Modelo 301, a 3 relaciones másicas 0.20, 0.25 y 0.30, utilizando una geometría de cilindros concéntricos, a temperatura de 25°C los datos fueron registrados en el programa *Rheoplus* se analizaron los diferentes comportamientos reológicos.



Figura 2.5 Reómetro Anton Paar MCR Modelo 301

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización reológica de quitosano en dispersión acuosa

La determinación de diámetro promedio para la molécula de quitosano obtenido fue mayor a 3000 nm.

En la Figura 3.1 se observa que los valores obtenidos de potencial-Z , las moléculas de quitosano obtenidas son de carácter catiónico.

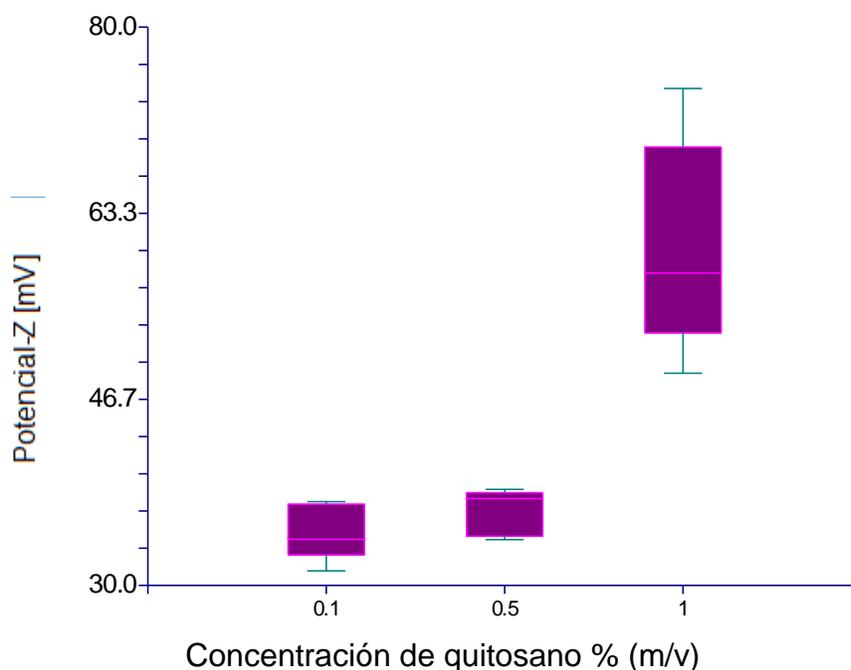


Figura 3.1 Potencial Z obtenido para las concentraciones de (0.10-1.00% m/v)

El carácter iónico de la molécula de quitosano a diferentes concentraciones se encuentra en un rango de +40 y +80 mV (Porrás et al., 2008), en los presentes resultados se obtienen para las mismas concentraciones valores de potencial Zeta que están dentro del rango presentados por dicho autor.

3.1.1 Análisis reológico de dispersiones de quitosano

Se realizaron corridas de las diferentes concentraciones de quitosano en un reómetro Anton Para modelo MCR 301 con geometría de paletas se caracterizó a 3 diferentes temperaturas: 5, 25 y 37°C ajustándose al modelo de Herschel-Bulkley (3.1)

$$\tau = \tau_0 + K(\dot{\gamma})^n \quad (3.1)$$

En la Figura 3.2 se observa el comportamiento dilatante de las isotermas de las diferentes concentraciones de quitosano ajustándose al modelo Herchel-Bulkley,

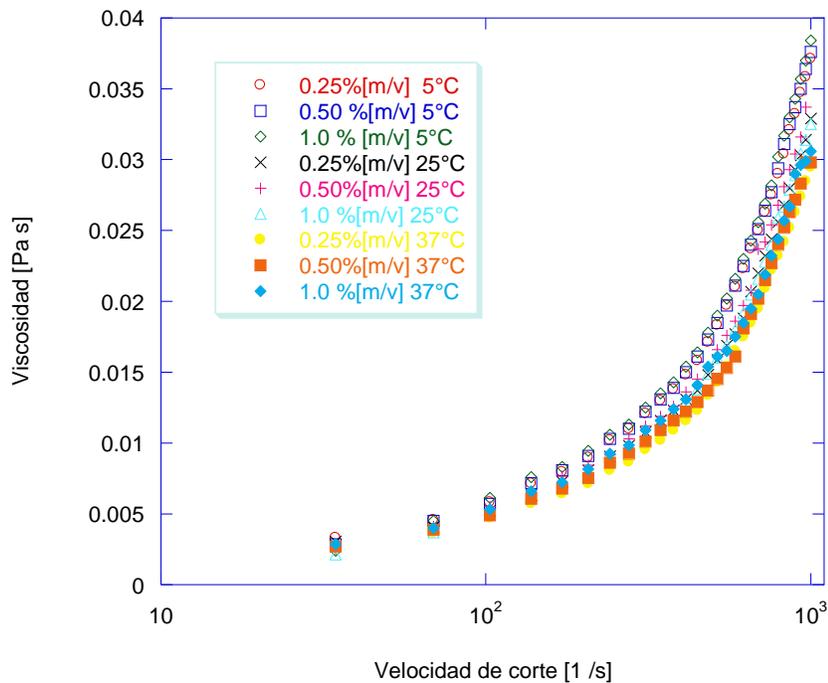


Figura 3.2 Comportamiento de la Viscosidad en función de la velocidad de corte. Denotando el incremento de la viscosidad al aumentar la tasa de corte.

En la Tabla 3.1 se presentan los parámetros del modelo matemático de Herchel-Bulkley, obteniendo para las tres concentraciones un ajuste (R^2) mayor a 0.99.

Tabla 3.1 Valores de los parametros reologicos del modelo Herchel-Bulkley para dispersiones de quitosano a 5,25 y 37 °C.

T [°C]	%[m/v]	Modelo $\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n$	R^2
5	0.25%	$\tau = 0.05729 + 8.4192x10^{-05}\dot{\gamma}^{1.8692}$	0.99262
	0.50%	$\tau = 0.1343 + 5.2528x10^{-05}\dot{\gamma}^{1.9442}$	0.99655
	1.00%	$\tau = 0.1260 + 6.0924x10^{-05}\dot{\gamma}^{1.9246}$	0.99578
25	0.25%	$\tau = 0.05531 + 7.5883x10^{-05}\dot{\gamma}^{1.8654}$	0.99047
	0.50%	$\tau = 0.11965 + 5.6777x10^{-05}\dot{\gamma}^{1.9099}$	0.99367
	1.00%	$\tau = 0.10279 + 4.7292x10^{-05}\dot{\gamma}^{1.9374}$	0.99577
37	0.25%	$\tau = 0.1202 + 4.1635x10^{-05}\dot{\gamma}^{1.9941}$	0.99571
	0.50%	$\tau = 0.11671 + 5.1018x10^{-05}\dot{\gamma}^{1.9145}$	0.99245
	1.00%	$\tau = 0.095197 + 7.3638x10^{-05}\dot{\gamma}^{1.8659}$	0.99469

Las dispersiones de quitosano presentaron un comportamiento no Newtoniano con características dilatantes es decir, la viscosidad aumenta con esfuerzo de corte ajustándose al modelo de Herchel-Bulkley, debido a su índice reológico, $n > 1$.

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la viscosidad en función de la concentración de sólidos. En la Figura 3.3 se observó que la viscosidad se vio influenciada por la concentración de sólidos, esto para las temperaturas de 5 y 37°C.

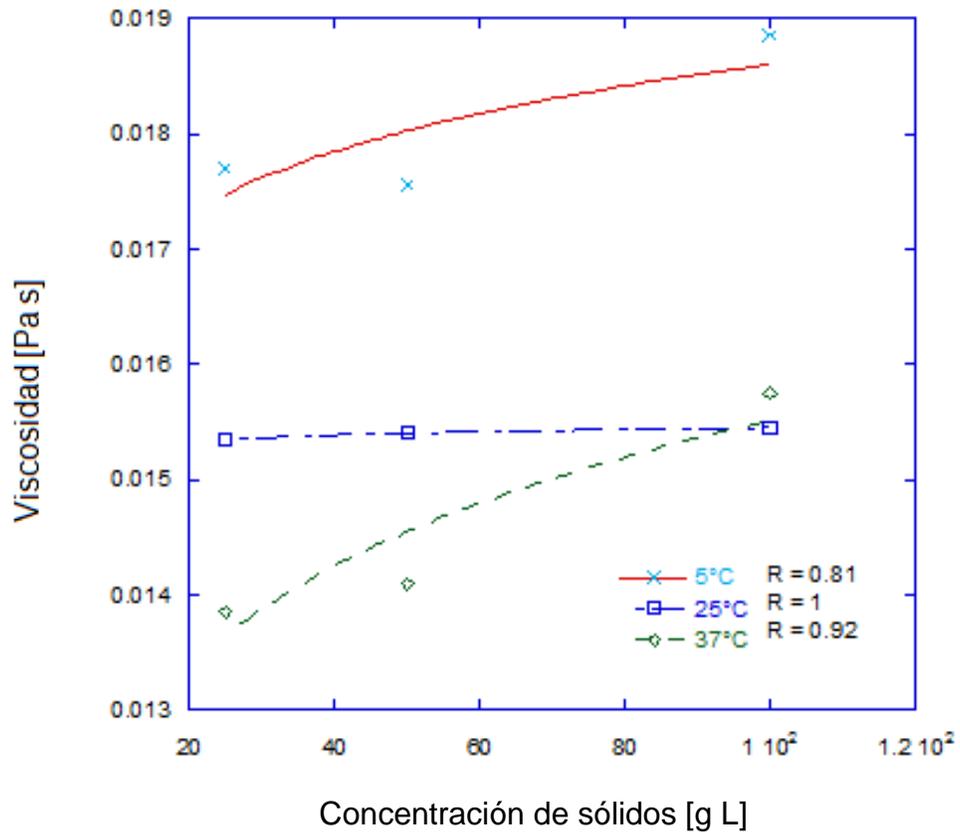


Figura 3.3 Efecto de la temperatura, en la viscosidad y en la concentración de sólidos.

3.2 Modelación del desempeño reológico de la asociación liposoma-quitosano

Se realizaron ensayos reológicos que se resumen en la Tabla 3.2 para las interacciones liposoma quitosano estas se ajustaron al modelo reológico de Carreau con una $R^2 \geq 0.95$ de acuerdo a (Núñez-Santiago, 2001) este modelo representa asertivamente el comportamiento de una solución polimérica.

Tabla 3. 2 Parámetros reológicos para el modelo de Carreau

Lípido	Relación másica	$n_0[pa s]$	$n_\infty[pa s]$	Modelo	R^2
				$\eta = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{(1 + (\lambda \cdot \dot{\gamma})^2)^n} + \eta_\infty$	
EPC	0.10	34.04	0.0185	$\eta = \frac{34.004}{(1 + (0.426 \cdot \dot{\gamma})^2)^{0.6}} + 0.0185$	0.97
	0.25	33.606	0.0186	$\eta = \frac{33.588}{(1 + (0.422 \cdot \dot{\gamma})^2)^{0.6}} + 0.186$	0.97
	0.30	123.32	0.0106	$\eta = \frac{123.3}{(1 + (1.358 \cdot \dot{\gamma})^2)^{0.592}} + 0.0106$	0.96
SPC	0.10	44.765	0.0183	$\eta = \frac{44.747}{(1 + (0.517 \cdot \dot{\gamma})^2)^{0.608}} + 0.0183$	0.97
	0.25	74.90	0.0165	$\eta = \frac{74.884}{(1 + (0.847 \cdot \dot{\gamma})^2)^{0.599}} + 0.0165$	0.95
	0.30	47.58	0.0183	$\eta = \frac{47.568}{(1 + (0.549 \cdot \dot{\gamma})^2)^{0.607}} + 0.0183$	0.98

De acuerdo a la naturaleza del fluido generado se considera una dispersión polimérica en la cual existen agregados suspendidos de fuerzas intermoleculares relativamente débiles y tienden a desagregarse cuando se somete a un campo de deformación es decir un esfuerzo de corte que de acuerdo a la Figura 3.4 se observa dicha deformación a bajos esfuerzos de corte y velocidad de corte, sin embargo a mayores velocidades de corte se inicia un proceso de degradación de las partículas rompiendo la interacción liposoma quitosano.

El comportamiento fue el mismo para todas las interacciones así como para quitosano de bajo peso molecular. Cabe resaltar que los esfuerzos y velocidades de corte aplicados provocaron la disociación de la interacción es decir las fuerzas ejercidas son mayores que las fuerzas intermoleculares que formaron la asociación

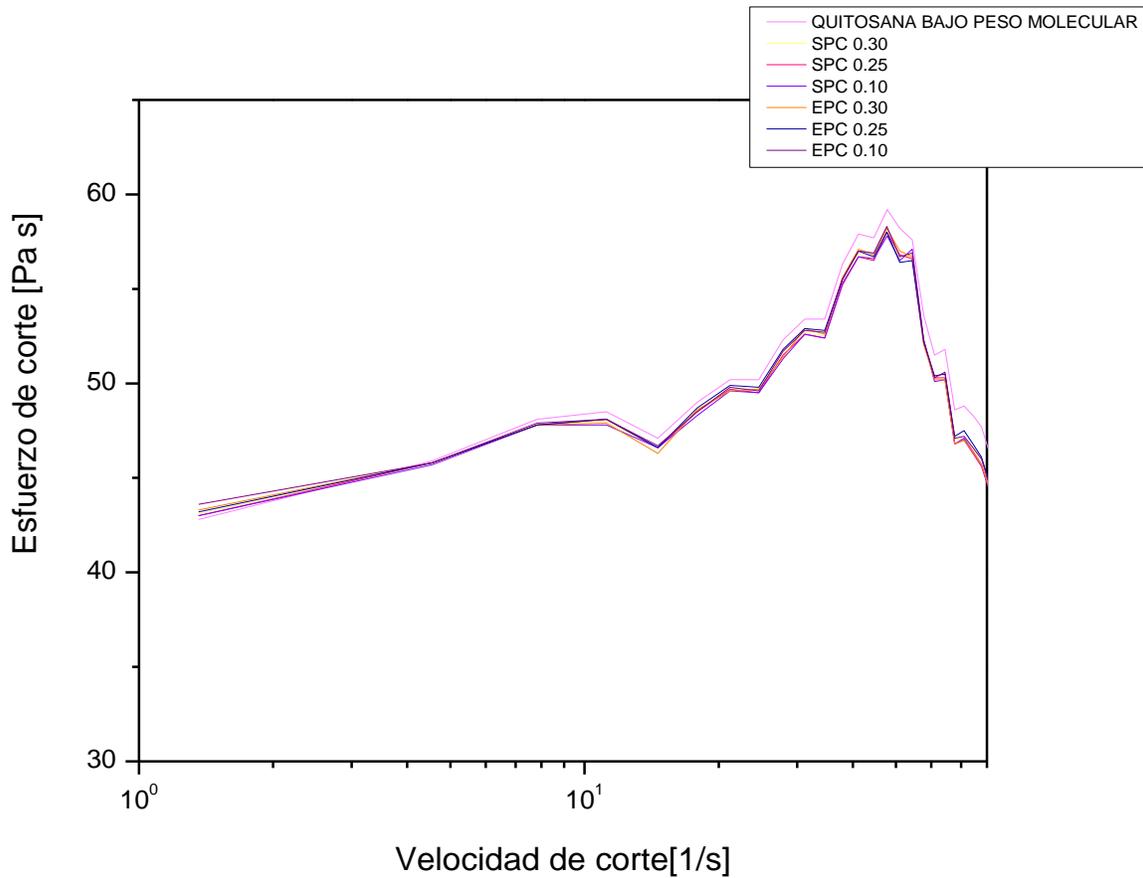


Figura 3.4 Curva de flujo de comportamiento reológico de la interacción liposoma fosfatidil colina de huevo (EPC) y fosfatidilcolina de soya (SPC) quitosano

3.3 Determinación de la influencia de la relación masa/volumen en la interacción liposomas-quitosano teniendo como variable de respuesta el comportamiento fenomenológico.

3.3.1 Método de inyección de etanol

Con el fin de estudiar la reproducibilidad de la técnica, cada experimento bajo las mismas condiciones se realizó por triplicado, realizando los análisis de caracterización 24 horas después de cada experimento obteniendo como resultado un índice de polidispersidad aceptable y tamaño de partícula adecuado para fines de esta investigación y altamente reproducible



Figura 3.5 dispersiones de quitosano

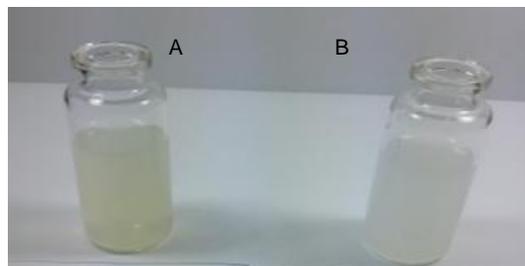


Figura 3.6 dispersiones de (A) SPC Y (B) EPC

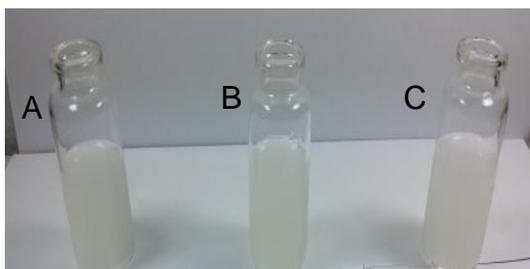


Figura 3.7 Quitosomas de 0.20 (A), 0.25 (B) y 0.30 (C) relación máxica

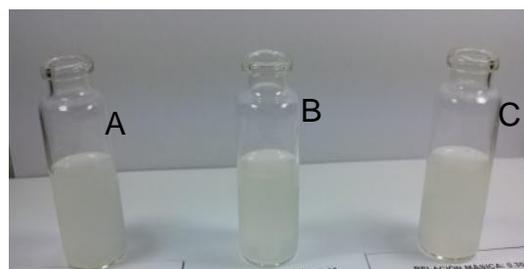


Figura 3.8 Quitosomas de 0.20 (A), 0.25 (B) y 0.30 (C) relación máxica

3.3.2 Caracterización de liposomas, quitosano y quitosomas

Diámetro hidrodinámico, polidispersidad y potencial zeta

Para validar el diámetro hidrodinámico se utilizó el índice de polidispersidad es un indicador de la distribución de partículas. En la Tabla 3.3 presenta los resultados obtenidos para cada lípido en términos de diámetro hidrodinámico medio (Z-Ave) e índice de polidispersidad (PDI), cada experimento fue repetido bajo las mismas condiciones 3 veces.

Tabla 3.3 Tabla de resultados de la caracterización de liposomas fosfatidilcolina de huevo (EPC) y fosfatidilcolina de soya (SPC)

Lípido	Concentración final [mM]	Z-Ave d.nm	PDI	ZP mV
EPC	4	398 ± 6.65^a	0.465 ± 0.007^a	-21.1 ± 4.12
	3	362.7 ± 5.38^a	0.311 ± 0.007^a	-26.3 ± 2.20
	2	417.7 ± 21.2^a	0.349 ± 0.092^a	-19.3 ± 4.51
SPC	10	214.5 ± 46.17^b	0.346 ± 0.104^a	-50.3 ± 2.63

^a no representa diferencia significativa entre las medias ($p > 0,05$) ^b representa diferencia significativa entre las medias ($p > 0,05$). Z-Ave: Diámetro medio de partícula, PDI: Índice de polidispersidad, ZP: potencial Zeta

En la Tabla 3.3 para el caso EPC (fosfatidilcolina de huevo) se obtuvo una variación no significativa de la desviación estándar para cada concentración analizada, obteniendo diámetros de partícula aceptables para este estudio y un índice de polidispersidad sin diferencia significativa para ambos lípidos confirmando una cuasi-monodispersidad en la suspensión coloidal de lípidos.

La carga superficial es generada principalmente por el fosfolípido, que no tuvo diferencia significativa en cada réplica. Valores negativos de potencial zeta indican que son lípidos de carácter aniónico, de acuerdo con (Lassic, 1998) partículas más

positivas que +30mV y más negativas que -30mV forman dispersiones estables, los resultados obtenidos para cada concentración de EPC demuestran que esta suspensión concentración de 3mM es eléctricamente más estable que las 2 y 4 mM. Sin embargo la suspensión de SPC es más estable que las anteriores.

En la Figura 3.9 y 3.10 se observa que la intensidad de dispersión de luz para el caso de EPC a concentraciones de 3 y 4 mM y SPC muestra dos distribuciones esto representa que hay diferentes tamaños de partículas que propician que exista dispersiones de luz diferentes, para el caso de la concentración de 2 mM obtenemos únicamente una dispersión de luz lo que refiere a una monodispersidad en la producción de liposomas.

En la Figura 3.11 y 3.12 observamos la distribución por número con respecto a tamaño de partícula, para el caso de EPC concentración 3 mM y 4 mM se observa un tamaño de partícula con una población menor a 500 nm, la concentración 2 mM muestra una pequeña población de diámetro mayor a 500 nm y la concentración 4 mM muestra una sola población de 500 nm. Para el caso de SPC presenta 3 poblaciones de diferentes tamaños de partícula.

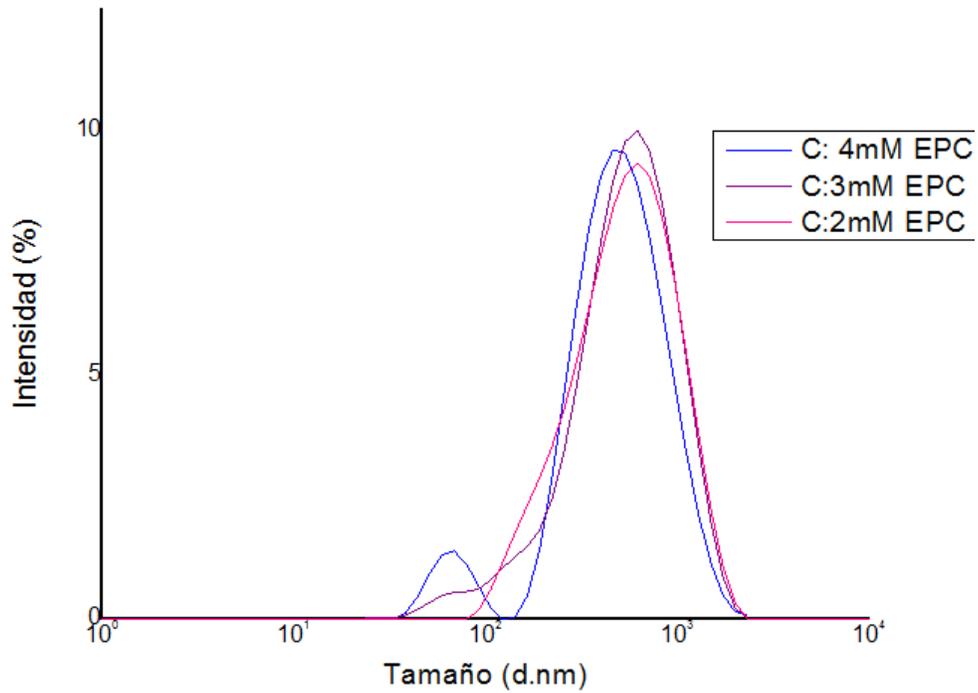


Figura 3.9 Distribución de tamaño de partícula por intensidad para Fosfatidilcolina de huevo (EPC)

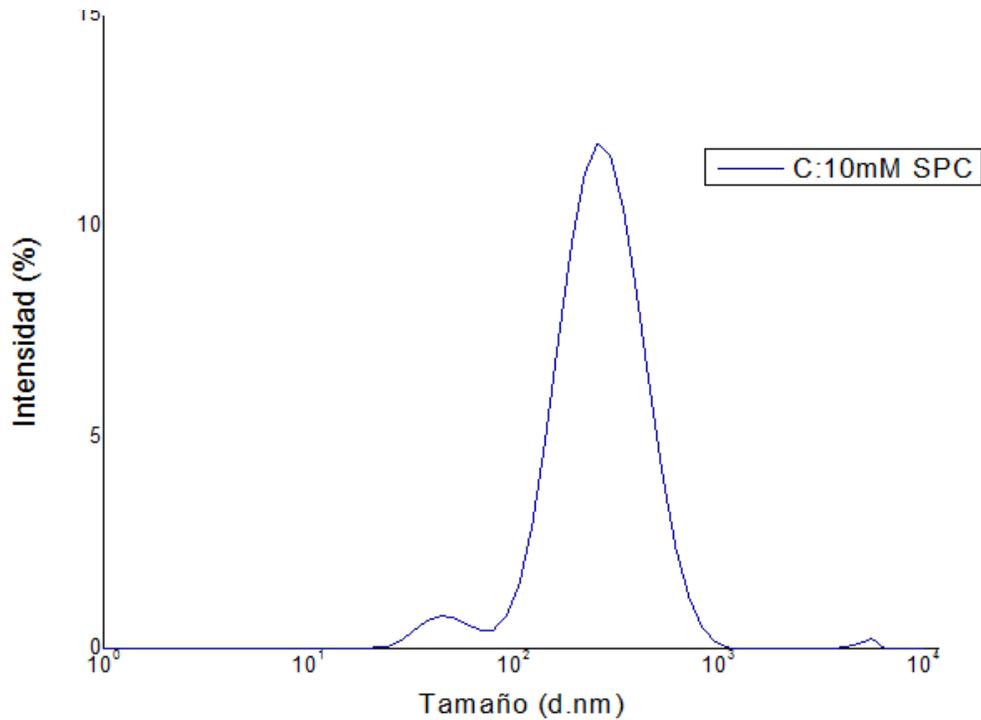


Figura 3.10 Distribución de tamaño de partícula por intensidad para Fosfatidilcolina de soja (SPC)

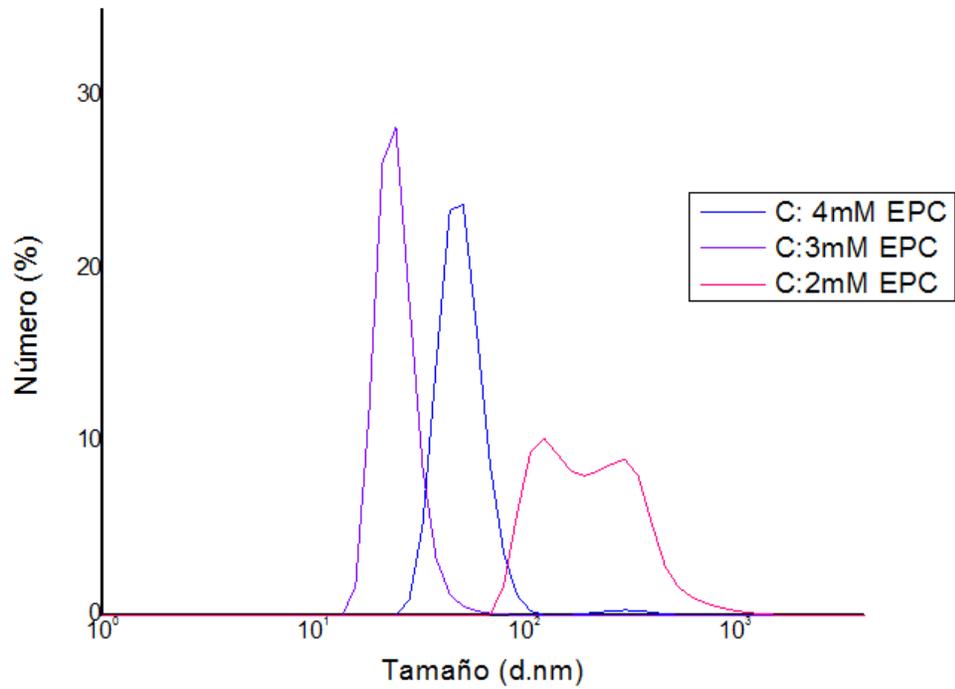


Figura 3.11 Distribución de tamaño de partícula por número para fosfatidilcolina de huevo (EPC)

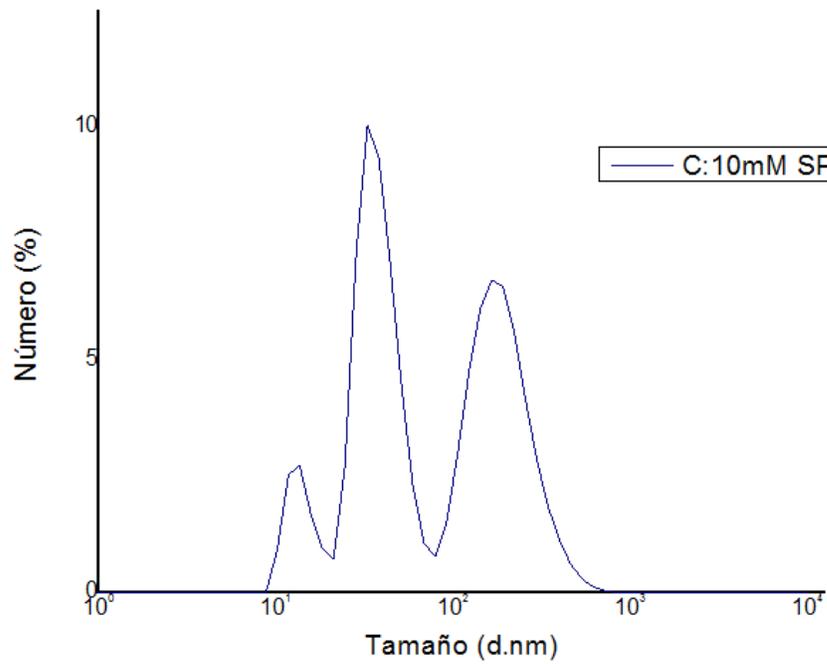


Figura 3.12 Distribución de tamaño de partícula por número para fosfatidilcolina de soja (SPC)

En la Figura 3.13 se muestra el índice de polidispersidad para cada lípido y respectiva concentración observando la variación de la desviación estándar para cada caso.

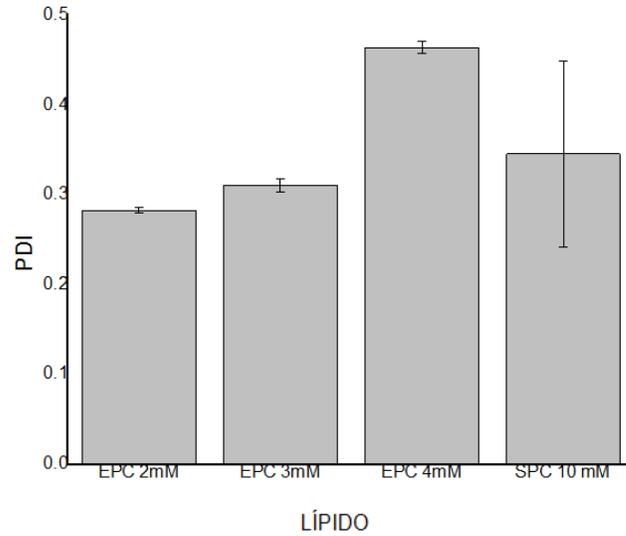


Figura 3.13 Índice de polidispersidad para cada lípido

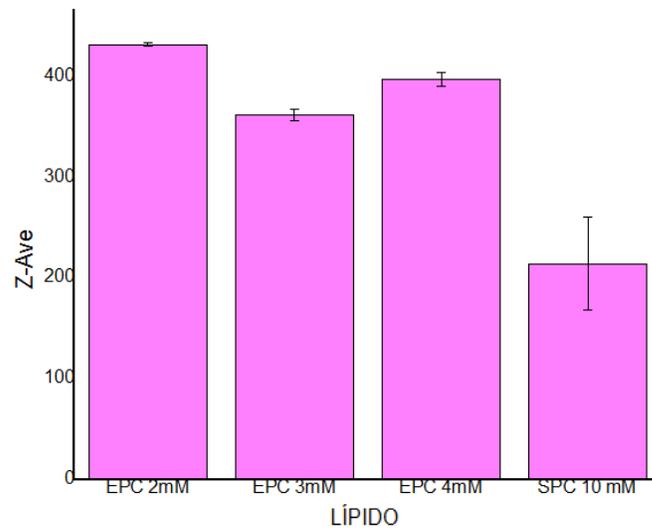


Figura 3.14 Tamaño de partícula para cada lípido

En la Figura 3.14 se comparan los resultados obtenidos de tamaño de partícula para cada lípido y concentración con la respectiva desviación estándar, observando una variación de tamaño de partícula con respecto a las diferentes concentraciones

trabajadas para fosfatidilcolina de huevo, teniendo tamaños de partícula de 362 nm hasta 417 nm, basándonos en los resultados para las 3 concentraciones lipídicas se procedió a la selección de una concentración para continuar con este estudio que fue 4mM.

El tamaño de partícula obtenido para fosfatidilcolina de soya se consideró aceptable para fines de este trabajo

3.3.3 Análisis de la asociación liposoma quitosano

Posterior a la producción de liposomas se llevo a cabo la interacción de liposoma quitosano se realizó su caracterización mediante la determinación de tamaño de partícula.

De acuerdo a los resultados obtenidos para la realización de la asociación se decidió trabajar con la concentración de 4mM para fosfatidilcolina de huevo y 10 mM para fosfatidilcolina de soya con 3 relaciones másicas.

En la Tabla 3.4 se compara los resultados obtenidos de acuerdo a [Lassic, 1998] obtuvimos suspensiones estables

Tabla 3.4 Caracterización de interacción liposoma-quitosano

LIPIDO-QUITOSANA	REL. MÁSICA	Volumen medio	SPAN [-]	ZP mV
SPC	0.10	18.17 ± 8.46 ^a	1.40±0.21	45.2 ±13.15
	0.25	13.22 ± 2.81 ^a	1.93± 0.57	49.77 ± 6.16
	0.30	5.55 ± 1.64 ^a	1.38± 0.13	47.7± 10.90
EPC	0.10	2.14 ± 0.18 ^a	1.29±0.030	51.8 ± 3.06
	0.25	2.48±0.32 ^a	1.17± 0.080	52.63± 5.10
	0.30	2.61 ±0.03 ^a	1.28± 0.05	49.23 ± 0.42

^a no representa diferencia significativa entre las medias ($p>0,05$).

En la Tabla 3.4 se resumen los resultados de la caracterización de los quitosomas generados con potencial eléctrico positivo para todas las relaciones másicas y ambos lípidos de acuerdo a los resultados obtenidos por Guo et al., (2003), el carácter catiónico del quitosano dio paso a la interacción mediante puentes de hidrogeno del polisacárido y cada fosfolípido aniónico. La estructura polimérica de quitosano permite la interacción de lípidos generando partículas más estables.

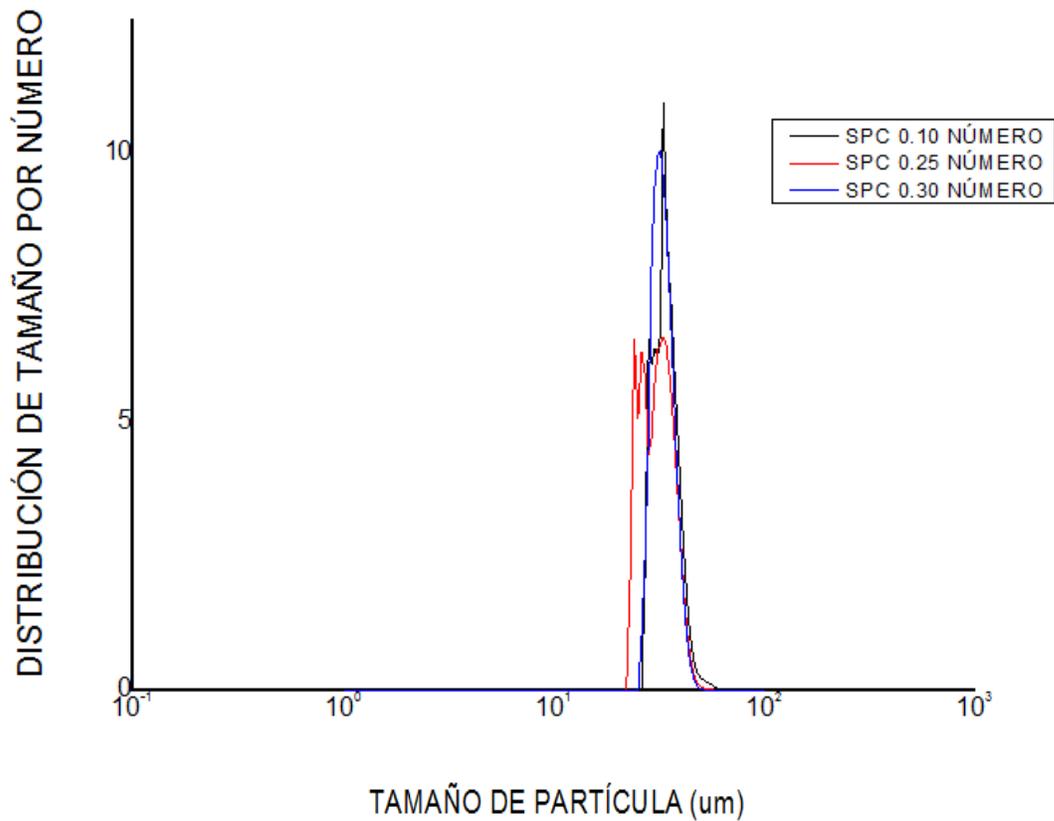


Figura 3.15 Distribución de tamaño de partícula por número para fosfatidilcolina de soya (SPC)

En la Figura 3.15 y 3.16 se representan gráficamente la distribución de tamaño de partícula por número para fosfatidilcolina de soya

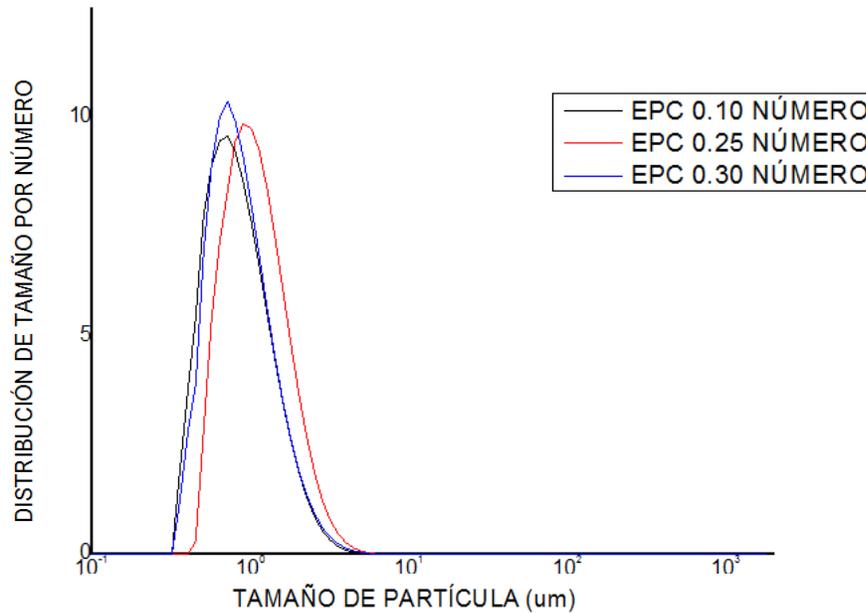


Figura 3.16 Distribución de tamaño de partícula por número para fosfatidilcolina de huevo

En la Figura 3.16 se observa la distribución de tamaño de partícula para fosfatidilcolina de huevo

En la Figura 3.15 se observa la misma distribución de tamaño para las relaciones másicas de 0.10, 0.25 y 0.30 % m/v, sin embargo para la relación másica de 0.10 y 0.30 se observa una distribución de tamaño por número uniforme es decir una sola población, caso contrario 0.25 para fosfatidilcolina de soya.

3.3.4 Determinación de monocapas de Langmuir

La interacción molecular entre los lípidos EPC Y SPC fue analizada mediante la técnica de monocapas de Langmuir, obteniendo el comportamiento fenomenológico mediante el análisis las isothermas obtenidas para las relaciones másicas de trabajo establecidas previamente, las isothermas de las monocapas relacionan la presión ejercida por las moléculas en la superficie del área que ocupan

En la técnica de monocapas de Langmuir se adicionaron a la subfase agua y ácido acético.

En la Figura 3.17 se observan las isothermas de lípido en subfase agua y ácido observando una presión de colapso mayor para la subfase agua sin embargo se considera que la subfase ácido aumenta la permeabilidad de la membrana disminuyendo la parte gaseosa de la monocapa, caso contrario para el agua.

De acuerdo a la Figura 3.18 se observa que al aumento de la concentración de quitosano aumenta la variación de la presión con respecto al área molecular es decir la membrana se condensa con el aumento de quitosano para la relación másica de 0.10 y 0.25, de acuerdo a la presión de colapso se consideran monocapas más estables para la relación másica de 0.10 y 0.25, observando una variación en la forma de la curva para la relación másica de 0.10 por lo que la parte gaseosa es menor con respecto a las otras relaciones másicas.

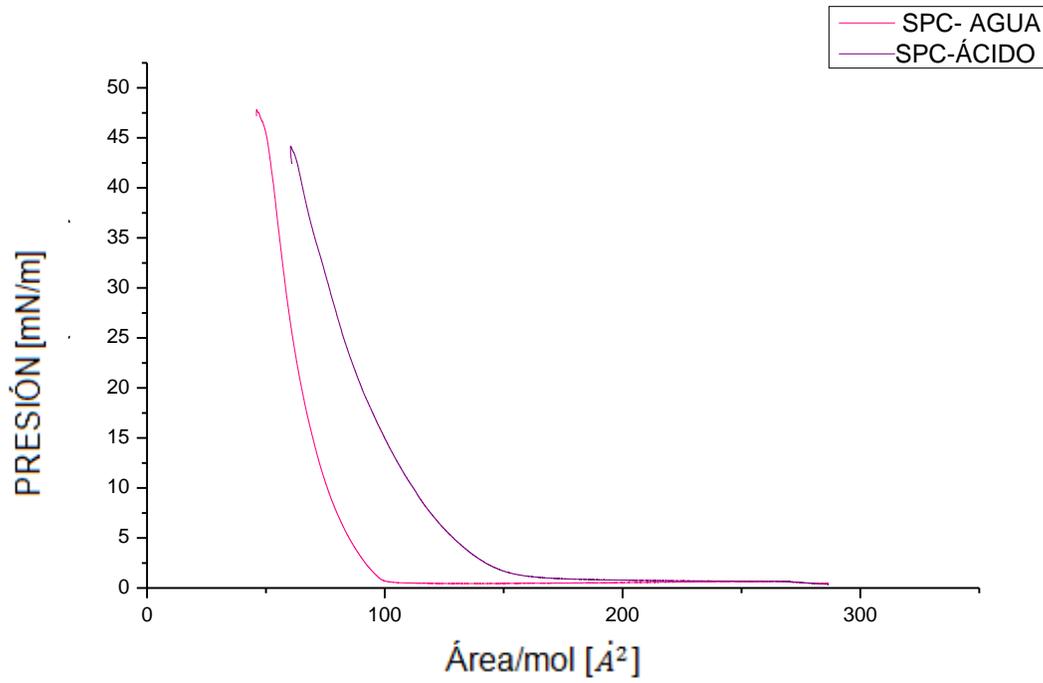


Figura 3.17. Isothermas de compresión para SPC teniendo como subfase agua y ácido acético

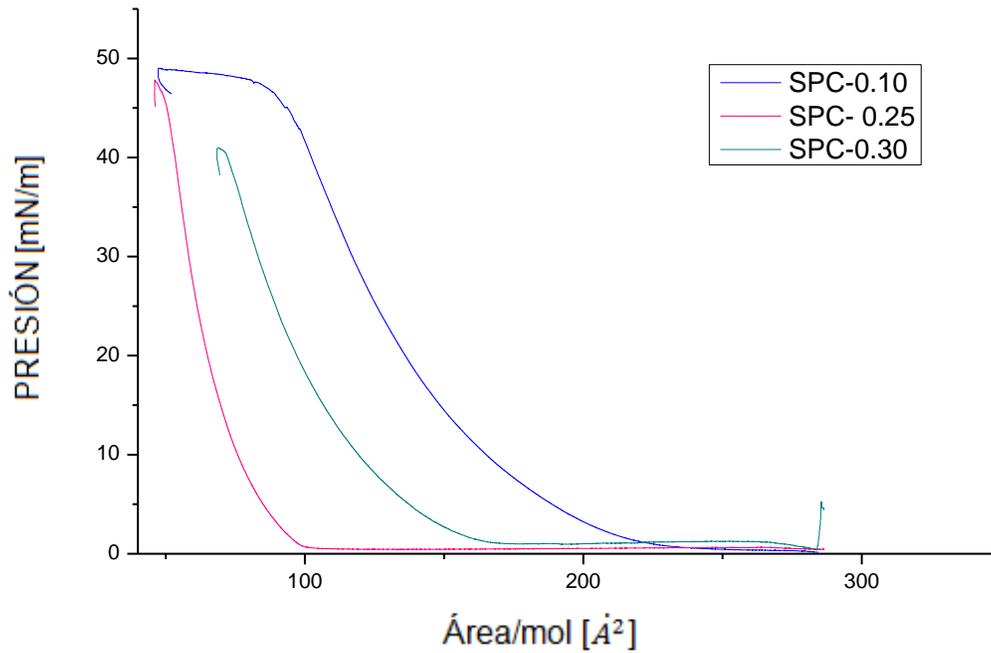


Figura 3.18 Isothermas de compresión para SPC teniendo como subfase quitosano

En la Tabla 3.5 se concentran los datos obtenidos de las isothermas analizadas para cada relación másica de fosfatidilcolina de soya teniendo como subfase quitosano, así como lípido con subfase agua y ácido acético.

Observando una variación mayor en la presión de colapso con respecto al lípido con subfase agua para el caso de 0.10, 0.25 es decir estas moléculas se consideran más estables

Tabla 3.5 Resumen de datos obtenidos de las isothermas para lípido SPC

LIPIDO	REL.MAS ICA	π_{col} [m N/m]	Cambio de área	$C_s^{-1} = -A \frac{d\pi}{dA}$ $\pi = 30$	$C_s^{-1} = -A \frac{d\pi}{dA}$ $\pi = 10$	Área molecular limite [Å/ molecula]
SPC-HAc	-	47.8222	148.65	63.44	38.76	46.0718
SPC-Agua	-	44.1491	150.61	106.56	49.82	60.3322
	0.10	48.9848	195.71	72.49	41.08	47.3150
SPC	0.25	47.8222	267.07	107.94	49.82	46.0718
	0.30	40.8972	202.95	70.61	38.81	68.4496

π_{col} : Presión de colapso, C_s^{-1} : modulo de compresión

El cambio de área es significativamente mayor con respecto a la monocapa es decir se obtuvieron isothermas más expandidas para las 3 relaciones másicas de trabajo es decir esto comprueba la existencia de la interacción con el quitosano contenido en la subfase, teniendo una presión de colapso de $\pi = 10$ se obtuvieron los valores para el modulo de compresión en este punto considerado como la fase expandida de las isothermas esta fase no es completamente desordenada como en un sistema tridimensional, ya que las moléculas exhiben una orientación preferencialmente perpendicular relativa a la superficie aumentando la densidad molecular, para luego pasar a la fase más ordenada, líquido condensado, atravesando una región de coexistencia de fases. Calculando el modulo de compresión con una presión de colapso de $\pi = 30$ a esta presión un punto comparativo con un sistema

tridimensional. En la Tabla 3.6 se resumen los datos obtenidos de las isothermas para cada ensayo, teniendo datos como presión de colapso π_{col} , cambio de área, modulo de compresión C_s^{-1} para presión de 10 [m N/m] presión a la cual se considera la fase expandida de cada sistema y para presión 30 [m N/m] punto en el cual obtenemos una comparación con un sistema tridimensional y área molecular límite.

Tabla 3.6. Resumen de datos obtenidos de las isothermas para lípido EPC

LÍPIDO	REL.MAS ICA	π_{col} [m N/m]	Cambio de área [Å^2]	$C_s^{-1} = -A \frac{d\pi}{dA}$ $\pi = 30$	$C_s^{-1} = -A \frac{d\pi}{dA}$ $\pi = 10$	Área molecular limite [Å^2 / molecula]
EPC-HAc	-	39.2159	163.01	63.44	38.76	82.6577
EPC- Agua	-	50.1979	106.48	106.56	50.59	68.1780
	0.10	47.5189	232.06	91.35	47.27	88.9260
EPC	0.25	43.3572	101	87.12	64.48	148.6627
	0.30	45.5307	171.87	82.02	48.93	81.1533

π_{col} : Presión de colapso, C_s^{-1} : modulo de compresión, π : presión

De la Tabla anterior resalta la influencia de quitosano como subfase en la membrana para EPC-0.30 obteniendo para la fase expandida un comportamiento similar a EPC-0.10 mostrando para el mismo comportamiento para presión de colapso y área molecular límite, comportamiento contrario al de SPC.

En la Figura 3.19 se observa el comportamiento de EPC con agua y ácido como subfase observando una ascenso o cambio área en 106.48 Å^2 para la subfase agua y en subfase ácido acético en 163.01 Å^2 mostrando una membrana más expandida para la subfase de ácido denotando que el ácido acético contribuye a una mayor permeabilidad en la membrana, en la Figura 3.19 se compara el comportamiento de SPC a relación másica 0.10, 0.25, 0.30 teniendo como subfase quitosano la forma de la isoterma no cambia con la diferentes relaciones másicas sin embargo existe una variación de las presión de colapso para y en la expansión de las membranas.

En la Figura 3.20 para el caso de SPC-0.30 es un sistema menos condensado con respecto a las otras isothermas, existe una tendencia de aumento de $\frac{d\pi}{dA}$ es decir la membrana aumenta su rigidez con el aumento de la concentración de quitosano.

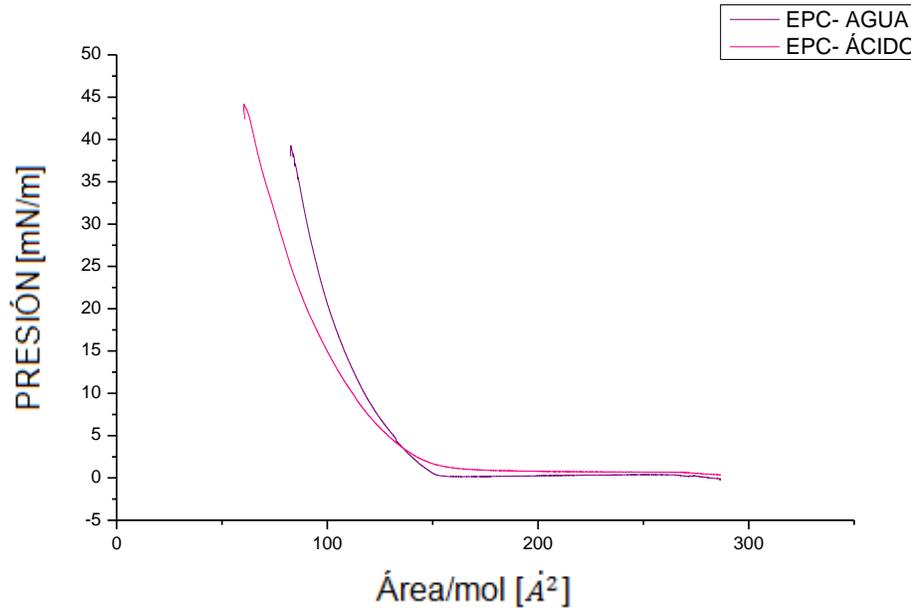


Figura 3.19. Isothermas de compresión para EPC teniendo como subfase quitosano

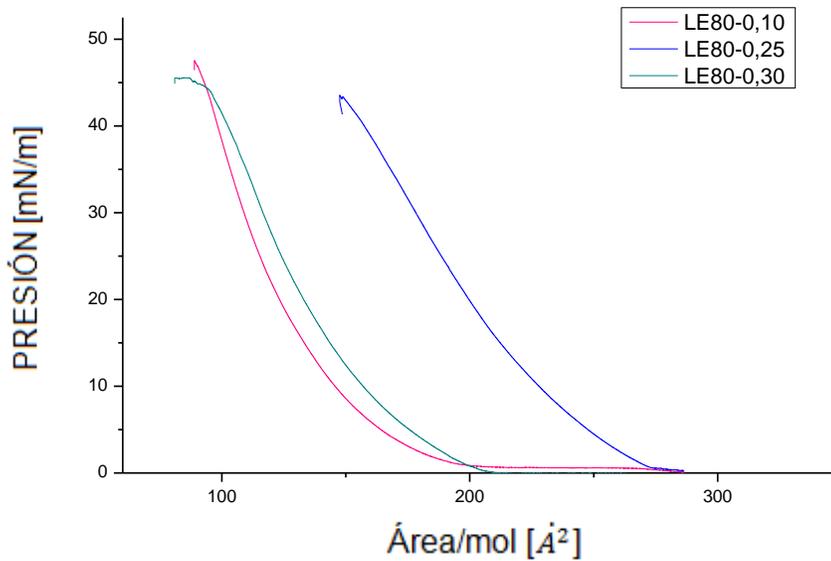


Figura 3.20. Isothermas de compresión para EPC teniendo como subfase agua y ácido acético

3.3.5 Microscopía electrónica de barrido

En las imágenes se presenta la morfología de las partículas de quitosano, SPC y EPC así como también las partículas formadas en la interacción, observando mayores poblaciones de quitosomas en las microfotografías E, F, H, I.

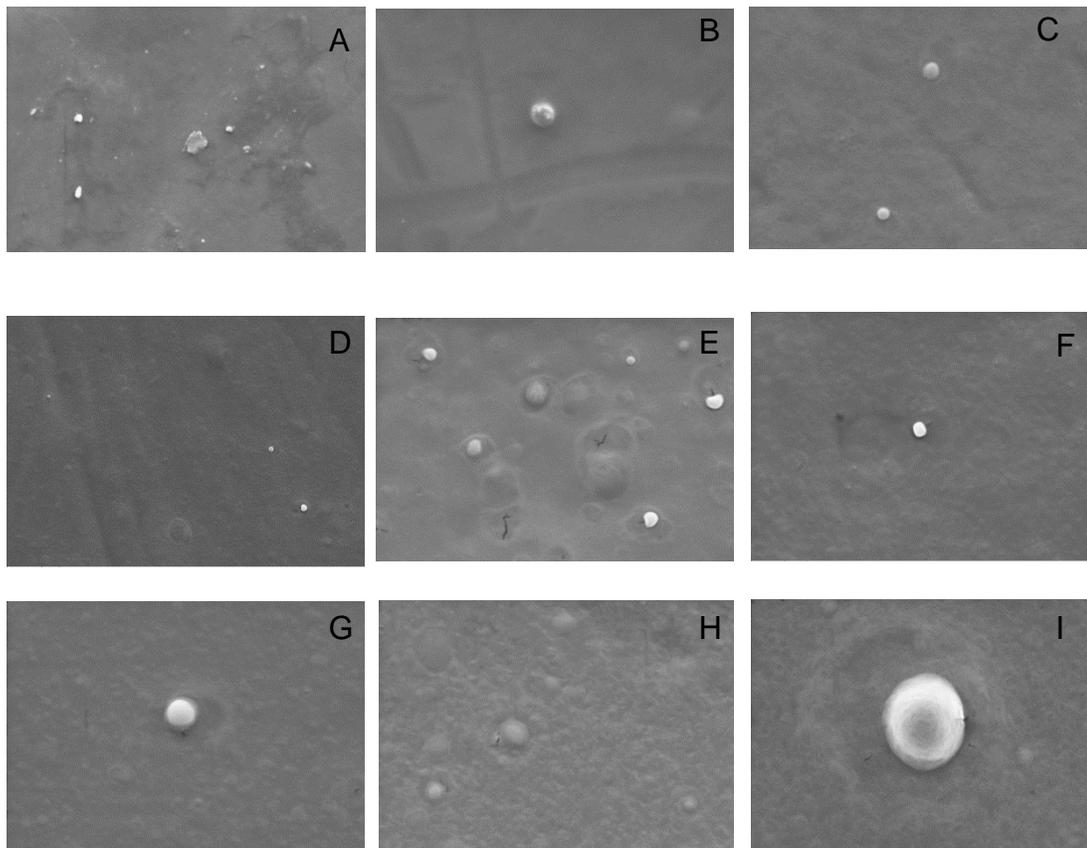


Figura 3.21 microfotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido A: Quitosano, B: SPC, C: EPC, D: EPC-0.10, E: EPC-0.25, F: EPC-0.30, G: SPC-0.10, H: SPC-0.25, I: SPC 0.30

3.4 Comparar el desempeño de la interacción de quitosano-Liposoma con ácido hialurónico-liposoma aniónico.

La interacción de liposoma con ácido hialurónico se llevo a cabo por diferencial de carga eléctrica sin embargo al presentar carácter aniónico no fue posible esta interacción para el caso de EPC, fosfolípido objeto de estudio en este trabajo, de acuerdo al método de producción de liposomas se obtuvieron tamaños de partícula de lípido marcadamente menores a los obtenidos en este trabajo sin embargo las nuevas tecnologías están dirigiéndose hacia la producción de liposomas mediante el métodos inyección de etanol dada su simplicidad y bajo costo, a diferencia del método usado por Martínez-Ramírez (2012) que uso el método convencional de Bangham teniendo como desventaja el uso de solventes y generación de residuos.

Los análisis de monocapas de Langmuir demostraron que para la relación lípido EPC ácido hialurónico la interacción no se llevó a cabo mostrando presiones de colapso de interacción menores a las del lípido es decir no hubo influencia entre ambos compuestos, sin embargo en los ensayos realizados para EPC quitosano se demostró la existencia de dicha interacción pero no para todas las relaciones másicas propuestas.

Los ensayos reológico aquí presentados muestran el comportamiento de una solución polimérica interactuando con un liposomas mostrando fuerzas de atracción relativamente sensibles ya que a grandes esfuerzos de corte y velocidad de corte este tiende de deformarse o romperse, lo que se comprende de mejor manera en los reogramas aquí presentados, las pruebas reológicas realizadas con la interacción ácido hialurónico logrando observar un comportamiento no newtoniano para ácido hialurónico y no mostró deformaciones a mayores velocidades y esfuerzos de corte.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

La caracterización reológica de quitosano en dispersiones acuosas mostró un comportamiento no Newtoniano con características dilatantes aumentando la viscosidad con el esfuerzo de corte ajustándose al modelo reológico Herchel-Bulkley, así como también el aumento de la viscosidad en función de la concentración de sólidos para las temperaturas de 5 y 37° C.

Los análisis reológicos realizados a la asociación liposoma-quitosano mostraron que las tasas de corte altas involucran niveles de energía más elevados que pueden superar las fuerzas inter partículas y, por lo tanto, efectuar la destrucción más eficiente de los quitosomas. Cualquier manipulación de las partículas obtenidas a esfuerzos y velocidades de corte elevados, puede provocar la destrucción, parcial o total de los agregados; esto a su vez cambia, de modo irreversible por lo general, la viscosidad y el esfuerzo de corte inicial.

Con respecto a la caracterización reológica realizada se determinó que las tasas de corte altas involucran niveles de energía más elevados que pueden superar las fuerzas inter partículas y, por lo tanto, efectuar la destrucción más eficiente de los quitosomas. Cualquier manipulación de las partículas obtenidas a esfuerzos y velocidades de corte elevados, puede provocar la destrucción, parcial o total de los agregados; esto a su vez cambia, de modo irreversible por lo general, la viscosidad y el esfuerzo de fluencia.

Los análisis realizados demostraron que la fabricación de liposomas mediante el método inyección de etanol produce dispersiones lipídicas estables de acuerdo al potencial de carga y tamaño hidrodinámicos obtenidos parámetros importantes para la toma de decisión en los estudios preliminares para la determinación de la concentración de trabajo para fosfatidilcolina de huevo esta fue 4mM.

Para el caso de fosfatidilcolina de soya se caracterizó obteniendo tamaños de partícula menores, y potencial eléctrico mayor a ± 30 mV indicador de que obtuvimos dispersiones eléctricamente estables.

La realización de la interacción fue llevada a cabo por diferencia de potencial eléctrico entre quitosano y lípidos, generando partículas de mayor tamaño, se realizaron a éstos pruebas de potencial eléctrico que mostraron un cambio eléctrico de partículas aniónicas (liposomas) a catiónicos (quitosomas), es decir un potencial zeta más positivo, estos cambios son más substanciales para el caso de EPC.

La caracterización de tamaño de partícula mostró tamaños de partículas menores para la relación másica de 0.30 para el caso de SPC caso contrario para EPC mostrando el menor tamaño de partícula para la relación másica de 0.10.

El comportamiento fenomenológico para determinar la influencia con respecto a la relación másica propuesta en esta investigación para las interacciones quitosano-SPC y quitosano-EPC fue determinado mediante las pruebas de monocapas de Langmuir estas demostraron la interacción de quitosano con cada lípido, esto se observa en la presión de colapso de lípido en comparación con la presión de colapso de las asociaciones, así como también la diferencia de área por molécula para cada isoterma, la relación másica 0.25 mostró mejores evidencias de interacción para el caso de SPC y para EPC fue 0.10.

La inclusión de liposomas en sistemas biopoliméricos como quitosano resulta en un sistema estable esto viabiliza estudios de transporte de bioactivos como vitaminas, fitoterapias de carácter hidrofóbico. Éstos pueden ser encapsulados en las membranas liposomales y estabilizados en una dispersión polimérica, los resultados aquí presentados pueden contribuir en el desarrollo de nuevas matrices alimenticias como las nanofibras.

Al comparar el desempeño de la interacción de quitosano-liposoma con ácido hialurónico-liposoma aniónico, se tuvo que para la producción de liposomas por el método de Bingham utilizado en las pruebas con ácido hialurónico se obtuvieron tamaños de partícula considerablemente menores a las pruebas realizadas en esta investigación, sin embargo las interacciones con liposomas fueron mayormente favorecidas con el biopolímero quitosano dado el carácter aniónico, esta interacción se vio reflejada en los ensayos fenomenológicos, demostrando la existencia de dicha interacción.

RECOMENDACIONES

Se recomienda dar seguimiento a este proyecto de investigación con otros lípidos, para observar un comportamiento diferente en el diámetro de partícula, mantener el método inyección de etanol para la producción de liposomas dada la fácil implementación a gran escala en la industria alimenticia, ya que ésta no necesita baja polidispersidad para su aplicación, así como la realización de pruebas con quitosano purificado para obtener tamaños de partículas menores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts, B., Bray., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2004. Introducción a la biología celular. Editorial Médica Panamericana. Madrid
2. Balan, V., y Verestiuc, L. 2014. "Strategies to improve chitosan hemocompatibility: a review". *European Polymer Journal*, **53**(1):171-188.
3. Bird, R.B., Stewart, W. y Lightfoot, E. 2006. Fenómenos de Transporte. LIMUSA WILEY. México.
4. Brown, T. L., Lemay H.E., Murphy, C.J.,Bursten B. E., Woodward, P.M., 2014. Química, la ciencia central.PEARSON.México.
5. Croiser, F., y Jerome, C. 2013. "Chitosan-based biomaterials for tissue Engineering". *European Polymer Journal*, **49**(4): 780-792.
6. De la Paz, N., Pérez, D., Fernámde, M., López D.E., Noriega, A.,Paneque-Rapado, M., Valentín-Altanés, S., García M.C.2013."Evaluación de la viscosimétrica del quitosano derivado de la quitina de langosta".*Revista Iberoamericana de Polímeros*.**14**(2):84-91
7. Florence, C., y Christine, J. 2013. "Chitosan-based biomaterials for tissue engineering". *Eurepean Polymer Journal*, **49**(1):780-792.
8. Franzen, U., y Ostergaard, J. 2012. "Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance-liposome interaction in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography". *Journal of Chromatography A*, **1267**(1):32-44.
9. Gaziola de la Torre, L.; Rosada-Silva, R.; Favaro-Trombone, A.; Gai-Frantz, F.; Coelho-Castelo, A.; Lopes-Silva, C.; Andrade-Santana, M. 2009. "The synergy between structural stability and DNA-binding controls the antibody production in EPC/DOTAP/DOPE liposomes and DOTAP/DOPE lipoplexes". *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, **73**(1):175-184.
10. González-Gutiérrez, J.J.2012."Desarrollo de biosensores enzimáticos mediante la técnica de Langmuir-Blodgett. Aplicación como sensores electroquímicos para la detección de antioxidantes. Tesis de grado ingeniero técnico industrial. Universidad de Valladolid.
11. Guo, J., Ping, Q., Jiang, G., Huang, L., Tong, Y.2003."Chitosan-coated liposomes: characcterization and interaction with leuprolide" *international journal of pharmaceutics*.**260** (1):167-173.

12. Hooke, R., 1678 Lectures de Potentia Restitutiva. Royal Society.
13. Huang, Z., Li, X., Zhang, t., Song, Y., She, Z., y Li, J. 2014. "Progress involving new techniques for liposome preparation". *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **30**(1):1-7
14. Johansson, C., Bras, J., Mondragon, I., Nenchita, P., Plackett, D., Simon, P., Svetec, D., Virtanen, S., Baschetti, M., Breen, C., Clegg, F., Aucejo, S. 2012. "Renewable fibers and bio-based materials for packaging applications- review of recent developments". *Bioresources.com* **7**(2):1-47
15. Laouini, A., Charcosset, Fessi, H., Holdich, R.G., Vladislavjevic, G.T., 2013. "Preparation of liposomes: a novel application of microengineered membranes". *RSC Advances*. **3**(15): 4985-4994
16. Lassic, D. 1998. "Novel application of liposomes". *Elsevier Science Direct*. **16**(1): 307-321
17. Madrigal-Carballo, S., Porrás, G., Sibaja, M., Vega-Baudrit, Villa, A., y Molina, F. 2010. "Vesículas liposomales estabilizadas con quitosano: estudio electrocinético". *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **11**(1):43-57.
18. Martínez-Ramírez, M. L. 2013. "Análisis de la interacción entre la asociación del ácido hialurónico (AH) y liposomas (EPC/DOPE/DOTAP, EPC/DOPE Y EPC)". Tesis de grado de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. I.T de Orizaba.
19. McPhail, D., Tetley, L., Dufes, C., y Uchegbu, I. F. 2000. "Liposomes encapsulating polymeric chitosan based vesicles - a vesicle in vesicle system for drug delivery". *International Journal of Pharmaceutics*, **(200)**1:73-86.
20. Nelson L., D., M., C., Michael. 2005. Lehninger Principios de Bioquímica. Omega.
21. Nuñez-Santiago M.C., Mendez Montealvo M.G., Solorzano Fera J.S., 2001. Introducción a la Reología. Instituto Politécnico Nacional, México.
22. Pacheco-López, A., N. 2010. "Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosano: caracterización y aplicación". Tesis de grado. Doctor en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
23. Patil, Y. P., y Jadhav, S. 2014. "Novel methods for liposome preparation". *Chemistry And Physics of Lipids*, **177**(1):8-18.

24. Pham-Thuy, T., Maalej-Jaafar, C., Charcosset, C., Fessi, H. 2012. "Liosome and niosome preparation using a membrane contactor for scale-up". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **94**(1):15-21.
25. Pillai, C., Paul, W., y Sharma, C. P. 2009. "Chitin and chitosan polymers: Chemistry, Solubility and fiber formation". *Progress in Polymer Science*, **34**(1): 641-678.
26. Porras, G., Villa, A., Molina, F., Sibaja, M., caballo, M., y S. 2008. "Vesículas Liposomales estabilizadas con quitosano: estudio reológico". *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **9**(6):538-548
27. Pons, M., Forandada, M., Estelrich, J. 1992. "Liposomes obtained by the ethanol injection method" . *International Journal of pharmaceutics*. **95**(1):51-56
28. Qi, Y., Jianan, S., Zhiwen, Z., Hajiun, Y., y Yaping, L. 2013. " Reserval of multidrug resistance by stimuli responsive drug delivery systems for therapy of tumor". *Nanotechnology and Drug Resistance*, **65**(1):1699-1715.
29. Rodriguez-Justo, O., y Moraes, A.M. 2011 "Analysis of process parameters on the characteristics of liposomes prepared by ethanol injection with a view to process scale-up: effect of temperature and batch volume" . *Chemical Engineering Research and Desing*, **89**(1):785-792
30. Ruano, M. 2013. Fabricación de liposomas y cápsulas poliméricas. Tesis de grado. Doctorado en Ciencias. Universidad Complutense de Madrid.
31. Salazar-Alpuche R.Y. 2001 "Elaboración de compuestos polielectrolitos a partir de quitosana pectina y su aplicación en tecnología ambiental". tesis de grado maestro en ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León
32. Shedge, A.s., y Badiger M.V., "hydrofobically modified Chitosan: solution properties by rheology and light scattering". 2014. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. **19**(1):91-102.
33. Vemuri, S., y Rhodes, C.T.. 1995. "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery system: A review". *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **70**(2):95-111.
34. Veranic, P., A., E., y Kerec-Cross, M. 2012. chapter three- Interactions of biopolymer chitosa whit plasma membrane in biomedical applications. *Advances in Planar Lipid Biliayers and Liposomes*, **16**(1):75-91.

35. Wang, Y., Tu, S., Li, R., Ying Yang, X., Lui, L., y Zhang, Q. 2010. Cholesterol succinyl chitosan anchored liposomes: preparation characterization, physical stability, and release behavior. *Nanomedicine*, **6**(1):471-477.
36. Yin, Q., Jianan, S., Zhang, Z., Yu, H., y Li, Y. 2013. "Reserval of multidrug resistance by stimuli-responsive drug delivery systems for therapy of tumor". *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**(1):1699-1715.