

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

T E S I S:

**“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ALMIDÓN Y SU
EVALUACIÓN COMO PORTADORAS DE UBIQUINOL (CoQ₁₀-H₂)”**

PRESENTADA POR:

ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO

NOVIEMBRE DE 2015

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

Saltillo Coahuila, a 14 de Diciembre de 2015

Coordinación de Posgrado

PRESENTE


Por este conducto nos permitimos informar a esta coordinación que, el documento de tesis preparado por **ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO** titulado "**Síntesis de nanopartículas de almidón y su evaluación como portadoras de ubiquinol (CoQ10-H2)**" el cual fue presentado el día 25 de Noviembre de 2015, ha sido modificado de acuerdo a las observaciones, comentarios y sugerencias, realizadas por el Comité Evaluador asignado. Por tal motivo, avalamos que el documento corresponde a la versión final del documento de tesis.

Atentamente,

SINODALES



M.C. Hened Saade Caballero



Dra. Raquel Ledezma Rodríguez



Dr. Jorge Carlos Ramírez Contreras

Vo. Bo. de los Asesores



Dra. Esther Treviño Martínez



Dr. Luis E. Elizalde Herrera

TESIS CON CARACTER ABIERTO

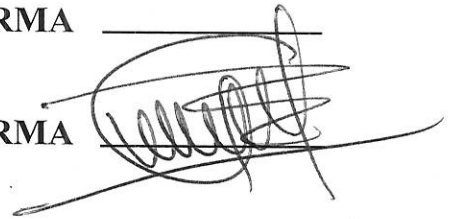
PROGRAMA: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS

AUTOR: ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO FIRMA _____

TITULO: Síntesis de nanopartículas de almidón y su evaluación como portadoras de ubiquinol (CoQ10-H2).

ASESORES: Dra. Ma. Esther Treviño Martínez FIRMA _____

Dr. Luis Ernesto Elizalde Herrera FIRMA _____



El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 25 de Noviembre de 2015



Sello de la Institución



Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CIQA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Tecnología de Polímeros

TESIS

**Síntesis de nanopartículas de almidón y su evaluación como
portadoras de ubiquinol (CoQ10-H2).**

Presentada por:

ANGÉLICA VELÁZQUEZ ARELLANO

Para obtener el grado de:

Maestro en Tecnología de Polímeros

Asesorado por:

**Dra. Ma. Esther Treviño Martínez
Dr. Luis Ernesto Elizalde Herrera**

SINODALES



Dr. Jorge Carlos Ramírez Contreras
Presidente



Dra. Raquel Ledezma Rodríguez
Secretario



M.C. Hened Saade Caballero
Vocal

DECLARACIÓN

En la ciudad de Saltillo, Coahuila, México, a los 25 días del mes de noviembre del año 2015, la que suscribe **Angélica Velázquez Arellano**, alumna del **Programa de Posgrado en Tecnología de Polímeros**, manifiesto que la información contenida en el presente documento forma parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo el trabajo de tesis titulado **"Síntesis de nanopartículas de almidón y su evaluación como portadoras de ubiquinol (CoQ₁₀-H₂)"** bajo la dirección de la **Dra. María Esther Treviño Martínez** y el **Dr. Luis Ernesto Elizalde Herrera**, la cual será propiedad del **Centro de Investigación en Química Aplicada** para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Saltillo, Coahuila a 25 de noviembre de 2015



Angélica Velázquez Arellano
Maestría en Tecnología de Polímeros

DEDICATORIA

Dedico este gran esfuerzo a mis padres, hermanas/os y sobrino; y agradezco a cada una de las personas que fueron mi apoyo en días de inmenso trabajo, desvelo y estrés.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por otorgarme el apoyo económico para la realización de esta investigación y al **Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)** por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación profesional.

A la **Dra. María Esther Treviño Martínez** y al **Dr. Luis Ernesto Elizalde Herrera**, por su apoyo, paciencia y disposición para el desarrollo del presente trabajo. Por compartir su experiencia y conocimientos que contribuyeron con mi formación académica.

A los sinodales: **Dr. Jorge Carlos Ramírez Contreras**, **Dra. Raquel Ledezma Rodríguez** y **M.C. Hened Saade Caballero**, por la evaluación del presente trabajo, por dar soluciones y opiniones con validez y aplicación en la mejora científica de la investigación realizada.

A la **Dra. María Lydia Berlanga Duarte**, **Dr. Carlos Espinoza González**, **Antonio Serguei Ledezma Pérez**, **M.C. Aída Esmeralda García Valdez**, **M.C. Antelmo Rodolfo Yasser Ruíz Martínez**, **I.Q. Beatriz Elvira Reyes Vielma**, **Lic. Gabriela Padrón Gamboa**, por el apoyo brindado en las actividades de laboratorio, realizadas durante el presente trabajo.

Al **M.C. Guadalupe Téllez Padilla**, **L.C.Q Jorge Felix Espinosa Muñoz**, **Q.F.B. Jesús Ángel Cepeda Garza**, **Q.F.B. Myriam Lozano Estrada**, **M.C. María Luisa López Quintanilla**, **L.C.Q Judith Nazareth Cabello Romero**, **Q.F.B. Bertha Alicia Puente Urbina**, **L.C.Q. Julieta Sánchez Salazar**, **M.C. Enrique Díaz Barriga**, **M.C. Blanca M. Huerta Martínez** y **L.C.Q. Ma. Guadalupe Méndez Padilla** por el apoyo en la caracterización de las nanopartículas de almidón antes y después del cargado con ubiquinol.

A la empresa **Nanoingredientes Bioactivos S.A. de C.V.** por permitirme realizar el proyecto **217848** perteneciente al **Programa de Estímulos a la Innovación (PEI) 2014-CONACYT**, referente a la obtención de nanopartículas a partir de fuentes renovables para su uso como portadoras de compuestos bioactivos de interés alimentario, cosmético y farmacéutico.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. BIOPOLÍMEROS	3
2.1.1. Clasificación de los biopolímeros	3
2.2. NANOPARTÍCULAS BIOPOLIMÉRICAS	5
2.2.1. Métodos para la obtención de nanopartículas biopoliméricas.....	6
2.3. NANOPARTÍCULAS DE ALMIDÓN (NPAs)	8
2.3.1. Métodos de preparación de NPAs.....	11
2.4. MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE NPAS	17
2.4.1. Esterificación de almidón	18
2.4.2. Pasivación con polietilenglicol (PEG).....	19
2.4.3. Aplicaciones de las NPAs modificadas	20
2.5. COENZIMA Q ₁₀	20
2.5.1. Propiedades de la CoQ ₁₀	21
2.6. MÉTODOS USADOS PARA MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD ORAL DE LA COQ ₁₀	22
2.6.1. Sistemas de Administración de Fármacos Autoemulsificados (SEDDS) o Nanoemulsificados (SNEEDS)	23
2.6.1.1. Formación de complejos entre la CoQ ₁₀ y las ciclodextrinas (CDs).....	24
2.6.1.2. Dispersiones de CoQ ₁₀ en soluciones acuosas de almidón	26
2.6.1.3. Liposomas.....	27
2.6.1.4. Encapsulación de CoQ ₁₀ en micro y nanopartículas biopoliméricas.....	29

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
3.1. HIPÓTESIS.....	32
3.2. OBJETIVOS.....	32
3.2.1. <i>Objetivo general</i>	32
3.2.2. <i>Objetivos particulares</i>	32
IV. METODOLOGÍA.....	33
4.1. MATERIALES Y REACTIVOS	33
4.2. EQUIPOS	33
4.3. METODOLOGÍA.....	34
4.3.1. <i>Preparación de NPAs</i>	34
4.3.1.1. <i>Tratamiento alcalino con agitación mecánica</i>	34
4.3.1.2. <i>Tratamiento alcalino con energía de ultrasonido</i>	35
4.4. MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LAS NPAS.....	36
4.4.1. <i>Modificación superficial con anhídrido maleico (AM)</i>	36
4.4.2. <i>Modificación con cloruro de lauroilo (CL)</i>	36
4.4.3. <i>Pasivación con polietilenglicol (PEG)</i>	37
4.4.3.1. <i>Preparación de la solución de PEG (10,000 g/mol)</i>	37
4.4.3.2. <i>Pasivación de las NPAs con PEG</i>	37
4.5. REDUCCIÓN QUÍMICA DE LA UBIQUINONA	38
4.6. EVALUACIÓN DE LAS NPAS COMO PORTADORAS DE UBIQUINOL.....	39
4.6.1. <i>Cargado con ubiquinol de las NPAs modificadas superficialmente</i>	39
4.7. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS	40
4.7.1. <i>Caracterización química</i>	41
4.7.2. <i>Dispersión de luz dinámica (DLS)</i>	41
4.7.3. <i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	41
4.7.4. <i>Microscopía electrónica de transmisión (TEM)</i>	41
4.7.5. <i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i>	42
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1. PREPARACIÓN DE LAS NPAS	43
5.1.1. <i>Tratamiento alcalino con agitación mecánica</i>	43

5.1.2.	<i>Tratamiento alcalino con energía de ultrasonido</i>	50
5.2.	MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LAS NPAS	58
5.2.1.	<i>Modificación con anhídrido maleico (AM)</i>	58
5.2.2.	<i>Modificación superficial con cloruro de lauroilo (CL)</i>	66
5.2.3.	<i>Pasivación con polietilenglicol (PEG)</i>	70
5.3.	REDUCCIÓN QUÍMICA DE LA UBIQUINONA	73
5.4.	EVALUACIÓN DE LAS NPAS COMO PORTADORAS DE UBIQUINOL.....	78
VI.	CONCLUSIONES	87
VII.	BIBLIOGRAFÍA	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Métodos para producir nano y micropartículas biopoliméricas.....	8
Figura 2.2. Estructura química de la amilosa y amilopectina, componentes principales del almidón.	9
Figura 2.3. Estructura del almidón de maíz (escala visual, esferulítica y lamelar).	10
Figura 2.4. Modelo basado en el empaquetamiento de las hélices dobles, que explica la organización cristalina de tipo A y B.	11
Figura 2.5. Esquema del proceso de hinchamiento de la molécula de almidón por efecto del tratamiento alcalino y posterior ruptura con agitación mecánica.	14
Figura 2.6. Métodos para la preparación de nanocristales, nanopartículas y nanocoloides a partir de almidón.....	16
Figura 2.7. Métodos para la obtención de NPAs modificadas químicamente.....	17
Figura 2.8. Estados de oxidación-reducción de la CoQ ₁₀	21
Figura 2.9. Estructura molecular de la ubiquinona y ubiquinol. La conversión se produce por un mecanismo de oxidación-reducción.	21
Figura 2.10. Métodos utilizados para mejorar la biodisponibilidad oral de la CoQ ₁₀	23
Figura 2.11. Complejos de inclusión con ciclodextrinas, que permiten mejorar la biodisponibilidad oral de la CoQ ₁₀	25
Figura 2.12. Proceso de la formación de la dispersión de CoQ ₁₀ en soluciones acuosas de almidón de maíz.	27
Figura 2.13. Estructura de un liposoma para encapsular CoQ ₁₀	28
Figura 4.1. Reducción de ubiquinona con borohidruro de sodio.	38
Figura 4.2. Esquema del proceso de cargado con ubiquinol de las NPAs-AM.....	39
Figura 5.1. Representación esquemática de la interacción entre el NaOH y los grupos –OH del almidón.	44
Figura 5.2. Distribución de los tamaños de NPAs obtenidas por tratamiento alcalino con agitación mecánica.....	45
Figura 5.3. Morfología de las de NPAs obtenidas por tratamiento alcalino y agitación mecánica a 20000X.....	47

Figura 5.4. Difractogramas del almidón de maíz con 70 % de amilopectina y almidón soluble lote 1 y 2 y de las NPAs obtenidas con tratamiento alcalino y agitación mecánica (A5 y A1)... 49

Figura 5.5. Difractograma del almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p) y esencialmente amilopectina y NPAs obtenidas con tratamiento alcalino y agitación mecánica (A3 y A4). 50

Figura 5.6. Efecto de la concentración de almidón y tiempo de sonicación sobre el Dp, antes de la liofilización y después de diálisis. 51

Figura 5.7. Distancia entre partículas con diferente Dp promedio, preparadas a partir de dispersiones con, 1, 5 y 10 % en peso de almidón y diferentes tiempos de sonicación..... 53

Figura 5.8. Efecto de la concentración de almidón y tiempo de sonicación en la distribución de tamaño de partícula, antes (izquierda) y después (derecha) del proceso de secado por liofilización..... 54

Figura 5.9. Micrografía de SEM de las NPAs obtenidas con tratamiento alcalino energía de ultrasonido (1 % de almidón y 5 min de ultrasonido) a 350000X. 55

Figura 5.10. Distribución de los tamaños de NPAs obtenidos cuando se escaló el volumen de la mezcla de reacción de 50 a 200 y 500 mL, utilizando una concentración de almidón de 5 % y 15 min de ultrasonido. 56

Figura 5.11. Espectros FTIR-ATR del almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p) y de las NPAs preparadas con tratamiento alcalino y energía de ultrasonido (Liofilizadas). 57

Figura 5.12. Termogramas de TGA para el almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p) y de las NPAs preparadas con tratamiento alcalino y energía de ultrasonido. 58

Figura 5.13. Reacción de esterificación del almidón con anhídrido maleico para la formación de maleato de almidón. 59

Figura 5.14. Espectros de FTIR-ATR de NPAs antes y después de su modificación con anhídrido maleico (exp. MA1). 61

Figura 5.15. Espectro de ¹H-RMN correlacionado con el espectro de ¹³C-RMN (HCQC) para NPAs de almidón modificadas con AM (exp. MA1). 63

Figura 5.16. Espectro de ¹H-RMN del maleato de almidón con relación de integración para determinar el AM injertado en la superficie de las NPAs. 64

Figura 5.17. Termogramas de TGA de almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p), NPAs y NPAs modificadas con anhídrido maleico..... 65

Figura 5.18. Micrografías de TEM de las NPAs modificadas con anhídrido maleico.	66
Figura 5.20. Espectros de FTIR-ATR de las NPAs antes y después de la modificación con cloruro de lauroilo.	67
Figura 5.21. Termogramas de TGA de almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p), NPAs y NPAs modificadas con cloruro de lauroilo.	68
Figura 5.22. Micrografías de TEM de las NPAs modificadas con cloruro de lauroilo.	69
Figura 5.23. Esquema de la pasivación superficial de nanocristales de celulosa con PEG.	70
Figura 5.24. Espectros de FTIR-ATR de las NPAs y de las NPAs pasivadas con PEG.	71
Figura 5.25. Termogramas de TGA de almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p), NPAs, NPAs compatibilizadas con polietilenglicol y polietilenglicol solo.	72
Figura 5.26. Micrografías de TEM de las NPAs pasivadas con polietilenglicol.	73
Figura 5.27. Espectro de FT-IR de la ubiquinona y del producto obtenido después de la reacción de reducción con borohidruro de sodio.	74
Figura 5.28. Espectro ¹ H-RMN 500 MHz en CDCl ₃ , de la ubiquinona.	75
Figura 5.29. Espectro ¹ H-RMN 500 MHz en CDCl ₃ , del producto obtenido de la reacción de reducción de CoQ ₁₀ con borohidruro de sodio.	76
Figura 5.30. Espectro ¹³ C-RMN 125 MHz en CDCl ₃ , de la ubiquinona.	77
Figura 5.31. Espectro ¹³ C-RMN 15 MHz en CDCl ₃ , del producto obtenido de la reacción de reducción de CoQ ₁₀ con borohidruro de sodio.	78
Figura 5.32. Caracterización por UV-visible de NPAs-AM (C1) y cargadas con ubiquinol.	80
Figura 5.33. Caracterización por UV-visible de la ubiquinona y ubiquinol utilizando ciclohexano como disolvente.	81
Figura 5.34. Evaluación de la estabilidad del ubiquinol mediante la comparación del color de las soluciones obtenidas antes y después del cargado con ubiquinona y ubiquinol en solución etanólica.	83
Figura 5.35. Espectro de FTIR-ATR de las NPAs- AM, que fueron cargadas con ubiquinona y ubiquinol.	83
Figura 5.37. Imagen de las reacciones de cargado de las NPAs esterificadas con AM y CL, así como las compatibilizadas con PEG.	85
Figura 5.38. Espectro de FTIR-ATR de las NPAs modificadas superficialmente con AM, CL y PEG que fueron cargadas con ubiquinol.	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Clasificación de los biopolímeros de acuerdo a su fuente de obtención.	4
Tabla 2.2. Polisacáridos utilizados en la obtención de nanopartículas.	6
Tabla 2.3. Biopolímeros usados para micro y nanoencapsulación de CoQ ₁₀	30
Tabla 5.1. Experimentos realizados para la preparación de NPAs por tratamiento alcalino con agitación mecánica.	44
Tabla 5.2. Experimentos realizados en la funcionalización de NPAs con AM.	59
Tabla 5.3. Señales de FTIR-ATR de los productos obtenidos después de la modificación química con AM.....	60
Tabla 5.4. Desplazamiento de señales de RMN características para maleato de almidón, anhídrido maleico y ácido maleico.	61
Tabla 5.5. Reacciones de reducción de CoQ ₁₀ con borohidruro de sodio.....	73
Tabla 5.6. Experimentos realizados para el cargado con ubiquinol de NPAs modificadas con AM.	79
Tabla 5.7. Experimentos realizados para el cargado con ubiquinol de NPAs modificadas superficialmente con AM, CL y PEG.....	81

RESUMEN

Tomando en cuenta factores como diámetro de partícula promedio (D_p) y eficiencia del proceso, se realizó la síntesis de nanopartículas de almidón (NPAs) mediante dos métodos: tratamiento alcalino con agitación mecánica y tratamiento alcalino con energía de ultrasonido. En el método donde se utilizó una solución alcalina (NaOH/urea/agua), con relación de 6/4/90 (p/p), para preparar dispersiones de almidón al 10 % en peso y posteriormente formar NPAs por agitación mecánica, se obtuvieron valores de D_p entre 30 y 300 nm. Se determinó que con el almidón soluble se obtienen D_p menores a 50 nm. Para los experimentos donde se utilizó almidón de maíz los D_p obtenidos fueron mayores a 100 nm. En cuanto al efecto de la relación amilopectina/amilosa sobre el valor de D_p se observó que el aumento en el contenido de amilosa ocasionó un incremento en el valor de D_p , obteniéndose un valor de ≈ 270 nm para las nanopartículas preparadas con almidón con 70 % de amilosa. Este resultado fue atribuido al incremento de la viscosidad de la dispersión, debido a la mayor interacción entre las cadenas poliméricas lineales de la amilosa. Las distribuciones de tamaño de partícula obtenidas para el almidón con 70 y 0 % de amilosa presentaron bimodalidad y sólo se consideró la mayor población de partículas obtenidas. Al sustituir la energía mecánica por energía de ultrasonido, se encontró un método más simple que permite la obtención de NPAs con valores de D_p entre 20 y 50 nm. Se estudiaron diferentes concentraciones de almidón (1, 5 y 10 % en peso) y tiempos de sonicación (5, 10 y 15 min). El tiempo de sonicación utilizado presentó un efecto inverso sobre el D_p , a excepción del tiempo de sonicación de 15 min para las concentraciones de almidón de 5 y 10 % en peso. Con el propósito de generar grupos funcionales a partir de los grupos $-OH$ presentes en el almidón, se llevó a cabo la modificación de la superficie de las NPAs con anhídrido maleico (AM), cloruro de lauroilo (CL) y polietilenglicol (PEG). Finalmente, se llevaron a cabo pruebas para lograr la interacción entre el ubiquinol y las NPAs modificadas. El ubiquinol utilizado fue obtenido mediante reducción química con $NaBH_4$. En la etapa de cargado solo se obtuvieron resultados cualitativos, sin embargo, indican que las NPAs modificadas con AM son una buena opción para el soporte de moléculas de ubiquinol. Mediante micrografías de TEM se obtienen NPAs cargadas con ubiquinol con D_p menor a 50 nm.

I. INTRODUCCIÓN

La formulación de productos que incorporen compuestos bioactivos benéficos para la salud humana es un tema de gran interés para las industrias farmacéutica, alimentaria y de cosméticos. Sin embargo, el diseño de sistemas novedosos que protejan las propiedades de los compuestos bioactivos para garantizar su efecto en el cuerpo humano es un gran reto [1].

En este sentido, la comunidad académica ha mostrado un interés en la síntesis de nanopartículas a partir de polímeros naturales que funcionen como medio de transporte para la administración de los compuestos bioactivos [2,3]. En las últimas décadas se ha presentado una clara tendencia en el estudio de polímeros tales como las proteínas (colágeno, gelatina y albúmina) y polisacáridos (almidón, dextrano celulosa y quitosán) [4].

Por tratarse de biomateriales no tóxicos y biodegradables, los polisacáridos son los polímeros más utilizados para esta aplicación, además de encontrarse en abundancia en la naturaleza y tener un costo de procesamiento relativamente bajo. Entre los polisacáridos más utilizados para la preparación de nanopartículas se encuentra el almidón; polímero que se puede obtener de diferentes fuentes (papa, maíz, trigo y arroz, entre otras plantas). El almidón está constituido principalmente por cadenas lineales de amilosa unidas por enlaces α -1,4-glucosídicos y amilopectina unidas por el mismo enlace pero con ramificaciones en β -1,6-glucosídicos cada 15-30 unidades monoméricas de glucosa [5].

La preparación de NPAs mediante diferentes métodos tales como, hidrólisis ácida y enzimática, energía ultrasónica, agitación mecánica, extrusión reactiva, microfluidización, precipitación y la combinación de hidrólisis ácida y energía de ultrasonido ya han sido reportados. Una característica ampliamente mencionada es que la gran cantidad de grupos —OH presentes en la superficie de las NPAs, conduce a la formación de aglomerados atribuidos a fuerzas de interacción como puentes de hidrógeno, esta característica ha limitado el desarrollo y aplicación de estos materiales [6]. Una alternativa para resolver este problema ha sido la modificación química de estos grupos —OH [7]. Se ha reportado el uso de ácidos dicarboxílicos (ácido maleico, ácido

fumárico, ácido succínico y anhídrido maleico) [8, 9, 10] o cloruros de ácido [11, 12] para la formación de grupos ésteres. Los grupos —OH con menor impedimento estérico (posición C₆) son los que tienen mayor posibilidad de reaccionar [13].

Las NPAs modificadas superficialmente ya han sido utilizadas para el cargado y liberación de compuestos bioactivos como el ácido flufenámico, cafeína y testosterona [14]. Pang y cols. [15] reportaron la síntesis de NPAs modificadas con anhídrido maleico para su cargado con curcumina la cual se considera un ingrediente bioactivo hidrófobo, similar a la Coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀). Esta coenzima es una molécula de gran importancia, debido a que es un componente esencial en las células biológicas. En los últimos años, la CoQ₁₀ ha sido motivo de estudio en todo el mundo, lo que ha permitido poner en evidencia propiedades que ayudan en el adecuado funcionamiento del cuerpo humano [16]. Además, dependiendo de su estado de óxido-reducción, esta coenzima, puede presentarse en tres formas: totalmente oxidada, oxidación intermedia y totalmente reducida, esta última es conocida como ubiquinol (CoQ₁₀-H₂) [17].

El ubiquinol actúa como un potente antioxidante debido al mecanismo de oxidación-reducción que permite inhibir la peroxidación de los fosfolípidos presentes en la membrana celular. Así mismo, protege a las proteínas mitocondriales y al ADN de los efectos negativos ocasionados por los radicales libres [18]. Aunado a esto, también se ha identificado que este compuesto, presenta propiedades antiinflamatorias y su efecto se ha comprobado en estudios *in vitro* [19]. En general, se prefiere el suministro oral de ubiquinol ya que este, se absorbe mejor que la ubiquinona [20]. No obstante, es bien conocido que su baja solubilidad en agua y su inestabilidad química, afectan negativamente su utilización como ingrediente bioactivo [21]. Por lo que sólo se ha trabajado con la forma oxidada (ubiquinona), con lo que se ha logrado mejorar su biodisponibilidad oral, pero no su efecto antioxidante.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue obtener un sistema a base de NPAs modificadas superficialmente, evaluando tres diferentes moléculas que permitan la obtención de grupos químicos que promuevan las interacciones con el ubiquinol.

II. ANTECEDENTES

2.1. Biopolímeros

Los biopolímeros son materiales que pueden ser asimilados por varias especies de microorganismos, por lo que son llamados biodegradables. Su degradación se presenta en lapsos de tiempo cortos ya sea en semanas o meses. Se obtienen a partir de sistemas biológicos tales como, plantas, animales y microorganismos, o bien, a partir de la síntesis química de materiales renovables. Se ha comprobado que no presentan un efecto tóxico en el cuerpo humano por lo que son considerados materiales biocompatibles [22, 23].

Debido a que los polímeros sintéticos se están convirtiendo en un problema ambiental creciente. Aunado a su baja disponibilidad, aumento en los precios del petróleo y a la inestabilidad geopolítica de las regiones que poseen las grandes reservas de este recurso, ha surgido la necesidad de obtener materiales a partir de fuentes renovables. Los biopolímeros, que en su mayor parte se obtienen de fuentes renovables, se han convertido en una alternativa interesante. No obstante, estos materiales tienen algunas limitaciones y desventajas tales como, dificultad en su procesamiento y bajo rendimiento. Esto, ha limitado su aplicación en diversos sectores industriales y ha impulsado la investigación para la solución de estos problemas [24].

2.1.1. Clasificación de los biopolímeros

Los biopolímeros se pueden clasificar en tres grupos de acuerdo a su fuente de obtención (Tabla 2.1). Extraídos de biomasa obtenida a partir de plantas y animales, los más comunes dentro de este grupo son el almidón, celulosa y quitosán. El segundo grupo de biopolímeros es producido por microorganismos como por ejemplo los poli (hidroxialcanoatos) que son sintetizados por bacterias mediante fermentación de materias primas renovables; el biopolímero producido depende principalmente de la cepa bacteriana y sustrato utilizado. Los biopolímeros del tercer grupo son sintetizados por polimerización de monómeros bioderivados de aceites vegetales y ácido láctico. Entre los aceites que se utilizan en la preparación de estos biopolímeros se

encuentran el de linaza, girasol, higuera, soja y palma. Algunos de los materiales obtenidos son: poliésteres, poliuretanos, poliamidas, resinas acrílicas, resinas epoxi y poliéster amidas. Otro de los biopolímeros obtenidos a partir de monómeros bioderivados es el poli (ácido láctico) que se produce a partir del ácido láctico [25].

Tabla 2.1. Clasificación de los biopolímeros de acuerdo a su fuente de obtención.

Biomasa		Producidos por microorganismos	Sintetizados a partir de monómeros bioderivados
Plantas	Animales		
Polisacáridos			
Almidón, celulosa y sus derivados. Pectinas, carragenatos, goma arábica, cis-1,4-poliisopreno	Quitina, quitosán y ácido hialurónico	Ácido hialurónico, xantanos, Curdlan, polulanos	Poliésteres, poliuretanos, poliamidas, resinas acrílicas, resinas epoxi y poliéster amidas
Proteínas			
Zeína, gluten y soja	Caseína, suero, colágeno (gelatina), albumina, queratina	Seda	
Lípidos y ácidos grasos			
Ceras, ácido esteárico	Ceras, ácido esteárico	Ácidos grasos polihidroxiados	Ácido poliláctico (PLA).
Lignina		Poli (hidroxialcanoatos), PHAs; polihidroxi butirato (PHB)	

Fuente: Niaounakis. *Handbook Series*, 2013, 79-80.

La disponibilidad y biodegradabilidad son los factores principales que han impulsado el uso de biopolímeros en diversas áreas. En el área de materiales, se han utilizado para la síntesis de nanopartículas, utilizadas para mejorar la biodisponibilidad oral de muchos compuestos bioactivos. Debido al aumento en el área de superficie en la nanoescala se obtiene una absorción más rápida demostrando ser más eficaz. Otro de los beneficios es que las matrices biopoliméricas empleadas en la síntesis de nanopartículas protegen al compuesto de factores externos como la luz y el oxígeno [3].

2.2. Nanopartículas biopoliméricas

Son materiales que tienen un tamaño en el intervalo de nanómetros y que se obtienen a partir de biopolímeros [26]. El tamaño crítico que distingue a una micropartícula de una nanopartícula sigue siendo un tema en discusión. Algunos autores reportan un tamaño de diámetro de 100 nm como el límite superior para las nanopartículas. Afirman que partículas con diámetro mayor presentan las mismas propiedades que los materiales en macroescala. Sin embargo, también mencionan que esta característica no es aplicable para todos los casos ya que depende directamente del material utilizado [27,28].

En general, las nanopartículas y micropartículas presentan características diferentes a las del material en macroescala, por ejemplo, sus propiedades fisicoquímicas y su funcionalidad están directamente relacionadas con su tamaño. Ha habido muchas investigaciones enfocadas en encontrar métodos para la síntesis de partículas a partir de biopolímeros y uno de los aspectos más importantes ha sido la selección de un biopolímero o combinación de ellos, que ayuden a obtener las propiedades deseadas de acuerdo a su aplicación final. Entre las características más buscadas destacan las siguientes: la polaridad, permeabilidad, degradabilidad, buen perfil de liberación, solubilidad y estabilidad [29].

Los biopolímeros más utilizados para la obtención de estas características son las proteínas y polisacáridos. Dentro de las proteínas, las más utilizadas son: la albumina [30], caseína [31], gelatina [32], β -lactoglobulina [33], lactoferrina [34], zeína [35], y gliadina [36]. Las dos últimas ya se han utilizado para encapsular compuestos bioactivos hidrófobos como la curcumina y la α -tocoferol, respectivamente. Sin embargo, se ha demostrado que las partículas obtenidas a partir de algunas proteínas son muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica y temperatura de activación, por lo que su utilización se ha visto limitada [30].

Debido a que los polisacáridos son altamente estables, no tóxicos y biodegradables, además de encontrarse en abundancia en la naturaleza y tener un costo de procesamiento relativamente bajo se han convertido en los biopolímeros más utilizados en la preparación de nanopartículas [4]. En la Tabla 2.2 se presentan algunos de los polisacáridos que se han utilizado en la preparación de nanopartículas, también se menciona su fuente de obtención y su estructura química.

Tabla 2.2. Polisacáridos utilizados en la obtención de nanopartículas.

Polisacárido	Fuente	Estructura
Agar [37]	Algas de los géneros <i>Gelidium</i> y <i>Gracilaria</i>	Disacárido compuesto por unidades alternas de D-galactosa unidas por enlaces β -1,3 y α -1-4 y por 3,6 anhidro-L-galactosa.
Alginato [38]	Paredes celulares de algas marinas pardas.	Polímeros lineales con distribuciones al azar de ácido β -D-manurónico y ácido α -L-gulurónico unidos con enlaces 1-4.
Carragenanos [37]	Paredes celulares de las algas rojas (Rhodophyceae).	Su estructura no está bien definida, se compone de un grupo lineal de galactanos unido por enlaces alternos (1-3) y por enlaces β -(1-4)-glucosídicos.
Celulosa [39]	Plantas	Unión de moléculas β -(1-4)-glucosa.
Quitosán [40]	Quitina, (parte de la estructura externa de los insectos y crustáceos).	Polímero lineal formado por cadenas aleatorias de β -(1-4)-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina.
Dextrano [41]	Bacterias	Polímero lineal, formado principalmente por enlaces α -(1-6)-D-glucosa.
Goma gellan [40]	Fermentación aeróbica de la glucosa inducida por la bacteria <i>Sphingomonas elodea</i> .	Molécula lineal formada por la unión de tres monómeros (glucosa, ácido glucorónico y ramnosa).
Inulina [42]	Vegetales	Se compone de moléculas de D-fructosa unidas por enlaces β -(2-1).
Pectina [43]	Plantas	Ester metilado del ácido poligalacturónico, formado por unidades de ácido galacturónico unidos por enlaces α -(1-4).
Almidón, maltodextrinas [44]	Plantas	Formado por enlaces α -(1-4) y α -(1-6)-D-glucosa.

Fuente: Joye y McClements. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2014, 19, 417–427.

2.2.1. Métodos para la obtención de nanopartículas biopoliméricas

De acuerdo al enfoque fisicoquímico que se utilice para la preparación de estas nanopartículas, los métodos se clasifican en “*top down methods*” (métodos de arriba hacia abajo) y “*bottom up methods*” (métodos de abajo hacia arriba) [29]. Se ha buscado que el método utilizado sea

comercialmente viable (rentable y fácil de escalar) y que se puedan utilizar disolventes no tóxicos. En el diagrama de la Figura 2.1, se muestran algunos de estos métodos.

Los métodos que implican el uso de fuerzas disruptivas (cizalla, impacto o compresión) para romper moléculas grandes incluyen, molienda, trituración y homogeneización [45]. Otro método que ha sido utilizado es la extrusión, en este caso las nanopartículas se obtienen al hacer pasar una solución de biopolímero a través de la boquilla del extrusor. Estos métodos son ampliamente utilizados a nivel industrial, pero los equipos necesarios durante el proceso generan altos costos para su funcionamiento y mantenimiento [29].

La obtención de nanopartículas por autoensamblaje molecular incluye a métodos como: precipitación, coacervación, formación de complejos de inclusión, secado por pulverización, así como gelificación iónica y térmica. La formación de nanomateriales se debe a cambios en las condiciones del medio como, pH, fuerza iónica, temperatura o concentración. Estos métodos, permiten mayor control en el tamaño, morfología y estabilidad termodinámica de las partículas [46].

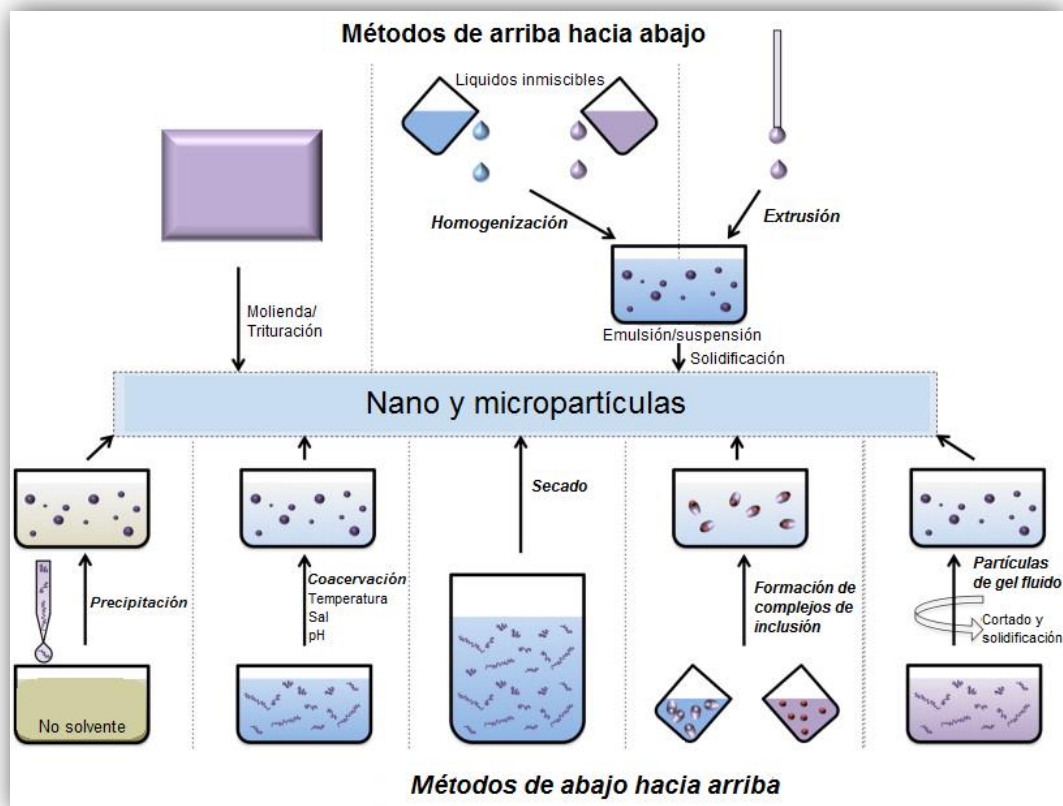


Figura 2.1. Métodos para producir nano y micropartículas biopoliméricas.

2.3. Nanopartículas de almidón (NPAs)

El almidón es un polímero, renovable y biodegradable, es el principal polisacárido de almacenamiento de energía de las plantas superiores. Se encuentra principalmente en raíces, tallos y semillas. Se obtiene en forma de gránulos con tamaño de 1-100 μm , los cuales son insolubles en agua fría. A nivel mundial, las principales fuentes de almidón son: maíz (82 %), trigo (8 %), papa y yuca (5 %). En el año 2012, el mercado mundial de almidón alcanzó los 51.2 billones de dólares y se espera que alcance 77.4 billones de dólares para el 2018. Actualmente se busca mejorar las propiedades del almidón o bien darle un valor agregado [5,6].

La fórmula condensada de este biopolímero es $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ y su monómero es la α -D-glucopiranososa o α -D-glucosa en su forma cíclica. Este polisacárido, está constituido principalmente de dos

macromoléculas glucosídicas: amilosa y amilopectina (Figura 2.2). La amilosa está formada por cadenas lineales de moléculas de glucosa, unidas por enlaces α -(1,4)-D-glucosídicos con pesos moleculares promedio de menos de 1 millón y la amilopectina consiste de estructuras de glucosa unidas por enlaces α -(1,4)-D-glicopiranosos con ramificaciones cortas cada 15-30 unidades monoméricas unidas por enlaces α -(1,6)-D-glucosídicos, con peso molecular promedio en el intervalo de millones [5,6, 47].

El almidón es un biopolímero semicristalino ya que es una mezcla de amilosa (20-30 %) y amilopectina (70-80 %). Con excepción de los almidones ricos en amilosa (53-70 %) y los almidones que tienen concentraciones mayores al 90 % de amilopectina, que son llamados cerosos. La región cristalina está formada por más de 10 unidades de glucosa que forman hélices dobles, las cuales se empaquetan para formar cristales, mientras que la región amorfa corresponde a los puntos de ramificación de la amilopectina [5, 47]. Las moléculas de amilosa están presentes en el gránulo como moléculas individuales muy próximas unas a otras. Se intercalan aleatoriamente entre las moléculas de amilopectina tanto en las regiones amorfas como cristalinas, dependiendo del origen biogénico del almidón, por ejemplo, en trigo se encuentra preferentemente en la región amorfa, en maíz con relación amilopectina/amilosa 73/27 (p/p) esta intercalada entre los grupos de amilopectina tanto en las regiones amorfas como cristalinas y en el caso del almidón de papa esta empaquetada entre las pequeñas ramificaciones de amilopectina o co-cristalizada con la amilopectina [48].

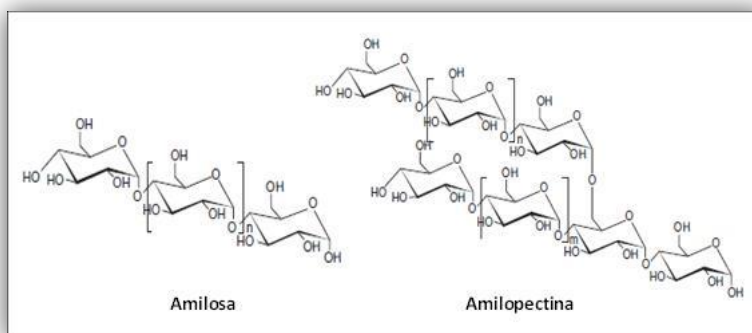


Figura 2.2. Estructura química de la amilosa y amilopectina, componentes principales del almidón.

Durante muchos años se han estudiado las características fisicoquímicas del almidón, sin embargo, debido a su complejidad aún no existe un modelo universalmente aceptado. LeCorre y cols. [6] proponen una estructura multiescala el almidón de maíz (Figura 2.3). Mencionan que este tipo de almidón está formado por: (a) gránulos de 30 μm , (b) constituidos por anillos de crecimiento, tanto amorfos como cristalinos (120-500 nm), (c) por lo tanto a nivel lamelar presenta regiones amorfas y cristalinas con tamaño de 9 nm, (d) la unidad que constituye a los anillos de crecimiento es llamada bloque (20-50 nm), (e) a partir de la hélice doble se obtienen laminillas cristalinas, (f) los nanocristales se obtienen cuando el gránulo de almidón es hidrolizado mediante un tratamiento ácido, (g) amilopectina: macromolécula glucosídica ramificada y (h) amilosa: macromolécula lineal con tamaño de 0.1-1 nm.

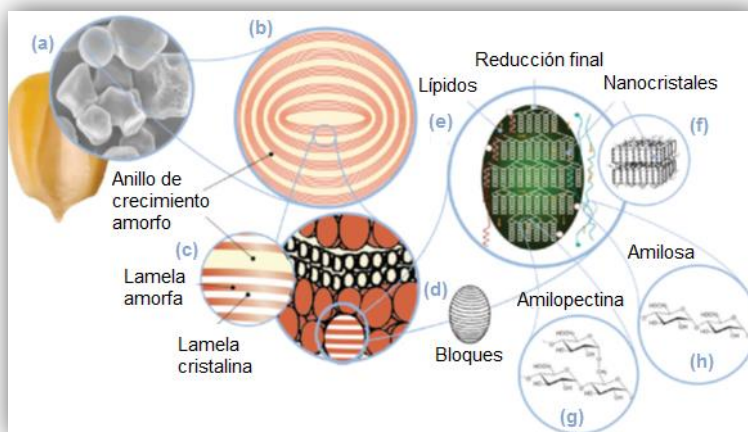


Figura 2.3. Estructura del almidón de maíz (escala visual, esferulítica y lamelar).

El almidón puede presentar tres tipos de cristalinidad (A, B y C). La de tipo A está estrechamente empaquetada con moléculas de agua entre cada estructura de la hélice doble, este tipo de cristalinidad la presentan los almidones de maíz con relación amilopectina/amilosa; 73/27; p/p y el que es esencialmente amilopectina, también la presentan el almidón de trigo y arroz. Por su parte la cristalinidad de tipo B, se encuentra menos empaquetada y las moléculas de agua están en la cavidad central formando seis hélices dobles como se muestra en la Figura 2.4. Este tipo de cristalinidad es característica de los almidones de papa y maíz con alto contenido de amilosa; 60-73 %) [6].

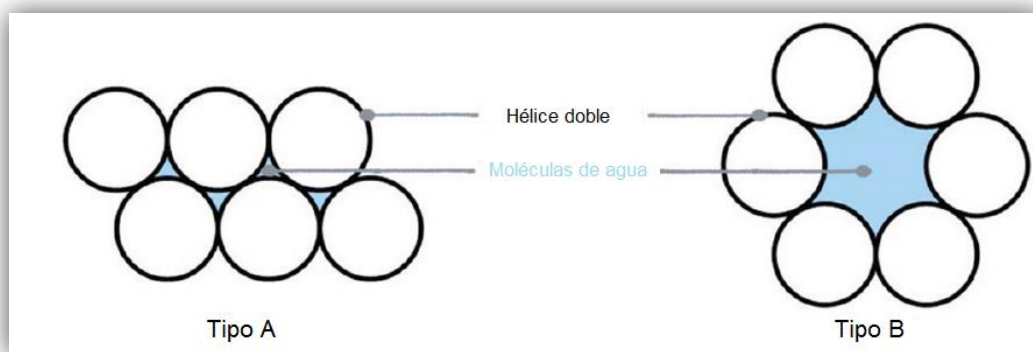


Figura 2.4. Modelo basado en el empaquetamiento de las hélices dobles, que explica la organización cristalina de tipo A y B.

La cristalinidad de tipo C, presenta los dos tipos de polimorfismo, ya que es una mezcla del patrón de difracción tipo A, localizado en los alrededores y de tipo B que se encuentra en el centro del gránulo. Este patrón de difracción se presenta sólo en los almidones de chícharo liso y de camote [49]. Los componentes menores que constituyen a los gránulos de almidón incluyen: proteínas, enzimas, aminoácidos y ácidos nucleicos, los cuales se localizan en la superficie, mientras que en la parte interna se encuentran principalmente lípidos [5,6].

De acuerdo a las características del almidón tales como, tipo de cristalinidad, relación amilopectina/amilosa, fuente de obtención y tamaño de gránulo. La temperatura de gelatinización, hinchamiento y grado de hidrólisis ácida, básica o enzimática serán diferentes para cada almidón y por lo tanto el tamaño de partícula obtenido [50].

2.3.1. Métodos de preparación de NPAs

Las NPAs, se obtienen a partir de la ruptura de los gránulos de almidón utilizando diferentes métodos como: hidrólisis ácida (HCl, H₂SO₄) o enzimática; o bien por tratamientos físicos como ultrasonido, agitación mecánica, extrusión reactiva o microfluidización. Así mismo, se han reportado métodos basados en la regeneración de moléculas a partir de una solución de almidón, llamada nanoprecipitación, que incluye técnicas como microemulsión y entrecruzamiento [6], estos métodos, así como Dp obtenido, rendimiento y tiempo del proceso se muestran en la Figura 2.5.

De los métodos reportados para la preparación de NPAs, la hidrólisis ácida ha sido más utilizada. Por ejemplo, Putaux y cols. [51] prepararon nanopartículas a partir de dispersiones que contenían 5 % de almidón de maíz (99 % de amilopectina) y soluciones de HCl 2.2 N. Las cuales se mantuvieron por 6 semanas a 36°C para lograr la hidrólisis total de los gránulos iniciales. Bajo estas condiciones, obtuvieron nanopartículas con una longitud de 20-40 nm y 15-40 nm de ancho. Se demostró mediante difracción de rayos X que estos materiales, conservan su estructura cristalina de tipo A, similar a la de los gránulos sin tratamiento, sin embargo, el rendimiento fue muy bajo.

Posteriormente, Angellier y cols. [52] mejoraron el proceso de preparación de NPAs utilizando dispersiones con 15 % de almidón de maíz (99 % de amilopectina) y una solución de H₂SO₄ 3.16 M, durante 5 días a 40°C y 100 rpm. Los resultados demuestran que se puede obtener un alto rendimiento controlando factores inherentes al almidón y al proceso tales como: concentración de almidón, origen biogénico del mismo, relación amilopectina/amilosa; tipo y concentración de ácido, temperatura y tiempo de hidrólisis. Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) evidencian que las NPAs se obtuvieron como agregados de 1-5 µm.

La aplicación industrial de las NPAs obtenidas por hidrólisis ácida, se ha visto limitada por aspectos como: larga duración del proceso, bajo rendimiento de producción (generalmente menos de 20 %) y subsecuentemente alto costo de producción [5]. Es por ello, que se han buscado otros procedimientos basados en tratamientos físicos como: ultrasonido, agitación mecánica, extrusión reactiva, microfluidización, o bien, una combinación de hidrólisis ácida con ultrasonido.

De los tratamientos físicos, el que más ha llamado la atención es el uso de ultrasonido debido a que es un proceso fácil y rápido en la preparación de NPAs. Se ha informado que durante la aplicación de esta energía, ocurre el proceso de cavitación que consiste en la formación, crecimiento y colapso de burbujas que generan energía de aproximadamente 10-100 kJ/mol la cual es suficiente para romper los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas a las cadenas de almidón [53]. Por lo que también se ha utilizado para disminuir la agregación de NPAs y subsecuentemente obtener dispersidad más estrecha [54]. En este contexto, Haaj y cols. [55] emplearon energía de ultrasonido como método para la preparación de NPAs. Utilizaron un

ultrasonido de 170W, 24kHz y una punta de 13 mm, prepararon dispersiones acuosas con un contenido de sólidos de 1.5 % para dos tipos de almidón de maíz (relación amilopectina/amilosa de 70/30 p/p y esencialmente amilopectina) y las sonicaron al 80 % de la potencia a diferentes tiempos (0-75 min). Durante la sonicación, las muestras fueron colocadas en un baño de hielo a 8°C. De acuerdo a los resultados de microscopia electrónica de barrido (SEM) y dispersión de luz dinámica (DLS) los autores afirman que la colisión mecánica y la alta cizalla, provocaron una alta fragmentación de los gránulos de almidón hasta que se alcanzó un Dp entre 30 y 100 nm. Este proceso tiene la ventaja de ser fácil y rápido en comparación con la hidrólisis ácida, pero depende de muchos factores como: potencia (W), frecuencia de sonicación (kHz), temperatura y tiempo de sonicación. También depende de factores intrínsecos a la materia prima: concentración de almidón y origen botánico del mismo [56]. Sin embargo, en todos los estudios realizados hasta el momento la concentración de almidón para la obtención de NPAs sigue siendo baja.

Otro método que ha sido utilizado es la microfluidización, por ejemplo, Liu y cols. [57] prepararon NPAs a partir de dispersiones acuosas al 5 % de almidón de maíz con 70 % de amilosa. Después de 6 ciclos en el microfluidizador (207 MPa), las micrografías obtenidas por SEM y TEM muestran que el diámetro de los gránulos de almidón disminuyó desde 6 µm hasta 200 nm. No obstante, se presentó una distribución muy amplia. Pero al repetir 30 veces la homogeneización se obtuvieron partículas coloidales de 10-20 nm. Esta reducción en el Dp, fue atribuida a la fuerza de arrastre ejercida por los fluidos al moverse en el sistema. Sin embargo, se observó que después de 10 ciclos con este tipo de energía ocurre la destrucción parcial o total de la estructura cristalina del almidón. Además, sólo se pueden procesar dispersiones de almidón a muy bajas concentraciones, por lo que su uso se ha visto limitado.

Posteriormente Song y cols. [58] con el método de extrusión reactiva prepararon NPAs en dos etapas. Primero se realizó una mezcla de almidón (amilopectina/amilosa; 72/28 %), agua y glicerol, con relación (100/22/23 p/p). En la segunda etapa, la mezcla de almidón se colocó en un extrusor de doble husillo para obtención de las NPAs agregando una solución acuosa de glioxal al 10 % en peso para lograr el entrecruzamiento de las NPAs. Se evaluó el efecto de las condiciones de extrusión como temperatura, velocidad del tornillo, contenido de agua y agente de entrecruzamiento sobre el Dp. Los resultados indican que se puede obtener un Dp de 160 nm. Sin

embargo, la combinación de calor y fuerza generada durante la extrusión, ocasionó una disminución en la estructura cristalina del almidón.

Con la finalidad de aumentar la capacidad en la preparación de las NPAs, se han propuesto nuevos procedimientos basados en la combinación de métodos. Zhang y cols. [59] realizaron un estudio para la producción de NPAs utilizando una dispersión acuosa de almidón de maíz con una relación amilopectina/amilosa de 72/28 (p/p). Se evaluó el efecto de la composición de solución alcalina utilizada para dispersar el almidón, sobre el Dp. Para preparar las soluciones alcalinas se utilizaron mezclas de diferentes composiciones p/p de NaOH/urea. Se observó una disminución en el tamaño de las partículas con el incremento en la concentración de NaOH hasta alcanzar un tamaño mínimo (≈ 92 nm) al utilizar la relación NaOH/Urea de 6/4 (p/p). Después de este punto, el tamaño de las partículas aumentó con el incremento en la concentración de NaOH. Los autores atribuyen este comportamiento al aumento en la viscosidad de la dispersión de almidón, lo cual afectó negativamente la eficiencia del tratamiento de agitación mecánica utilizado para la formación de las NPAs. Al variar la concentración de urea se observó un comportamiento similar, aunque en este caso no se ofrece una explicación. En la Figura 2.5 se representa un esquema propuesto por los autores para el proceso de formación de las NPAs.

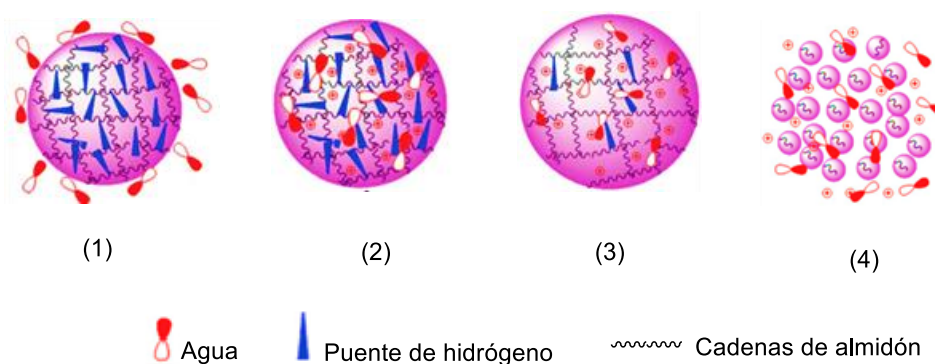


Figura 2.5. Esquema del proceso de hinchamiento de la molécula de almidón por efecto del tratamiento alcalino y posterior ruptura con agitación mecánica.

Kim y cols. [60] reportaron la preparación de nanopartículas a partir de dispersiones acuosas con 14.7 % de almidón de maíz (99 % de amilopectina). Primero se llevó a cabo la hidrólisis ácida (H_2SO_4 3.16 M) durante diferentes tiempos (3, 5 y 7 días), utilizando agitación magnética a temperatura de $40^\circ C$. Las muestras se neutralizaron con NaOH 1M y se centrifugaron en repetidas

ocasiones para separar la suspensión y los precipitados de almidón. Posteriormente cada muestra se ultrasonicó (750 W, 20 kHz) a diferentes condiciones. Los resultados indican que los dos hidrolizados de almidón obtenidos antes del tratamiento con ultrasonido mostraron distribuciones bimodales con Dp de $>2 \mu\text{m}$ y $<200 \text{ nm}$ respectivamente. No obstante, cuando se utilizó la suspensión de almidón obtenida después de 7 días de hidrólisis ácida combinada con un tratamiento con ultrasonido por 30 min y 20 % de amplitud de vibración se obtuvieron Dp $<100 \text{ nm}$. Sin embargo, cuando se utilizó un tiempo y amplitud de vibración mayores los resultados no fueron favorables ya que se obtuvieron Dp mayores y con distribuciones bimodales. Los autores atribuyen este comportamiento a la formación de aglomerados de pequeñas partículas, inducidos por un tratamiento con ultrasonido inadecuado. Asimismo, se reportó que las nanopartículas presentaron una pérdida parcial de la cristalinidad por efecto de la energía de ultrasonido, lo cual se comprobó mediante SEM, donde también se evidencia que las NPAs tienen una forma esférica.

Posteriormente, con el objetivo de evitar la pérdida de la cristalinidad en las NPAs, Kim y cols. [61] reportaron un método donde utilizaron hidrólisis ácida por 6 días (H_2SO_4 3.16 M) y energía de ultrasonido (60 % de amplitud por 3 min), con temperatura de hidrólisis de 4°C . Los autores afirman que a esta temperatura se reduce la pérdida de cristalinidad. Mediante micrografías obtenidas por SEM se reportan Dp entre 50 y 90 nm con formas globulares y distribución uniforme. Así mismo, mencionan que después del tratamiento con ultrasonido las NPAs no perdieron su cristalinidad (33 %).

También se ha reportado el método de nanoprecipitación para la obtención de NPAs, esta técnica consiste en la adición continua de una solución diluida de polímero a un disolvente que lo conduce a su precipitación en forma de partículas de tamaño nonométrico. La precipitación se lleva a cabo por la separación interfacial del polímero ocasionada por el disolvente (semipolar y miscible en agua). Este método ofrece múltiples ventajas tales como: una gran área interfacial, un sistema termodinámicamente estable, monodispersidad en el tamaño de las NPAs, además se evita el uso de fuentes de energía externas [5]. Mediante precipitación se han reportado técnicas como microemulsión donde se han obtenido Dp de 82.5 nm [62] y con entrecruzamiento Dp entre 5-100 nm [63].

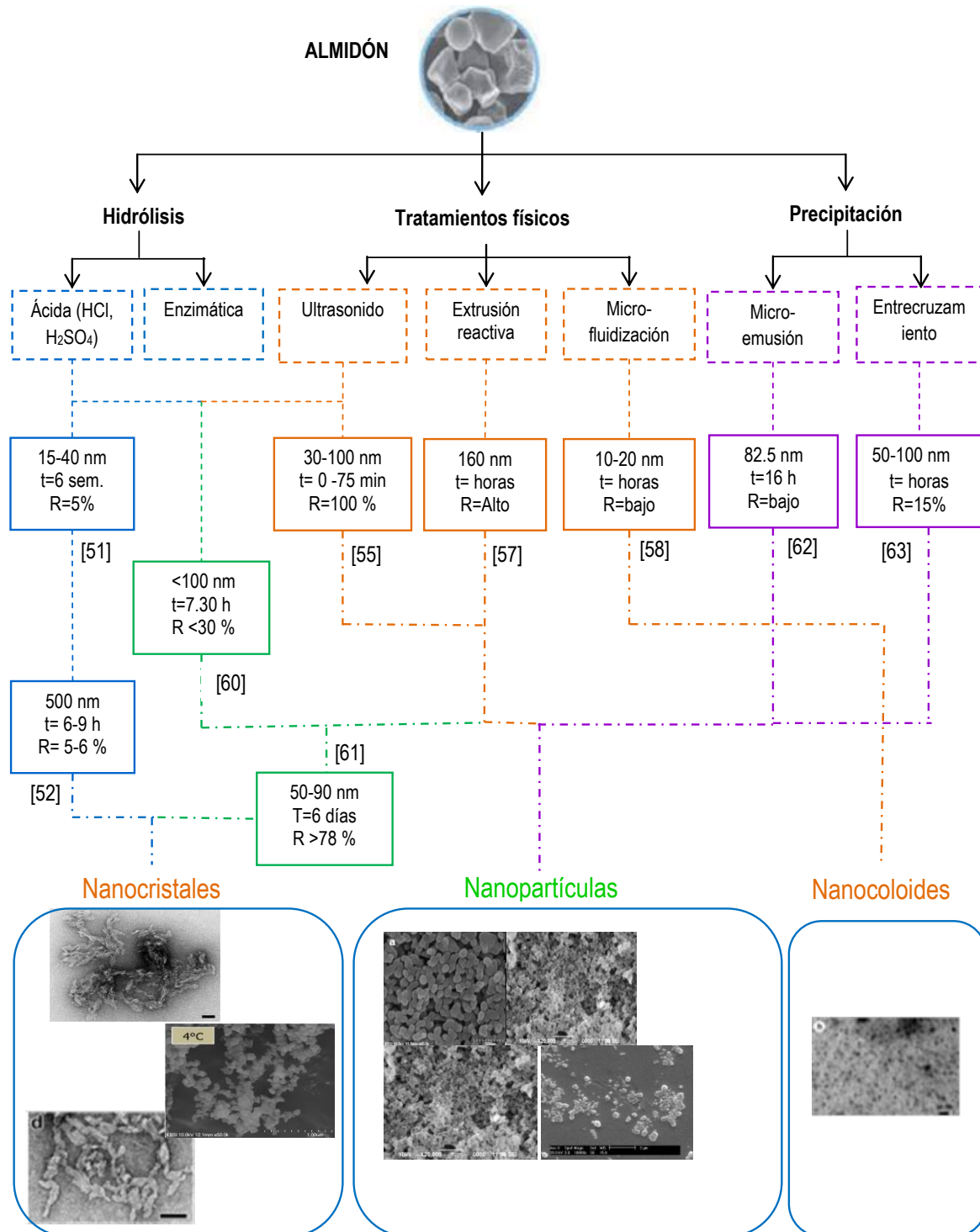


Figura 2.6. Métodos para la preparación de nanocrisales, nanopartículas y nanocoloides a partir de almidón.

2.4. Modificación de la superficie de NPAs

En todas las investigaciones reportadas para la preparación de NPAs se menciona que debido a la gran cantidad de grupos —OH presentes en la superficie de las NPAs, estos materiales presentan una alta tendencia a formar aglomerados especialmente cuando se obtienen en forma de polvo [6]. Por lo tanto, el carácter hidrófilo de este polisacárido es una de las razones que ha limitado el desarrollo y aplicación de las NPAs [64]. Una alternativa para resolver este problema ha sido la modificación química de los grupos —OH [7]. Se ha reportado el uso de ácidos dicarboxílicos [8, 9, 10] o cloruros de ácido [11, 12] para la formación de grupos ésteres. Los grupos —OH con menor impedimento estérico (posición C₆) son los que tienen mayor posibilidad de reaccionar [13]. La modificación también se ha realizado a través de una polimerización por injerto de caprolactona u óxido de etileno, como se ilustra en la Figura 2.7.

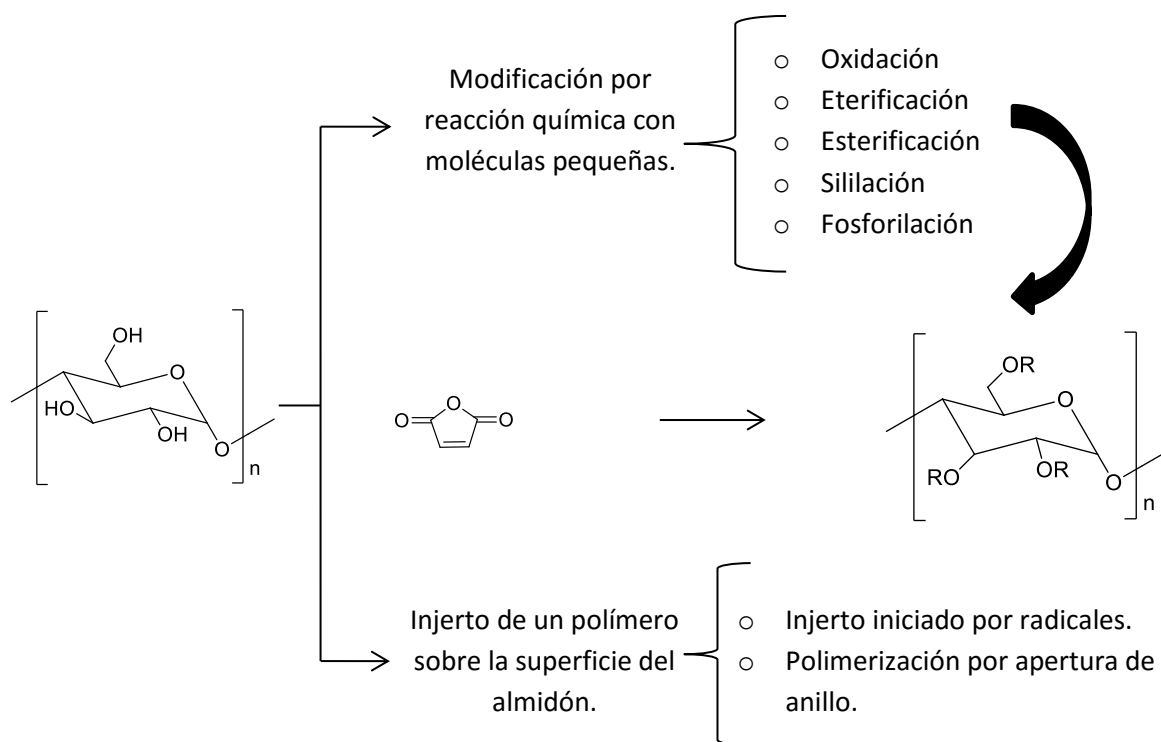


Figura 2.7. Métodos para la obtención de NPAs modificadas químicamente.

2.4.1. Esterificación de almidón

La modificación de almidón con un alto grado de sustitución (DS) utilizando anhídrido acético, para la obtención de almidón acetilado se ha reportado frecuentemente. El grado de sustitución de almidón se define como el número de grupos —OH sustituidos por unidad monomérica. La unidad repetitiva del almidón sólo tiene tres grupos —OH por lo que el grado de sustitución puede variar de 0 hasta 3. El DS de los materiales puede ser controlado variando las condiciones de reacción, tales como temperatura, concentración de reactivos y disolvente utilizado [65].

El uso de ácidos dicarboxílicos como ácido maleico, fumárico y succínico para la formación de monoésteres de almidón se han utilizado con menor frecuencia. La esterificación de almidón se puede realizar con diversos reactivos, tales como anhídridos de ácido, anhídrido octenil succínico (OSA), anhídrido succínico de dodecenilo (DDSA), ácidos grasos y cloruros de ácido graso [11].

Biswas y cols. [66] realizaron un estudio donde sintetizaron maleato de almidón con un DS de 0.25 utilizando una tecnología de calentamiento asistido por microondas y como disolvente dimetil sulfóxido (DMSO) y piridina como catalizador. Sin embargo, el uso de disolventes tóxicos es inadecuado para aplicaciones biomédicas, por lo que se han buscado nuevas alternativas para llevar a cabo la esterificación. En este sentido, Tay y cols. [9] sintetizaron maleato de almidón con un grado de sustitución de 0.21 utilizando como disolvente agua y NaOH como catalizador. La sustitución de anhídrido maleico en las cadenas de almidón se confirmó por espectroscopia de FT-IR. En este estudio se sugiere utilizar las NPAs modificadas con anhídrido maleico obtenidas, como portadoras de fármacos en aplicaciones biomédicas. Posteriormente, Pang y cols. [15] reportaron la síntesis de NPAs modificadas con anhídrido maleico para su cargado con curcumina la cual se considera un ingrediente bioactivo hidrófobo, similar al ubiquinol.

Por otra parte, también se ha realizado la modificación hidrófoba de polisacáridos para la obtención de materiales anfífilicos para usos biomédicos esto, se ha realizado por medio de una reacción química entre los grupos —OH del almidón y cloruros de ácido graso. La esterificación de almidón con estas moléculas presenta varias ventajas en comparación con otros métodos donde se utilizan otros compuestos químicos. Entre las ventajas se encuentran las siguientes: utilización de agua como disolvente en lugar de solventes orgánicos, tiempo de reacción corto, los

productos modificados se precipitan en agua sin la necesidad de utilizar co-solventes. Aunado a ello, los polisacáridos modificados superficialmente con cadenas hidrófobas se están sugiriendo como portadores de fármacos y compuestos bioactivos. En este contexto, Namazi y cols. [11] realizaron un estudio comparativo donde emplearon ácidos grasos de cadena larga como ácido octanóico (C_8), ácido láurico (C_{12}) y ácido palmítico (C_{16}) para la esterificación de NPAs utilizando agua como disolvente y NaOH como catalizador, encontraron que para el almidón de maíz se obtuvo un DS de 0.45 con el ácido octanóico, 0.32 para ácido láurico y 0.11 para ácido palmítico. Mencionan que el DS disminuye cuando aumenta la cadena hidrocarbonada del ácido graso.

En otro estudio, Namazi y cols. [12] realizaron la modificación hidrófoba de nanocristales de almidón utilizando ácido octanóico (C_8), ácido nonanóico (C_9) y ácido decanóico (C_{10}) y como disolvente agua en lugar de disolventes orgánicos como el tolueno. Los resultados indican que el mayor grado de sustitución se logró con el ácido octanóico (0.13). Todos los materiales obtenidos después de la modificación química presentaron mayor estabilidad térmica atribuida a la exitosa sustitución de los grupos $-OH$ presentes en la superficie.

2.4.2. Pasivación con polietilenglicol (PEG)

Un agente de pasivación es aquel que forma una película o envoltorio relativamente inerte sobre la superficie de un material con la finalidad de protegerlo de agentes externos como luz, pH, temperatura y oxígeno. Los agentes utilizados para esta función son altamente tóxicos, ejemplos de ellos son el tiofeno, tiourea y el acetato de mercapto. Recientemente se han utilizado polímeros solubles como el polietilenglicol (PEG) para controlar la forma, tamaño y distribución de tamaño mediante la pasivación de la superficie de las NPs [67]. Pereda y cols. [68] reportaron la preparación de nanocristales de celulosa (NCCs) por el método de hidrólisis ácida, los cuales modificaron superficialmente con soluciones acuosas de PEG. El comportamiento térmico y mecánico de los NCCs que fueron modificados superficialmente mostró la interacción entre los grupos del PEG y los grupos $-OH$ de la celulosa. Por lo tanto, estudio sugiere el uso de PEG como agente de pasivación de NCCs.

2.4.3. Aplicaciones de las NPAs modificadas

Los almidones modificados son conocidos por su idoneidad en aplicaciones biomédicas, ya que en fase acuosa las nanopartículas pueden servir como vehículos de compuestos bioactivos hidrófobos [69, 70]. Se sugiere que las NPAs tienen la capacidad de administrar una gran cantidad de compuestos bioactivos a diferentes partes del cuerpo y durante períodos de tiempo prolongados.

Las NPAs modificadas ya se han utilizado en la encapsulación de compuestos hidrófilos, Zhang y cols. [71] reportaron la síntesis de NPAs injertadas con cadenas de poli (ácido glicólico); (PGA), el cual es un polímero sensible a los cambios de pH. En este trabajo, las nanopartículas funcionalizadas fueron cargadas con insulina (compuesto hidrófilo) y se realizaron estudios *in vitro* donde se demostró que la liberación de la insulina fue mucho más lenta a un pH similar al de los jugos gástricos y fue más rápida a un pH similar al del líquido intestinal.

Recientemente, Chin y cols. [72] realizaron la síntesis de NPAs, mediante un método de nanoprecipitación *in situ* empleando un sistema de microemulsión (w/o). En este caso, las nanopartículas fueron cargadas con curcumina, el cual es un compuesto hidrófobo. Determinaron que la liberación de curcumina depende del hinchamiento de las NPAs, lo que proporcionó un mecanismo de liberación controlada de la curcumina a un pH de 7.4 durante 10 días. En general este estudio sugiere que las NPAs pueden ser utilizadas como vehículos en la liberación de compuestos bioactivos hidrófobos.

2.5. Coenzima Q₁₀

La coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) o ubiquinona es una sustancia que se encuentra presente en todas las células biológicas, donde juega un papel vital en la cadena respiratoria mitocondrial como portador de electrones [73]. Es responsable, junto con otros componentes celulares, de la conversión de energía a partir de carbohidratos y ácidos grasos en vía metabólica. También, activa factores de transcripción del ADN, como el complejo proteico NF-κB, el cual se encarga de inducir la expresión genética [16]. Además, dependiendo de su estado de óxido-reducción, esta coenzima, puede presentarse en tres formas: totalmente oxidada (1), oxidación intermedia (2) y

totalmente reducida (3), esta última es conocida como ubiquinol, sus diferencias químicas se muestran en la Figura 2.8 [17].

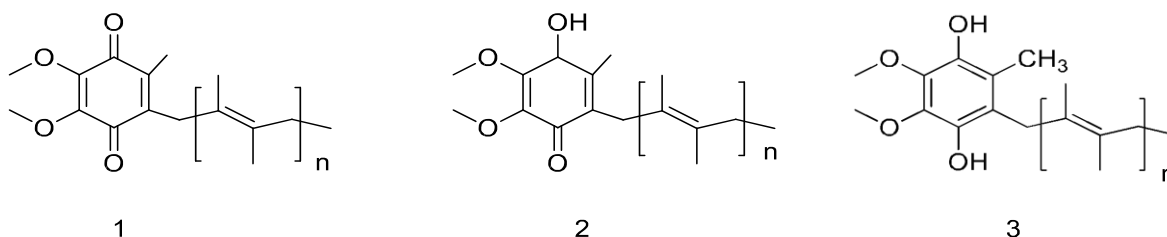


Figura 2.8. Estados de oxidación-reducción de la CoQ₁₀.

La forma totalmente reducida (ubiquinol), actúa como un potente antioxidante debido al mecanismo de oxidación-reducción (Figura 2.9) que permite inhibir la peroxidación de los fosfolípidos presentes en la membrana celular. Así mismo, protege a las proteínas mitocondriales y al ADN de los efectos negativos ocasionados por los radicales libres [18]. Además, el ubiquinol puede potenciar su actividad antioxidante cuando es combinado con otros compuestos poli-insaturados como, α -tocoferol y limoneno [75]. Aunado a esto, también se ha identificado que este compuesto, presenta propiedades antiinflamatorias y su efecto se ha comprobado en estudios *in vitro* [19]. En general, se prefiere el suministro oral de ubiquinol ya que este, presenta mejor actividad biológica que la ubiquinona [20].

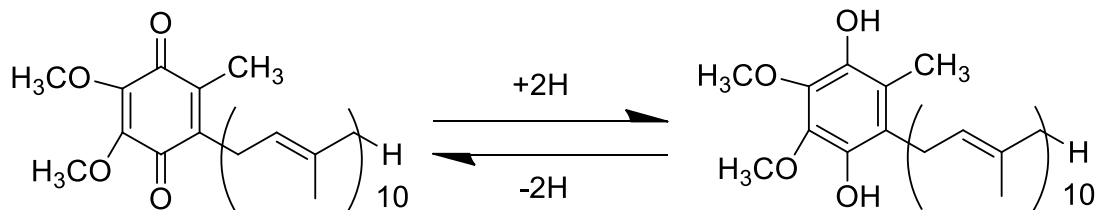


Figura 2.9. Estructura molecular de la ubiquinona y ubiquinol. La conversión se produce por un mecanismo de oxidación-reducción.

2.5.1. Propiedades de la CoQ₁₀

La CoQ₁₀ es sintetizada por el cuerpo humano cuando se es sano y joven se almacena en las glándulas del corazón, riñones, hígado, músculos, páncreas y tiroides [76]. Donde ayuda a

prevenir diversas enfermedades como: diabetes mellitus tipo II [77]; cáncer [78]; dolor de cabeza ocasionado por migraña [79]; enfermedades del sistema cardiovascular (hipertensión, enfermedad coronaria, latido irregular del corazón e insuficiencia cardiaca congestiva) y enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, síndrome de fatiga crónica, fibromialgia y depresión) [80].

No obstante, la velocidad de síntesis de este compuesto disminuye con la edad, algunos estudios evidencian que después de los 21 años [81]. Por lo que se ha intentado suministrar al organismo mediante la ingesta de algunos alimentos como: carnes rojas, pescados, aves, productos lácteos, brócoli y espinacas [82] pero estas fuentes sólo contribuyen en una concentración muy baja de 3-5 mg CoQ₁₀/día en la dieta de países occidentales [83]. Es por ello, que en los últimos años ha habido un interés en el uso de CoQ₁₀ como ingrediente funcional de alimentos y bebidas. Sin embargo, esto no ha sido fácil de lograr debido a factores como: su alto peso molecular (863 g/mol); estructura cristalina; alta susceptibilidad a la degradación por calor (punto de fusión de 48°C) [84], exposición a la luz y al oxígeno [85]; pero principalmente, debido a su baja solubilidad en agua (<4 ng/mL) [86], su biodisponibilidad oral y por lo tanto la absorción en el tracto digestivo de los humanos es muy baja (T_{max}, 5-10 h) [87]. Es por ello, que en los últimos años se han realizado muchas investigaciones dirigidas a subsanar dicha problemática.

2.6. Métodos usados para mejorar la biodisponibilidad oral de la CoQ₁₀

Con la finalidad de mejorar la biodisponibilidad oral de la CoQ₁₀ se han desarrollado métodos enfocados en aumentar su solubilidad en agua, los cuales se muestran en la Figura 2.10. Entre los más importantes y eficientes se encuentran: los Sistemas de Administración de Fármacos Autoemulsificados (SEDDS) o nanoemulsificados (SNEEDS); formación de complejos entre la CoQ₁₀ y las ciclodextrinas (CDs); dispersiones acuosas usando polisacáridos, liposomas y preparación de micro y nanopartículas poliméricas. A continuación se describen algunos de los trabajos más importantes donde se han utilizado dichas metodologías.

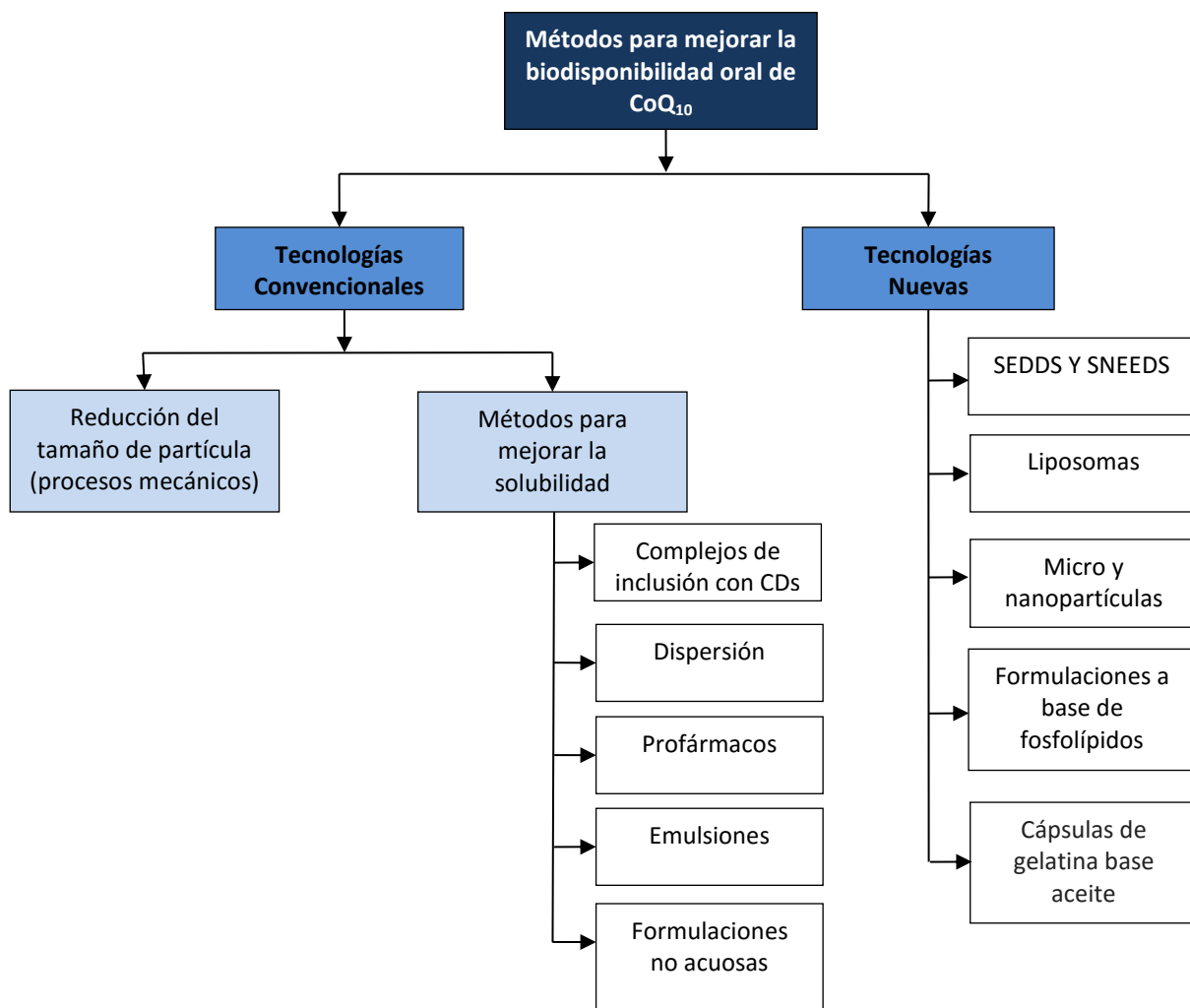


Figura 2.10. Métodos utilizados para mejorar la biodisponibilidad oral de la CoQ₁₀.

2.6.1. Sistemas de Administración de Fármacos Autoemulsificados (SEDDS) o Nanoemulsificados (SNEEDS)

En estos sistemas se utilizan, principalmente, mezclas isotrópicas de aceites, tensoactivos y co-tensoactivos que forman, mediante agitación suave, una emulsión en agua [88]. Se han publicado muchos estudios *in vitro* enfocados en el desarrollo de SEDDS y SNEEDS [89,90], así como otros realizados *in vivo* [91, 92, 93, 94]. A continuación se mencionan algunos de los trabajos reportados donde se ha logrado mejorar significativamente la biodisponibilidad oral de la CoQ₁₀.

Por ejemplo, Kommuru y cols. [91] prepararon un SEDDS de CoQ₁₀, utilizando aceites de triglicéridos (aceite de cacahuate, maíz y soya) como disolvente y glicéridos poliglicolizados (PGG)

como tensoactivo, encontraron que todos los sistemas aumentaron la biodisponibilidad oral de la CoQ₁₀ dos veces más que una formulación en polvo, cuando fueron evaluadas en perros. Así mismo, Balakrishnan y cols. [92] desarrollaron una formulación para la preparación de un SEDDS, la composición fue optimizada mediante la elaboración de diagramas de fase utilizando diferentes aceites y tensoactivos, al evaluar este nuevo sistema en ratas, encontraron que hubo un aumento significativo en la biodisponibilidad oral en comparación con una formulación en polvo.

Aunque esta técnica permite aumentar la biodisponibilidad oral de la CoQ₁₀, se ha reportado que algunos aceites o tensoactivos suministrados en forma de emulsiones, suspensiones o dispersiones pueden causar toxicidad potencial en el cuerpo humano [90]. Además, si su aplicación final es como suplemento de alimentos, dichos componentes pueden proporcionar sabores desagradables y por lo tanto mala calidad organoléptica para el consumidor final [76].

2.6.1.1. Formación de complejos entre la CoQ₁₀ y las ciclodextrinas (CDs).

Las CDs son oligosacáridos cíclicos derivados del almidón, que tienen una superficie hidrófila y una cavidad hidrófoba en forma de hueco, como se ilustra en la Figura 2.11 [95] característica que les permite formar complejos de inclusión con moléculas que tienen baja solubilidad en agua como la CoQ₁₀. El aumento de esta propiedad en los compuestos huéspedes, aunado a las propiedades que tienen las ciclodextrinas como: estabilidad al calor, oxidación y luz UV ha dado lugar al desarrollo de muchas investigaciones enfocadas a mejorar la biodisponibilidad oral de este compuesto hidrófobo.

Por ejemplo, Gao y cols. [96] realizaron un estudio sistemático donde evaluaron tres ciclodextrinas naturales (α -, β - y γ -CDs) y una hidrófila (2-hidroxipropil- β -CD); al evaluar las formulaciones en perros encontraron que con la γ -CD se mejoró significativamente la solubilidad de la CoQ₁₀ debido a la formación de complejos solubles entre estos dos compuestos. Terao y cols. [97] reportaron un estudio comparativo entre un complejo de CoQ₁₀- γ -CD y una mezcla de CoQ₁₀ con celulosa microcristalina (CoQ₁₀-MCC), y al evaluar estas formulaciones en adultos sanos, encontraron que la formulación de CoQ₁₀- γ -CD aumentó significativamente los niveles de CoQ₁₀ en el plasma de todos adultos evaluados, en comparación con la formulación de CoQ₁₀-MCC. Estos resultados indican que la absorción y biodisponibilidad oral de la CoQ₁₀ se puede

mejorar mediante este método y se sugiere como una opción viable para su administración por vía oral.

En otro estudio, Žmitek y cols. [98] reportaron datos de la mejora en biodisponibilidad oral y bioequivalencia de un complejo de CoQ₁₀-β-CD (conocido en la industria alimentaria como Q₁₀Vital®), en este caso se logró aumentar la concentración de CoQ₁₀ en el plasma de humanos sanos cuando se suministró una nueva formulación líquida (Q₁₀Vital®-líquido; 0.58±0.32 mg/L) o en polvo (Q₁₀Vital®-polvo; 0.55±0.19 mg/L), en comparación con una formulación comercial de cápsulas de gelatina suave con CoQ₁₀ disuelta en aceite de soya (0.44±0.16 mg/L). El estudio demostró que la bioequivalencia de las nuevas formulaciones es mayor a los límites que requiere la FDA (90-125 %).

Aunque en todos los estudios se logró aumentar la biodisponibilidad oral de la CoQ₁₀ con esta técnica, es importante mencionar que en la mayoría de los casos se reporta que el potencial zeta de las formulaciones en polvo es 0 mV, lo que indica que el complejo formado, genera precipitados que son inestables para un almacenamiento prolongado [99].

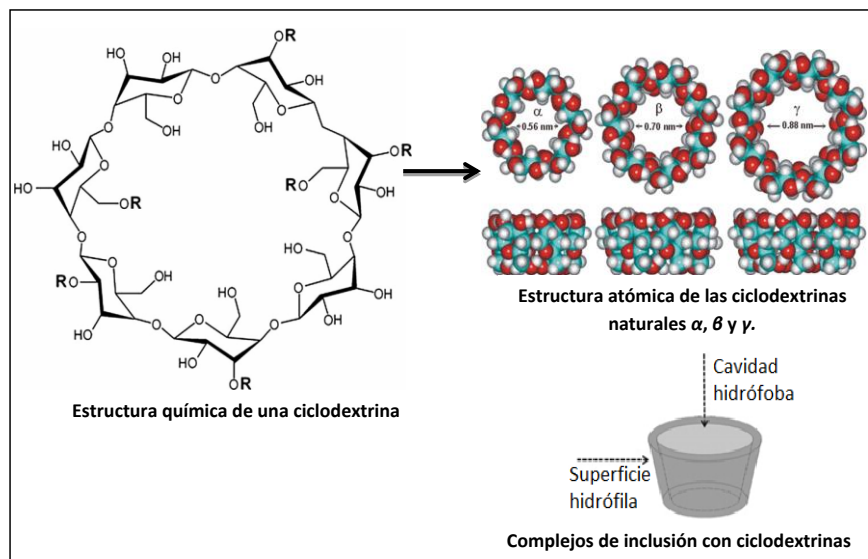


Figura 2.11. Complejos de inclusión con ciclodextrinas, que permiten mejorar la biodisponibilidad oral de la CoQ₁₀.

2.6.1.2. Dispersiones de CoQ₁₀ en soluciones acuosas de almidón

El almidón también se ha utilizado para estabilizar dispersiones acuosas de CoQ₁₀. Kim y cols. [76] prepararon mediante tratamiento térmico con autoclave (121°C/20 min) dos dispersiones acuosas. Una de almidón de maíz (70 % de amilosa) y otra de dextrinas obtenida por hidrólisis ácida del mismo almidón. Las cuales se utilizaron para dispersar a la CoQ₁₀. Posteriormente mediante centrifugación separaron las partículas formadas las cuales tenían un Dp de 5-7 µm. Después, con diferentes tiempos de ultrasonido (3, 5 y 7 min) lograron reducir el Dp a nanómetros. Los resultados muestran que con el menor tiempo de ultrasonicación se presentaron precipitados después de 2 horas de almacenamiento. Mientras que con el tratamiento de 5 minutos de ultrasonicación se redujo el Dp hasta 80 nm para dextrina y 250 nm para almidón. Además, las dispersiones permanecieron estables durante 3 semanas. En el tratamiento donde se utilizaron 7 min de ultrasonicación se presentó un aumento en la población de partículas con tamaño en el orden de micras y una disminución en la población de partículas con tamaño nanométrico. Los autores afirman que este tiempo de ultrasonicación ocasiono la aglomeración de las partículas pequeñas.

Posteriormente, Yoon y cols. [73] optimizaron el estudio mencionado anteriormente. En este caso, se evaluó el efecto del tiempo y la temperatura en la formación de las dispersiones de CoQ₁₀ utilizando almidón de maíz con diferente contenido de amilosa (0, 25 y 70 % de amilosa). También se utilizaron dos dextrinas con diferente longitud de cadena, las cuales se obtuvieron por hidrólisis ácida del almidón que tenía 70 % de amilosa. Los resultados evidencian que con el almidón de maíz con 25 % de amilosa se logró dispersar un 57.3 % de CoQ₁₀, seguido del almidón con 70 % de amilosa con el cual se dispersó el 21.9 %, mientras que con el almidón con 0 % de amilosa sólo se dispersó un 9.8 % de CoQ₁₀. Estos resultados se obtuvieron cuando la dispersión se realizó a 100°C durante 3 horas. En cuanto al tamaño de las partículas después del tratamiento con ultrasonido fue <150 nm y la dispersión permaneció estable durante 2 semanas. Es este estudio describen el proceso de la formación de la dispersión mediante un esquema, el cual se muestra a continuación.

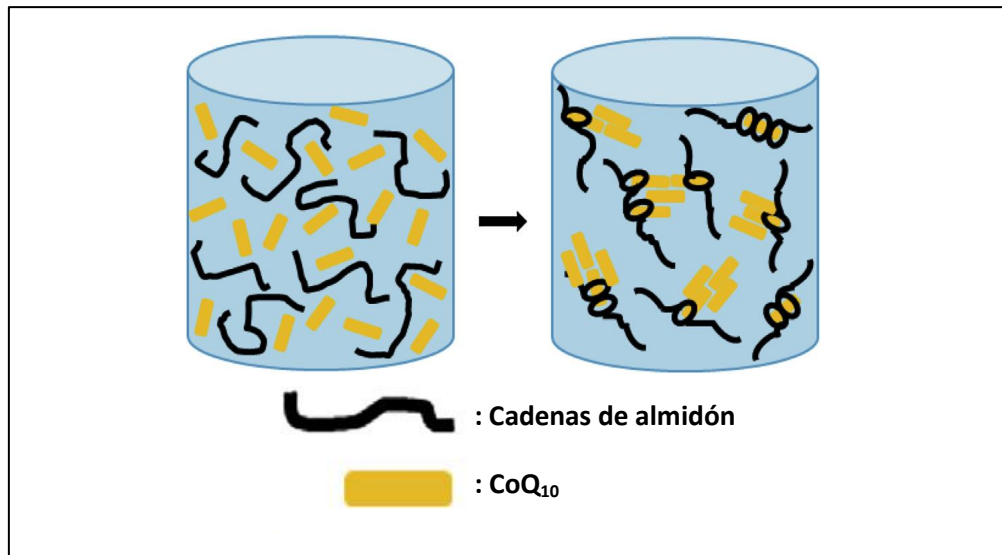


Figura 2.12. Proceso de la formación de la dispersión de CoQ₁₀ en soluciones acuosas de almidón de maíz.

2.6.1.3. Liposomas

Son vesículas esféricas que tienen una membrana compuesta por una doble capa de fosfolípidos (moléculas que tienen una parte hidrófoba y otra hidrófila). Su tamaño de diámetro está en el orden de nanómetros o micrómetros. Los liposomas sirven para transportar compuestos atrapados en su interior (Figura 2.13) y entregarlos en un sitio de acción específico. Las moléculas anfífilas y lipófilas (CoQ₁₀) se solubilizan dentro de la doble capa de fosfolípidos de acuerdo a su afinidad hacia estos [100]. El uso de liposomas ha mostrado un aumento en la biodisponibilidad oral de compuestos hidrófobos y ya han sido probados con la CoQ₁₀, incluso para el CoQ₁₀-H₂ [101].

En este sentido, Xia y cols. [102] incorporaron diferentes concentraciones de CoQ₁₀, en nanoliposomas compuestos de fosfolípidos extraídos de la yema de huevo, así como colesterol y Tween 80. Los resultados obtenidos muestran que los liposomas sin CoQ₁₀ se agregaron después de 90 días y aumentaron su tamaño desde 117.5 a 260.9 nm. Mientras que los nanoliposomas que contenían CoQ₁₀ presentaron mayor estabilidad por el Tween 80 incorporado, además de acuerdo a estudios realizados *in vivo* esta formulación permitió aumentar la capacidad antioxidante del compuesto a nivel de la membrana celular.

Así mismo, Lee y col. [103] desarrollaron una formulación liposomal compuestos de fosfatidilcolina de soya y α -tocoferol (vitamina E), la cual se empleó para encapsular CoQ_{10} y evaluar *in vivo* su capacidad antioxidante por vía tópica. Los liposomas formulados tenían un diámetro menor a 200 nm y con distribución estrecha. La encapsulación y subsecuente acumulación de CoQ_{10} en la piel de ratas se mejoró dos veces más en comparación con una suspensión de CoQ_{10} sin encapsular. Con este estudio se demuestra que los liposomas elaborados son candidatos prometedores para la aplicación tópica de CoQ_{10} .

Por otro lado Fiorini y cols. [104] prepararon liposomas de lecitina de huevo y dimiristoil fosfatidilcolina para evaluar la localización de ubiquinol en la bicapa lipídica de los liposomas. Ya que la eficiencia del poder antioxidante del compuesto depende de su localización dentro del material. Los resultados encontrados indican que las moléculas de $\text{CoQ}_{10}\text{-H}_2$ se encuentran en la interface del lípido polar, lo cual induce a cambios en las propiedades fisicoquímicas de la bicapa de fosfolípidos. El anillo del ubiquinol (quinona) no se localiza en el centro de la bicapa fosfolípida como se pensaba anteriormente, sino que se localiza cerca la cabeza polar de los fosfolípidos en la que sus grupos hidroxilo pueden formar puentes de hidrógeno con el agua, lo que hace que aumente su solubilidad.

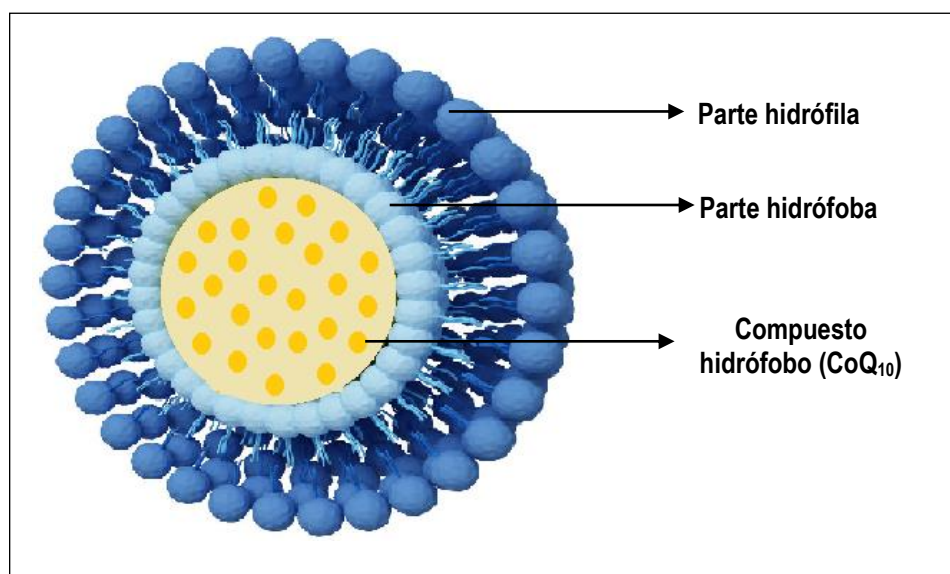


Figura 2.13. Estructura de un liposoma para encapsular CoQ_{10} .

2.6.1.4. Encapsulación de CoQ10 en micro y nanopartículas biopoliméricas

La encapsulación es una tecnología en la que se aplica una barrera física (matriz polimérica) para proteger a un compuesto bioactivo de cualquier condición adversa como: temperatura, luz, pH, humedad y oxígeno, con la finalidad de conservar su funcionalidad hasta que se encuentren en el sitio de acción específico [44].

Actualmente, existe una gran variedad de materiales para encapsular moléculas bioactivas. Sin embargo, es recomendable utilizar aquellos que sean inertes, que ofrezcan una buena protección al compuesto bioactivo frente a las condiciones ambientales, además se recomienda que pueda manipularse en disolventes o condiciones aceptables y aprobadas para uso en la industria alimentaria como agua o etanol, finalmente es recomendable que sean grado alimenticio (GRAS) esto, con el fin de garantizar una liberación controlada, además de mantener la estabilidad y calidad del compuesto [2]. Así mismo, considerando que estos soportes estarán por un largo periodo de tiempo dentro del cuerpo humano, es requisito fundamental que los materiales sean biocompatibles y biodegradables. Es por ello que se ha mostrado un interés creciente en el uso de biopolímeros para la síntesis de micro y nanopartículas que funcionen como medio de transporte en la administración de compuestos bioactivos.

Entre los biopolímeros más usados se encuentran aquellos provenientes del poli (ácido L-glutámico); PGA, tales como: poli (ácido láctico); PLA, polietilenglicol; PEG y sus copolímeros como el poli (ácido láctico-co-glicólico); PLGA, así como algunos polisacáridos, entre ellos el quitosán y almidón (Tabla 2.3). Sin embargo, los polisacáridos se han convertido en los materiales más utilizados, debido a que mejoran la solubilidad y estabilidad del compuesto activo, disminuyen su posible toxicidad y efectos secundarios; además se encuentran en abundancia en la naturaleza y tienen un costo de procesamiento relativamente bajo [4].

Por ejemplo, Bule y cols. [85] realizaron un estudio donde primero evaluaron la solubilidad de la CoQ₁₀ en diferentes aceites (cártamo, oliva, salvado de arroz, coco y linaza). Posteriormente, mediante la técnica de emulsión (w/o) encapsularon CoQ₁₀, usando dispersiones acuosas de goma arábica (GA), maltodextrina (MD) y almidones modificados (MS). De acuerdo a los resultados obtenidos la solubilidad de la CoQ₁₀ fue mayor en los aceites de coco y linaza, esto a 37°C. Sin embargo, para continuar con el estudio se utilizó el aceite de linaza debido a que proporciona

beneficios para la salud incluyendo la prevención o tratamiento de enfermedades. En cuanto al uso de las dispersiones acuosas también se hicieron mezclas de las mismas y se encontró que la estabilidad de las microcápsulas y la eficiencia de encapsulación fue mejor con GA (84.27 %) en comparación con la MD (46.22 %) y MS (53.31 %). El Dp menor de las microcápsulas también se logró con GA (14 μ m). Finalmente se confirmó mediante exposición de las microcápsulas a la luz UV que esta técnica puede proteger a la CoQ₁₀.

Tabla 2.3. Biopolímeros usados para micro y nanoencapsulación de CoQ₁₀

BIOPOLÍMERO	MÉTODO	RESULTADO	REFERENCIA
Ácido poliglicólico y sus copolímeros			
Poli (ácido láctico-co-glicólico); (PLGA).	Emulsión; fase orgánica: PLGA disuelto en acetato de etilo y una solución acuosa de bromuro de didodecil metil amonio (DMAB).	NPs de PLGA solas con diámetro de 100.9 ± 2.8 nm y PDI de 0.095 ± 0.007 y de 107.3-131.6 nm cuando se encapsuló la CoQ ₁₀ (5-75% p/p) respectivamente.	[105]
Poli (ácido láctico-co-glicólico); (PLGA).	Nanoprecipitación: 50 mg de PLGA/5 mL de acetonitrilo; solución de PLGA: agua desionizada; 1:10 v/v.	NPs menores de 200 nm, con dispersidad estrecha, morfología esférica y potencial Z de -40 mV.	[106]
Poli (ácido láctico) (PLA) y poli (etilenglicol) (PEG).	Microencapsulación por expansión rápida de soluciones supercríticas (Dióxido de carbono).	Microesferas de PLA (2-3 μ m) y PEG (4-6 μ m).	[107]
Polisacáridos			
Quitósán y N-carboximetil quitósán (NCCM), entrecruzadas con triptófano (TPP).	Secado por aspersión: antes del secado se agregó 20 % (p/p) de dióxido de silicio coloidal (Aerosil 200) con respecto a la concentración de idebenona.	NPs cargadas con idebenona con tamaño de diámetro de 400-1000 nm el cual esta inversamente relacionado con el entrecruzamiento con TPP.	[108].
Goma arábica, maltodextrina y almidón modificado.	Emulsión; dispersiones de goma arábica (GA), maltodextrina (MD) y almidones modificados (MS) y CoQ ₁₀ disuelta en	Los mejores resultados se obtuvieron con GA (84.27 %) en comparación con la MD (46.22 %) y MS (53.31 %). El menor tamaño de	[85]

aceite de linaza.

también se logró con GA (14
µm)

De acuerdo a lo anteriormente mencionado se puede utilizar almidón en la síntesis de nanopartículas para encapsular o adherir CoQ₁₀, la cual es vulnerable a luz, oxígeno y temperatura y con esta tecnología se puede proteger de tales efectos. Además, se considera como una tecnología viable debido a su posible escalamiento y bajo costo [106].

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Las nanopartículas de almidón preparadas mediante el tratamiento alcalino de los gránulos y posterior dispersión con métodos físicos pueden ser modificadas superficialmente para la generación de grupos químicos que favorezcan la interacción con moléculas de ubiquinol.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Obtener nanopartículas de almidón modificadas superficialmente para su evaluación como portadoras de ubiquinol.

3.2.2. Objetivos particulares

- Preparar nanopartículas de almidón mediante el tratamiento alcalino de los gránulos y posterior dispersión con energía mecánica y de ultrasonido.
- Modificar superficialmente las nanopartículas de almidón utilizando tres moléculas diferentes: anhídrido maleico (AM), cloruro de lauroilo (CL) y polietilenglicol (PEG).
- Reducir químicamente la ubiquinona para la obtención de moléculas de ubiquinol estables.
- Evaluar las nanopartículas modificadas superficialmente como portadoras de ubiquinol.

IV. METODOLOGÍA

A continuación se describen los materiales y reactivos, así como los equipos necesarios para el desarrollo de la metodología que se describirá en los apartados siguientes y que fueron utilizados para la preparación, modificación y caracterización de las NPAs, así como para la reducción química de ubiquinona a ubiquinol y posterior evaluación del cargado de las NPAs con ubiquinol.

4.1. Materiales y Reactivos

Todos los reactivos de Sigma-Aldrich se utilizaron sin purificación adicional. Almidón soluble, almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p), almidón de maíz (esencialmente amilopectina), almidón de maíz (70 % de amilosa), urea al 98 %, hidróxido de sodio (NaOH) al 97 %, anhídrido maleico 98 %, cloruro de lauroilo 99 %, PEG (Mw= 10,000 g/mol), d-limoneno 98.7%. El ubiquinol se obtuvo de la reacción de reducción de la coenzima Q₁₀ (99.1%) con borohidruro de sodio (99 %). Las muestras para resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) y resonancia magnética nuclear de carbono (¹³C-RMN) se disolvieron en sulfóxido de dimetilo deuterado (DMSO-d₆) con 99.96 % de deuterio, cloroformo deuterado (CDCl₃-d) con 99.96 % de deuterio y óxido de deuterio (D₂O) con 99.99 % de deuterio. Para la purificación de las NPAs se utilizó una membrana para diálisis MWCO 12400 y agua desionizada obtenida de 2 columnas de intercambio iónico Cole-Parmer. Todos los solventes, como el etanol y ciclohexano fueron grado analítico. Para la caracterización por TEM se utilizó acetato de uranilo (C₄H₆O₆U·2H₂O), como agente de tinción negativa.

4.2. Equipos

Para la preparación de las NPAs por el método alcalino se utilizó una parrilla de agitación magnética con calentamiento; un agitador mecánico IKA con una propela de cuatro aspas a 45°; un congelador comercial (CH5 F0, Torrey) y una liofilizadora Labconco Freezone, un homogeneizador ultrasónico Q SONICA (U.S.A.) con una potencia de 750 W y una frecuencia de 24 kHz, provisto de una punta con diámetro de 13 mm; reactor enchaquetado de vidrio de 100 mL;

centrifuga (Allegra 64R Beckman Coulter). En la modificación de las NPAs se utilizó: un sistema de reacción que comprende de matraz bola de 100 mL con 3 bocas, provisto de un sistema de reflujo; una parrilla de agitación magnética; un baño de temperatura controlada; una estufa de vacío.

La determinación del tamaño y morfología de NPAs se hizo por dispersión de luz dinámica (DLS), a un ángulo de 180°, en un equipo modelo Microtrac Nano-Flex, por microscopía electrónica de barrido (SEM) en un equipo modelo TOPCON SM-510, microscopía electrónica de transmisión (TEM), marca Titán, modelo FEI a condiciones 80-300 KV.

La caracterización química de las NPAs modificadas, se hizo en un espectrómetro (FT-IR) Nicolet Magna 550, acoplado a un micro ATR con cristal de germanio, con un rango de longitud de onda de 4000-400 cm^{-1} . El análisis termogravimétrico de muestras de almidón y nanopartículas se hizo en un equipo TA Instruments Q500. La caracterización de los productos obtenidos después de la reacción de reducción se hizo en un espectrómetro (FT-IR) Nicolet 6700, espectrómetro de RMN Bruker con campo magnético de 11.7 tesla y 500 MHz.

Para determinar del contenido de ubiquinol adherido a las NPAs modificadas se empleó un espectrofotómetro UV-Vis Cary 5000, versión 1.12, en un rango de longitud de 200 a 400 nm.

4.3. Metodología

4.3.1. Preparación de NPAs

Para encontrar las condiciones que nos permitieran obtener partículas con las características deseadas, como Dp menor a 50 nm, dispersidad estrecha y un alto rendimiento, se emplearon dos métodos: (1) tratamiento alcalino con agitación mecánica y (2) tratamiento alcalino con energía de ultrasonido. A continuación se describe cada uno de ellos.

4.3.1.1. Tratamiento alcalino con agitación mecánica

Para la preparación de las NPAs se hizo una adaptación de la metodología reportada por Zhang y cols. [59]. En un vaso de precipitado de 250 mL se colocaron 100 mL de una solución de NaOH/urea/agua, en una relación de 6/4/90 (p/p), a la que se agregaron lentamente 10 g de

almidón soluble y de maíz con diferente relación amilopectina/amilosa. La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética a 300 rpm durante 24 h a 30°C. Al final se obtuvo una dispersión homogénea donde ya no se apreciaba la presencia de grumos. La solución se almacenó en un congelador a -15°C durante 24 h. Pasado este tiempo, la solución se descongeló utilizando agitación mecánica (1000 y 2000 rpm), durante 30 min. Al final, se obtenía una dispersión homogénea y viscosa. La dispersión de NPAs se transfirió a un tubo de diálisis para eliminar el NaOH y urea hasta llegar a un pH de 7, para lo cual se cambió el agua destilada tantas veces como fue necesario. La dispersión a pH neutro se transfirió a un vaso de liofilización y se congeló para llevarla al liofilizador donde se eliminó la totalidad del agua. Las NPAs se obtuvieron en forma de un sólido blanco, el cual se pesó y se almacenó en un frasco cerrado para protegerlo de la humedad.

4.3.1.2. Tratamiento alcalino con energía de ultrasonido

Para la preparación de las NPAs se hizo una combinación de la metodología reportada por Zhang y cols. [59] y Haaj y cols. [55]. En un vaso de precipitado de 100 mL se colocaron 50 mL de una solución de NaOH/urea/agua, en una relación de 6/4/90 (p/p), a la que se agregó lentamente una determinada cantidad de almidón (0.5, 2.5 y 5 g). La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética durante 24 h a 30°C. Al final se obtuvo una dispersión homogénea donde ya no se apreciaba la presencia de grumos. La dispersión se colocó en un baño de agua con hielo y sometió a energía de ultrasonido durante un intervalo de tiempo determinado (5, 10 y 15 min) en un homogeneizador ultrasónico. Durante la sonicación de las muestras, la amplitud ultrasónica se moduló al 60 %. Concluido el tiempo de sonicación, las dispersiones se transfirieron a tubos de diálisis para eliminar el NaOH y urea hasta obtener un pH de 7, para lo cual se cambió el agua destilada tantas veces como fue necesario. Una parte de la dispersión a pH neutro se transfirió a un vaso de liofilización y se congeló para llevarla al liofilizador donde se eliminó la totalidad del agua. Las NPAs se obtuvieron en forma de un sólido blanco, el cual se pesó y se almacenó en un frasco cerrado para protegerlo de la humedad.

4.4. Modificación de la superficie de las NPAs

En la presente investigación se realizó la modificación superficial de las NPAs con anhídrido maleico (AM), cloruro de lauroilo (CL) y polietilenglicol (PEG). Esto con el objetivo de sustituir los grupos —OH presentes en la superficie de las NPAs y lograr el anclaje del ubiquinol o bien formar un envoltorio sobre las NPAs para lograr la estabilidad termodinámica del material que nos permitiera controlar la morfología, tamaño y distribución del tamaño de las NPAs.

4.4.1. Modificación superficial con anhídrido maleico (AM)

En este caso se hizo una adecuación del método de esterificación con AM propuesto por Tay y cols. [9] y Pang y cols. [15]. En un matraz bola se cargaron 8 g de NPAs (0.044 mol de anhidroglucosa) y 10 mL de agua ultrapura (18.2 MΩ). La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 15 min, con lo que se obtuvo una dispersión cuasi-homogénea ya que la concentración de NPAs era muy alta. Posteriormente, se adicionaron 12.5 mL de una solución acuosa de NaOH 2.0 M y se continuó con agitación magnética hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla de NPAs en presencia del medio básico fue lentamente gelatinizada cambiando su apariencia a mezcla viscosa de color amarillo claro. Posteriormente, se adicionaron 7.9 g de AM (0.080 mol), continuando con la agitación y temperatura de reacción controlada a 80°C, durante un tiempo de 7 h. Al término del tiempo indicado, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y las NPAs modificadas se precipitaron en 50 mL de etanol absoluto. El precipitado obtenido se separó del etanol mediante un proceso de filtración bajo vacío empleando membranas de nylon con poro de 0.2 μm. El filtrado se lavó en 3 ocasiones con etanol con la finalidad de eliminar el exceso de AM y sus derivados (ácido maleico). Las NPAs se secaron en una estufa de vacío a 40°C por 2 días. Para eliminar el AM libre las NPAs se re-disolvían en agua ultrapura (0.01g/mL), se re-precipitaban en 100 mL de etanol y se volvían a secar.

4.4.2. Modificación con cloruro de lauroilo (CL)

Se hizo una adecuación del método de esterificación con CL propuesto por Namazi y cols. [11,12]. En un matraz bola de 50 mL se cargaron 2 g de NPAs y 10 mL de agua ultrapura (18.2 MΩ). La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 h, con lo que se

obtuvo una dispersión cuasi-homogénea. Enseguida la dispersión se sonó por 5 min a 60 % de potencia, usando un baño de hielo para mantener la temperatura de la muestra. Posteriormente, se adicionaron 3 mL de una solución acuosa de NaOH 2.0 M y se continuó con agitación magnética hasta obtener una mezcla homogénea de color marrón oscuro. Al gel obtenido se le adicionaron 3 mL de cloruro de lauroilo ($C_{12}H_{23}ClO$), continuando con la agitación magnética durante 5 min, a 25°C. Las NPAs se precipitaron en 100 mL de etanol absoluto. Se realizó una extracción del cloruro de lauroilo que no reaccionó utilizando un sistema Soxhlet. El precipitado obtenido se separó centrifugando en dos ocasiones a 10,000 rpm/30 min. Las NPAs se secaron en una estufa de vacío a 40°C por 2 días.

4.4.3. Pasivación con polietilenglicol (PEG)

En este caso se siguió la metodología reportada por Pereda y cols. [68] donde se llevó a cabo la pasivación con PEG de nanocristales de celulosa.

4.4.3.1. Preparación de la solución de PEG (10,000 g/mol).

En un matraz de 250 mL se preparó una solución de PEG (10,000 g/mol) al 1.25 %, en agua ultrapura (18.2 M Ω), se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante 4 h. La solución se protegió de la luz para evitar la foto-oxidación del polímero.

4.4.3.2. Pasivación de las NPAs con PEG

Se preparó una dispersión de NPAs en agua ultrapura (18.2 M Ω), a la cual se le agregó lentamente la solución de PEG (1.25 %). La relación final de NPAs/PEG fue 65/35 p/p. La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética durante 4 horas, protegiéndola de la luz. Después de este tiempo la mezcla se purificó en repetidas ocasiones para eliminar el PEG que no se encontrará unido en la superficie de las NPAs, al final la dispersión se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó hasta la eliminación total de agua.

4.5. Reducción química de la ubiquinona

En este caso se siguió la metodología que reporta por Murphy y cols. [109]. En un matraz de vidrio de 100 mL de capacidad se colocan 3.0 g CoQ₁₀ disuelta en 20 mL de éter dietílico, a esta solución se le adicionaron con ayuda de un embudo de adición 1.50 g de borohidruro de sodio en 30 mL de agua bidestilada. La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas. Durante este tiempo se monitoreo la reacción por medio de cromatografía en capa fina. La relación entre las distancias recorridas por los compuestos y por el acetato de etilo/hexano al 10 % v/v desde el origen de la placa (RF) fue de 0.6 para la CoQ₁₀ y de 0.48 para el CoQ₁₀-H₂. La reacción continuó hasta que en su totalidad la ubiquinona se ha transformado en ubiquinol. Después la mezcla de reacción se decanta y se separa el extracto etéreo adicionando 50 mL de éter dietílico al producto de la reacción. Posteriormente el éter se destila del extracto y el sólido amarillo es almacenado en atmósfera de nitrógeno. El proceso de reducción de la CoQ₁₀ por NaBH₄, se muestra en la Figura siguiente (Figura 4.1). Para la caracterización espectroscópica se disolvieron 10 mg de la muestra en 2 mL de CDCl₃-d y se adquirieron sus espectros de ¹H-RMN ¹³C-RMN.

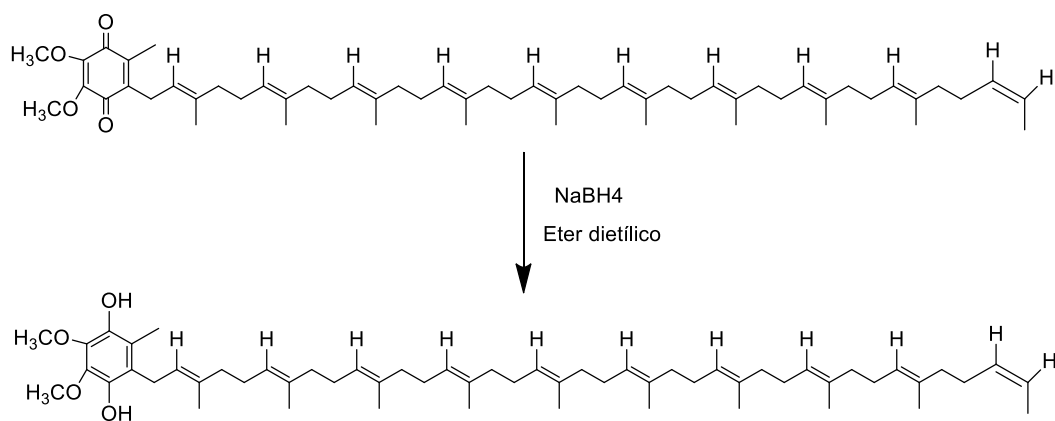


Figura 4.1. Reducción de ubiquinona con borohidruro de sodio.

4.6. Evaluación de las NPAs como portadoras de ubiquinol

4.6.1. Cargado con ubiquinol de las NPAs modificadas superficialmente

Para los primeros experimentos de cargado con ubiquinol, se utilizaron las NPAs-AM, estas NPAs se obtuvieron con tratamiento alcalino y agitación mecánica. Para estos experimentos se empleó la metodología propuesta por Pang y cols. [15] quienes cargaron curcumina (compuesto hidrófobo) en NPAs-MA. En un matraz de 3 bocas de 250 mL se colocaron 0.8 g de NPAs modificadas con AM, a las cuales se les añadió una mezcla agua/etanol (60/40; v/v). Posteriormente se les agregó gota a gota utilizando un embudo de adición, una solución de ubiquinol en etanol absoluto al 1 % p/v. La relación NPAs/ubiquinol fue de 1/1 (p/p). La mezcla se calentó hasta 55°C y se mantuvo bajo agitación magnética por 20 h (Figura 4.2). Las NPAs obtenidas se recuperaron por un proceso de filtración y se lavaron con etanol hasta que este solvente dejó de tener un color amarillo causado por el ubiquinol. Estos lavados se hicieron para remover el ubiquinol que no se encontrará formando puentes de hidrógeno con los grupos éster proporcionados por el AM a la superficie de las NPAs. Finalmente las NPAs se secaron en una estufa de vacío a 60°C, durante 24 horas para su caracterizaron.



Figura 4.2. Esquema del proceso de cargado con ubiquinol de las NPAs-AM

En otros experimentos, las NPAs-AM se pesaron en un tubo de reacción y se les agregó la solución de ubiquinol, en etanol o en limoneno. A la mezcla de reacción se le eliminó el oxígeno por un proceso de congelación con nitrógeno líquido-vacío-descongelación, hasta que ya no se observará la liberación de burbujas. Los tubos se sellaron y se colocaron en un baño de aceite para que la reacción se llevara a cabo a 55°C durante 20 h.

En los experimentos donde se utilizaron las NPAs que fueron obtenidas por tratamiento alcalino y energía de ultrasonido y que posteriormente fueron modificadas superficialmente con AM y CL y PEG. La disolución del ubiquinol en etanol, así como las reacciones de cargado se llevaron a cabo en tubos Schlenk, bajo atmosfera de nitrógeno. Las condiciones de reacción fueron las siguientes.

Primero se pesaron 0.6 g de NPAs modificadas superficialmente en el tubo Schlenk, al cual se le agregaron 10 mL de etanol absoluto para su dispersión. En otro tubo Schlenk se pesaron 0.2 g de ubiquinol, el cual se encontraba almacenado en una ampolleta bajo atmosfera inerte. Se le agregaron 20 mL etanol para su disolución. Una vez que la solución de ubiquinol se observó homogénea se transfirió al tubo donde se encontraban dispersas las NPAs modificadas superficialmente. A la mezcla de reacción se le eliminó el oxígeno por un proceso de congelación con nitrógeno líquido-vacío-descongelación, hasta que ya no se observará la liberación de burbujas. Los tubos se sellaron y se dejaron bajo agitación magnética a 25°C para que la reacción se llevara a cabo durante 20 h. Las NPAs obtenidas se recuperaron por un proceso de filtración y se lavaron con etanol hasta que este solvente dejó de tener un color amarillo causado por el ubiquinol. Estos lavados se hicieron para remover el ubiquinol que no se hubiera adherido a la superficie de las NPAs por medio de puentes de hidrógeno con los grupos éster proporcionados por el AM o CL. Finalmente las NPAs se secaron en una estufa de vacío a 60°C, durante 24 h.

4.7. Caracterización de los productos obtenidos

La caracterización de las NPAs y NPAs modificadas se realizó por DLS, SEM, TEM, TGA, ¹H-RMN, ¹³C-RMN y FT-IR a continuación se describen las técnicas usadas en cada caso.

4.7.1. Caracterización química

Para determinar si las NPAs que fueron preparadas mediante tratamiento alcalino de los gránulos, habían sufrido algún cambio químico durante el proceso de preparación, los materiales se caracterizaron por espectroscopia de FT-IR, mediante la técnica de ATR empleando un cristal analizador de germanio. Los productos obtenidos después de la modificación superficial con AM, CL y PEG también se caracterizaron por esta técnica.

Sólo para el caso de la evaluación del AM unido a la cadena de almidón, también se utilizó espectroscopia de RMN empleando la técnica HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation). Para preparar la muestra se disolvieron 40 mg de NPAs-AM en 2 mL de DMSO-d₆ y la solución se mantuvo en agitación magnética durante 2 min para lograr la homogenización de la mezcla. Los datos de ¹H-RMN fueron colectados a 16 barridos, la escala fue calibrada usando la señal del DMSO-d₆ en 2.49 ppm. Los datos de ¹³C-RMN fueron colectados durante 12 h a 25°C.

4.7.2. Dispersión de luz dinámica (DLS)

Para la determinación del diámetro de partícula promedio por DLS, las muestras se re-dispersaron en agua desionizada a una concentración de 0.1 % p/v. En el caso de las NPAs que se encontraban en dispersión acuosa se midieron a la concentración a la cual fueron preparadas. Las mediciones se hicieron a temperatura ambiente (20 y 25°C) a una longitud de onda del láser de 780 nm.

4.7.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para las mediciones por SEM, una gota de una dispersión acuosa de NPAs a una concentración de 0.01 % p/v, fue depositada en un porta-muestras y se dejó secar a temperatura ambiente, protegiéndola de cualquier contaminación por polvo para su posterior observación.

4.7.4. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Se prepararon dispersiones de NPAs al 5 %, a partir de esta dispersión se hicieron diluciones hasta una concentración de 0.005 %. Posteriormente se utilizó un ultrasonido (HIELSCHER UP200S, Ciclo 0.5 y amplitud de 30 %), durante 5 min para lograr una dispersión homogénea y evitar la aglomeración de las NPAs.

Posteriormente, se preparó una solución de acetato de uranilo al 2 % pesando 100 mg de este compuesto en un vial previamente cubierto con aluminio para protegerlo de la luz y al cual se le adicionaron 5 mL de agua desionizada. La solución se mantuvo bajo agitación magnética durante 15 min y después de este tiempo se utilizó papel filtro (Whatman No. 1) para eliminar cualquier impureza y evitar la contaminación de la muestra.

Para la preparación de las muestras y su posterior observación por TEM se siguió el protocolo que a continuación se describe: se añadió una gota de la dispersión de NPAs sobre una rejilla de cobre (Cu), la cual está cubierta con una película de carbono; se dejó reposar durante 3 min y se retiró parcialmente el exceso la dispersión con un trozo de papel filtro; enseguida se agregó una gota de la solución de acetato de uranilo y se dejó reposar durante 1 min, también se le retiro el exceso con un trozo de papel filtro; finalmente se dejó secar por 5 min antes de la observación.

4.7.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

La evaluación de la descomposición térmica de muestras de almidón antes y después de la formación de NPAs, así como de las NPAs modificadas, se hizo por TGA en una atmósfera de nitrógeno (50 mL/min). Las mediciones se hicieron en muestras con un peso de 10-30 mg en el intervalo de temperatura de 30-600°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan los resultados de la preparación de nanopartículas por dos métodos: (1) tratamiento alcalino con agitación mecánica y (2) tratamiento alcalino con energía de ultrasonido. Las NPAs obtenidas fueron caracterizadas por DLS, SEM, FTIR-ATR y TGA. También se presentan los resultados de la modificación superficial de las NPAs utilizando tres diferentes moléculas: AM, CL y PEG. Enseguida se muestran los resultados obtenidos de la reducción de ubiquinona para la obtención de ubiquinol y finalmente, se muestran los resultados cualitativos del cargado de ubiquinol en las NPAs modificadas.

5.1. Preparación de las NPAs

Con la finalidad de alcanzar los objetivos planteados, se consideraron los métodos reportados para la preparación de NPAs, tomando en cuenta principalmente factores como, Dp, condiciones experimentales estándar y rendimiento. Se seleccionaron dos métodos, tratamiento alcalino con agitación mecánica y tratamiento alcalino con energía de ultrasonido los resultados se muestran a continuación.

5.1.1. Tratamiento alcalino con agitación mecánica

El hinchamiento y parcial disolución de un gránulo de almidón en agua sólo se logra con la ruptura de los puentes de hidrógeno formados por la gran cantidad de grupos —OH presentes en su estructura química [110]. Esta ruptura puede lograrse con un incremento en la temperatura de la disolución (80°C) [111] o con la adición de compuestos químicos (ácidos o bases) que ocasionen la pérdida del orden molecular (gelatinización) al interactuar con los grupos —OH (Figura 5.1) [9].

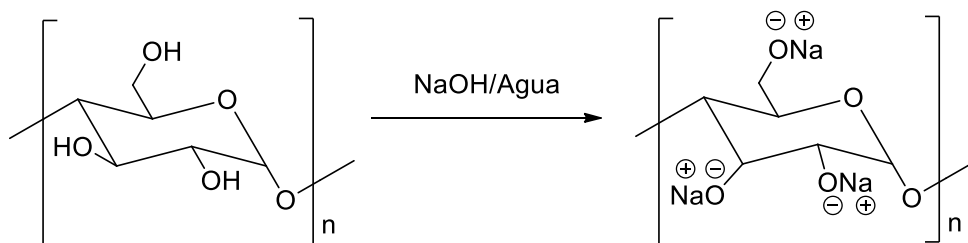


Figura 5.1. Representación esquemática de la interacción entre el NaOH y los grupos –OH del almidón.

Tomando como base el trabajo realizado por Zhang y cols. [59] se hizo un estudio preliminar para reproducir el método utilizando una solución alcalina con la composición NaOH/urea/agua de 6/4/90 (p/p), que les permitió obtener el menor Dp (≈ 92 nm). En el presente estudio se utilizó almidón soluble y almidones de maíz con diferente contenido de amilosa para evaluar el efecto en el Dp. El Dp de las NPAs se determinó por DLS. En la Tabla 5.1 se presenta la información de los experimentos realizados con los valores de Dp obtenidos.

Tabla 5.1. Experimentos realizados para la preparación de NPAs por tratamiento alcalino con agitación mecánica.

Exp.	Tipo de almidón	Velocidad de agitación (rpm)	Dp (nm)
A1	Almidón soluble	1000	35.5
A2	Almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p)	1000	177.4
A3	Almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p)	2000	122.2
A4	Almidón de maíz esencialmente amilopectina	2000	139.4
A5	Almidón de maíz con 70 % de amilosa	2000	270.3

Los resultados indican que con el almidón soluble, exp. A1, se obtienen partículas más pequeñas. Sin embargo, solo se contaba con una pequeña cantidad de este almidón y cuando se adquirió un nuevo lote fue imposible reproducir los resultados, por lo que se descartó para continuar trabajando. Los experimentos donde se utilizó almidón de maíz con diferente contenido de amilosa no condujeron a los resultados esperados es decir NPAs con Dp menor a 50 nm, en todos los casos se obtuvieron tamaños de partícula promedio mayores que 100 nm y las distribuciones de estos tamaños mostraron bimodalidad en algunos casos (Figura 5.2).

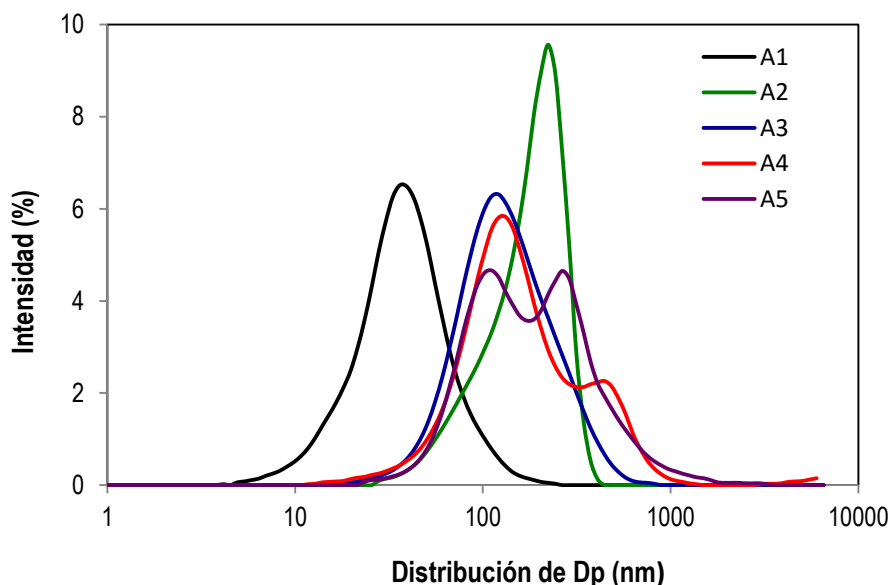


Figura 5.2. Distribución de los tamaños de NPAs obtenidas por tratamiento alcalino con agitación mecánica.

Para el caso específico del experimento A2, donde se utilizó la misma formulación que Zhang y cols. Los resultados evidencian la formación de partículas con diámetro promedio mayor que el reportado por estos autores. Este resultado podría atribuirse al tipo de hélice utilizada para la agitación mecánica o bien, a la geometría del contenedor, ya que estas condiciones no se especifican en el reporte de Zhang. Con el propósito de lograr una reducción en el tamaño de las partículas se llevó a cabo el experimento A3, donde se duplicó la velocidad de agitación logrando una disminución en el valor de diámetro promedio (Dp), de 50 nm. Esta reducción es atribuida evidentemente al incremento de energía mecánica utilizada para la formación de las NPAs.

En cuanto al efecto de la relación amilopeptina/amilosa sobre el valor de Dp (experimentos A3, A4 y A5) se observa que el aumento en el contenido de amilosa ocasiona un incremento en el valor de Dp. También se obtienen distribuciones de tamaño de partícula bimodales, en este caso se reportó un Dp de 270 nm, correspondiente a la mayor población de partículas obtenido en las distribuciones. Durante la experimentación, fue evidente el incremento de la viscosidad de las dispersiones de almidón con un mayor contenido de amilosa, lo cual se explica por la mayor interacción entre las cadenas poliméricas, ya que al ser lineales ocupan un mayor espacio que las cadenas ramificadas [112]. Aparentemente, este incremento en la viscosidad de la dispersión hizo

que el proceso de rompimiento de las cadenas de almidón para la formación de las NPAs fuera menos eficiente, tal como lo reportaron Zhang y cols. [59]. LeCorre y cols. [50] ya habían reportado un comportamiento similar en el valor de Dp. Mencionan que este comportamiento se debe al acomodo lineal de las cadenas de amilosa dentro del gránulo de almidón ya que estas se encuentran como moléculas individuales muy próximas unas a otras. Se intercalan aleatoriamente entre las moléculas de amilopectina tanto en las regiones amorfas como cristalinas [48]. Recientemente, Kang y cols. [113] mencionan que la eficiencia de un método físico en la preparación de las NPAs disminuye cuando incrementa el contenido de amilosa en los almidones evaluados, debido a la tendencia de la amilosa a agregarse. Aunado a que existen otros factores que determinan el tamaño de partícula tal como, tamaño de gránulo, % de cristalinidad y tipo de cristalinidad.

En general, la caracterización de las NPAs por SEM fue complicada porque no podía evitarse la formación de aglomerados. No obstante, en algunos casos se logró distinguir una morfología cuasi-esférica de las NPAs como se puede apreciar en las micrografías de la Figura 5.3. Esta selección de micrografías se presenta como evidencia de la formación de NPAs, ya que los gránulos de almidón de maíz tienen tamaños de 1 a 100 μm [5,6]. La formación de aglomerados en la síntesis de NPAs ya ha sido reportada, incluso se menciona que su aplicación práctica se ha visto restringida por su alta tendencia a aglomerarse [64]. En particular, Kim y cols. [72] mencionan que la obtención de NPAs con una distribución de tamaños de partícula estrecha es prácticamente imposible, independientemente del tipo de almidón, concentración o método empleado para su obtención.

La morfología de las NPAs, ya ha sido estudiada por LeCorre y cols. [50]. Estos autores mencionan que no se observó un efecto importante inducido por el contenido de amilosa sobre la morfología de las NPAs. El cambio observado lo atribuyen principalmente al tipo de cristalinidad que presentan los diferentes almidones utilizados (maíz, trigo y papa). Para el caso del almidón de maíz, que es con el cual podemos comparar los resultados obtenidos en este estudio mencionan que, las partículas obtenidas a partir de almidón de maíz con 70 % de amilosa presentan una forma esférica, mientras que las obtenidas de almidón con alto contenido de amilopectina tienden a presentar una morfología cúbica. Así mismo, mencionan que para el caso del almidón

con una relación amilopectina/amilosa; 73/27 (p/p), las muestras fueron muy difíciles de caracterizar y que por esta razón no pudieron obtener una forma definida. Estos resultados son atribuidos a la cristalinidad de tipo A o B presentada en los diferentes almidones.

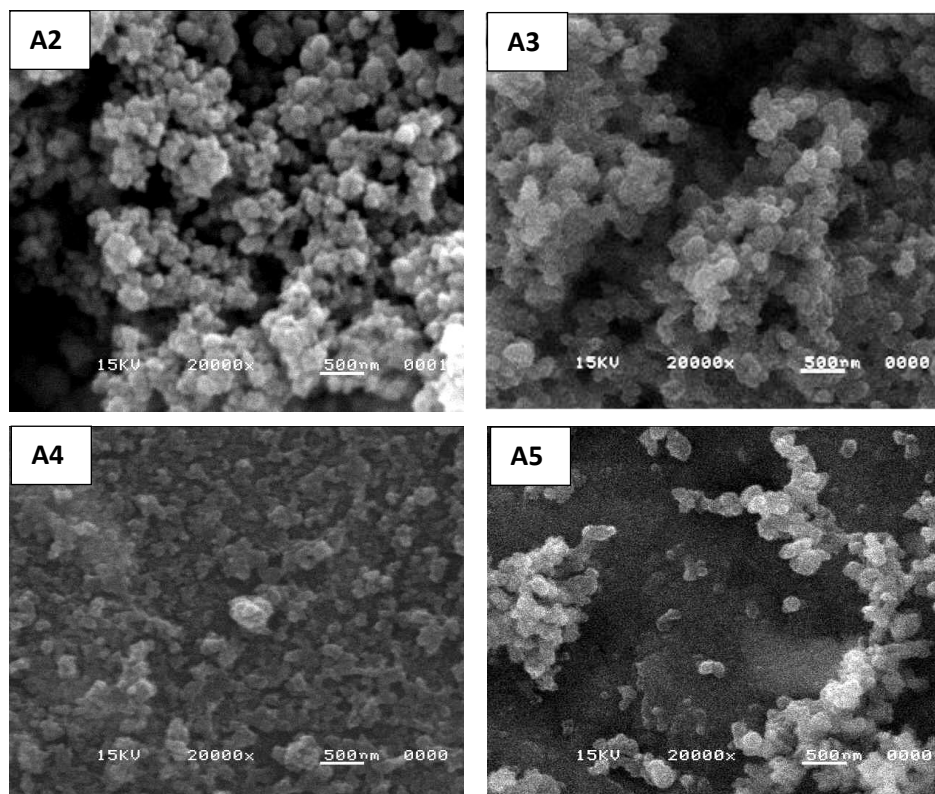


Figura 5.3. Morfología de las de NPAs obtenidas por tratamiento alcalino y agitación mecánica a 20000X.

De acuerdo a los resultados de difracción de rayos X mostrados en la Figura 5.4 y 5.5 se determinó que después del tratamiento alcalino y agitación mecánica se perdió cristalinidad en los materiales obtenidos. Este comportamiento se presentó para todos los almidones utilizados. La pérdida parcial o total de cristalinidad en NPAs obtenidas mediante tratamientos físicos ya ha sido reportada por Liu y cols. [57] y Song y cols. [58].

Debido a que el almidón de maíz con 70 % de amilosa presenta cristalinidad tipo B, se esperaba un valor de Dp menor al obtenido, ya que este tipo de almidón presenta una estructura menos empaquetada lo cual favorece el hinchamiento del gránulo y posterior formación de NPAs [6]. Sin embargo, al caracterizar este tipo de almidón por difracción de rayos X, se obtuvo un

difractograma (Fig. 5.4), que no corresponde a los ya reportados en la literatura [50]. Por lo que este resultado podría ser atribuido a estas diferencias en sus picos de difracción. Para el almidón soluble se obtuvieron picos de difracción similares a los obtenidos con los almidones de cristalinidad tipo A (almidón de maíz con relación amilopectina/amilosa; 73/27 (p/p y esencialmente amilopectina). No obstante de este tipo de almidón no se han reportado difractogramas en la literatura y tampoco está clasificado dentro de los tipos de cristalinidad, por lo que la única explicación lógica para el Dp obtenido es que se trata de un almidón que es clasificado como soluble y esta característica favoreció la formación de partículas con Dp menores a 50 nm. Aunque cuando se utilizó otro lote de almidón soluble (Lote 2) los resultados no fueron favorables (resultados no mostrados), a pesar de que presentan los mismos picos de difracción (Figura 5.4).

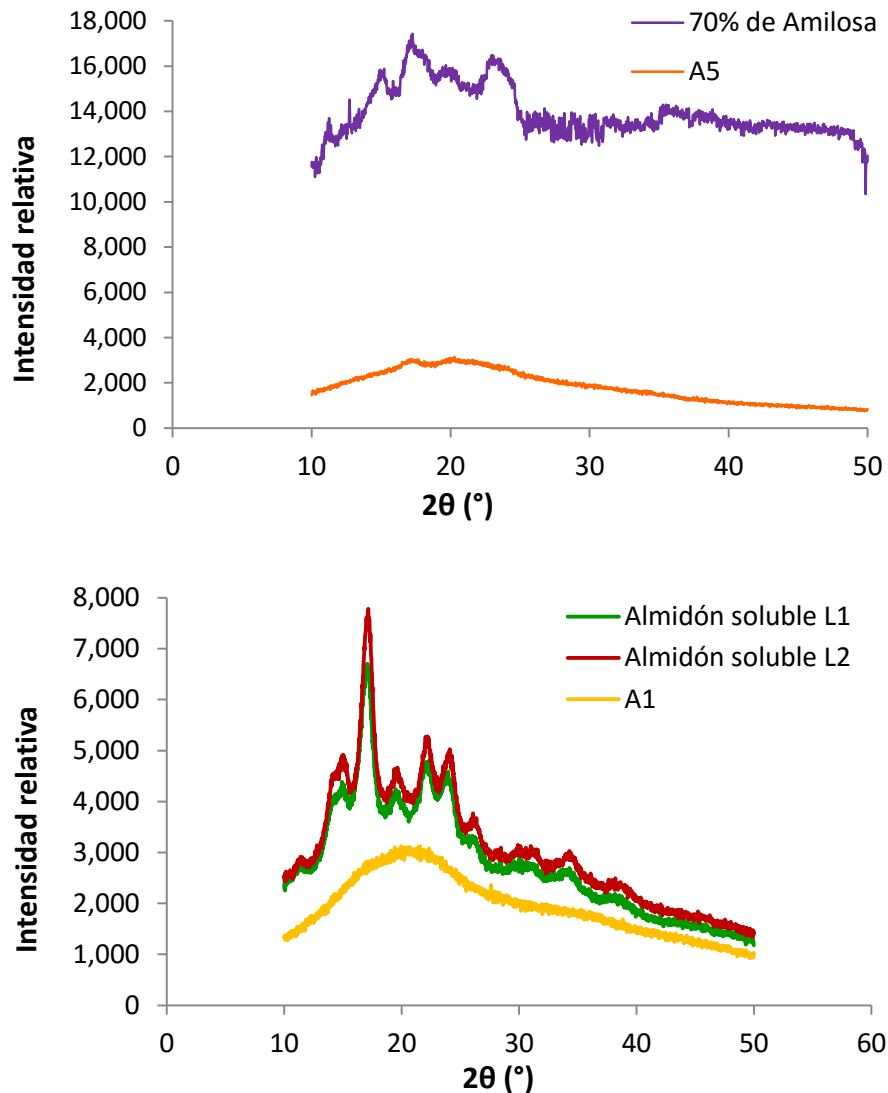


Figura 5.4. Difractogramas del almidón de maíz con 70 % de amilopectina y almidón soluble lote 1 y 2 y de las NPAs obtenidas con tratamiento alcalino y agitación mecánica (A5 y A1).

Por otra parte, los almidones de maíz con relación amilopectina/amilosa; 73/27; p/p y el que es esencialmente amilopectina, presentan la cristalinidad tipo A. Es decir, cadenas estrechamente empaquetadas que dificultarían el hinchamiento del gránulo [6]. En este caso los difractogramas obtenidos presentan los mismos picos de difracción (Fig. 5.5). Los resultados de Dp para estos dos almidones fueron muy similares lo que se podría atribuir a su similitud en estos picos de difracción.

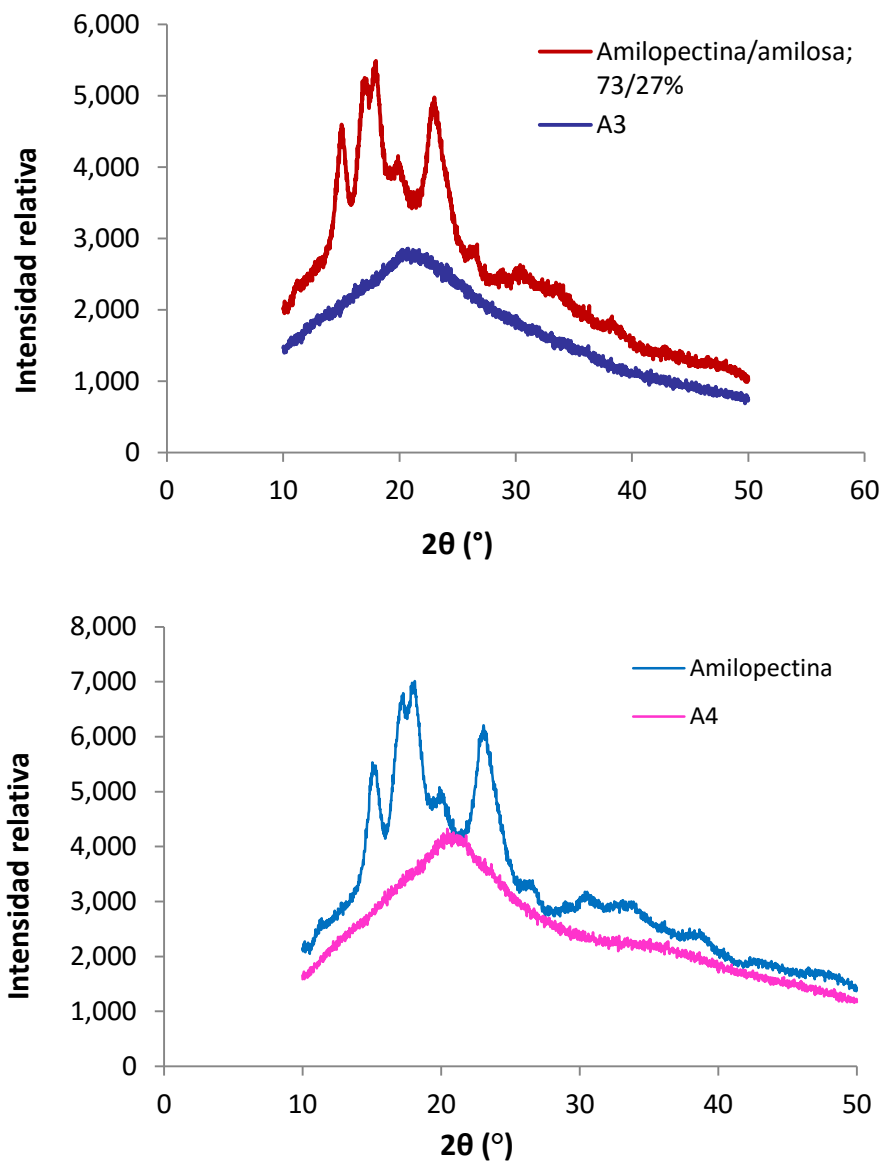


Figura 5.5. Difractograma del almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p) y esencialmente amilopectina y NPAs obtenidas con tratamiento alcalino y agitación mecánica (A3 y A4).

5.1.2. Tratamiento alcalino con energía de ultrasonido

Recientemente Haaj y cols. [55] aplicaron energía de ultrasonido a una dispersión acuosa de almidón al 1.5 % en peso y lograron obtener valores de Dp tan pequeños como 30 nm para almidón de maíz con una relación amilopectina/amilosa de 73/27 (p/p). La desventaja de este método es que trabajan con dispersiones de almidón de muy baja concentración, a diferencia del

método reportado por Zhang y cols., quienes partían de dispersiones alcalinas con un contenido de almidón del 10 % en peso. Otra desventaja observada fue el alto tiempo de sonicación necesario para obtener tamaños de partícula tan pequeños, ya que se requirió un tratamiento de 90 min.

En el presente estudio se planteó llevar a cabo una combinación de los métodos reportados por Zhang y Haaj como una opción que permitiera la preparación de NPAs con tamaño pequeño sin sacrificar el rendimiento por lote. Para ello, se evaluó el efecto de la concentración de almidón (1, 5 y 10 % en peso), utilizando la solución alcalina de composición NaOH/urea/agua de 6/4/90 (p/p), y el tiempo de ultrasonificación (5, 10 y 15 min). Para preparar las dispersiones se utilizó almidón de maíz con una relación amilopectina/amilosa de 73/27 (p/p). En la Figura 5.6 se presenta el efecto de las variables evaluadas sobre el Dp de las partículas que se determinó justo después del proceso de diálisis y antes del proceso de secado por liofilización.

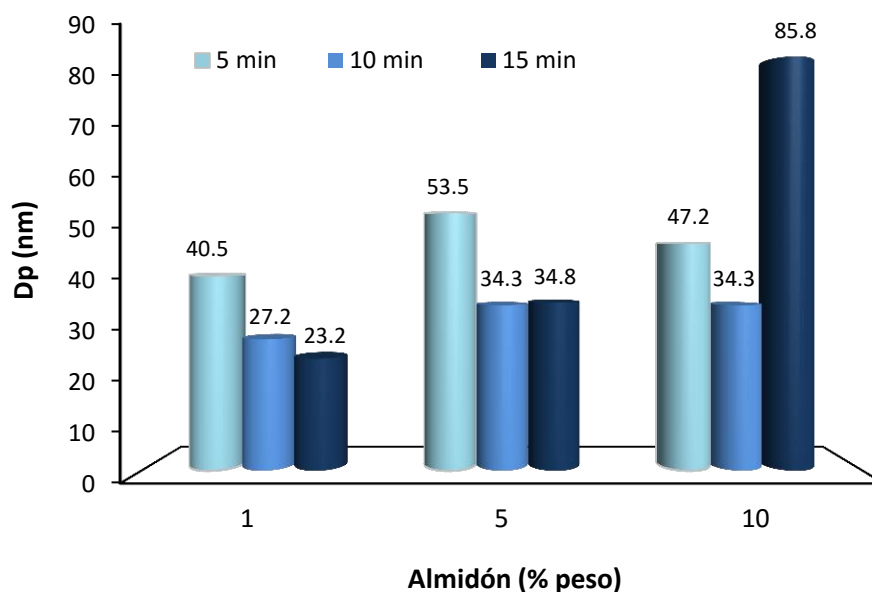


Figura 5.6. Efecto de la concentración de almidón y tiempo de sonicación sobre el Dp, antes de la liofilización y después de diálisis.

Para el caso de la concentración de almidón más baja (1 % en peso), se observa un efecto inverso del tiempo de sonicación sobre el Dp. El comportamiento se conserva para las concentraciones de almidón más altas (5 y 10 % en peso), pero sólo a tiempos cortos de sonicación (5 y 10 min). Un

tiempo de sonicación prolongado no tuvo efecto sobre el Dp para la concentración de 5 % en peso y, aparentemente, tuvo un efecto negativo para la concentración de 10 % en peso, ya que se obtuvo un Dp de ≈ 86 nm, este valor representa el diámetro de la mayor población de partículas obtenido ya que se obtuvieron distribuciones multimodales.

Este comportamiento no concuerda con lo esperado puesto que lo lógico es que a mayor energía el gel de almidón formado fuera fracturado en partículas más pequeñas. Aunado a que hay una mayor concentración de almidón. La explicación para el incremento en el valor de Dp determinado por DLS puede ser que las partículas formadas fueron tan pequeñas que aumentó la cercanía entre ellas, aunado a que se tenía una mayor concentración de almidón en el medio. Con la intención de tener un argumento más sólido para respaldar esta hipótesis, se tomaron los valores de Dp reportados de la Figura 5.6 que se obtuvieron después de diálisis y se hizo el cálculo de la distancia entre partículas para dispersiones de NPAs a las concentraciones de almidón estudiadas (1, 5 y 10 % en peso), considerando para el almidón una densidad de 1.56 g/cm^3 [5]. Por supuesto, la densidad del almidón pudiera ser diferente, ya que se encontraba hinchado en la solución acuosa por efecto del NaOH, sin embargo, la tendencia en cuanto a la distancia de las partículas bajo las diferentes condiciones estudiadas sería la misma.

De esta manera, en la Figura 5.7 se puede ver la distancia entre partículas con diferente Dp en dispersiones a diferentes concentraciones. Al analizar las gráficas se puede notar el efecto inverso del tiempo de sonicación sobre el Dp, a excepción del tiempo de sonicación de 15 min para las concentraciones de almidón de 5 y 10 % en peso. Si la tendencia se hubiese mantenido de acuerdo a la línea punteada, se hubiera llegado a los valores estimados de Dp con las correspondientes distancias entre partículas. Bajo estas circunstancias, el tamaño tan pequeño de las partículas las hizo muy inestables, además, por lo tanto, la cercanía con otras partículas igualmente inestables, favoreció su coalescencia.

Este fenómeno ya ha sido reportado por Dufresne y cols. [64], Kim y cols. [60, 61,76] y Liu y cols. [57]. Específicamente, Liu reportó que los nanocristales de almidón tienden a formar aglomerados cuando el tamaño de partícula es más pequeño y la concentración en el medio es mayor, por lo que la proximidad entre las partículas disminuye y las interacciones moleculares son más

evidentes. Así mismo, Kim y cols. [60,61] reportaron que un tiempo de sonicación excesivo puede causar una agregación de las partículas de tamaño nanométrico.

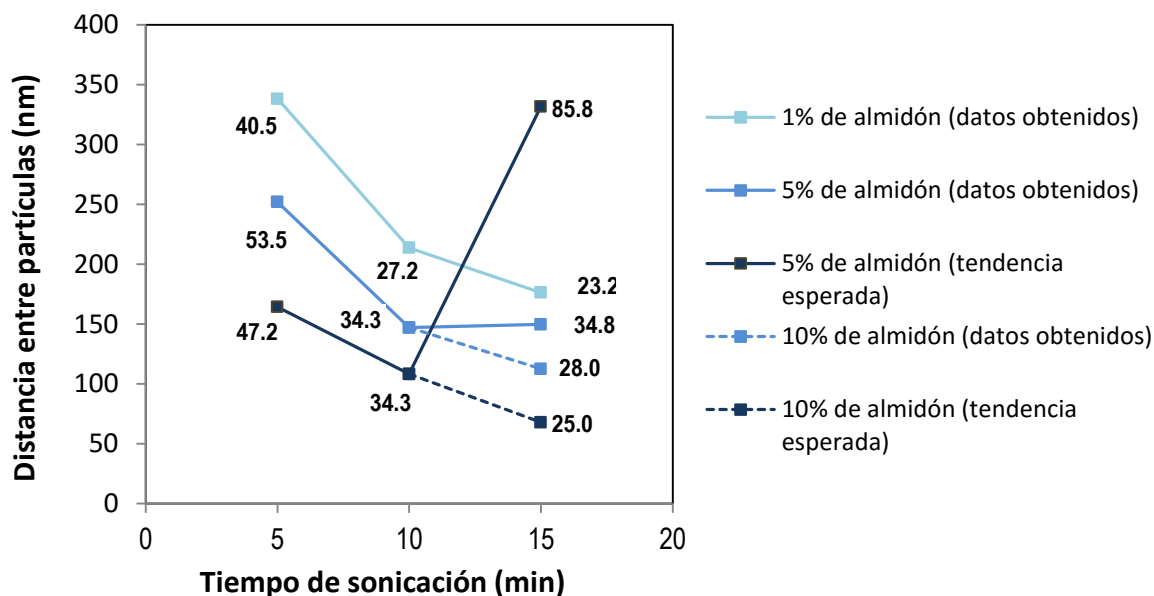


Figura 5.7. Distancia entre partículas con diferente Dp promedio, preparadas a partir de dispersiones con, 1, 5 y 10 % en peso de almidón y diferentes tiempos de sonicación.

Una vez que las NPAs fueron secadas por liofilización se hicieron pruebas de re-dispersión y determinación del Dp. Los resultados de Dp indican que los valores fueron prácticamente los mismos antes y después de la liofilización. Sin embargo, tal como se puede apreciar en la Figura 5.8 se presentó un cambio en las distribuciones de tamaños de partícula, presentándose distribuciones con más de una moda. Este cambio fue más evidente para el caso de las NPAs obtenidas a partir de dispersiones con la mayor concentración de almidón y tiempos de 10 y 15 min.

En la Figura 5.9 se muestra una micrografía de SEM de alta resolución para las NPAs obtenidas del experimento donde se utilizó 1 % en peso de almidón y un tiempo de sonicación de 5 min. Puede notarse la presencia de partículas con diámetros alrededor de los 30 nm pero que se encuentran formando parte de grandes aglomerados. La aglomeración se atribuye a las formación de puentes de hidrógeno entre la gran cantidad de grupos –OH presentes en la superficie de las partículas [6]

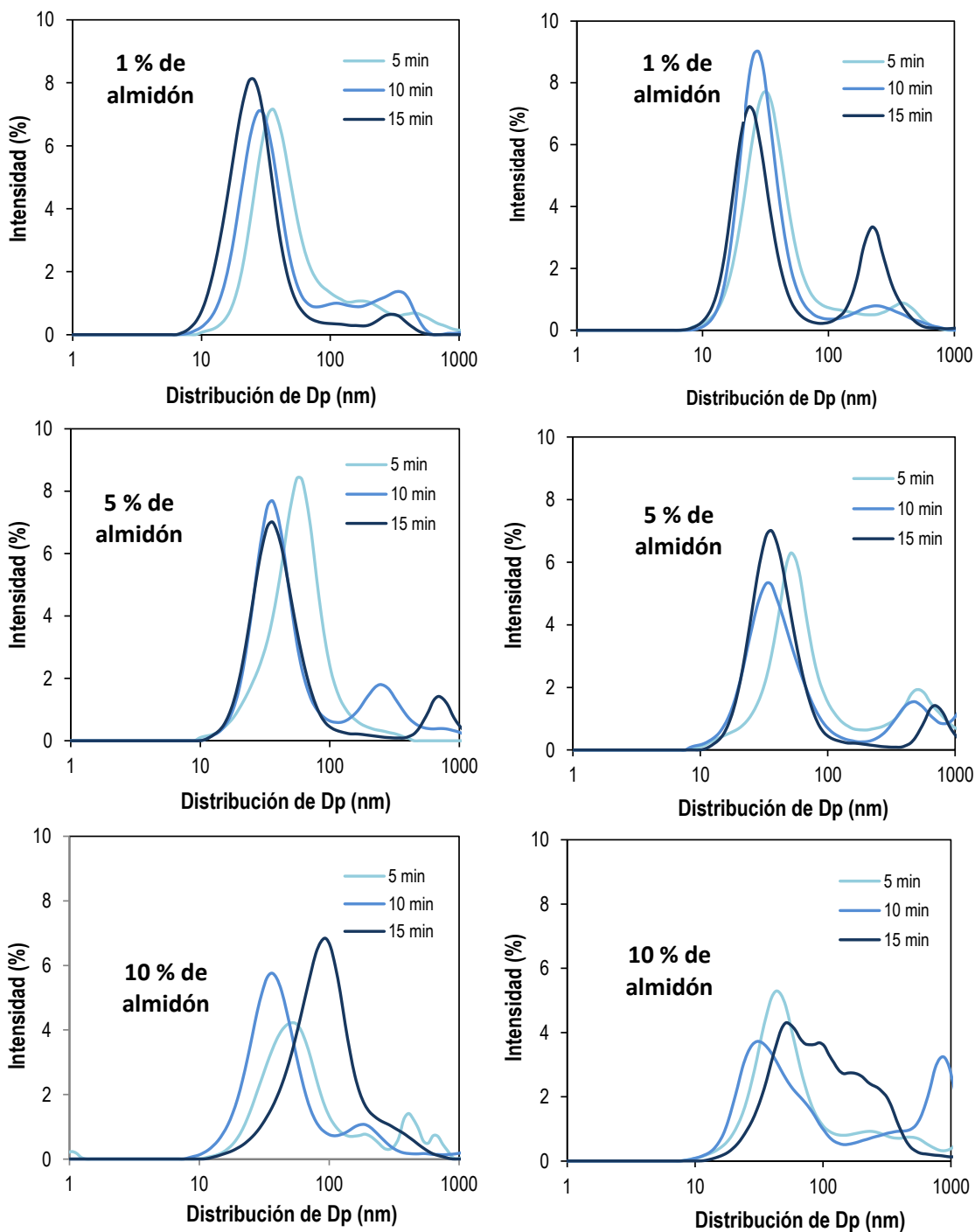


Figura 5.8. Efecto de la concentración de almidón y tiempo de sonicación en la distribución de tamaño de partícula, antes (izquierda) y después (derecha) del proceso de secado por liofilización.

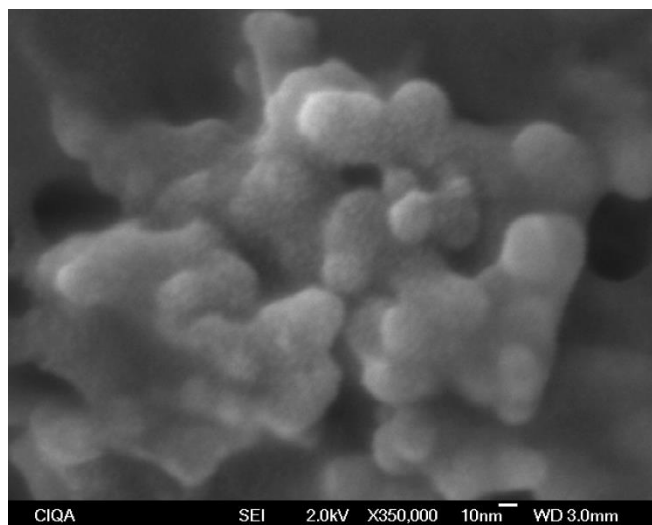


Figura 5.9. Micrografía de SEM de las NPAs obtenidas con tratamiento alcalino energía de ultrasonido (1 % de almidón y 5 min de ultrasonido) a 350000X.

Con base en los resultados, se determinó que la combinación del uso de una solución alcalina para dispersar una mayor cantidad de almidón, con el uso de energía de ultrasonido para producir NPAs, es eficiente y permite la preparación de partículas con tamaños por debajo de los 50 nm incluso para la concentración de almidón del 10 % en peso.

Se hizo un estudio para evaluar la reproducibilidad del método utilizando un equipo de ultrasonido diferente, variando el lote de almidón y escalando el volumen de la mezcla de reacción de 50 a 200 y 500 mL. Las condiciones de operación seleccionadas fueron concentración de almidón de 5 % en peso y tiempo de sonicación de 15 min. El Dp de las NPAs se midió después de que fueron secadas por liofilización y se re-dispersaron en agua. Los resultados fueron satisfactorios, ya que para el volumen de 50 mL se obtuvo un valor de Dp cercano a los 30 nm, comparable con los tamaños anteriormente obtenidos. Cuando se incrementó el volumen de reacción los valores de Dp incrementaron a valores cercanos a los 50 nm. No obstante, debido a que un estudio de escalamiento no era el objetivo del presente estudio, no se hicieron más experimentos en este sentido. En la Figura 5.10 se presenta la distribución de tamaños para las NPAs preparadas a diferentes volúmenes de mezcla de reacción.

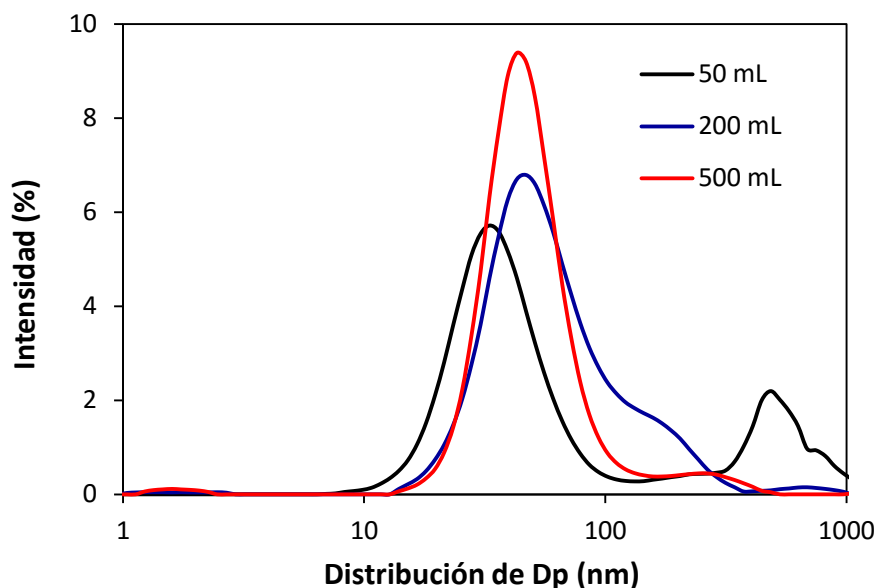


Figura 5.10. Distribución de los tamaños de NPAs obtenidos cuando se escaló el volumen de la mezcla de reacción de 50 a 200 y 500 mL, utilizando una concentración de almidón de 5 % y 15 min de ultrasonido.

Para determinar si el tratamiento alcalino combinado con energía de ultrasonido afectó la estructura química de las moléculas de almidón durante el proceso de preparación de las NPAs, se realizó la caracterización química por FTIR-ATR. En la Figura 5.11, se presentan el espectro obtenido para las NPAs preparadas con la concentración de 5 % en peso y 15 min de sonicación, así como el espectro del almidón utilizado para su preparación.

En el espectro del almidón se observan sus señales características: una señal muy intensa en 3400 cm^{-1} , corresponden a los grupos -OH de la unidad repetitiva del almidón; la señal en 2920 cm^{-1} , se atribuye a la vibración del estiramiento C-H y por último, la señal cercana a 1000 cm^{-1} se atribuye al estiramiento del enlace C-O , que corresponde al grupo C-O-C que se encuentra en el anillo almidón. Al comparar ambos espectros no se observan cambios evidentes en el desplazamiento de las señales, a excepción de la señal en 990 cm^{-1} que se corre a 1022 cm^{-1} para las NPAs. Se ha reportado, Wang y cols. [114] que cuando la señal del estiramiento C-O se desplaza hacia intensidades más altas es porque la interacción entre los enlaces de hidrógeno es más débiles. Esto podría ser un efecto de la solución alcalina utilizada para dispersar el almidón (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p).

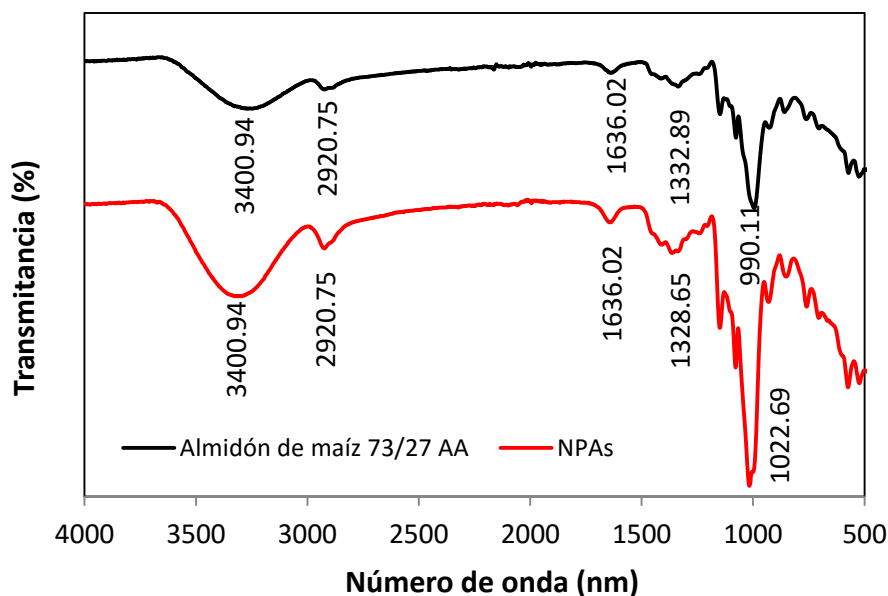


Figura 5.11. Espectros FTIR-ATR del almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p) y de las NPAs preparadas con tratamiento alcalino y energía de ultrasonido (Liofilizadas).

De acuerdo a lo reportado por Zhang y cols. [59] la urea sólo actuó como un donador en los enlaces de hidrógeno para evitar la agregación de las moléculas de almidón y, una vez formadas las NPAs, se eliminó en la etapa de diálisis. En el espectro de las NPAs, no se observa la aparición de nuevos desplazamientos correspondientes al grupo N—H de la urea, por lo que se asegura que no hubo ninguna reacción química entre la urea y los grupos —OH del almidón, lo que hubiera producido un derivado del almidón llamado carbamato en la solución acuosa de hidróxido de sodio y urea.

La temperatura de degradación del almidón con una relación amilopectina/amilosa de 73/27 (p/p) ha sido reportada en 275°C por Simi y cols. [115]. Para corroborar que no se haya presentado un cambio estructural en el almidón durante el proceso de preparación de las NPAs, se hizo un estudio para detectar algún cambio en la temperatura de degradación del material. Los termogramas mostrados en la Figura 5.12 indican que la temperatura de degradación para el almidón comienza a 271°C, mientras que para las NPAs inicia a 245°C. Este cambio, ya ha sido observado por otros autores [114] y lo atribuyen a la menor interacción que existe entre las NPAs, por la ruptura de sus cadenas durante la preparación.

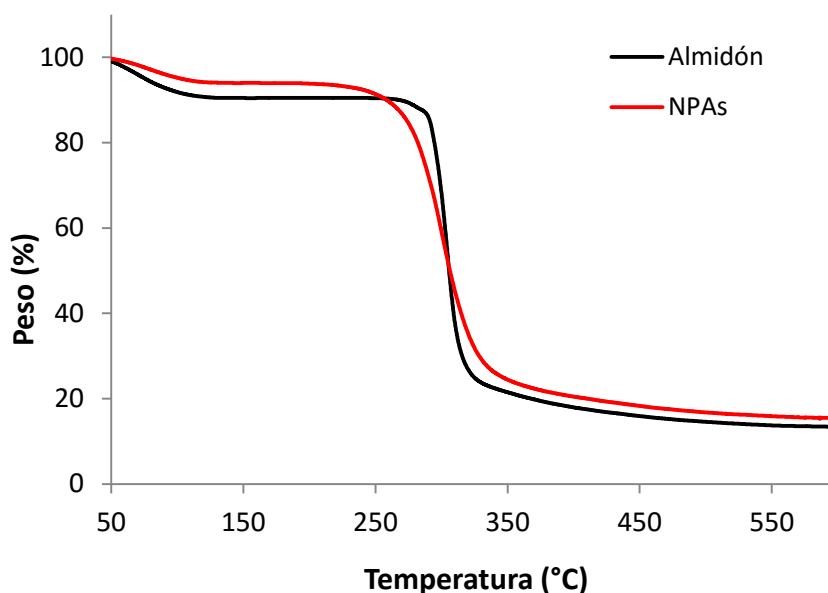


Figura 5.12. Termogramas de TGA para el almidón de maíz (amilopeptina/amilosa; 73/27; p/p) y de las NPAs preparadas con tratamiento alcalino y energía de ultrasonido.

5.2. Modificación de la superficie de las NPAs

Con la finalidad de generar grupos funcionales en la superficie de las NPAs para lograr la interacción entre estos grupos y las moléculas de ubiquinol. Se realizó la modificación de la superficie de las NPAs con tres diferentes moléculas: AM, CL y PEG. A continuación se muestran los resultados obtenidos cuando las NPAs modificadas fueron caracterizadas por FTIR-ATR, TGA y TEM.

5.2.1. Modificación con anhídrido maleico (AM)

La reacción de esterificación con AM se ilustra en la Figura 5.13. De acuerdo al esquema, los grupos —OH presentes en las cadenas de almidón pueden ser esterificados en un medio básico acuoso para la formación de maleato de almidón [9]. Los grupos —OH más susceptibles a reaccionar son aquellos que no presentan impedimento estérico [13].

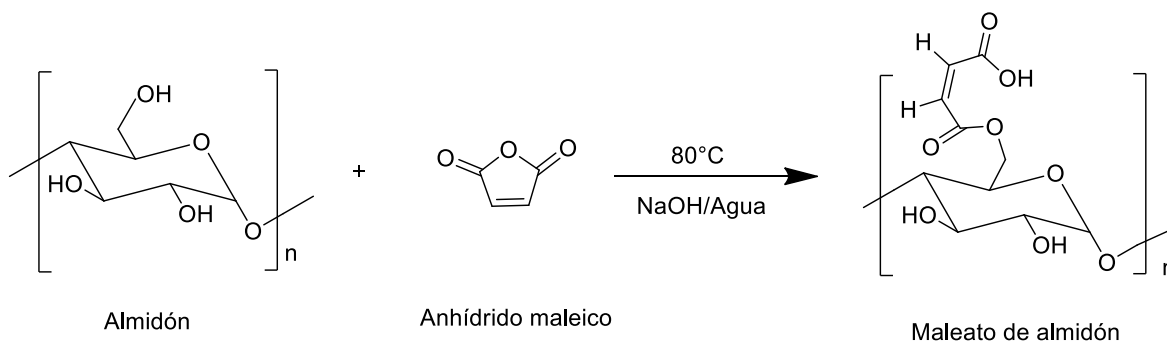


Figura 5.13. Reacción de esterificación del almidón con anhídrido maleico para la formación de maleato de almidón.

Para llevar a cabo la modificación de la superficie de las NPAs con AM se utilizaron los lotes de NPAs preparadas con diferentes tipos de almidón y mediante diferentes técnicas. En la Tabla 5.2, se presenta la información de los experimentos realizados. Sólo para el caso del experimento MA1 (almidón soluble) se hizo la modificación química utilizando 8 g de NPAs, para el resto de los experimentos se utilizaron 2 g, esto por la disponibilidad del material.

Tabla 5.2. Experimentos realizados en la funcionalización de NPAs con AM.

Exp.	Tipo de almidón	Dp por DLS (nm)	Cantidad (g)	Proceso de obtención de las NPAs
MA1	Almidón soluble	35.5	8	Tratamiento alcalino con agitación mecánica
MA2	Almidón de maíz (73 % amilopectina; 27 % amilosa)	122.2	2	Tratamiento alcalino con agitación mecánica
MA3	Almidón de maíz esencialmente amilopectina	106.5	2	Tratamiento alcalino con agitación mecánica
MA4	Almidón de maíz con 70 % de amilosa	270.3	2	Tratamiento alcalino con agitación mecánica
MA5	Almidón de maíz (73 % amilopectina; 27 % amilosa)	29.5	2	Tratamiento alcalino con energía de ultrasonido

Para evaluar la modificación superficial de las NPAs con AM se realizó la caracterización por espectroscopia de FTIR-ATR. En la Tabla 5.3 se presenta un resumen de las principales señales observadas para cada una de las NPAs modificadas, donde se aprecia que no se presentó un efecto del tipo de almidón, método de preparación o diámetro de las NPAs en la modificación superficial de las mismas. En la Figura 5.14 se presenta un ejemplo de la comparación entre los espectros de las NPAs antes y después de la modificación.

Tabla 5.3. Señales de FTIR-ATR de los productos obtenidos después de la modificación química con AM.

Exp.	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5
Grupo carbonilo de maleato en almidón (1721 cm^{-1})	1719	1716	1720	1722	1714
Grupos hidroxilo del almidón, 3395 cm^{-1}	3327	3372	3350	3347	3348
Enlace C-O anillo anhidro-glucosa, 1155, 1079, 1024, 934 cm^{-1}	1150	1147	1149	1149	1146
	1077	1078	1076	1076	1078
	1022	1022	1022	1022	1022
	927	933	926	924	924
C-H estiramientos en 2931 cm^{-1}	2925	2937 señal muy pequeña	2923	2916	2935
C=C, grupo maleato y presencia de agua 1634,1581 cm^{-1}	1645, 1580	1621,1577	1633,1573	1633,1575	1630, 1577

En todos los espectros de las NPAs modificadas se observa la aparición de una banda cercana a 1721 cm^{-1} , atribuida a la presencia del grupo carbonilo del maleato injertado en la cadena de almidón, [116,117], mientras que la señal cercana a 1581 cm^{-1} , se atribuye a los dobles enlaces C=C del grupo maleato [118]. La señal cercana a 1634 cm^{-1} corresponde a los estiramientos que se complementan con la señal antes mencionada, aunque también podría deberse a trazas de humedad en el material analizado [116]. La ausencia de la banda en 1857 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del AM demuestra que no existen residuos de este compuesto en las NPAs modificadas [119].

Las bandas de absorción que aparecen cercanas a 1155, 1079, 1024 y 934 cm^{-1} , corresponden a los estiramientos de los enlaces C—O del almidón [10], específicamente los picos en 1079 y 1024 cm^{-1} son característicos del estiramiento del enlace C—O del anillo de anhidro-glucosa [10,15], indicando que la modificación química ocurrió, principalmente, sobre los grupos —OH reactivos. La banda extremadamente ancha cercana a 3395 cm^{-1} es atribuida a los enlaces O—H de los grupos —OH [9]. La banda cercana a 2931 cm^{-1} es característica de los estiramientos C—H del almidón [120].

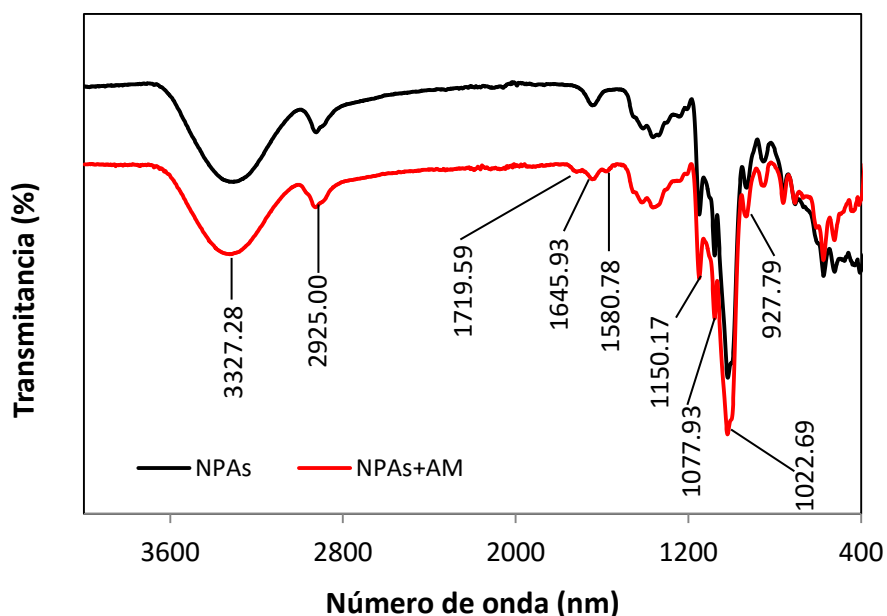


Figura 5.14. Espectros de FTIR-ATR de NPs antes y después de su modificación con anhídrido maleico (exp. MA1).

Para corroborar la esterificación de estas NPs también se realizó la caracterización por espectroscopia de RMN. En la Tabla 5.4 se presentan las señales características esperadas, tanto de ^1H -RMN como de ^{13}C -RMN, para los compuestos involucrados en la reacción de modificación.

Tabla 5.4. Desplazamiento de señales de RMN características para maleato de almidón, anhídrido maleico y ácido maleico.

Compuesto	Señales características en ^{13}C -RMN (ppm)	Señales características en ^1H -RMN (ppm)
Maleato de almidón	166.5, 134.0, 108.0, 84.0,	3.30, 3.73, 3.74, 3.75, 4.41,

	75.0, 73.5, 73.0, 63.5	4.51, 5.03, 6.35, 6.31, 11.0
Anhídrido maleico	165.9, 137	7.1
Ácido maleico	166, 134	6.37, 11.0

En el espectro de ^1H -RMN (espectro horizontal de la Figura 5.15) se observa la presencia de señales en el intervalo de 3.0 - 5.5 ppm, las cuales son características de la molécula de almidón. Aunado a esto, también se aprecian nuevas señales entre 6.3 y 6.4 ppm que corresponden a los dobles enlaces ($\text{C}=\text{C}-\text{H}$) presentes en el maleato de almidón. Se presentó una señal fina en 6 ppm que podría considerarse como un subproducto de la reacción ya que el AM a temperatura ambiente se hidroliza en agua con gran facilidad formando ácido maleico, y/o su isómero geométrico (ácido fumárico). Por otra parte, la señal en 5 ppm es característica del hidrógeno anomérico, presente en la molécula de glucosa. Esta señal evidencia que el anillo glucosídico no sufrió degradación durante la reacción de esterificación con AM. Las señales con desplazamientos entre 2.9 y 3.6 ppm corresponden a los hidrógenos de $-\text{CH}$ y $-\text{CH}_2$ alfa a los oxígenos de los hidroxilos de la glucosa.

En el espectro de ^{13}C -RMN (espectro vertical de la Figura 5.15), se observa una señal en 63 ppm que corresponde al único carbono (C_6) de $-\text{CH}_2$ presente en la molécula modificada. Las señales entre 73 y 76 ppm corresponden a los carbonos 2, 4 y 5 de la molécula de glucosa. La señal en 100 ppm corresponde al carbono anomérico (C_1). La señal presente en 166 ppm de espectro de ^{13}C -RMN, demuestra la presencia de carbonilos.

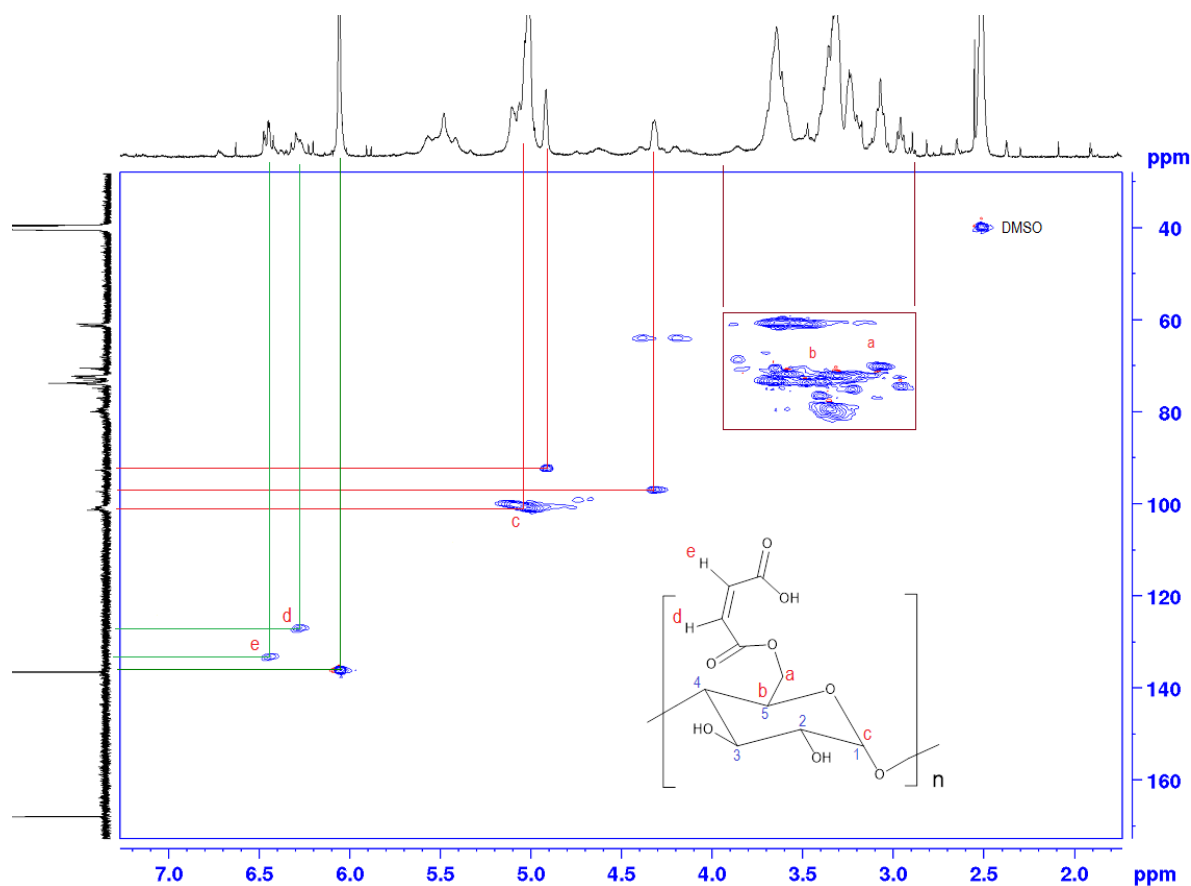


Figura 5.15. Espectro de ^1H -RMN correlacionado con el espectro de ^{13}C -RMN (HCQC) para NPAs de almidón modificadas con AM (exp. MA1).

En cuanto a la correlación de los espectros. La señal ancha en 5.5 ppm (^1H -RMN) con apariencia de multiplete no presenta correlación alguna con el espectro de ^{13}C -RMN, lo que indica la presencia de hidrógenos no asociados a carbonos, características de los grupos $-\text{OH}$ presentes en la molécula glucosídica, esto nos indica que no todos los $-\text{OH}$ presentes en las NPAs reaccionaron con el AM. La señal fina con desplazamiento en 6.0 ppm en el espectro de protón se correlaciona con un desplazamiento en 138 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN característico de los carbonos de doble enlace $\text{C}=\text{C}$ del AM y sus derivados. Los desplazamientos en 6.2 y 6.4 ppm (^1H -RMN), corresponden a los dobles enlaces $\text{C}=\text{C}-\text{H}$, cuya correlación es clara con las señales multiplete en 134 y 136 ppm (^{13}C -RMN).

El estudio de la cantidad de AM injertado sobre la superficie de las NPAs se determinó mediante una relación de integraciones obtenidas en el espectro de la Figura 5.16. Las señales asignadas

específicamente para los dobles enlaces de la fracción de AM cuyo desplazamiento se encuentra entre 6.2 y 6.4 ppm correspondiente a 2 protones. Con respecto a la integración correspondiente a los hidrógenos glucosídicos presentes entre 2.9 y 3.6 ppm, los cuales corresponden a 6 protones de los 7 que posee el anillo glucosídico. La relación de integración de cada señal con respecto del número de protones involucrados en la molécula indica que el almidón tiene un contenido de AM de 0.18 mol o 0.09 en peso.

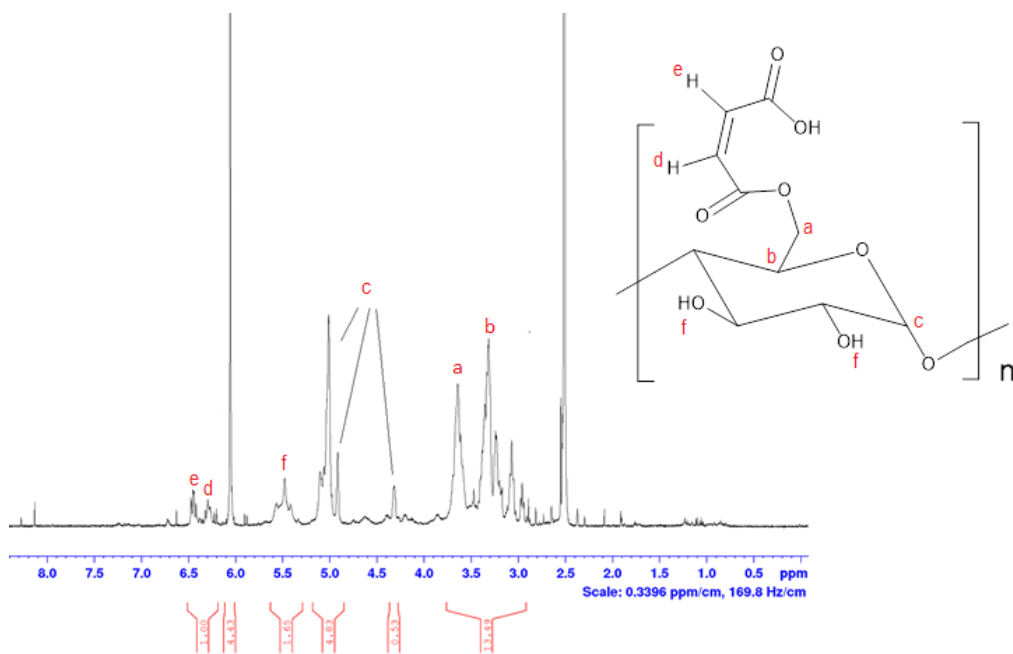


Figura 5.16. Espectro de ¹H-RMN del maleato de almidón con relación de integración para determinar el AM injertado en la superficie de las NPAs.

Se realizó el análisis termogravimétrico de las NPAs modificadas con AM. Los termogramas se presentan en la Figura 5.17 se observa una ligera disminución en la temperatura de degradación de las nanopartículas modificadas en comparación con las NPAs que no fueron modificadas esto podría deberse a la exitosa sustitución de los grupos —OH. Simi y cols. [115] mencionan que al esterificar las NPAs su temperatura de degradación disminuyó ligeramente, debido a la menor cantidad de grupos —OH restantes en la molécula después de la sustitución.

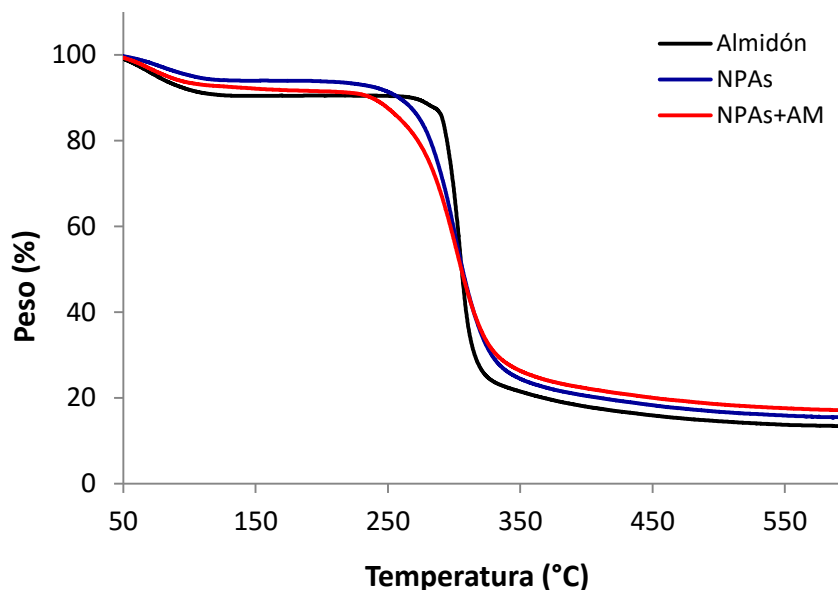


Figura 5.17. Termogramas de TGA de almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p), NPAs y NPAs modificadas con anhídrido maleico.

Para determinar los cambios morfológicos de las NPAs antes y después de su modificación con AM, se hizo una caracterización por TEM. Fue notoria la diferencia en el comportamiento de las partículas desde el momento de la preparación de las muestras. A la misma concentración de 5 % en peso de una dispersión acuosa; las NPAs sin modificar requerían de un cierto tiempo bajo agitación magnética, mientras que las modificadas se dispersaban inmediatamente. Las dispersiones inicialmente preparadas, se diluyeron hasta llegar a una concentración de 0.005 % en peso y se utilizaron para preparar las rejillas antes de su observación por TEM, que posteriormente fueron teñidas con acetato de uranilo.

No fue posible obtener buenas micrografías de las NPAs sin modificar porque no se distinguían fácilmente, en cambio las NPAs modificadas se veían claramente, tal como se muestra en la Figura 5.18. La esterificación de los grupos —OH definitivamente incrementó la facilidad para dispersar las NPAs, lo cual se atribuye a una disminución en la formación de puentes de hidrógeno entre las partículas y por consecuencia, disminuyó la tendencia de las partículas a formar grandes aglomerados.

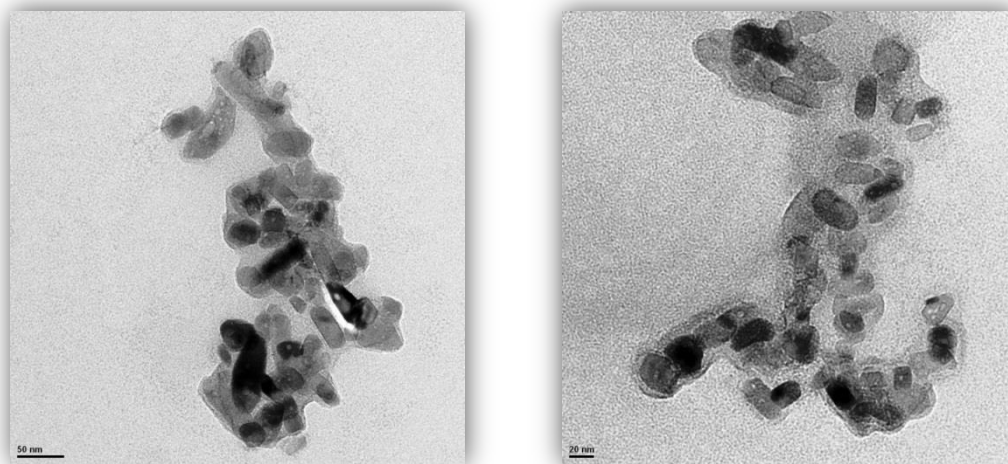


Figura 5.18. Micrografías de TEM de las NPAs modificadas con anhídrido maleico.

5.2.2. Modificación superficial con cloruro de lauroilo (CL)

Con el propósito de obtener NPAs que presentarán mayor afinidad con el ubiquinol (compuesto hidrófobo), [69,70], se intentó la modificación química de NPAs en un medio básico acuoso utilizando CL, un ácido graso de cadena larga. Para esto, se utilizaron NPAs obtenidas en el experimento donde se utilizó una dispersión de 5 % en peso de almidón y 15 min de sonicación.

De acuerdo a lo ilustrado en el esquema de la Figura 5.19, la sustitución de los grupos –OH más reactivos, conduce a la formación de macromoléculas constituidas por un esqueleto hidrófilo al que se le unen cadenas laterales hidrófobas. Después de la esterificación, podrían quedar algunos grupos –OH sin reaccionar por el impedimento estérico de los mismos [11].

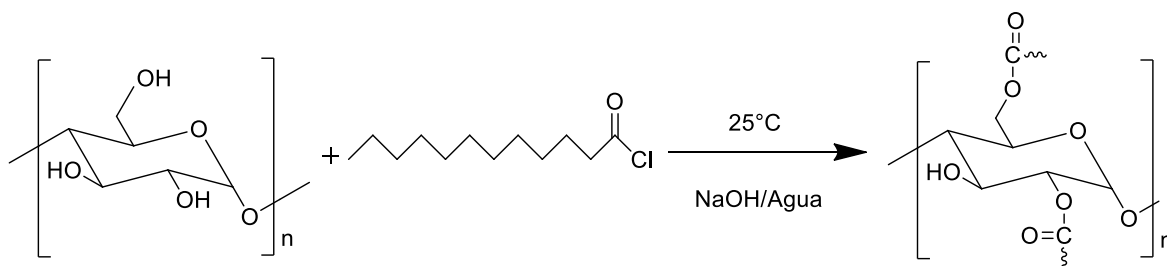


Figura 5.19. Esquema que representa la reacción de esterificación del almidón con cloruro de lauroilo.

Las NPAs modificadas fueron caracterizadas por espectroscopia de FTIR-ATR. Los espectros para las NPAs antes y después de su modificación con CL se muestran en la Figura 5.20. La aparición de una nueva banda de absorción en las NPAs modificadas, localizada en 1745 cm^{-1} , se atribuye a las vibraciones del grupo carbonilo (C=O) del éster y se toma como una evidencia de que ocurrió la reacción de esterificación.

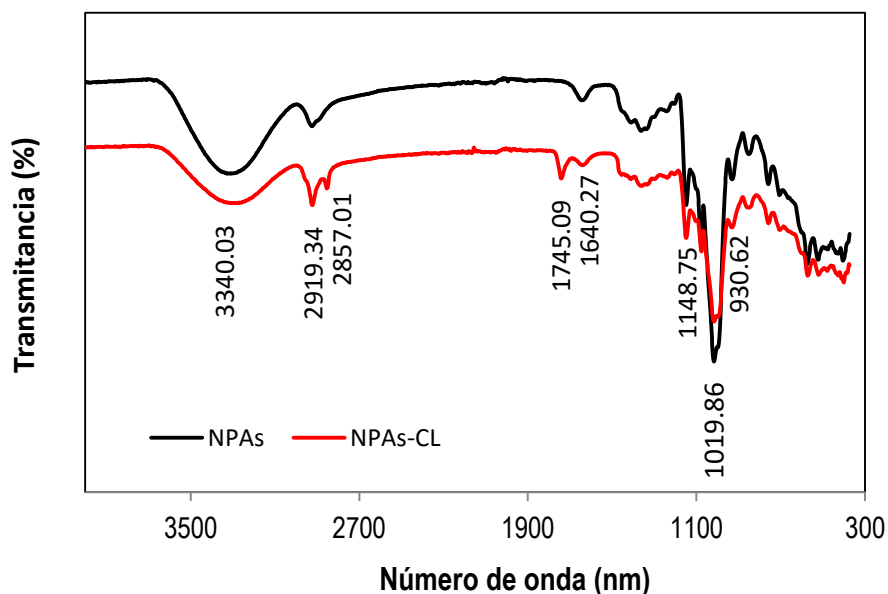


Figura 5.20. Espectros de FTIR-ATR de las NPAs antes y después de la modificación con cloruro de lauroilo.

Así mismo, las señales observadas en 2919 cm^{-1} y 2857 cm^{-1} para las NPAs modificadas se atribuyen a los estiramientos de los metilos y metilenos asociados a los sustituyentes del ácido graso [11]. El estiramiento C—H localizado en 2919 cm^{-1} incrementó su intensidad después de la

modificación debido al aumento de la longitud de cadena hidrocarbonada. Mientras que la intensidad de la banda de absorción localizada en 3340 cm^{-1} atribuida a los estiramientos O—H, disminuyó después de la reacción de esterificación, esto podría deberse a la sustitución de grupos —OH [115].

Al igual que en la modificación con AM, en este caso también se evaluó mediante TGA la estabilidad térmica de las NPAs antes y después de la esterificación. Las curvas obtenidas se muestran en la Figura 5.21. Se puede observar que el proceso de degradación de los materiales analizados se llevó a cabo en dos pasos. Primero de 50 a 250°C , el cual se relaciona con la pérdida de agua (deshidratación) y la segunda se presentó de 200 a 600°C , asociada a la degradación del almidón y sus derivados [12].

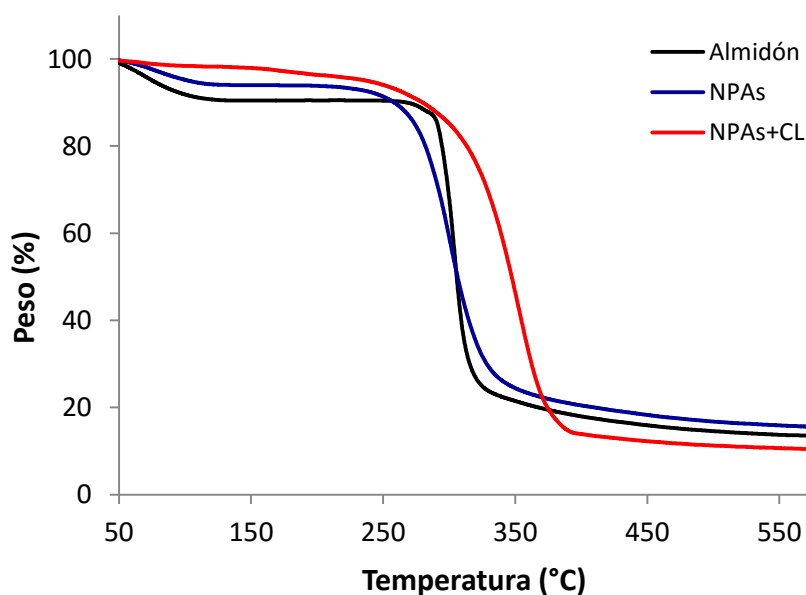


Figura 5.21. Termogramas de TGA de almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p), NPAs y NPAs modificadas con cloruro de lauroilo.

Las curvas mostradas indican que la estabilidad térmica de las NPAs que fueron modificadas con el ácido graso aumentó en comparación con las NPAs que no fueron modificadas esto podría explicarse ya que después de la modificación existe una mayor longitud de la cadena hidrocarbonada que ocasiono el aumento en la estabilidad térmica de las NPAs modificadas [115]. Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos para las NPAs modificadas con AM,

se esperaba una disminución de la estabilidad térmica por sustitución de grupos —OH. Aunque en este caso el CL se encuentra bloqueando a estos grupos debido a su naturaleza hidrófoba.

Las NPAs modificadas con CL también se caracterizaron por TEM. En la Figura 5.22 se presentan las micrografías obtenidas. Estas partículas no se dispersaban con facilidad en agua, en comparación con las que fueron modificadas con AM. En este caso se disminuyó la capacidad de las partículas para formar puentes de hidrógeno y aglomerarse, pero también se les confirió cierto carácter hidrófobo que afectó su dispersabilidad en el agua, aunque esto nos evidencia que la esterificación para unir cadenas hidrófobas a la cadena hidrófila de las NPAs se llevó a cabo. Namazi y cols. [12] evaluaron mediante TEM los cambios morfológicos de nanocristales de almidón antes y después de su modificación superficial con diferentes ácidos grasos (ácido octanóico, ácido nonanóico y ácido decanóico), mencionan que después de la modificación pareciera que el tamaño de los nanocristales aumentó ligeramente en comparación con los nanocristales no modificados, en el presente estudio no fue posible realizar esta comparación ya que no fue posible obtener una micrografía de las NPAs antes de la modificación química. Sin embargo, la morfología de las nanocristales es muy similar al de las NPAs aquí sintetizadas.

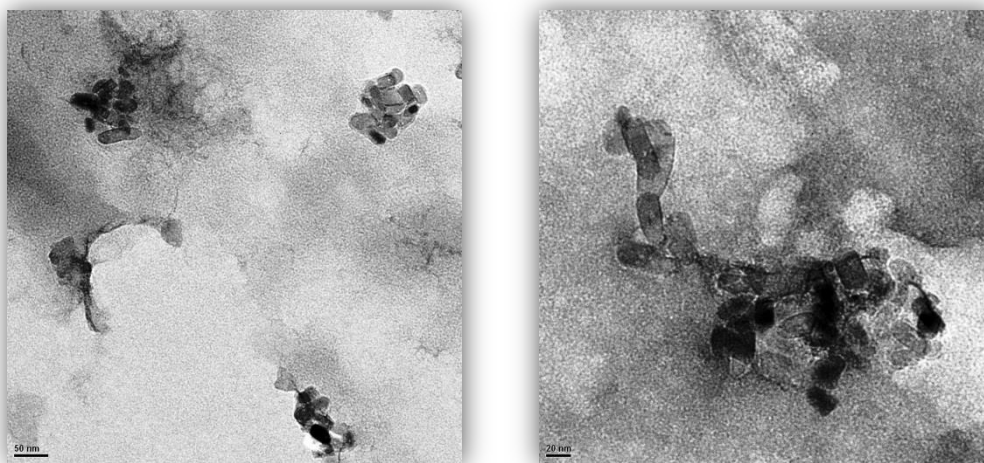


Figura 5.22. Micrografías de TEM de las NPAs modificadas con cloruro de lauroilo.

5.2.3. Pasivación con polietilenglicol (PEG)

Con el propósito de aumentar la estabilidad de las NPAs, mediante la disminución de su energía superficial se realizó la pasivación de la superficie de las NPAs utilizando PEG. Este, es un polímero que presenta una parte polar y la otra no polar, lo cual le permite actuar como tensoactivo para disminuir la energía superficial de las NPAs [68]. Se utilizaron las NPAs obtenidas en el experimento donde se utilizó una dispersión de 5 % en peso de almidón y 15 min de sonicación.

Basados en el esquema que se presenta en la Figura 5.23, se esperaría que durante la pasivación de las NPAs ocurriera la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos —OH del almidón y del PEG [121]. Aunque no se han encontrado reportes sobre la pasivación de NPAs utilizando PEG, esta se ha llevado a cabo en nanocristales de celulosa.

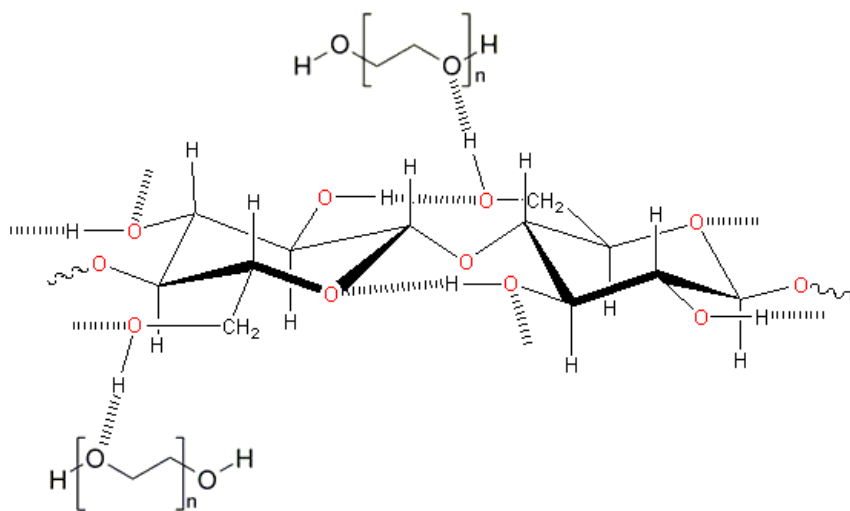


Figura 5.23. Esquema de la pasivación superficial de nanocristales de celulosa con PEG.

También en este caso se hizo la caracterización química por espectroscopia de FTIR-ATR. En la Figura 5.24 se muestran los espectros de las NPAs antes y después de la pasivación con PEG. El aumento en la intensidad de la señal cercana a 2900 cm^{-1} para las NPAs modificadas superficialmente se atribuye a un incremento de los estiramientos C—H. Así mismo, se observa que en la región de huella dactilar se conservan las señales en 964 , 1024 , 1100 y 1149 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos C—O, donde 1100 y 1024 cm^{-1} corresponden

específicamente al estiramiento C—O del anillo de anhidroglucosa. Al tratarse de una modificación superficial física no hay probabilidad de una apertura de anillo de la molécula [7].

Considerando que antes del secado por liofilización se hicieron lavados de las NPAs para asegurar la eliminación del PEG libre, en el espectro de IR de las NPAs modificadas superficialmente es evidente la aparición de bandas en 1469, 1341, 1280, 1243, 824 cm^{-1} las cuales son bandas características del PEG, como se observa en el espectro donde se evaluó el PEG sólo. Esto nos evidencia la presencia de cadenas PEG unidas físicamente a las NPAs.

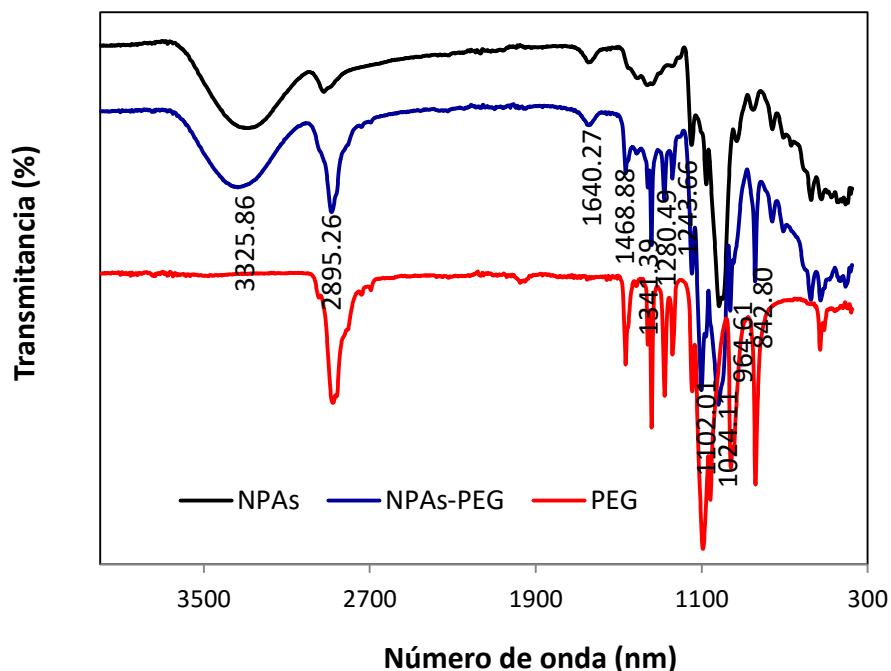


Figura 5.24. Espectros de FTIR-ATR de las NPAs y de las NPAs pasivadas con PEG.

La estabilidad térmica de las NPAs compatibilizadas con PEG, también se evaluó por TGA. Los termogramas se presentan en la Figura 5.25. Se observa que después de la pasivación la estabilidad térmica de las NPAs aumentó. Esto se podría explicar ya que el PEG presenta una alta estabilidad térmica y al estar unido a la superficie de las NPAs, ocasiona que se aumente su estabilidad.

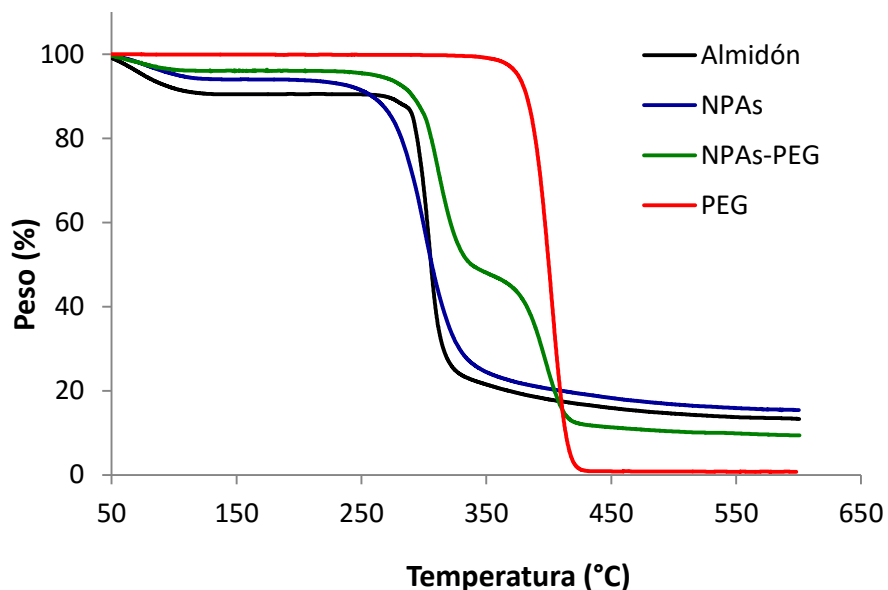


Figura 5.25. Termogramas de TGA de almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p), NPAs, NPAs compatibilizadas con polietilenglicol y polietilenglicol solo.

Las micrografías de las NPAs que fueron modificadas superficialmente con PEG, se muestran en la Figura 5.26. En este caso se observa una morfología diferente en comparación con las NPAs que fueron esterificadas. Las NPAs pasivadas presentaron una buena dispersabilidad en agua, similar a la observada para las NPAs modificadas con AM. Sin embargo, al llevar a cabo el estudio de microscopia por TEM, se observó que las NPAs aun presentan una tendencia a formar aglomerados, pero se distinguen mucho mejor que las NPAs donde no se llevó a cabo la pasivación, ya que en estas últimas ni siquiera fue posible la obtención de una micrografía por TEM, debido a que se observaban como grandes aglomerados.

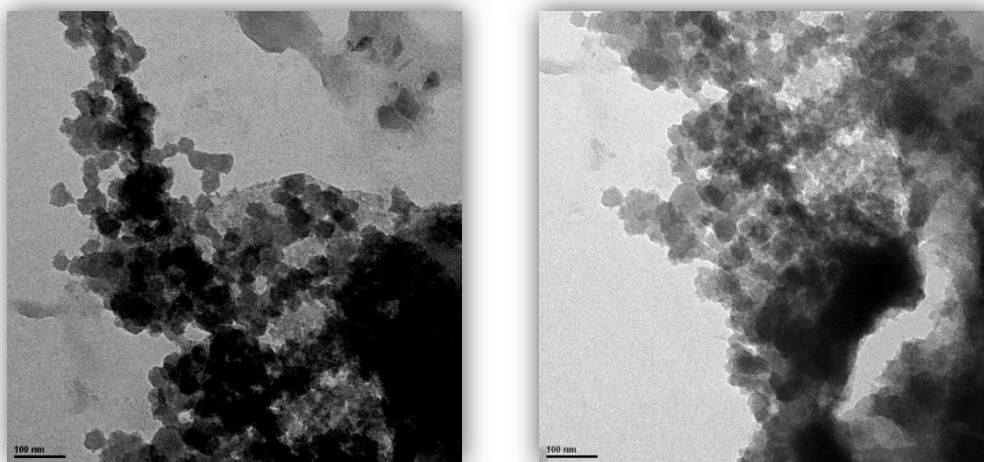


Figura 5.26. Micrografías de TEM de las NPAs pasivadas con polietilenglicol.

5.3. Reducción química de la ubiquinona

El ubiquinol empleado en el cargado de las NPAs modificadas se obtuvo mediante la reducción química del grupo carbonilo (C=O) presente en la ubiquinona, utilizando borohidruro de sodio (NaBH_4) como agente reductor [109]. Las reacciones se llevaron a cabo en un sistema co-solubilizado utilizando éter dietílico como disolvente [122], además de metanol o etanol como co-solvente. En todos los experimentos se agregó un exceso de NaBH_4 con respecto a la ubiquinona (la relación molar empleada fue de 1:5). En la Tabla 5.5 se muestra la información de los experimentos realizados para la reducción, se observa que el rendimiento de la reacción incrementó cuando se dejó la reacción por un mayor tiempo, se determinó que no hubo un claro efecto del tipo de co-solvente sobre el rendimiento de la reacción ya que fue muy similar.

Tabla 5.5. Reacciones de reducción de CoQ_{10} con borohidruro de sodio.

Exp.	Disolvente/alcohol	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)
E1	Éter dietílico/metanol	1	82
E2	Éter dietílico/metanol	2	91
E3	Éter dietílico/metanol	3	95
E4	Éter dietílico/etanol	3	93

Para determinar si la reacción de reducción se llevó a cabo de manera exitosa, se hizo una caracterización por FT-IR de la ubiquinona utilizada y del producto obtenido después de la reacción de reducción. En la Figura 5.27 se muestran los espectros obtenidos. Para el espectro del producto de reacción se observa una señal en 3471 cm^{-1} la cual es atribuida a grupos —OH no asociados, la cual no aparece en el espectro de la ubiquinona. La señal de —OH no asociados presentes en el ubiquinol es atribuida a la cadena hidrocarbonada larga que evita la asociación intra e intermolecular de la hidroquinona. También se observan las bandas de alargamiento de doble enlace en 1610 cm^{-1} , pero estas son características para ambos compuestos.

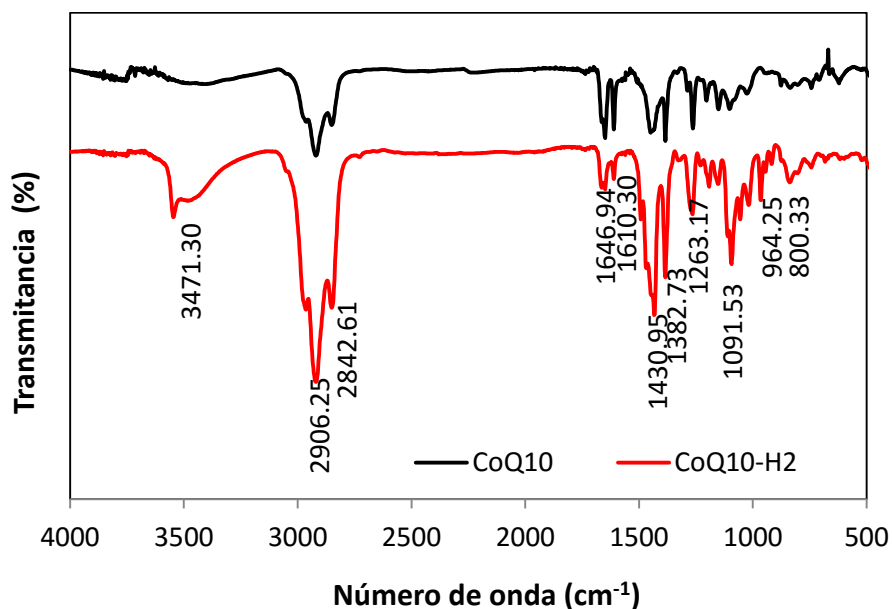


Figura 5.27. Espectro de FT-IR de la ubiquinona y del producto obtenido después de la reacción de reducción con borohidruro de sodio.

Con la finalidad de tener un análisis más detallado también se llevó a cabo la caracterización por espectroscopia de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para ambos compuestos. En la Figura 5.28 se muestra el espectro de ^1H -RMN de la ubiquinona, donde se observa un desplazamiento químico en 5.28 ppm correspondiente a la resonancia de los hidrógenos vinílicos. Mientras que el desplazamiento en 4.95 ppm es atribuido al protón localizado al final de la cadena. Para el caso de los protones de los grupos metóxidos se presentó un desplazamiento en 4.0 ppm y se puede observar que estos grupos no son equivalentes ya que tienen diferente ambiente magnético. La resonancia del metileno de la primera unidad isoprénica que se encuentra unido al ciclo de la benzofenona tiene

un desplazamiento en 3.25 ppm, mientras que los metilos y metilenos con hibridaciones sp^3 presentan su resonancia en el intervalo de 2.30 ppm a 1 ppm.

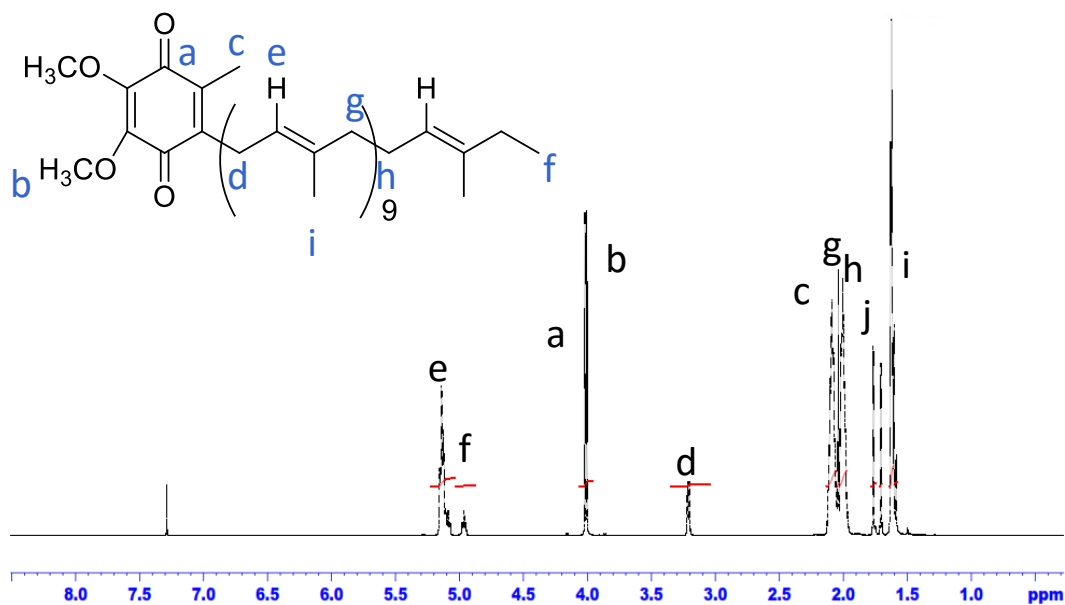


Figura 5.28. Espectro ¹H-RMN 500 MHz en CDCl₃, de la ubiquinona.

También se obtuvo el espectro de ¹H-RMN del producto obtenido después de la reacción de reducción (E3), los resultados se muestran en la Figura 5.30. En primer lugar se observa que la resonancia de los hidrógenos unidos al anillo bencénico aparecen en 5.29 ppm e integran para dos hidrógenos. Otro cambio importante es que se eliminan las diferencias estructurales en el ciclo de 6 miembros, lo cual ocasiona que los grupos metóxidos sean equivalentes y por lo tanto aparece una sola señal en 3.85 ppm.

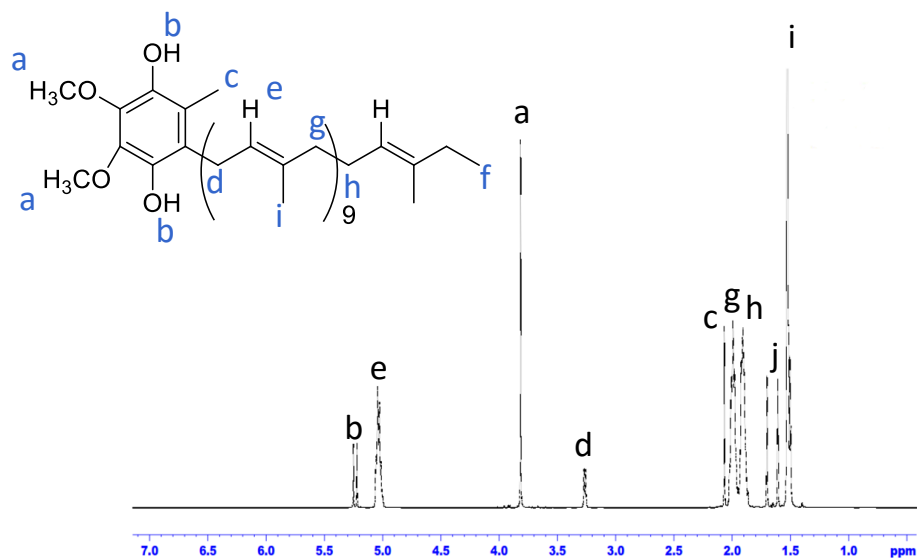


Figura 5.29. Espectro ^1H -RMN 500 MHz en CDCl_3 , del producto obtenido de la reacción de reducción de CoQ_{10} con borohidruro de sodio.

Los resultados de la caracterización realizada por ^{13}C -RMN de las muestras se presentan a continuación. En el espectro de la Figura 5.30, se muestra el resultado de la caracterización espectroscópica de la ubiquinona. Donde se observa la presencia de dos resonancias en 184.3 y 183.5 ppm que corresponden a los carbonilos del anillo de la benzoquinona, la presencia de estos dos grupos carbonilo implica una diferencia en ambiente magnético en la estructura de la ubiquinona.

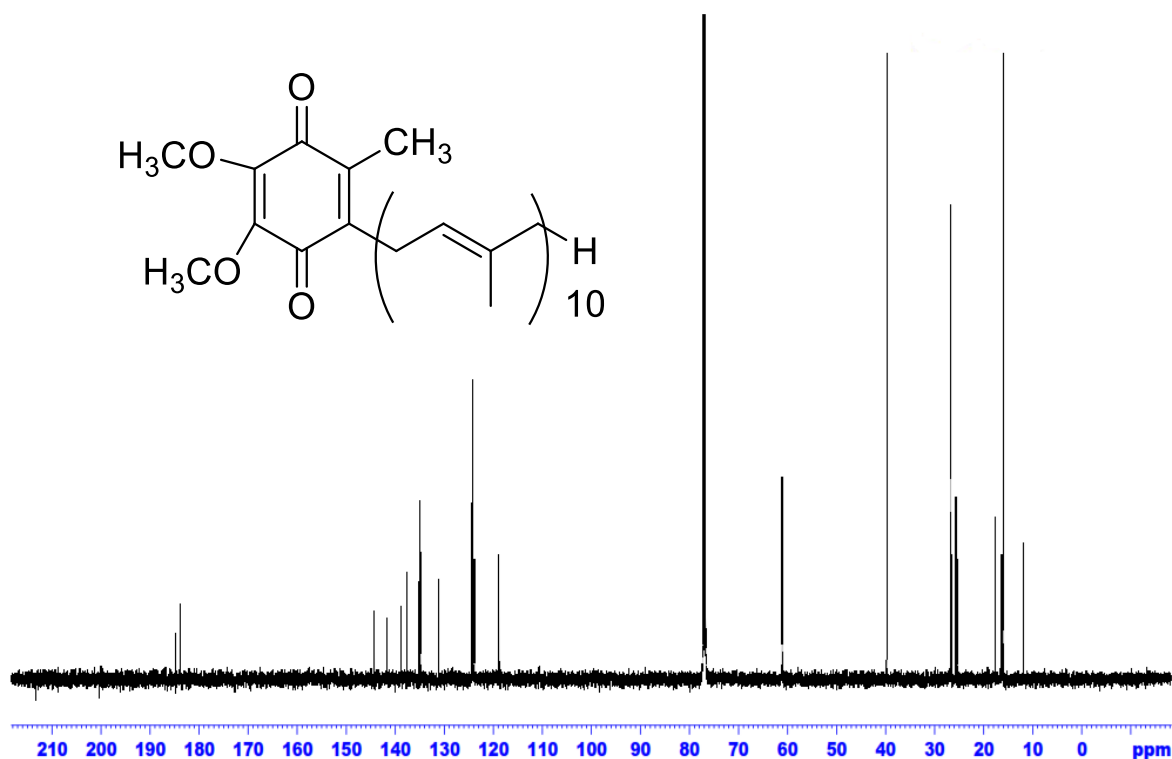


Figura 5.30. Espectro ¹³C-RMN 125 MHz en CDCl₃, de la ubiquinona.

Además, se adquirió el espectro del producto obtenido después de la reacción de reducción de la ubiquinona (exp. E3), este, se muestra en la Figura 5.31, donde es muy evidente la ausencia de las señales en 183 y 184 correspondientes al grupo carbonilo, las cuales si se presentan en la ubiquinona, pero después de la reacción de reducción desaparecieron.

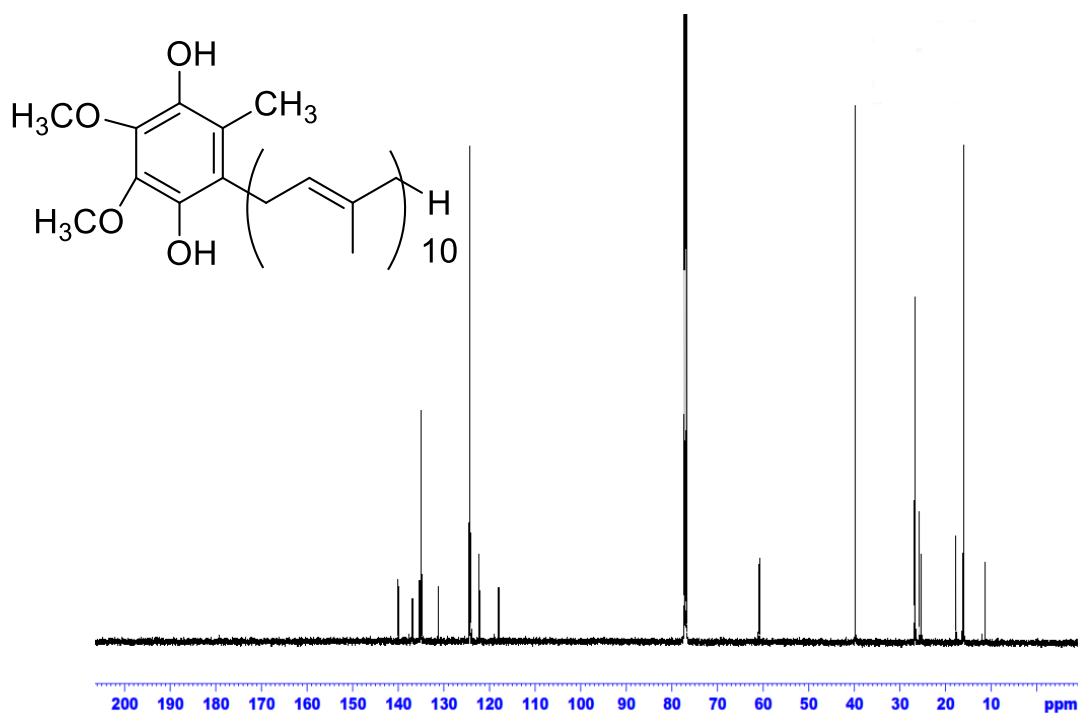


Figura 5.31. Espectro ^{13}C -RMN 15 MHz en CDCl_3 , del producto obtenido de la reacción de reducción de CoQ_{10} con borohidruro de sodio.

Todas las evidencias espectrales obtenidas tanto por FT-IR, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, corroboran la presencia del ubiquinol después de la reacción de reducción con borohidruro de sodio. Por lo que se continuó con la reacción de cargado con ubiquinol de las NPAs modificadas superficialmente con AM, CL y PEG. Los resultados se muestran en el siguiente apartado.

5.4. Evaluación de las NPAs como portadoras de ubiquinol

Para llevar a cabo las pruebas de cargado con ubiquinol se siguió la metodología propuesta por Pang y cols. [15]. En la Tabla 5.6 se presentan las condiciones de reacción utilizadas para el cargado con ubiquinol de las NPAs modificadas con AM. Para el exp. C1 se trabajó en un sistema con reflujo a presión atmosférica y las NPAs se dispersaron en una solución etanol/agua con relación 40/60 (v/v). Se tomaron muestras a diferentes tiempos de cargado para determinar la cantidad de ubiquinol que se había cargado a las NPAs. Sin embargo, en todos los casos se observó que había un precipitado amarillo que sugería la oxidación del ubiquinol para formar ubiquinona.

Para evitar la oxidación del ubiquinol se hicieron dos nuevos experimentos, pero esta vez en atmósfera inerte. En el experimento C2 se eliminó el agua y se trabajó con etanol al que se adicionó vitamina E como un protector de la oxidación del ubiquinol [75]. En el experimento C3 se utilizó limoneno en lugar de etanol.

Tabla 5.6. Experimentos realizados para el cargado con ubiquinol de NPAs modificadas con AM.

Exp.	Tipo de almidón	Condiciones de reacción para el cargado con ubiquinol
C1	Almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p)	Sistema abierto etanol/agua 55°C; 20h
C2	Almidón soluble	Atmósfera inerte etanol/vitamina E 55°C; 20h
C3	Almidón soluble	Atmósfera inerte limoneno 55°C; 20h

Cuando se trabajó con la mezcla etanol/agua se utilizó un sistema co-solubilizado con lo que se obtenía una mezcla homogénea (transparente), ya que las NPAs son insolubles en etanol pero solubles en agua. Durante el cargado de las NPAs en etanol o limoneno, no se obtuvo una solución homogénea y desde el principio de la reacción se observaba un precipitado blanco que se mantenía disperso con ayuda de agitación magnética. La heterogeneidad de las muestras no permitió detectar la presencia del precipitado generado por la oxidación del ubiquinol.

En la Figura 5.32 se presentan los espectros de UV-visible obtenidos para los experimentos descritos anteriormente. Para efecto de comparación, antes del proceso de cargado, se analizaron las NPAs utilizadas en el experimento C1. Estas partículas presentaron un pico de absorción máxima entre 230 nm. Este resultado coincide con lo reportado por Tay y cols. [9] para el almidón maleatado, quienes encontraron un pico en 250 nm y lo atribuyen a las transiciones $\pi-\pi^*$ de los grupos insaturados del maleato.

En las muestras donde se llevó a cabo la reacción de cargado, se observa que la intensidad máxima encontrada en este rango de longitud de onda, es menor, lo cual nos haría pensar que algunos de los grupos insaturados del maleato formaron puentes de hidrógeno con el ubiquinol Pang y cols. [15]. Sin embargo, no se observa ningún pico de absorción máxima en 290 nm que es la longitud de onda reportada para el ubiquinol [123] o bien en 275 nm correspondiente a su

forma oxidada (CoQ₁₀) [124]. Esto pudiera ser atribuido a un error en la técnica de caracterización empleada, ya que las muestras se corrieron en agua ultrapura y el ubiquinol no puede ser solubilizado en este medio

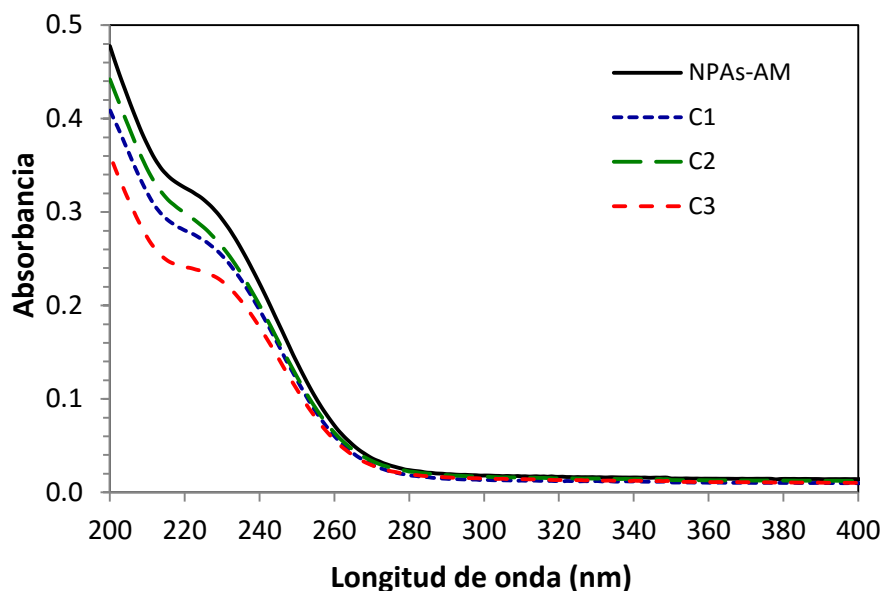


Figura 5.32. Caracterización por UV-visible de NPAs-AM (C1) y cargadas con ubiquinol.

Para complementar el estudio de caracterización por UV-visible, se corrieron muestras de ubiquinona y ubiquinol utilizando ciclohexano como disolvente. Los espectros que se muestran en la Figura 5.33 indican que la solución de ubiquinol mostró un pico de absorción en la misma longitud de onda que la molécula oxidada (CoQ₁₀). Estos resultados evidencian la inestabilidad del ubiquinol ya que se oxida rápidamente para dar lugar a la formación de la CoQ₁₀. Basados en estos resultados fue necesario hacer un replanteamiento del procedimiento a seguir en el cargado de las NPAs, ya que si las moléculas de ubiquinol se encuentran ya oxidadas al ponerse en contacto con las NPAs modificadas, no podrá haber la interacción para la formación de los puentes de hidrógeno.

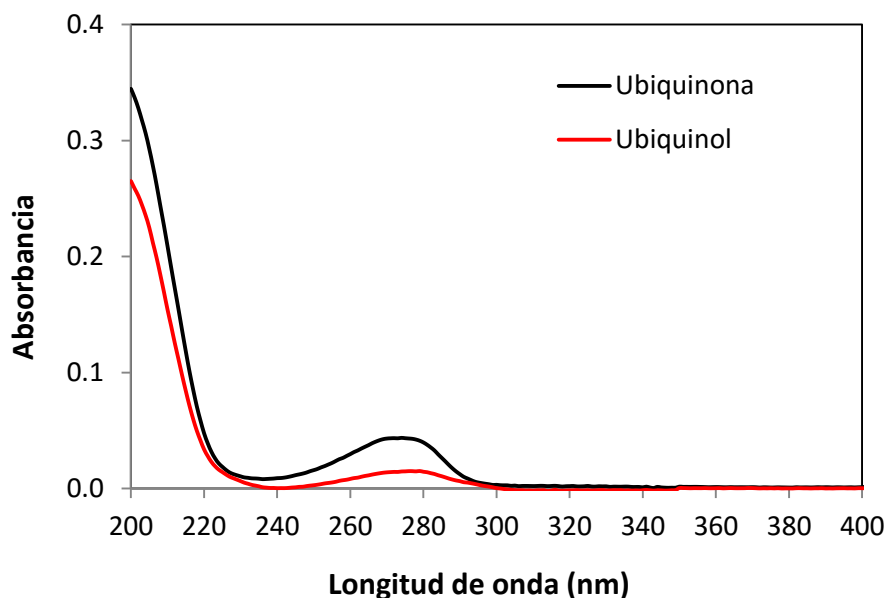


Figura 5.33. Caracterización por UV-visible de la ubiquinona y ubiquinol utilizando ciclohexano como disolvente.

Se realizaron nuevos experimentos de cargado de ubiquinol en las NPAs-AM y en este caso también se incluyeron las NPAs modificadas superficialmente con CL y PEG. Para distinguir mejor el comportamiento que tendría el ubiquinol en caso de que se oxidará durante la reacción de cargado, se hizo un experimento utilizando la CoQ₁₀. En todos los experimentos de cargado se trabajó en atmósfera inerte y se protegió de la luz a la mezcla de reacción (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Experimentos realizados para el cargado con ubiquinol de NPAs modificadas superficialmente con AM, CL y PEG.

Exp.	Tipo de almidón	Condiciones de reacción para el cargado con ubiquinol
NPAs-AM (ubiquinona)	Almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p)	Atmósfera inerte, etanol 25°C; 20h
NPAs-AM (ubiquinol)	Almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p)	Atmósfera inerte, etanol 25°C; 20h
NPAs-CL (ubiquinol)	Almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p)	Atmósfera inerte, etanol 25°C; 20h
NPAs-PEG (ubiquinol)	Almidón de maíz (amilopectina/amilosa; 73/27; p/p)	Atmósfera inerte, etanol 25°C; 20h

A continuación se ilustran los experimentos realizados que nos permitieron evaluar la estabilidad del ubiquinol antes y después de la reacción de cargado (Figura 5.34). En primer lugar se observa que el color de la soluciones (antes del cargado) y de las dispersiones (después del cargado) tanto para el compuesto oxidado (ubiquinona) y reducido (ubiquinol) es diferente. Por lo que se asume que el ubiquinol permaneció estable antes y durante la reacción de cargado bajo las condiciones utilizadas. Esto, se pudo comprobar mediante cromatografía de capa fina, donde se determinó que las muestras presentaron un comportamiento diferente utilizando la misma mezcla de solventes. Por lo que se corroboró que no se trata de la misma sustancia por lo que se logró trabajar con el ubiquinol sin que este se oxidara a ubiquinona.

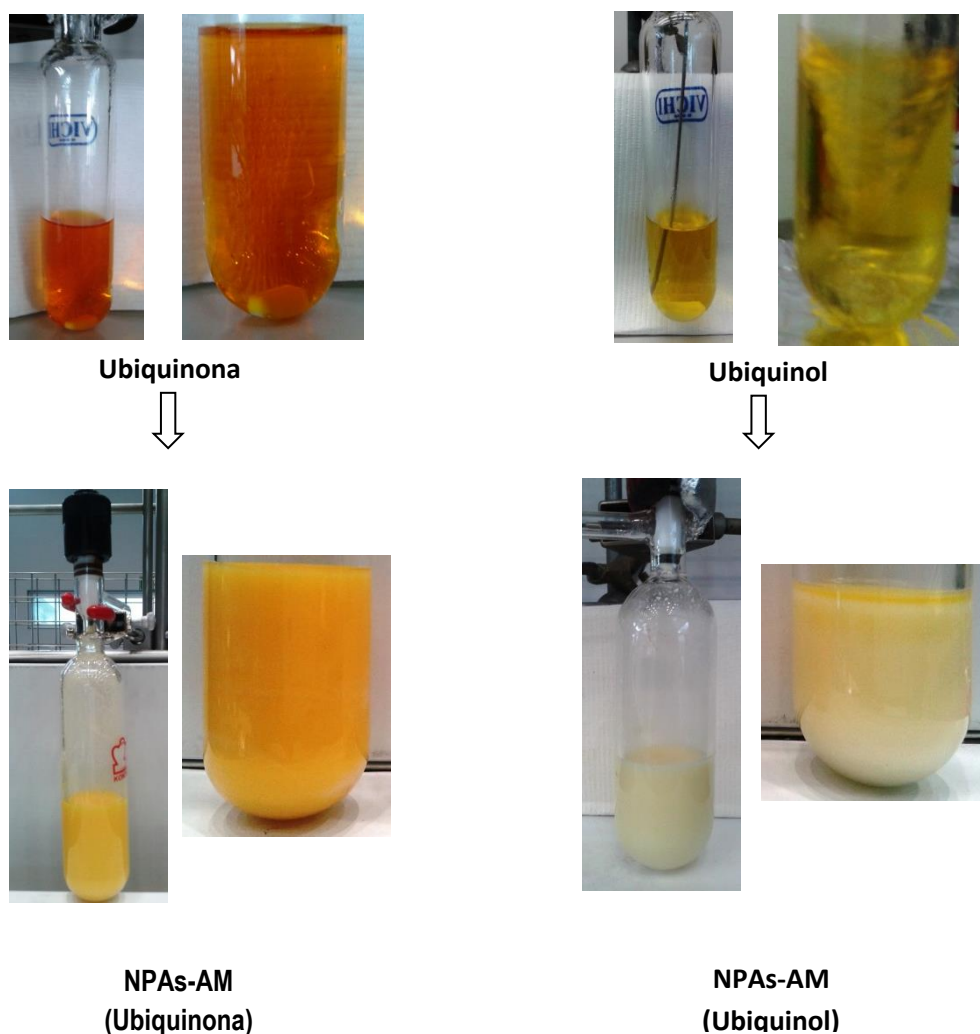


Figura 5.34. Evaluación de la estabilidad del ubiquinol mediante la comparación del color de las soluciones obtenidas antes y después del cargado con ubiquinona y ubiquinol en solución etanólica.

Con la finalidad de evidenciar el cargado de las NPAs con ubiquinol, estas se lavaron con etanol y se secaron para su posterior caracterización. En la Figura 5.35, se presentan los espectros obtenidos por FTIR-ATR. En ambos espectros, se observan las señales características para el almidón, además de la aparición de una nueva señal cercana a 2842 cm^{-1} , la cual es característica del ubiquinol y ubiquinona (Figura 5.27) y es atribuida a los estiramientos de metilos y metilenos presentes en estas moléculas. Así mismo, se observó la presencia de la señal en 1716 cm^{-1} , correspondiente al grupo carbonilo del maleato de almidón, esto se podría atribuirse a que no todos las esterificaciones formadas en la reacción de modificación lograron unirse al ubiquinol o bien a que se eliminó el ubiquinol con los lavados realizados.

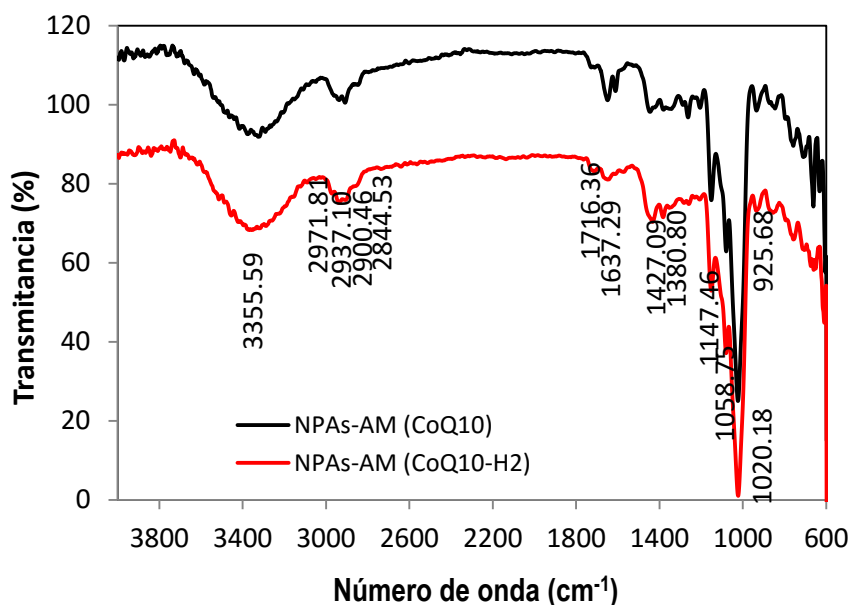


Figura 5.35. Espectro de FTIR-ATR de las NPAs- AM, que fueron cargadas con ubiquinona y ubiquinol.

Para verificar estos resultados, se realizó una caracterización por TEM de las NPAs obtenidas en ambos experimentos. Las micrografías se presentan en la Figura 5.36, en este caso sólo fue posible la observación de las muestras donde se realizó el cargado con ubiquinol. Para el caso de las NPAs-AM donde se trabajó con ubiquinona no se pudieron distinguir claramente, aun cuando

se trabajó bajo las mismas condiciones para la preparación de la muestra. En la micrografía obtenida para las NPAs donde se cargó ubiquinol, se observan partículas individuales con un núcleo bien diferenciado por un color más oscuro y una coraza de un color más claro, lo cual podría tratarse del ubiquinol adherido a la superficie de las NPAs, que por impedimento estérico ocasiona que las NPAs se encuentren separadas unas de otras. Además, se observan como NPAs esféricas, con tamaño menor de 50 nm.

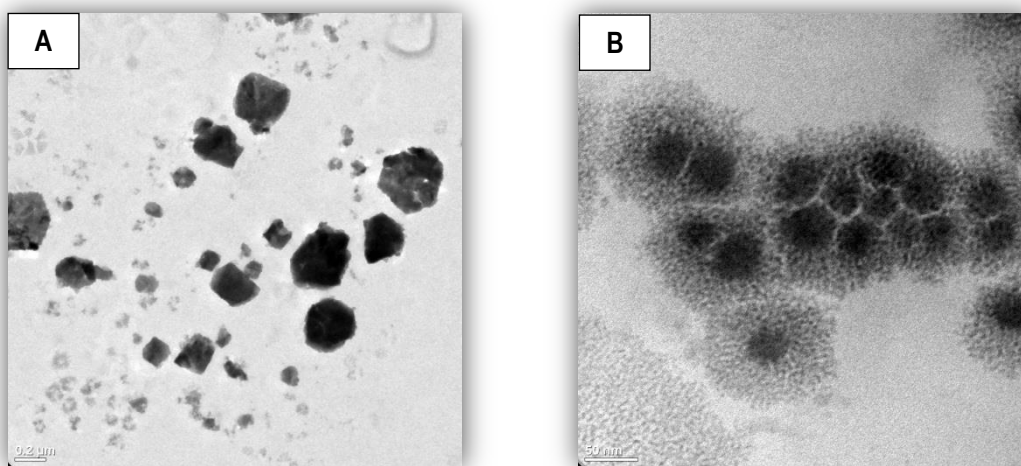


Figura 5.36. Micrografía de TEM, obtenida para NPAs-AM cargadas con ubiquinona (A) y ubiquinol (B).

De acuerdo a los resultados mencionados anteriormente, Naggara y cols. [125] reportan micrografías de TEM para evidenciar el cargado de diclofenaco sódico en NPAs preparadas por la técnica de nanoprecipitación y entrecruzadas con tripolifosfato de sodio. Los autores mencionan que las micrografías obtenidas presentan una coloración más oscura cuando la concentración del fármaco es mayor. No obstante, bajo estas condiciones (mayor concentración de fármaco) obtienen partículas con Dp mayor y con aglomerados. Es importante mencionar que en el estudio de Naggara y cols., el diclofenaco sódico se encontraba encapsulado en las NPAs entrecruzadas y no en la superficie como en este caso. Aun así, los autores reportan un el Dp menor de 80 nm para todos sus experimentos de cargado.

Después de comprobar que el ubiquinol no se había oxidado, y que además se encontraba adherido en la superficie de las NPAs modificadas con AM. También se realizaron experimentos

de cargado de las NPAs que fueron modificadas superficialmente con CL y PEG. En la Figura 5.37 se muestran las reacciones de cargado con ubiquinol de los tres tipos de NPAs que fueron modificadas. En los tres casos el color de las muestras es diferente. En primer lugar se observa que en ninguna de las reacciones la mezcla es homogénea, ya que las NPAs se observaron cómo precipitados una vez que se eliminó la agitación magnética. Sin embargo, la reacción menos estable fue la de las partículas que estaban modificadas con CL, ya que a diferencia de las otras dos reacciones pareciera que el ubiquinol quedó completamente separado en la parte superior del tubo de reacción.

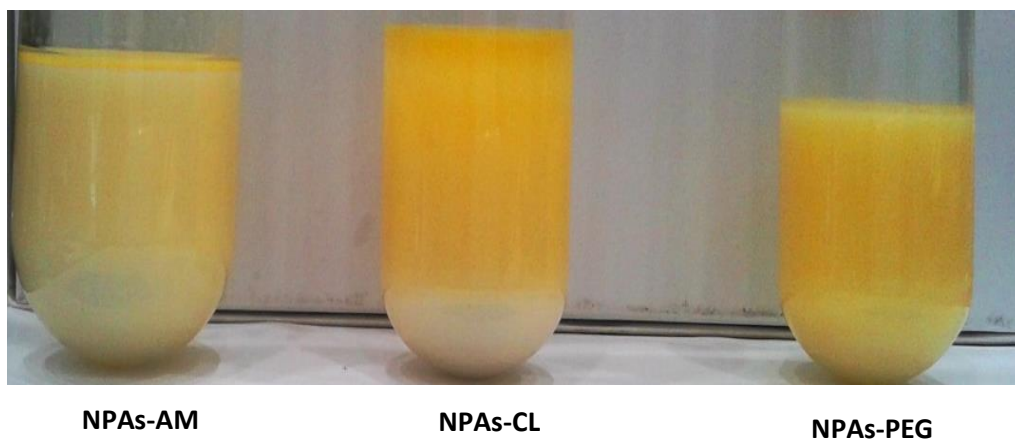


Figura 5.37. Imagen de las reacciones de cargado de las NPAs esterificadas con AM y CL, así como las compatibilizadas con PEG.

También para los productos de estos experimentos se realizó la caracterización por FTIR-ATR, los resultados se muestran en la Figura 5.38. Para el caso de las NPAs modificadas con CL, se observan resultados similares que los encontrados en el caso anterior (NPAs modificadas con AM) en este caso se observó la presencia de una señal en 1718 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), esto se podría atribuirse a que no todos los grupos ésteres formados en la reacción de modificación con CL lograron unirse al ubiquinol o bien a que se eliminó el ubiquinol con los lavados realizados como sucedió para el AM. La aparición de una banda en 2871 cm^{-1} , la cual es característica del ubiquinol y ubiquinona (Figura 5.27) y es atribuida a los estiramientos de metilos y metilenos presentes en estas moléculas.

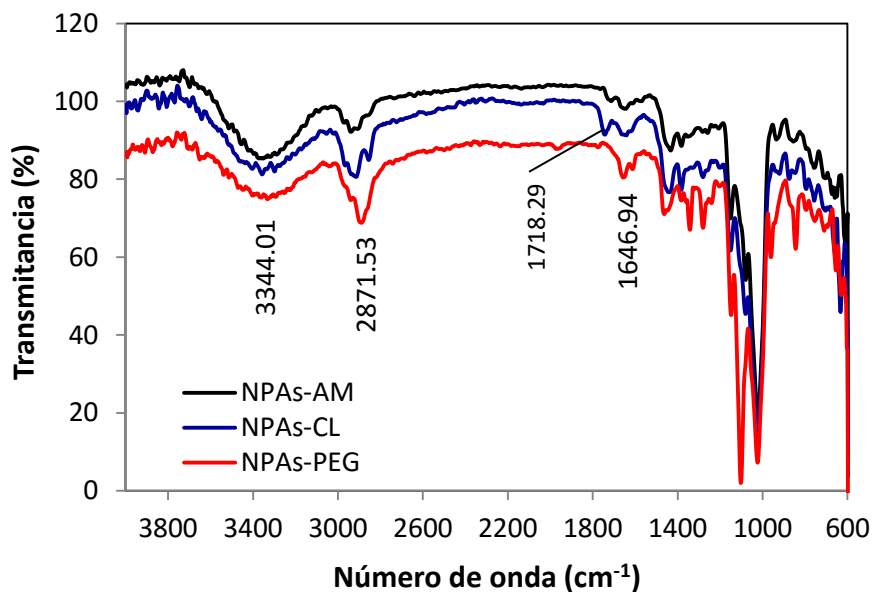


Figura 5.38. Espectro de FTIR-ATR de las NPAs modificadas superficialmente con AM, CL y PEG que fueron cargadas con ubiquinol.

El análisis visual del comportamiento de las muestras durante la reacción de cargado nos permite concluir que el ubiquinol es estable en las condiciones de cargado utilizadas y que existe una clara diferencia en el color de la muestra de NPAs modificadas con AM y cargadas con ubiquinol, cuando se compara con el mismo tipo de partículas cargadas con ubiquinona, así como cuando se compara con las otras partículas modificadas, ya que en estos casos la solución se tornaba de un color naranja y las NPAs en el precipitado se veían de color blanco.

VI. CONCLUSIONES

Se hizo un estudio comparativo para determinar la factibilidad del uso de energía ultrasónica en sustitución de agitación mecánica para la preparación de NPAs a partir de una dispersión de almidón en una solución alcalina y se comprobó que la sonicación reduce considerablemente el tiempo de preparación, así como el tamaño de las NPAs obtenidas.

Se hizo un estudio para determinar el efecto de la concentración de almidón en solución alcalina (1, 5 y 10 % en peso) y tiempos de sonicación (5, 10 y 15 min). El tiempo de sonicación utilizado presentó un efecto inverso sobre el D_p , a excepción del tiempo de sonicación de 15 min para las concentraciones de almidón de 5 y 10 % en peso, esto se debe a que las NPAs tienen un tamaño tan pequeño que son muy inestables, además, la cercanía con otras partículas igualmente inestables, favoreció su coalescencia.

La modificación superficial de las NPAs con AM, CL y PEG fue exitosa en todos los casos. La solubilidad en agua de las NPAs modificadas con AM y PEG incrementó, lo cual se atribuye a una disminución en la tendencia a formar aglomerados por la formación de puentes de hidrógeno. En el caso de las NPAs con CL, la solubilidad en el agua disminuyó por el incremento en la hidrofobicidad de las mismas.

El empleo de borohidruro de sodio como agente reductor, así como éter dietílico y alcoholes de bajo peso molecular como disolventes, conduce a la reducción de la ubiquinona con altos rendimientos. Al tratarse de un compuesto con un alto poder antioxidante, el ubiquinol obtenido es altamente inestable y se oxida rápidamente si no se mantiene en condiciones de atmósfera inerte y fotoprotección.

Resultados cualitativos indican que las NPAs modificadas con AM son la opción más viable para lograr la interacción entre las moléculas de ubiquinol sobre las NPAs, obteniéndose por micrografías de TEM evidencias de la obtención de NPAs cargadas con ubiquinol con D_p menor a 50 nm.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Yang, J.; Huang, Y.; Gao, C.; Liu, M.; Zhang, X. (2013). Fabrication and evaluation of the novel reduction-sensitive starch nanoparticles for controlled drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115, 368-376.
2. De Vos, P.; Faas, M.M.; Spasojevic, M.; Sikkema, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, **2010**, 20, 292–302.
3. Alvarez-Lorenzo, C.; Blanco-Fernandez, B.; Puga, A.M.; Concheiro, A. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Rev.*, **2013**, 65 (9) 1148-1171.
4. Liu, Z.; Jiao, Y.; Wang, Y.; Zhou, C.; Zhang, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Rev.*, **2008**, 60, 1650-1662.
5. Kim, H.Y.; Park, S.S.; Lim, S.T. Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2015**, 126, 607–620.
6. LeCorre, D.; Bras, J.; Dufresne, A. Starch Nanoparticles: A Review. *Biomacromolecules*, **2010**, 11, 1139–1153.
7. Sun, R.; Sun, X.F. Succinylation of sago starch in the N, N-dimethylacetamide/lithium chloride system. *Carbohydrate Polymers*, **2002**, 47(4), 323-330.
8. Yoshimura, T.; Yoshimura, R.; Seki, C.; Fujioka, R. Synthesis and characterization of biodegradable hydrogels based on starch and succinic anhydride. *Carbohydrate Polymers*, **2006**, 64(2), 345–349.
9. Tay, S.H.; Pang, S.C.; Chin, S.F. Facile synthesis of starch maleate monoesters from native sago starch. *Carbohydrate Polymers*, **2012**, 88(4), 1195-1200.
10. Pang, S.C.; Chin, S.F.; Tay, S.H.; Tchong, F.M. Starch–maleate–polyvinyl alcohol hydrogels with controllable swelling behaviors. *Carbohydrate Polymers*, **2011**, 84(1), 424–429.
11. Namazi, H.; Fathi, F.; Dadkhaha, A. Hydrophobically modified starch using long-chain fatty acids for preparation of nanosized starch particles. *Scientia Iranica, Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering*, **2011**, 18, 439–445.

12. Namazi, H.; Dadkhah A. Convenient method for preparation of hydrophobically modified starch nanocrystals with using fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, **2010**, 79, 731–737.
13. Tomasik, P.; Zaranyika, M.F. Nonconventional methods of modification of starch *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **1995**, 51, 243-318.
14. Santander-Ortega, M.J.; Stauner, T.; Loretz, B. Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery, *Journal of Controlled Release*, **2010**, 141(1), 85–92.
15. Pang, S.C.; Tay, S.O.; Chin, S.F. Facile Synthesis of Curcumin-Loaded Starch-Maleate Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, **2013**, ID 824025.
16. Crane, F.L. Biochemical functions of coenzyme Q₁₀. *Journal of the American College of Nutrition*, **2001**, 20(6), 591-598.
17. Hosoe, K. Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH™) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2007**, 47(1), 19-28.
18. Beal, M.F. Coenzyme Q₁₀ as a possible treatment for neurodegenerative diseases. *Free Radical Research*, **2002**, 36(4), 455-460.
19. Turunen, M.; Olsson, J.; Dallner, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Biomembranes*, **2004**, 1660(1–2), 171-199.
20. Kurowska, E.M.; Dresser, G.; Deutsch, L.; Bassoo, E.; Freeman, D.J. Relative bioavailability and antioxidant potential of two coenzyme Q₁₀ preparations. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **2003**, 47(1), 16-21.
21. Sarwar, B.; Shamama, J.; Kanchan, K. Bioavailability Enhancement of Coenzyme Q₁₀: An Extensive Review of Patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, **2010**, 4, 245-257.
22. Wilde B. International Norms on Biodegradability and Certification Procedures. Chapter 5: In: Bastioli C, Editor, *Handbook of Biodegradable Polymers*. Sawbury, UK: Rapra Technology Limited, **2005**, 45-82.
23. Hermann, B.G.; Debeer, L.; De Wilde, B.; Blok, K.; Patel, M.K. To compost or not to compost: Carbon and energy footprints of biodegradable materials' waste treatment. *Polymer Degradation and Stability*, **2011**, 96:1159-1171.

24. Tolinski, M. The Life Cycles of Plastics. *Plastics and Sustainability: Towards a Peaceful Coexistence between Bio-based and Fossil Fuel-based Plastics*. John Wiley & Sons, Inc., **2011**, 31-71.
25. Niaounakis, M. *Biopolymers: Reuse, Recycling, And Disposal*, Editor, *Plastics Design Library (Pdl) Pdl Handbook Series*, **2013**, 79-80.
26. Chang, Y.C.; Chen DGH. Adsorption kinetics and thermodynamics of acid dyes on a carboxymethylated chitosan-conjugated magnetic nano-adsorbent. *Macromol Biosci.*, **2005**, 5(3), 254–61.
27. Weiss, J.; Takhistov, P.; McClements, J. Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science*, **2006**, 71, 107–116.
28. Sekhon, B.S. Food nanotechnology an overview. *Nanotechnol Sci Appl.*, **2010**, 3, 1-15.
29. Joye, I.J.; McClements, D.J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2014**, 19, 417–427.
30. Khan, S.A.; Schneider, M. Improvement of nanoprecipitation technique for preparation of gelatin nanoparticles and potential macromolecular drug loading. *Macromol Biosci.*, **2013**, 13, 455–463.
31. Dhayal, S.K.; Gruppen, H.; De Vries, R.; Wierenga, P.A. Controlled formation of protein nanoparticles by enzymatic cross-linking of alpha-lactalbumin with horseradish peroxidase. *Food Hydrocoll.*, **2014**, 36, 53-59.
32. Huq, T.; Khan, A.; Khan, R.A.; Riedl, B.; Lacroix, M. Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, **2013**, 53, 909–916.
33. Jones, O.G.; McClements, D.J. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes. *Adv Colloid Interface Sci.*, **2011**, 167, 49–62.
34. Bengoechea, C.; Jones, O.G.; Guerrero, A.; McClements, D.J. Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: impact of composition, pH and thermal treatment. *Food Hydrocoll.*, **2011**, 25, 1227–1232.
35. Patel, A.; Hu, Y.C.; Tiwari, J.K.; Velikov, K.P. Synthesis and characterisation of zein-curcumin colloidal particles. *Soft Matter*, **2010**, 6, 6192–6199.

36. Duclairoir, C.; Orecchioni, A.M.; Depraetere, P.; Nakache, E. Alpha-tocopherol encapsulation and in vitro release from wheat gliadin nanoparticles J Microencapsul, **2002**, 19, 53–60.
37. Burey P, Bhandari BR, Howes T, Gidley MJ. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. Crit Rev Food Sci Nutr., **2008**, 48, 361–377.
38. Diab, R.; Jaafar-Maalej, C.; Fessi, H.; Maincent, P. Engineered nanoparticulate drug delivery systems: the next frontier for oral administration? Am Assoc Pharm Sci J., **2012**, 14:688–702.
39. Tripathy, J.; Raichur, A.M. Designing carboxymethyl cellulose based layer-by-layer capsules as a carrier for protein delivery. Colloids Surf B Biointerfaces, **2013**, 101, 487–92.
40. Yang, F.; Xia, S.; Tan, C.; Zhang, X. Preparation and evaluation of chitosan-calciumgellan gum beads for controlled release of protein. Eur Food Res Technol., **2013**, 237, 467–79.
41. Wang, H.; Han, S.; Sun, J.; Fan, T.F.; Tian, C.; Wu, Y. Amphiphilic dextran derivatives nanoparticles for the delivery of mitoxantrone. J Appl Polym Sci., **2012**, 126, 35–43.
42. Poulain, N.; Dez, I.; Perrio, C.; Lasne, M.C.; Prud'homme, M.P.; Nakache, E. Microspheres based on inulin for the controlled release of serine protease inhibitor: preparation, characterization and in vitro release. J Control Release, **2003**, 92, 27–38.
43. Zimet, P.; Livney, Y.D. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for omega-3 polyunsaturated fatty acids. Food Hydrocoll, **2009**, 23, 1120–1126.
44. López-Córdoba, A.; Deladino, L.; Martino, M. Release of yerba mate antioxidants from corn starch-alginate capsules as affected by structure. Carbohydr Polym., **2014**, 99, 150–157.
45. Merisko-Liversidge, E.; Liversidge, G.G.; Cooper, E.R. Nanosizing: a formulation approach for poorly water-soluble compounds Eur J Pharm Sci., **2003**, 18, 113–120.
46. Panagiotou, T.; Fisher, R.J. Producing micro and nano size formulations for functional foods applications. Funct Foods Health Dis., **2013**, 3, 274–289.
47. LeCorre, D.; Dufresne, A. Preparation of Starch Nanoparticles. Biopolymer Nanocomposites: Processing, Properties, and Applications, First Edition, **2013**, John Wiley & Sons, Inc.

48. Blanshard, J.M.; V. Starch granule structure and function: a physicochemical approach. Starch: Properties and Potentials; Galliard, T., Ed.; Society of Chemical Industry: London, **1987**, 3, 16-54.
49. Bogracheva, T.Y.; Morris, V.J.; Ring, S.G.; Hedley, C.L. Biopolymers **1998**, 45 (4), 323–332.
50. LeCorre, D.; Bras, J.; Dufresne, A. Influence of botanic origin and amylose content on the morphology of starch nanocrystals. Journal of Nanoparticle Research, **2011**, 13(12), 7193–7208.
51. Putaux, J.L.; Molina-Boisseau, S.; Momaur, T.; Dufresne, A. Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis Biomacromolecules, **2003**, 4, 1198–1202.
52. Angellier, H.; Choisnard, L.; Molina-Boisseau, S.; Ozil, P.; Dufresne, A. Optimization of the preparation of aqueous suspensions of waxy maize starch nanocrystals using a response surface methodology. Biomacromolecules, **2004**, 5, 1545–1551.
53. Tischer, P.C.S.F.; Sierakowski, M.R.; Westfahl, H.; Tischer, C.A. Nanostructural reorganization of bacterial cellulose by ultrasonic treatment. Biomacromolecules, **2010**, 11, 1217–1224.
54. Grieser, F.; Ashokkumar, M.; Sostaric, J.Z.; In, L.A.; Crum, T.J.; Mason, J.L.; Reisse, K.S. Sonochemistry and sonoluminescence, NATO ASI series, **1999**, (345–362).
55. Haaj, S.B.; Magnin, A.; Pétrier, C.; Boufi, S. Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication. Carbohydrate Polymers, **2013**, 92 (2), 1625-1632.
56. Zuo, J.Y.; Knoerzer, K.; Mawson, R.; Kentish, S.; Ashokkumar, M. The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions. Ultrasonics Sonochemistry, **2009**, 16 (4), 462-468.
57. Liu, D.; Wu, Q.; Chen, H.; Chang, P.R. Transitional properties of starch colloid with particle size reduction from micro- to nanometer. Journal of Colloid and Interface Science, **2009**, 339, 117–124.
58. Song, D.; Thio, Y.S.; Deng, Y. Starch nanoparticle formation via reactive extrusion and related mechanism study. Carbohydrate Polymers, **2011**, 85, 208–214.
59. Zhang, Z.; Shan, H.; Sun, J.; Weng, Y.; Wang, X.; Xiong, J.; Chen, L.; Chen, X. Facile preparation of corn starch nanoparticles by alkali-freezing treatment. RSC Adv., **2013**, 3, 13406–13411.

60. Kim, H.Y.; Han, J.A.; Kweon, D.K.; Park, J.D.; Lim, S.T. Effect of ultrasonic treatments on nanoparticle preparation of acid-hydrolyzed waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers*, **2013**, 93(2), 582–588.
61. Kim, H.Y.; Park, D.J.; Kim, J.Y.; Lim, S.T. Preparation of crystalline starch nanoparticles using cold acid hydrolysis and ultrasonication. *Carbohydrate Polymers*, **2013**, 98(1), 295–301.
62. Chin, S.F.; Azman, A.; Pang, S.C. Size Controlled Synthesis of Starch Nanoparticles by a Microemulsion Method. *Journal of Nanomaterials*, **2014**, ID 763736, 7 pages.
63. Ma, X.; Jian, R.; Chang, P.R.; Yu, J. Fabrication and characterization of citric acid-modified starch nanoparticles/plasticized-starch composites. *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 3314–3320.
64. Dufresne, A. Polysaccharide nanocrystals reinforced nanocomposites. *Canadian Journal of Chemistry*, **2008**, 86, 484–494.
65. Golachowski, A.; Zieba, T.; Kapelko-Zeberska, M.; Drozd, A.; Gryzkin, A.; Grzechac, M. Current research addressing starch acetylation. *Food Chemistry*, **2014**, 176, 350-356.
66. Biswas, A., Shogren, R. L., Kim, S., & Willett, J. L. Rapid preparation of starch maleate half-esters. *Carbohydrate Polymers*, **2006**, 64(3), 484–487.
67. Rodríguez-Fragoso, P. (2008). *Síntesis de nanopartículas semiconductoras recubiertas con almidón*. (Tesis doctoral), Instituto Politecnico Nacional. México, D.F.
68. Pereda, M.; El Kissi, N.; Dufresne, A. Extrusion of polysaccharide nanocrystal reinforced polymer nanocomposites through compatibilization with poly(ethylene oxide). *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2014**, 6(12), 9365–9375.
69. Namazi, H.; Kanani, A. Investigation diffusion mechanism of b-lactam conjugated telechelic polymers of PEG and b-cyclodextrin as the new nanosized drug carrier devices. *Carbohydr. Polym.*, **2009**, 76, 46–50
70. Kim, J.H.; Kim, Y.S.; Kim, S.; Park, J.H.; Kwon, I.C. Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles as carrier for Paclitaxel. *J. Control. Release*, **2006**, 111, 228–234.
71. Zhang, Z.; Shan, H.; Chen, L.; He, C.; Zhuang, X.; Chen, X. Synthesis of pH-responsive starch nanoparticles grafted poly (L-glutamic acid) for insulin controlled release. *Eur Polym J.*, **2013**, 49, 2028-2091.

72. Chin, S.F.; Akmar, S.N.; Pang, S.C. Preparation and Characterization of Starch Nanoparticles for Controlled Release of Curcumin. *International Journal of Polymer Science*, **2014**.
73. Yoon, H.K.; Tae-Rang, T.R.; Lim, S.T. Stabilization of aqueous dispersion of CoQ₁₀ nanoparticles using maize starches *Food Hydrocolloids*, **2014**, 35, 144-149.
74. Grossi, G.; Bargossi, A.M.; Fiorella, P.L.; Piazzzi, S.; Battino, M.; Bianchi, G.P. Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of coenzyme Q₁₀ in plasma. *J. Chromatogr.*, **1992**, 593, 217–226.
75. Fantuzzi, M.; Glendale, C.A. Ubiquinol and alpha lipoic acid compositions. **US2008/0226710 A1**.
76. Kim, E.A.; Kim, J.Y.; Chung, H.J.; Lim, S.T. Preparation of aqueous dispersions of coenzyme Q₁₀ nanoparticles with amylo maize starch and its dextrin. *LWT - Food Science and Technology*, **2012**, 47, 493-499.
77. Mezawa, M.; Takemoto, M.; Onishi, S.; Ishibashi, R.; Ishikawa, T., Yamaga, M.; Fujimoto, M.; Okabe, E.; He, P.; Kobayashi, K.; Yokote, K. The reduced form of coenzyme Q₁₀ improves glycemic control in patients with type 2 diabetes: *Biofactors*. **2012**, 38(6) 416-21.
78. Jeya, M., Moon, H.J.; Lee, J.L.; Kim, L.W.; Lee, J.K. Current state of coenzyme Q₁₀ production and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2010**, 85(6), 1653–1663.
79. Rozen, T.; Oshinsky, M.; Gebeline, C.; Bradley, K.; Young, W.; Shechter, A.; Silberstein, S. Open label trial of coenzyme Q₁₀ as a migraine preventive. *Cephalalgia*, **2002**, 22, 137–141.
80. Morris, G.; Anderson, G.; Berk, M.; Maes, M. Coenzyme Q₁₀ depletion in medical and neuropsychiatric disorders: potential repercussions and therapeutic implications. *Mol Neurobiol*, **2013**, 48, 883–903.
81. Ely, J.T.A.; Krone, C.A. A brief update on ubiquinone (Coenzyme Q₁₀). *Orthomolecular Medicine*, **2000**, 15 (2), 63–68.
82. Belhaj, N., Dupuis, F.; Arab-Tehrany, E.; Denis, F.M.; Paris, C.; Lartaud, L.; Linder, M. Formulation, characterization and pharmacokinetic studies of coenzyme Q₁₀ PUFA's nanoemulsions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2012**, 47, 305–312.

83. Weber, C.; Bysted, A.; Holmer, G. Coenzyme Q₁₀ in the diet–daily intake and relative bioavailability. *Mol Aspects Med.*, **1997**, 18, 251-254.
84. Swarnakar, N.K.; Jain, A.K.; Singh, R.P.; Godugu, C.; Das, M.; Jain, S. Oral bioavailability, therapeutic efficacy and reactive oxygen species scavenging properties of coenzyme Q₁₀-loaded polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, **2011**, 32(28), 6860-6874.
85. Bule, M.V.; Singhal, R.S.; Kennedy, J.F. Microencapsulation of ubiquinone-₁₀ in carbohydrate matrices for improved stability. *Carbohydrate Polymers*, **2010**, 82, 1290–1296.
86. Onoue, S.; Terasawa, N.; Nakamura, T.; Yuminoki, K.; Hashimoto, N.; Yamada, S. Biopharmaceutical characterization of nanocrystalline solid dispersion of coenzyme Q₁₀ prepared with cold wet-milling system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2014**, 53, 118–125.
87. Bhagavan, H.N.; Chopra, R.K. Coenzyme Q₁₀: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radic Res.*, **2006**, 40(5), 445–453.
88. Pouton, C.W. Lipid formulations for oral administration of drugs: Non-emulsifying, self-emulsifying and ‘self-microemulsifying’ drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci.*, **2000**, 11(2), 593-598.
89. Nazzal, S.; Guven, N.; Reddy, I.K.; Khan, M.A. Preparation and characterization of Coenzyme Q₁₀-Eudragit® solid dispersion. *Drug Dev Ind Pharm.*, **2002**, 28(1), 49-57.
90. Palamakula, A.; Nutan, M., Khan, M. Response surface methodology for optimization and characterization of limonene-based coenzyme Q₁₀ self-nanoemulsified capsule dosage form. *AAPS Pharm Sci Tech.*, **2004**, 5(4), 114–121.
91. Kommuru, T.R.; Gurley, B., Khan, M.A.; Reddy, L.K. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q₁₀: formulation development and bioavailability assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, **2001**, 212(2), 233-246.
92. Balakrishnan, P.; Lee, B.J.; Oh, D.H.; Kim, J.O.; Lee, Y.I.; Kim, D.D.; Jee, J.P.; Lee, Y.B.; Woo, J.S.; Yong, C.S.; Choi, H.G. Enhanced oral bioavailability of Coenzyme Q₁₀ by self-emulsifying drug delivery systems. *Int J Pharm.*, **2009**, 374(1–2), 66–72.

93. Nepal, P.R.; Han, H.K.; Choi, H.K. Preparation and in vitro-in vivo evaluation of Witepsol® H35 based self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) of coenzyme Q₁₀. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2010**, 39(4) 224-232.
94. Onoue, S.; Uchida, A.; Kuriyama, K.; Nakamura, T.; Seto, Y.; Kato, M.; Hatanaka, J.; Tanaka, T.; Miyoshi, H.M.; Yamada, S. Novel solid self-emulsifying drug delivery system of coenzyme Q₁₀ with improved photochemical and pharmacokinetic behaviors. *Pharm Sci.*, **2012**, 46(5), 492-499.
95. López-Nicolas, J.M.; Rodríguez-Bonilla, P.; García-Carmona, F. Cyclodextrins and Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2014**, 54(2), 251-276.
96. Gao, X.; Nishimura, K.; Hirayama, F.; Arima, H.; Uekama, K.; Schmid, G.; Terao, K.; Nakata, D.; Fukumi, H. Enhanced dissolution and oral bioavailability of coenzyme Q₁₀ in dogs obtained by inclusion complexation with γ -cyclodextrin. *Coenzyme Q₁₀ complexation with γ -cyclodextrin. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2006**, 1(2), 95-102.
97. Terao, K.; Nakata, D.; Fukumi, H.; Schmid, G.; Arima, H.; Hirayama, F.; Uekama, K. Enhancement of oral bioavailability of coenzyme Q₁₀ by complexation with γ -cyclodextrin in healthy adults. *Nutrition Research*, **2006**, 26, 503-508.
98. Žmitek, J.; Smidovnik, A.; Fir, M.; Prosek, M.; Žmitek, K.; Walczak, J. Relative bioavailability of two forms of a novel water-soluble coenzyme Q₁₀. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **2008**, 52(4), 281-287.
99. Hatanaka, J.; Kimura, Y.; Lai-Fu, Z.; Onoue, S.; Yamada, S. Physicochemical and pharmacokinetic characterization of water-soluble Coenzyme Q₁₀ formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, **2008**, 363(1-2), 112-117.
100. Mozafari, M.R.; Khosravi-Darani, K.; Borazan, G.G.; Cui, J.; Pardakhty, A.; Yurdugul, S. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *Int J Food Prep.*, **2008**, 11(4):833–844.
101. McCook, J.P.; Persaud, I.; Narain, N.R. Topical formulations having enhanced bioavailability. **US20080233183**.
102. Xia, S.; Xu, S.; Zhang, X.; Zhong, F. Effect of Coenzyme Q₁₀ incorporation on the characteristics of nanoliposomes. *J Phys Chem B.*, **2007**, 111(9), 2200–2207.

103. Lee, W.C.; Tsai, T.H. Preparation and characterization of liposomal coenzyme Q10 for in vivo topical application. *International Journal of Pharmaceutics*, **2010**, 395, 78–83.
104. Fiorini, R.; Ragni, L.; Ambrosi, S.; Littarru, G.P.; Gratton, E.; Hazlett, T. Fluorescence Studies of the Interactions of Ubiquinol-10 with Liposomes. *Photochemistry and Photobiology*, **2008**, 84, 209–214.
105. Ankola, D.D.; Viswanad, B.; Bhardwaj, V.; Ramarao, P.; Kumar, M.N. Development of potent oral nanoparticulate formulation of coenzyme Q₁₀ for treatment of hypertension: Can the simple nutritional supplements be used as first line therapeutic agents for prophylaxis/therapy. *Eur J Pharm Biopharm*, **2007**, 67(2), 361-369.
106. Nehilla, B.J.; Bergkvist, M.; Popat, K.C.; Desai, T.A. Purified and surfactant-free coenzyme Q₁₀-loaded biodegradable nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **2008**, 348, 107–114.
107. Vergara, M.S.; Ortiz, C.H.; Gonzalez, J.; Quezada, J.A. Microencapsulation of Coenzyme Q10 in Poly (ethylene glycol) and Poly(lactic acid) with Supercritical Carbon Dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2012**, 51, 5840–5846
108. Amorim, C.M.; Couto, A.G.; Netz, D.J.A.; Freitas, R.A. Antioxidant idebenone-loaded nanoparticles based on chitosan and N-carboxymethylchitosan. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2010**, 6, 745–752.
109. Murphy, M. P., Smith, R., PCT Int. Appl., 2005019233, 2005, *Journal of Organic Chemistry*, **1989**, 54(14), 3303.
110. Neelam, K.; Vijay, S.; Lalit, S. Various techniques for the modification of starch and the applications of its derivatives. *International Research Journal of Pharmacy*, **2012**, 3(5), 25–31.
111. Mukerjea, R.; Slocum, G.; Robyt, J.F. Determination of the maximum water solubility of eight native starches and the solubility of their acidic-methanol and -ethanol modified analogues. *Carbohydrate Research*, **2007**, 342, 103–110.
112. Sperling, L.H. *Introduction to Physical Polymer Science*, Wiley-Interscience, 4th Edition, **2006**, Pág. 73-75.

113. Kang, N.; Zuo, Y.J.; Hilliou, L.; Ashokkumar, M.; Hemar, Y. Viscosity and hydrodynamic radius relationship of high-power ultrasound depolymerized starch pastes with different amylose content. *Food Hydrocolloids*, **2016**, 52, 183-191.
114. Wang, N.; Ding, E.Y.; Cheng, R.S. Thermal degradation behaviors of spherical cellulose nanocrystals with sulfate groups. *Polymer*, **2007**, 48, 3486–3493.
115. Simi, C.K.; Emilia Abraham, T. Hydrophobic grafted and cross-linked starch nanoparticles for drug delivery. *Bioprocess Biosyst Eng.*, **2007**, 30, 173–180.
116. Kacurakova, M.; Wilson, R.H. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, **2001**, 44(4), 291-303.
117. Fang, J.M.; Fowler, P.A.; Sayers, C.; Williams, P.A. The chemical modification of a range of starches under aqueous reaction conditions. *Carbohydrate Polymer*, **2004**, 55(3), 283–289.
118. Thakur, S.; Chauhan, G.S.; Ahn, J.H. Synthesis of acryloyl guar gum and its hydrogel materials for use in the slow release of L-DOPA and L-tyrosine. *Carbohydrate Polymers*, **2009**, 76(4), 513-520.
119. Wu, C.S. Physical properties and biodegradability of maleated-polycaprolactone/starch composite. *Polymer Degradation and Stability*, 2003, 80(1), 127-134.
120. Shanbhag, A.; Barclay, B.; Koziara, J.; Shivanand, P. Application of cellulose acetate butyrate-based membrane for osmotic drug delivery. *Cellulose*, **2007**, 14(1), 65–71.
121. Lin, N.; Dufresne, A. Physical and/or Chemical Compatibilization of Extruded Cellulose Nanocrystal Reinforced Polystyrene Nanocomposites. *Macromolecules*, **2013**, 46, 5570–5583.
122. Kimio, H.; Yoji, Y.; Shizumasa, K.; Takeshi, S.; Yucata, M.; Tetsuya, N. Synthesis of deuterium-labelled coenzyme Q10. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **2002**, 45, 831-839.
123. Orozco, D.; Skamarack, J.; Reins, K.; Titlow, B.; Lunetta, S.; Li, F.; Roman, M. Determination of Ubidearenone (Coenzyme Q₁₀, Ubiquinol-10) in Raw Materials and Dietary Supplements by High-Performance Single-Laboratory Validation. *Journal of AOAC International*, **2007**, 90 (5), 1227-1236.

124. Mailvelan, R.; Mounnissamy, V.M.; Selvamani, P.; Rajesh, J.; Raviraj, T. Development and validation of UV spectrophotometric methods for the simultaneous estimation of ubidecarenone (coenzyme Q₋₁₀) and clomifene citrate in bulk and tablet dosage forms. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, **2013**, 1(1), 23-30.
125. Naggara, M.E.; Rafie, M.H.; Sheikh, M.A.; Feky, G.S.; Hebeish, A. Synthesis, Characterization, Release Kinetics and Toxicity Profile of Drug-Loaded Starch Nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. Available online 7 September **2015**.