



Universidad de  
Oviedo

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**MÁSTER EN INGENIERÍA QUÍMICA**

***PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE  
ALMIDÓN CON FINES BIOMÉDICAS***

**DIANA MORÁN TUYA**

**TUTORES:**

**María Matos González**

**Gemma Gutiérrez Cervelló**

**Febrero 2021**

## RESUMEN

Las nanopartículas de almidón (NPAs) son una opción prometedora en el desarrollo estratégico de nuevos nanomateriales renovables y biodegradables para ser empleadas en nuevas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas cuando se cargan con antibióticos o agentes anticancerígenos como sistemas de administración de fármacos. Las propiedades finales de las NPAs están fuertemente influenciadas tanto por el método de síntesis empleado como por las condiciones de operación durante el proceso de producción. Un tamaño controlado y monodisperso es crucial para las distintas bioaplicaciones en las que se puedan utilizar.

El objetivo de este trabajo es sintetizar NPAs de tamaño controlado mediante el método de microemulsión ya que estudios recientes indican que es posible obtener NPAs con tamaños inferiores a 30 nm y elevada monodispersidad.

Se estudiaron diferentes formulaciones para la preparación de las microemulsiones (variando la proporción y composición de fase acuosa, de fase orgánica y las cantidades de estabilizante y coestabilizante) y agentes precipitantes con los que sintetizar las NPAs. La fase acuosa consiste en una disolución en la que se encuentra disuelto el polímero, en este caso el almidón, mientras que el agente precipitante consiste en una disolución en la que se encuentra disuelto un disolvente que hará que el polímero precipite en forma de nanopartículas. A continuación, las NPAs formadas fueron caracterizadas en términos de tamaño, morfología, monodispersidad y cristalinidad con el fin de determinar la formulación óptima de síntesis.

Finalmente, se determinó la cantidad de NPAs obtenidas, así como su viabilidad como vehículos de carga de un compuesto bioactivo con propiedades antimicrobianas, la vainillina, con la formulación óptima seleccionada.

## EXECUTIVE SUMMARY

Starch nanoparticles (SNPs) are a promising choice for the strategic development of new renewable and biodegradable nanomaterials for novel biomedical and pharmaceutical applications when loaded with antibiotics or with anticancer agents as target drug delivery systems. The final properties of the SNPs are strongly influenced by the synthesis method and conditions, being a controlled and monodispersed size crucial for the different applications in which they are used.

The aim of this work is to synthesize controlled size SNPs by the microemulsion method since it is known from previous studies that this method allows size controlled leading to sizes smaller than 30 nm.

Different formulations were studied for the preparation of the microemulsions (regarding organic and aqueous phases ratios and stabilizers and co-stabilizers concentrations), as well as the precipitating agents used to synthesize the SNPs. The aqueous phase consists of a solution in which the polymer is dissolved, in this case the starch, while the precipitating agent consists in a solution in which a solvent is dissolved, and it will cause the precipitation of the polymer in the form of nanoparticles. SNPs were characterized in terms of size, morphology, monodispersity and crystallinity in order to determine the optimal formulations.

Finally, the total amount of SNPs obtained was determined, as well as their viability as loading vehicles of a bioactive compound with antimicrobial properties, vanillin, with the optimal formulations selected.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>EXECUTIVE SUMMARY</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
1.1. INTRODUCCIÓN .....	9
1.2. OBJETIVOS.....	10
<b>2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS</b> .....	<b>11</b>
2.1. EL ALMIDÓN .....	12
2.2. NANOPARTÍCULAS DE ALMIDÓN.....	13
2.2.1. <i>Métodos de síntesis</i> .....	15
2.2.1.1. Nanoprecipitación .....	15
2.2.1.2. Emulsión / microemulsión .....	15
2.2.1.3. Emulsión cross-linking .....	17
2.2.1.4. Diálisis.....	18
2.2.1.5. Método de plantilla .....	18
2.2.1.6. Molienda de bolas .....	19
2.2.1.7. Ultrasonidos con y sin hidrólisis ácida .....	20
2.2.1.8. Atomización ultrasónica .....	22
2.2.2. <i>Aplicaciones</i> .....	22
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
3.1. MATERIALES .....	26
3.1.1. <i>Preparación de la fase acuosa</i> .....	26
3.1.2. <i>Disolución con agente de precipitación</i> .....	26
3.1.3. <i>Formulación de microemulsiones</i> .....	26
3.1.4. <i>Secado de NPAs</i> .....	27
3.1.5. <i>Encapsulación de compuestos bioactivos</i> .....	27
3.2. EQUIPOS .....	28
3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	30
3.3.1. <i>Preparación de microemulsiones</i> .....	30
3.3.1.1. <i>Preparación de la fase acuosa</i> .....	31

3.3.1.2. Formulación de microemulsiones.....	32
3.3.2. <i>Síntesis de NPAs</i> .....	32
3.3.3. <i>Caracterización de NPAs</i> .....	35
3.3.3.1. Dispersión de luz dinámica (DLS).....	35
3.3.3.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	36
3.3.3.3. Difracción de rayos X en polvo (XRPD).....	38
3.3.4. <i>Encapsulación de compuestos bioactivos</i> .....	39
3.3.5. <i>Caracterización de NPAs encapsuladas</i> .....	40
3.3.5.1. Espectrometría de resonancia magnética nuclear (NMR) .....	40
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
4.1. SÍNTESIS DE NPAs.....	43
4.1.1. <i>Distribución de tamaño de partícula, tamaño y morfología</i> .....	43
4.1.2. <i>Determinación de materia seca</i> .....	53
4.1.3. <i>Análisis de difracción de rayos X en polvo (XRPD)</i> .....	54
4.2. ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS .....	55
4.2.1. <i>Encapsulación de vainillina</i> .....	55
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
5.1. CONCLUSIONES .....	60
<b>6. PRESUPUESTO.....</b>	<b>62</b>
6.1. COSTES DIRECTOS.....	63
6.1.1. <i>Gastos de personal</i> .....	63
6.1.2. <i>Materiales</i> .....	64
6.1.2.1. Reactivos.....	64
6.1.2.2. Material de laboratorio.....	64
6.1.3. <i>Equipos</i> .....	65
6.1.4. <i>Otros gastos</i> .....	65
6.2. COSTES INDIRECTOS.....	66
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>APÉNDICES.....</b>	<b>76</b>
A. LISTA DE SÍMBOLOS .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura molecular de la amilosa y la amilopectina .....	12
Fig. 2. Organización cristalina de los gránulos de almidón de tipo A y tipo B .....	13
Fig. 3. Esquema explicativo de los procesos "de arriba hacia abajo" y "de abajo hacia arriba" para la obtención de NPAs.....	14
Fig. 4. Esquemmatización del proceso de nanoprecipitación .....	15
Fig. 5. Esquemmatización del proceso de emulsión.....	16
Fig. 6. Clasificación de los tipos de emulsiones según la disposición de las gotas.....	16
Fig. 7. Esquemmatización del proceso de emulsión cross-linking .....	17
Fig. 8. Esquemmatización del proceso de diálisis .....	18
Fig. 9. Esquemmatización del proceso de plantilla.....	19
Fig. 10. Esquemmatización del proceso de molienda de bolas .....	20
Fig. 11. Esquemmatización del proceso de ultrasonidos con hidrólisis ácida .....	21
Fig. 12. Esquemmatización del proceso de ultrasonidos.....	21
Fig. 13. Esquemmatización del proceso de atomización ultrasónica.....	22
Fig. 14. Estructura química de la urea.....	26
Fig. 15. Estructura química del CTAB .....	27
Fig. 16. Estructura química de la vainillina .....	28
Fig. 17. Esquema de la estructura de una microemulsión W/O.....	31
Fig. 18. Esquemmatización del proceso de síntesis de NPAs por el método de microemulsión..	33
Fig. 19. Diagrama ternario que representa la región de estabilidad de la microemulsión y los seis sistemas de emulsión que se estudian .....	34
Fig. 20. Equipo Malvern Zetasizer Nano ZS.....	35
Fig. 21. Representación esquemática de un SEM.....	37
Fig. 22. Microscopio electrónico de barrido .....	38
Fig. 23. Difractómetro de rayos X.....	39
Fig. 24. Espectrómetro de resonancia magnética nuclear .....	41
Fig. 25. Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M1 con: (a) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica NaOH 12% (p/v) y etanol 96% (b)	

	fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (c) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96%.....	44
Fig. 26.	Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M2 con: (a) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica NaOH 12% (p/v) y etanol 96% (b) fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (c) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96%.....	46
Fig. 27.	Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M3 con: (a) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica NaOH 12% (p/v) y etanol 96% (b) fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (c) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96%.....	47
Fig. 28.	Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M4 con: (a) fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (b) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96%.....	49
Fig. 29.	Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M5 con: (a) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica NaOH 12% (p/v) y etanol 96% (b) fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (c) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96%.....	50
Fig. 30.	Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M6 con: (a) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica NaOH 12% (p/v) y etanol 96% (b) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica etanol 96% (c) fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (d) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% .....	52
Fig. 31.	Espectro XRPD del almidón de maíz y comparación de lavados .....	54
Fig. 32.	Espectro <sup>1</sup> H NMR del almidón nativo.....	55
Fig. 33.	Espectro <sup>1</sup> H NMR de la vainillina.....	56
Fig. 34.	Espectro <sup>1</sup> H NMR de las NPAs con una concentración de vainillina del 0.01 % (p/v) ..	57
Fig. 35.	Espectro <sup>1</sup> H NMR de las NPAs con una concentración de vainillina del 0.1 % (p/v)....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Composición de los sistemas de microemulsión estudiados para la síntesis.....	34
Tabla II. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M1 mediante DLS e ImageJ .....	43
Tabla III. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M2 mediante DLS e ImageJ .....	45
Tabla IV. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M3 mediante DLS e ImageJ .....	47
Tabla V. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M4 mediante DLS e ImageJ .....	48
Tabla VI. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M5 mediante DLS e ImageJ .....	49
Tabla VII. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M6 mediante DLS e ImageJ .....	51
Tabla VIII. Costes referidos al personal .....	63
Tabla IX. Gastos referidos a los reactivos empleados durante la investigación .....	64
Tabla X. Gastos referidos a los materiales de laboratorio empleados durante la investigación ...	64
Tabla XI. Gastos referidos a los equipos utilizados durante la investigación .....	65
Tabla XII. Gastos de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo .....	66

# **1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



## 1.1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la investigación científica ha experimentado una gran expansión en cuanto al desarrollo de materiales innovadores y eficientes con aplicaciones nanotecnológicas, así como en la producción de nuevos productos sostenibles mediante el uso de materias primas renovables (Le Corre, Bras y Dufresne, 2011). En este aspecto, debido a las atractivas características que posee el almidón, tales como su biocompatibilidad, biodegradabilidad, bajo coste, renovabilidad y su no toxicidad, la aplicación a nivel industrial de este material en la nanoescala (NPAs) destaca en numerosas áreas como medicina, farmacia, alimentación y envasado (Haaj et al, 2016; Rostamabadi, Falsafi y Jafari, 2019; Thielemans, Belgacem y Dufresne, 2006).

A su vez, se ha demostrado que las NPAs poseen diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas en comparación con las partículas o gránulos del almidón nativo, como son, una mayor solubilidad, mayor superficie de reacción (Cui, 2019), mayor capacidad de absorción y mayor tasa de penetración biológica. Es por esto por lo que, las NPAs poseen un gran atractivo para ser empleadas como transportadoras de compuestos bioactivos (Qin et al, 2019).

La encapsulación consiste en un proceso en el que pequeñas gotas o partículas de compuestos de interés se rodean con un recubrimiento o se introducen en una matriz. El portador adsorbe las moléculas del fármaco mediante interacciones químicas débiles, como enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. El tamaño de estas moléculas va a ser el que influya en la selección del método de carga del fármaco (Salonen et al, 2005) y, a su vez, este va a afectar a las características de liberación del mismo.

Los nanomateriales utilizados como sistemas transportadores cargados con los compuestos bioactivos cuya matriz consiste en una base de almidón (por ejemplo, las ciclodextrinas, que se forman mediante la modificación enzimática del almidón (Slominska, Szostek y Grzeskowiak, 2002) son ampliamente utilizados para la encapsulación y liberación controlada de fármacos. No obstante, aún no existe suficiente investigación sobre las características de las NPAs para la administración de fármacos (Jain et al, 2008; Jain et al, 2011). Para una aplicación más amplia de NPAs como portadoras de fármacos, es necesario realizar una investigación sobre sus características de carga y liberación controlada empleando un fármaco modelo.



## 1.2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es la síntesis de NPAs de tamaño controlado mediante el método de microemulsión para su futuro uso en aplicaciones biomédicas.

Las diferentes etapas de las que consta este trabajo son las que se presentan a continuación:

- Revisión bibliográfica de las condiciones de síntesis y selección de la formulación apropiada para las microemulsiones y agentes precipitantes.
- Síntesis de las NPAs por el método de microemulsión.
- Caracterización de las NPAs en términos de tamaño, morfología, monodispersidad y cristalinidad.
- Selección de los parámetros óptimos de síntesis desde el punto de vista de la obtención de NPAs de pequeño tamaño y monodispersas.
- Determinación de la productividad del proceso de síntesis de NPAs.
- Viabilidad de las NPAs como vehículos transportadores de compuestos bioactivos.

## **2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS**

## 2.1. EL ALMIDÓN

El almidón es de uno de los polímeros más prometedores y que presenta numerosas aplicaciones en distintos campos, como la cosmética, la industria farmacéutica y la industria alimentaria, esto es debido a que se trata de un polímero natural, abundante en la naturaleza, cuya producción tiene un bajo coste y además es biodegradable y biocompatible con el medioambiente (El-Sheikh, 2017). Se trata del segundo material de biomasa que más abunda en la naturaleza después de la celulosa y consiste en una fuente primaria de almacenamiento de energía en forma de carbohidratos que se encuentran en las plantas (Sun, Fan y Xiong, 2014). Se presenta como un polvo blanco después de su extracción de las plantas y es insoluble en agua fría. Este polvo está constituido por gránulos microscópicos cuyo tamaño varía en función de su origen botánico, así como su forma, su contenido químico y su conversión (Le Corre y Dufresne, 2010).

Se trata de un polímero cuya estructura molecular se diferencia en dos moléculas de distinta naturaleza, la amilosa, que consiste en una molécula amorfa lineal y que a su vez puede estar ligeramente ramificada y la amilopectina que es una molécula cristalina y altamente ramificada. Ambas están formadas por unidades de glucosa que se unen entre ellas con diferentes enlaces. En la Fig. 1 se muestra la estructura de las moléculas previamente mencionadas.

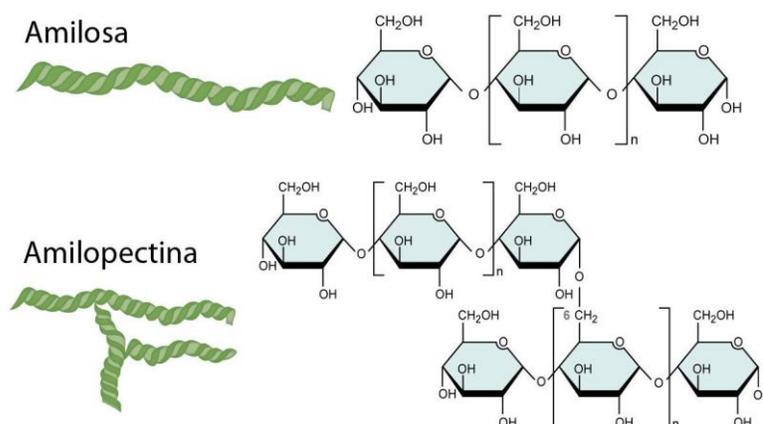


Fig. 1. Estructura molecular de la amilosa y la amilopectina

Por otro lado, si se habla de la estructura granular, los gránulos de almidón pueden presentar tres tipos de cristalinidad dependiendo de su patrón de difracción de rayos X, tipo A, tipo B y tipo C. La diferencia entre estos tres tipos de cristalinidad está basada en el empaquetamiento de las dobles hélices por las que están formadas los gránulos de almidón. La cristalinidad de tipo A consiste en una estructura estrechamente empaquetada con moléculas de

agua entre cada estructura de la doble hélice mientras que la cristalinidad de tipo B consiste en una estructura más abierta, es decir, menos empaquetada en la que las moléculas de agua se encuentran en una cavidad central formada por seis hélices dobles (Le Corre, Bras y Dufresne, 2010) como se puede ver en la Fig. 2.

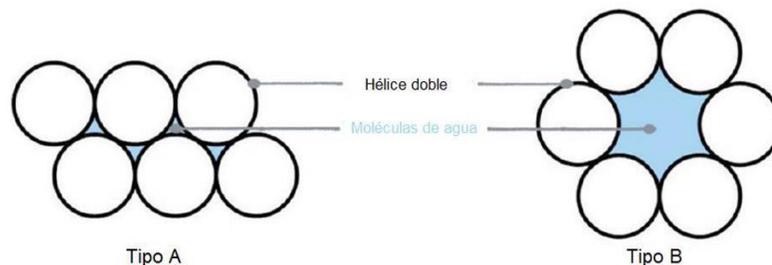


Fig. 2. Organización cristalina de los gránulos de almidón de tipo A y tipo B

En cuanto a la cristalinidad de tipo C, se considera una mezcla de los tipos A y B debido a que su patrón difracción de rayos X se presenta como una combinación de los anteriores, el de tipo A que se encuentra localizado en el entorno del gránulo y el de tipo B que se localiza en el centro de él (Le Corre, Bras y Dufresne, 2010).

Por último, existe también un patrón de cristalinidad de tipo V que resulta de complejos formados entre la amilosa y otras sustancias como ácidos grasos, alcoholes o emulsificantes (Putseys, Lamberts y Delcour, 2010).

## 2.2. NANOPARTÍCULAS DE ALMIDÓN

Las NPAs se obtienen a partir de la rotura de los gránulos de almidón mediante diferentes métodos de síntesis. Estos pueden clasificarse en procesos denominados *de arriba hacia abajo* (top-down) o *de abajo hacia arriba* (bottom-up) en función de cómo se encuentre el material de partida (Wang, 2004; Sant, 2012). Los procesos *de arriba hacia abajo* comprenden todos aquellos métodos de síntesis en los que las NPAs se obtienen a partir de un material de partida voluminoso o con un tamaño de partícula en el rango de micras que se divide o se disgrega en partículas de tamaño nanométrico. Por otro lado, el enfoque *de abajo hacia arriba* engloba aquellos procesos de síntesis en los que se forman núcleos primarios de pequeño tamaño a partir del ensamblaje de átomos o moléculas regulados por medios termodinámicos como el autoensamblaje (Kim, Park y Lim, 2015). En la Fig. 3. se muestra la comparación entre ambos procesos.



Fig. 3. Esquema explicativo de los procesos "de arriba hacia abajo" y "de abajo hacia arriba" para la obtención de NPAs

Los procesos *de arriba hacia abajo* también se pueden clasificar según el número de pasos necesarios para obtener las NPAs finales que implican procesos simples o híbridos como pueden ser la hidrólisis ácida o enzimática (Kim, Park y Lim, 2008; Putaux et al, 2003). La hidrólisis implica bajos rendimientos en largos periodos de tiempo y las NPAs obtenidas tienden a presentar regiones más cristalinas en los gránulos de almidón ya que resisten mejor la hidrólisis ácida que las regiones amorfas. Todo lo contrario, ocurre en los tratamientos físicos, como son la homogeneización a alta presión (Liu et al, 2009), la ultrasonificación (Haaj et al, 2013) o la extrusión (Song, Thio y Deng, 2011) en donde se obtienen mayores rendimientos en periodos más cortos de tiempo, sin embargo, es complicado el control de la destrucción de los cristales.

Respecto a los procesos *de abajo hacia arriba*, los procesos más comunes para la síntesis de las NPAs son los métodos de microemulsión (Chin, Azman, y Pang, 2014) y de nanoprecipitación (Chin, Pang, y Tay, 2011). Estos dos procesos ofrecen numerosas ventajas ya que se trata de técnicas químicas suaves en las que no se requiere de grandes cantidades de disolventes tóxicos ni de fuentes de energía externas además de poder conseguirse un control eficiente del tamaño, forma, monodispersidad y composición de las NPAs finales (Chin, Azman, y Pang, 2014; Chin, Pang, y Tay, 2011). Además, permiten la adición de los compuestos a encapsular, bien en la fase acuosa u orgánica usadas para llevar a cabo la síntesis por estas dos vías, lo que permite llevar a cabo la encapsulación de manera directa.

## 2.2.1. Métodos de síntesis

### 2.2.1.1. Nanoprecipitación

El proceso de nanoprecipitación supone la adición sucesiva de una disolución acuosa diluida en la que se encuentra el polímero a un disolvente que conduce a la precipitación del polímero en escala nanométrica. Este método está basado principalmente en la deposición o desplazamiento del polímero en la interfaz seguido por el desplazamiento del disolvente de la disolución lipofílica (Kim, Park y Lim, 2015). En la siguiente Fig. 4. se esquematiza el método de síntesis descrito.

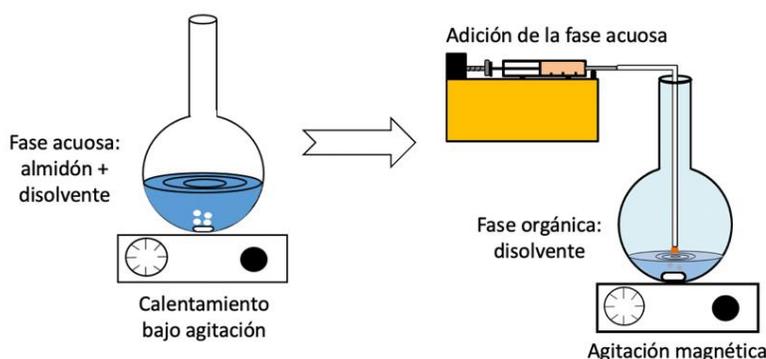


Fig. 4. Esquemización del proceso de nanoprecipitación

### 2.2.1.2. Emulsión / microemulsión

Este método consiste en la formación de una emulsión a partir de dos fases, una disolución acuosa que contenga el polímero disuelto y otra orgánica inmiscible en agua. A continuación, se emulsionan las fases con una agitación intensa, que puede llevarse a cabo con un homogeneizador mecánico, por microfluidización o mediante ultrasonidos. A su vez, ya que se puede presentar agregación del polímero, se emplea un tensioactivo cuya presencia estabiliza la emulsión. Este método se representa gráficamente en la Fig. 5. Las gotas que se forman debido a la agitación actúan como pequeños reactores que producen la precipitación controlada del almidón en forma de nanopartículas en su interior.

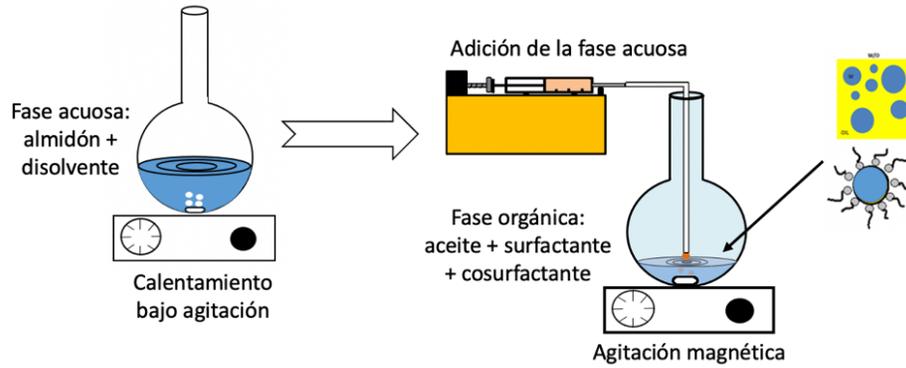


Fig. 5. Esquematización del proceso de emulsión

Las emulsiones pueden clasificarse, según la disposición de las gotas que las conforman, en emulsiones simples o emulsiones múltiples. Las emulsiones simples se pueden dividir en emulsiones de tipo agua en aceite (W/O), en donde pequeñas gotas de agua (fase dispersa) están dispersas en una fase aceitosa (fase continua o dispersante), o de tipo aceite en agua (O/W) en donde es el aceite el que está disperso en forma de gotas en una fase acuosa. Por otro lado, las emulsiones múltiples se clasifican en emulsiones de tipo agua en aceite en agua (W/O/W) en donde pequeñas gotas de agua se encuentran dispersas en gotas más grandes de aceite y que estas a su vez se encuentran dispersas en una fase acuosa, estas emulsiones se suelen llamar membranas líquidas ya que el aceite actúa como una membrana. Por otro lado, las del tipo aceite en agua en aceite (O/W/O) consisten en emulsiones en donde pequeñas gotas de aceite están dispersas en gotas mayores de agua y estas a su vez dispersas en una fase aceitosa. Todos los tipos de emulsiones mencionados se pueden ver representados en la Fig. 6 a continuación.

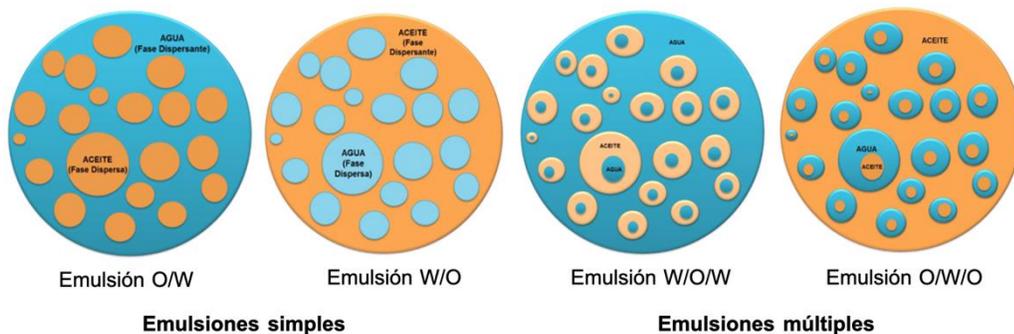


Fig. 6. Clasificación de los tipos de emulsiones según la disposición de las gotas

En ocasiones, también se pueden emplear microemulsiones en lugar de emulsiones para la síntesis de las NPAs, lo cual conduce a la formación de partículas más pequeñas y uniformes (Chin, Azman y Pang, 2014). Este tipo de emulsiones muestran algunas diferencias con respecto

a las macroemulsiones (llamadas tradicionalmente emulsiones), como por ejemplo que tienen un tamaño de gota inferior a  $0.1 \mu\text{m}$ , presentan un aspecto translúcido, son termodinámicamente estables y por tanto su formación es espontánea. Sin embargo, a pesar de que su composición general sea la misma que la de las emulsiones (agua, aceite y tensioactivo), las microemulsiones requieren de una cantidad de tensioactivo (o estabilizante) mucho mayor, debido a que se trata de sistemas termodinámicamente estables y por tanto su tensión interfacial debe ser cercana a cero, además su pequeño tamaño de gota provoca una elevada área interfacial, por tanto se requieren grandes cantidades de estabilizante (por encima incluso del 20% respecto a la cantidad total de compuestos), y es frecuente que se utilicen coestabilizantes para lograr obtener las tensiones interfaciales necesarias.

### 2.2.1.3. Emulsión cross-linking

En los últimos años, se ha investigado una nueva técnica para la obtención de NPAs a partir de una emulsión con reticulación (emulsión cross-linking). Esta técnica consiste en mezclar una fase acuosa que contiene agentes reticulantes con otra que contiene almidón disuelto, dicha mezcla se adiciona en una fase aceitosa u orgánica que contiene agentes emulsionantes como se observa en la Fig. 7. A partir de esta emulsión W/O se generan pequeñas partículas debido a la reacción de reticulación que tiene lugar en el interior de las gotas acuosas. No obstante, las partículas que se obtienen con este método de síntesis son de tamaño micrométrico (Fang et al, 2008; Frassen y Hennink, 1998). Por tanto, para reducir el tamaño de dichas partículas hasta escala nanométrica, la emulsión que se realice debe contener gotas de tamaño nanométrico, lo que se consigue realizando una miniemulsión (también denominadas nanoemulsión) en lugar de una emulsión (Shi et al, 2011).

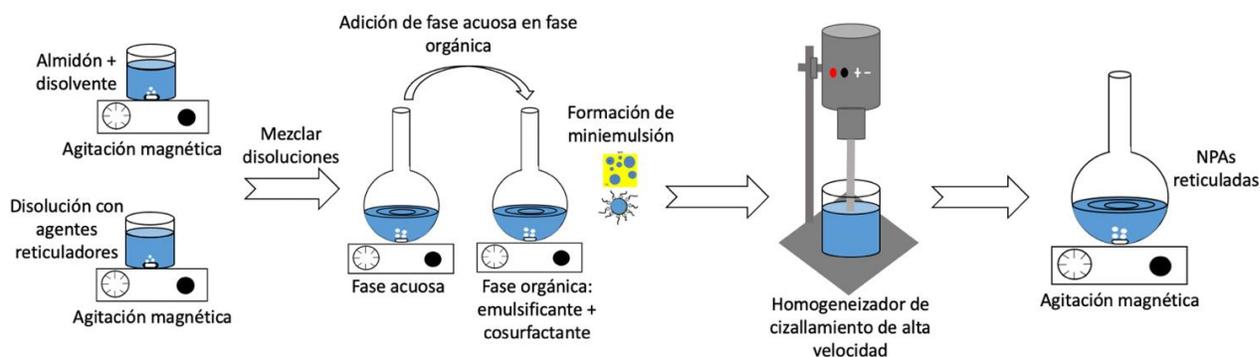


Fig. 7. Esquemización del proceso de emulsión cross-linking

#### 2.2.1.4. Diálisis

El método de diálisis consiste en disolver un biopolímero en un disolvente orgánico. A continuación, la disolución se introduce en una bolsa de diálisis y esta a su vez se sumerge en un líquido que es miscible con el disolvente orgánico, pero en el que el biopolímero es insoluble. Debido al desplazamiento progresivo entre el disolvente orgánico y el líquido exterior en el que el biopolímero no es soluble a través de la bolsa de diálisis se consigue alcanzar la sobresaturación de la disolución de biopolímero situada en el interior de la bolsa de diálisis y, por tanto, el biopolímero se irá agregando de manera gradual debido al cambio de polaridad que sufre el medio donde se encuentra (Chronopoulou et al, 2009; Rao y Geckeler, 2011). Este proceso está esquematizado a continuación en la Fig. 8.

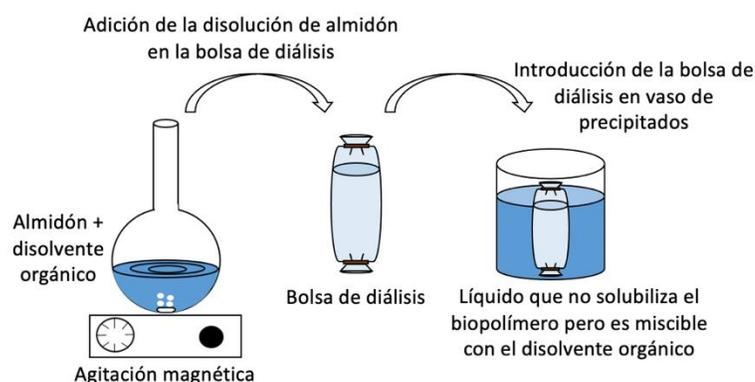


Fig. 8. Esquematización del proceso de diálisis

Poder controlar la tasa de agregación, así como modular el tamaño de las partículas son algunas de las ventajas de este método junto con su simplicidad y la versatilidad de la tecnología empleada (Namazi, Fathi, y Dadkhah, 2011).

#### 2.2.1.5. Método de plantilla

Este método se emplea en particular para la síntesis de partículas huecas o porosas. Estas NPAs se preparan creando un espacio vacío dentro de un precursor sólido a partir de diversas técnicas físicas y químicas, como pueden ser el método de plantilla, procesos con reactor de boquilla, la polimerización en emulsión y la separación de fases (Steichen, Moore y Peppas, 2013). De todas estas técnicas, el método de plantilla es el método más sencillo y utilizado (Hu et al, 2011; Qi et al, 2015). Este método normalmente consiste en recubrir la superficie exterior de un material que actuará como plantilla con un material polimérico, en este caso almidón, y posteriormente se eliminará el material utilizado como plantilla hasta obtener una partícula hueca

(Nakashima y Kimizuka, 2003; Sun, Liu, y Li, 2006; Yin et al, 2001) como se puede ver en la Fig. 9. Para ello será necesario adicionar una suspensión que contiene las partículas que actuarán como plantilla a una disolución en la que se encuentra el almidón gelificado, lo que favorecerá la precipitación del almidón y deposición del mismo sobre las partículas que actúan de plantilla. Finalmente será necesario provocar algún cambio en el medio, como cambio de pH o temperatura que provoque la disolución del material que actúo de plantilla produciendo así las NPAs de almidón huecas.

Las condiciones finales de las partículas huecas están limitadas por el tamaño y la forma que tenga la plantilla de partida, mientras que el grosor del material de recubrimiento está determinado por el proceso de recubrimiento de la plantilla.

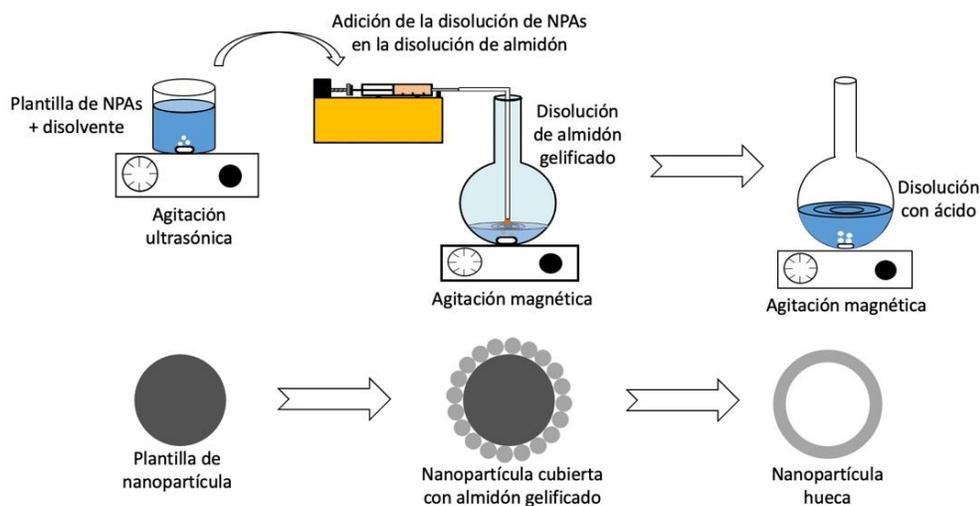


Fig. 9. Esquemización del proceso de plantilla

#### 2.2.1.6. Molienda de bolas

La molienda de bolas es una de las técnicas más fiables a la hora de sintetizar nanopartículas debido a que no requiere del uso de aditivos o de un paso final de secado para su obtención. En los últimos años, se ha desarrollado la molienda de bolas para la reducción de distintos materiales poliméricos a escala nanométrica entre los que destacan el almidón (Dai et al, 2018), la celulosa (Deng et al, 2016) y otros polímeros a base de proteínas (Ramadhan y Foster, 2018) para ser posteriormente utilizados en distintas aplicaciones. Esta técnica se puede llevar a cabo mediante el uso de disolventes, lo que se conoce como molienda húmeda o prescindiendo de estos, conociéndose esta como molienda en seco. El fresado se lleva a cabo debido a la fricción mecánica que existe entre el material molido y el medio de molienda, es decir,

las bolas de molienda, que pueden tratarse tanto de bolas del mismo tamaño o bolas con diferentes tamaños. El recipiente donde se lleva a cabo la molienda y las bolas de molienda acostumbran a estar hechos de un mismo material con una alta dureza como circonio, corindón o acero inoxidable. La energía mecánica necesaria para llevar a cabo el molido se proporciona mediante el movimiento rotatorio del recipiente, como es el caso de un molino de bolas planetario, lo que se muestra en la Fig. 10.

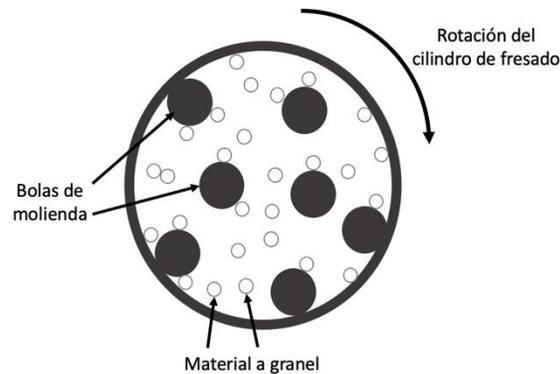


Fig. 10. Esquematación del proceso de molienda de bolas

La molienda húmeda también se puede considerar un proceso de química verde ya que, al no requerir de elevadas temperaturas, conlleva un ahorro considerable de energía y a su vez, los aditivos que requiere el proceso no serán necesarios en elevadas cantidades (Protesescu et al, 2018).

#### 2.2.1.7. Ultrasonidos con y sin hidrólisis ácida

Este método consiste, por un lado en un proceso de precipitación que implica la adición de una disolución en la que se encuentra diluido el almidón en una fase acuosa y por otro, en un proceso de ultrasonidos que reduce el tamaño de las partículas formadas debido a la rotura de los enlaces covalentes propios del almidón a causa de las fuerzas de corte o los efectos mecánicos producidos por el colapso de unas microburbujas que forman las ondas sonoras (Ahmad et al, 2019a; Silva et al, 2017; Chang et al, 2017). La esquematización del proceso se puede ver representada en la siguiente Fig. 11.

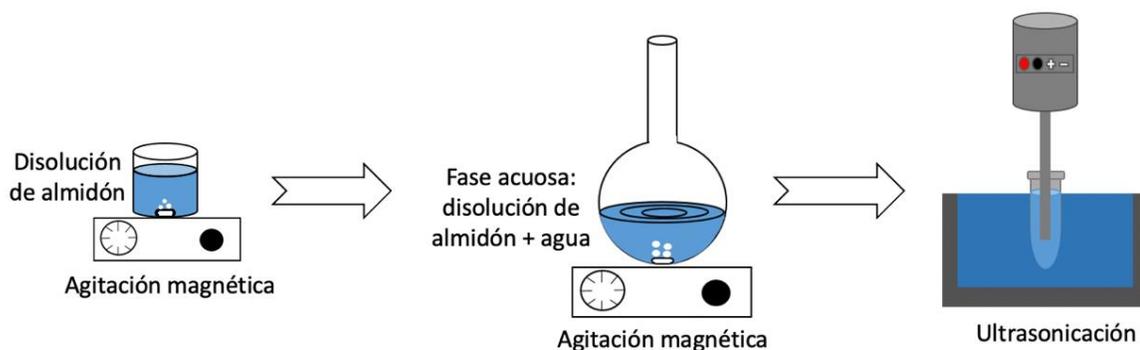


Fig. 12. Esquematzación del proceso de ultrasonidos

En el proceso de hidrólisis ácida se pueden diferenciar tres etapas en función de las velocidades de reacción implicadas; etapa rápida, etapa lenta y etapa muy lenta (Angellier et al, 2005). Por lo general, son necesarios una serie de pasos para la síntesis de NPAs mediante el proceso de hidrólisis ácida: (i) mezclar el almidón con el ácido, (ii) calentar la mezcla a temperatura y agitación constantes, (iii) neutralizar la disolución con sucesivos lavados con agua destilada mediante centrifugación y (iv) refrigerar la suspensión durante un periodo de tiempo determinado (Chena Aldao et al, 2018). Algunos de los inconvenientes de este proceso son que existe un bajo rendimiento de recuperación, así como una velocidad de reacción lenta y es muy probable que se produzca la agregación de las partículas (Ma et al, 2008). El proceso de ultrasonidos con hidrólisis ácida se muestra esquematizado en la Fig. 12.

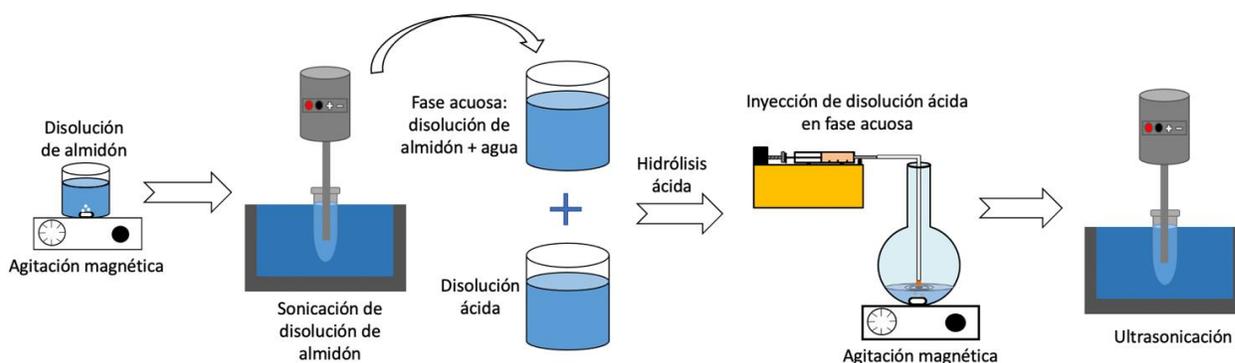


Fig. 11. Esquematzación del proceso de ultrasonidos con hidrólisis ácida

No obstante, la combinación de procesos físicos y químicos permite obtener NPAs con propiedades más deseadas (Manal, 2017). Este proceso es sencillo y muy conveniente en cuanto a seguridad y coste y, además, se puede obtener un mejor rendimiento con el tamaño de partícula final deseado.

### 2.2.1.8. Atomización ultrasónica

La atomización ultrasónica es una forma prometedora de generar microgotas de líquido mediante el uso de energía ultrasónica. En el mecanismo de formación de estas gotas se pueden proponer dos hipótesis distintas para explicar el proceso de desintegración que sufre la película líquida vibrante durante el proceso, que comprende ondas capilares y el mecanismo de cavitación (Barreras, Amaveda y Lozano, 2002). Las ondas capilares consisten en una estructura ordenada en forma de malla con un mismo número de crestas y valles por unidad de área (Ramisetty, Pandit y Gogate, 2013). En el modelo común de la atomización ultrasónica, las gotas se desprenden de las crestas de las ondas capilares estacionarias y, en el mecanismo de cavitación, se forman las burbujas de cavitación en la superficie que está vibrando debido a la aplicación de ondas ultrasónicas. Cuando estas cavidades colapsan, los choques hidráulicos que se generan promueven la segregación de la película líquida y, por consiguiente, que las gotas sean expulsadas (Avvaru et al, 2006). Una sencilla esquematización para la obtención de las NPAs mediante este proceso se presenta en la siguiente Fig. 13 en donde se forma una emulsión debido a la agitación de la mezcla constituida por una fase orgánica y una disolución donde se encuentra disuelto el polímero y que posteriormente es sometida al proceso de atomización.

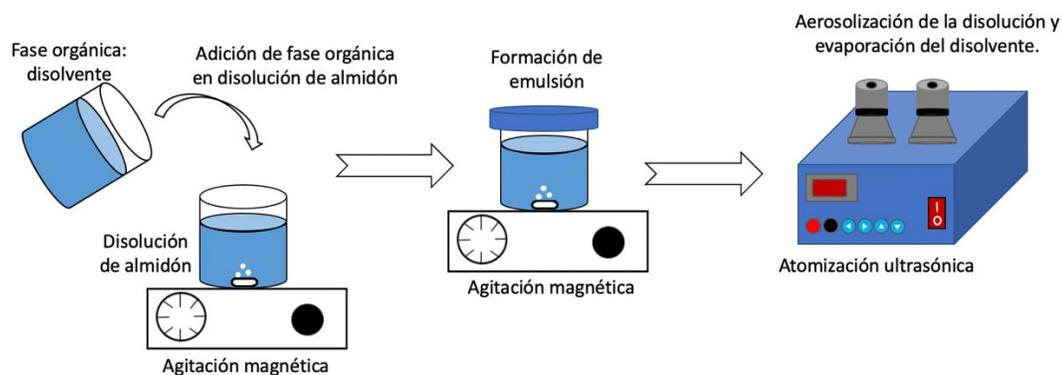


Fig. 13. Esquematización del proceso de atomización ultrasónica

### 2.2.2. Aplicaciones

En los últimos años las NPAs han atraído mucha atención debido a sus propiedades únicas y su amplio abanico de aplicaciones. Las NPAs han encontrado aplicaciones novedosas en numerosos sistemas alimentarios, pudiendo ser empleadas como materiales de refuerzo en nanocompuestos (Dufresne et al, 1996; Chen et al, 2008; Le Corre, Bras y Dufresne, 2010; Rajisha et al, 2014) o como estabilizantes de emulsiones (Binks y Whitby, 2004; Li et al, 2012; Midmore, 1998; Tzoumaki et al, 2011; Yusoff y Murray, 2011). En este campo, también tienen



aplicación como aditivos alimentarios (LeCorre, Bras y Dufresne, 2010) y aglutinantes del sabor de los alimentos (Tari et al, 2003).

A su vez, las NPAs también son ampliamente utilizadas como rellenos plásticos (Angellier et al, 2005; Kristo y Biliarderis, 2007), material de implantes (Thielemans, Belgacem y Dufresne, 2006), aglutinantes de recubrimiento (Bloembergen et al, 2008) o en el tratamiento de aguas residuales (Alila et al, 2011; Labet et al, 2007).

Entre las numerosas aplicaciones que tienen las NPAs, hay que destacar el uso de estos nanomateriales para fines biomédicos. Las NPAs son consideradas un buen vehículo para mejorar la liberación controlada de numerosos fármacos y estos a su vez tienen numerosas aplicaciones en diferentes campos como la medicina, la cosmética, la biotecnología o la industria alimentaria entre otros.

Una de las principales aplicaciones médicas en las que se pueden emplear las NPAs es en la terapia contra el cáncer. En estudios recientes, *Alp et al* (2019) demostraron las ventajas que ofrece la encapsulación de agentes antitumorales en nanopartículas poliméricas, desde mejorar la solubilidad del fármaco, proteger contra el metabolismo sistémico, aumentar el tiempo de exposición al fármaco, hasta reducir la toxicidad sistémica. Los autores realizaron pruebas con células de cáncer de mama MCF-7 para medir el efecto del fármaco CG-1521 encapsulado en ellas. Finalmente, los datos demostraron que la encapsulación del fármaco en las NPAs mejoró la eficacia terapéutica hacia las células MCF-7 y sugiere que esta tecnología de encapsulación puede ser útil para otros cánceres hormonodependientes. Por otro lado, *Xu et al* (2020) evaluaron la capacidad de absorción celular de las NPAs usando una línea celular de cáncer de pulmón humano A549 empleando curcumina como grupo de control. A su vez, se realizaron pruebas de citotoxicidad utilizando curcumina libre, que mostró una eficacia limitada contra las células cancerígenas. En comparación con la curcumina libre, las NPAs finalmente mostraron un efecto inhibitorio sobre las células cancerígenas y los resultados indicaron que estas partículas, como material portador de fármacos, no eran citotóxicas en las concentraciones requeridas y podrían ser un sistema prometedor de administración de fármacos para el cáncer de pulmón, actuando como un vehículo eficaz para apuntar y administrar medicamentos de forma localizada en los puntos de interés.

En una aplicación médica más generalizada, algunos autores también realizaron pruebas para determinar el funcionamiento de las NPAs cargadas de antibióticos y verificar su funcionalidad. *El-Naggar et al* (2015) realizaron un estudio de patología histológica en piel de rata



para confirmar si la formulación se toleraba sin síntomas de irritación cutánea. Se compararon los resultados cuando se recubrió la piel de ratas con el gel que tenía el antibiótico cargado en NPAs reticuladas con los resultados cuando no se recubrió la piel de las ratas. Finalmente, el estudio reveló que las NPAs cargadas con antibióticos no mostraban ningún efecto nocivo sobre la piel de las ratas y que por tanto podrían considerarse como un buen vehículo para la liberación controlada de fármacos.

Por otro lado, *Liu et al* (2016) investigaron la liberación in vitro de NPAs cargadas con polifenoles en jugos gástricos artificiales e intestinales. Este estudio mostró perfiles de liberación sostenida de polifenoles a partir de NPAs y sugirió que estas pueden ser un nanoportador prometedor y eficaz para proteger compuestos bioactivos sensibles y controlar su liberación.

De los estudios comentados puede concluirse que el uso de NPAs de almidón es una herramienta segura y eficaz para la vehiculización y liberación controlada de biocompuestos tanto de interés alimentario como clínico.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

En esta sección, se describen los materiales, reactivos y los equipos empleados para el desarrollo de la metodología experimental que se describirá en los siguientes apartados, y que fueron empleados para la síntesis y caracterización de las NPAs, así como para la evaluación de estas como portadoras de compuestos bioactivos.

### 3.1. MATERIALES

#### 3.1.1. Preparación de la fase acuosa

- Almidón de maíz, suministrado por la Universidad de Lund (Suecia). Se trata de un polvo de color blanco insoluble en agua a temperatura ambiente.
- Hidróxido de sodio, suministrado por Panreac. Se presenta como un sólido cristalino de color blanco y soluble en agua. Se trata a temperatura ambiente ya que es un reactivo muy exotérmico.
- Urea o diaminometanona, suministrado por Serva Electrophoresis GmbH. Se trata de un polvo cristalino de color blanco y debido a su momento dipolar es soluble en agua y en alcohol. Su fórmula molecular es  $\text{CON}_2\text{H}_4$  y su estructura química se ve en la Fig. 14.

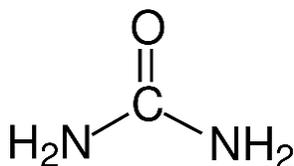


Fig. 14. Estructura química de la urea

- Agua milli-Q, suministrada por la Universidad de Oviedo. Consiste en un agua ultrapura obtenida a través de una serie de procesos de filtración y desionización. Se emplea para preparar las disoluciones que se van a utilizar en la síntesis y para el posterior lavado de las NPAs.

#### 3.1.2. Disolución con agente de precipitación

- Hidróxido de sodio, suministrado por Panreac. Se utiliza como reactivo para conformar una disolución que se emplea como agente precipitante para la síntesis.
- Etanol 96%, suministrado por Montplet. Se emplea como agente precipitante para la síntesis y también como reactivo para los lavados de las NPAs.

#### 3.1.3. Formulación de microemulsiones

- 1-Butanol, suministrado por Sigma Aldrich. Se trata de un alcohol de color transparente que se emplea como coestabilizante en la microemulsión.
- 1-Hexanol, suministrado por Alfa Aesar. Es un alcohol de color transparente que actúa como fase orgánica en la microemulsión ya que posee una cadena mayor que la del 1-butanol.
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), suministrado por Sigma-Aldrich. Es una sal de amonio cuaternario, uno de cuyos grupos alquilo es de gran longitud, con actividad detergente. Se trata de un tensioactivo catiónico, es decir un tensioactivo iónico en el que la parte hidrófila se carga positivamente. Se presenta como un polvo blanco, su fórmula química es  $C_{19}H_{42}BrN$ , su valor HLB es de 10 y su estructura química está representada en la Fig. 15.

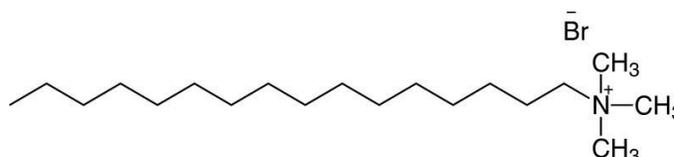


Fig. 15. Estructura química del CTAB

#### 3.1.4. Secado de NPAs

- Etanol absoluto, suministrado por Montplet. Consiste en un alcohol que se presenta como un líquido de color transparente y es empleado en el secado de las NPAs posterior a su lavado.

#### 3.1.5. Encapsulación de compuestos bioactivos

- Vainillina, suministrada por Sigma Aldrich. Se trata de un compuesto orgánico que se presenta en forma de polvo de color blanco soluble en cloroformo y éter. Es una esencia saborizante que se puede obtener de la vaina natural de la vainilla o se puede sintetizar a partir de sustancias como la lignina o el eugenol, siendo la forma sintética una forma de obtenerla mucho más económica que la otra. Su fórmula química es  $C_8H_8O_3$  y su estructura química se muestra en la Fig. 16.

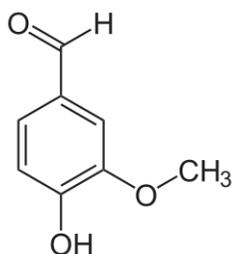


Fig. 16. Estructura química de la vainillina

### 3.2. EQUIPOS

- Baño termostático P. Selecta Unitronic 320 DR (Grupo Selecta)
  - Dimensiones: 77x34.5x46 cm
  - Dimensiones depósito: 35x24x16 cm
  - Peso: 25 kg
  - Requerimiento de energía: 220 V, 50 Hz
  - Capacidad: 27 L
  - Intervalo de temperatura: 0 - 100°C
- Balanza Sartorius Research R200D (Sartorius)
  - Dimensiones: 21.8x36x32 cm
  - Peso: 8 kg
  - Diámetro de placa: 11 cm
  - Intervalo de temperatura permitido: 10 - 30°C
  - Tiempo de respuesta: 2 s
  - Capacidad: 200 g
- Agitador magnético RCT Basic (IKA)
  - Puestos de agitación: 1
  - Dimensiones: 16x8.5x27 cm
  - Peso: 2.5 kg
  - Diámetro de placa: 13.5 cm
  - Intervalo de temperatura: 0 - 310°C
  - Intervalo de velocidad: 50 - 1500 rpm
  - Potencia del motor: 9 W



- Consumo de energía: 650 W
- Volumen máximo de agitación: 20 L
- Agitador magnético sumergible LABOMAG 1x1 (SHP Sterile Technology)
  - Puntos de agitación: 1
  - Dimensiones: 15.5x3.8x15.7 cm
  - Peso: 1.5 kg
  - Potencia de agitación: 5 W
  - Rango de velocidad: 100 - 1350 rpm
  - Volumen máximo de agitación: 1 L
- Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)
  - Dimensiones: 32x60x26 cm
  - Peso: 21 kg
  - Rango de medición: 0.3 nm -10  $\mu\text{m}$
  - Rango de temperatura: 10 - 35°C
  - Volumen mínimo de muestra: 12  $\mu\text{L}$
  - Principio de medición: Dispersión de luz dinámica (para tamaño de partícula)
  - Sensibilidad: 0.1 mg/mL
  - Precisión: Mejor que  $\pm 2\%$
- Centrífuga Kubota High Speed Refrigerated 6500 (Kubota Corporation)
  - Dimensiones: 50x74x94 cm
  - Peso: 201 kg
  - Máxima capacidad: 3 L
  - Máxima velocidad: 22000 rpm
  - Requerimiento de energía: 220 - 230 V, 30 A, 50 - 60 Hz
  - Ajuste de temperatura: -20 a 40°C
- Microcentrífuga Thermo Scientific Espresso
  - Dimensiones: 15x25x20 cm
  - Peso: 4.2 kg
  - Máxima capacidad: 12 x 2 ml



- Máxima velocidad: 14600 rpm
- Requerimiento de energía: 120 – 230 V, 50 – 60 Hz
- Estufa Selecta Modelo 210 (Grupo Selecta)
  - Rango de temperatura: 0 - 200°C
  - Potencia: 1300 W
  - Voltaje: 220 V
- Agitador oscilatorio IKA MS3 digital
  - Tipo de movimiento: circular
  - Dimensiones: 14.8x6.3x20.5 cm
  - Peso: 2.9 kg
  - Potencia del motor: 8W
  - Rango de velocidad: 0 – 3000 rpm

También se utilizaron celdas de cuarzo para espectrofotómetro, tubos Eppendorf de 1.5 ml, pipetas Pasteur de plástico, tubos Falcon de 15 ml y 50 ml, matraces aforados de 100 ml, vasos de precipitados de 50 ml, frascos de tapón azul de 50 ml para la preparación de la fase acuosa y tubos de vidrio para síntesis y secado.

### **3.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de artículos científicos publicados en revistas de alta calidad que están recogidos en bases de datos como ScienceDirect o Scopus. Los artículos consultados han sido publicados en los últimos años con el fin de mostrar una visión actualizada de los avances conseguidos en este campo.

La obtención de las NPAs se puede dividir en dos partes: (i) preparación de los sistemas de microemulsión y (ii) síntesis de las NPAs a partir de la adición de una disolución etanólica.

#### **3.3.1. Preparación de microemulsiones**

Las microemulsiones que se realizan en este trabajo son de tipo W/O en donde, como se menciona previamente en el apartado 2.2.1.2., pequeñas gotas de agua se dispersan en una fase aceitosa. Básicamente, para conseguir una microemulsión W/O, se prepara una disolución en donde se encuentran un disolvente orgánico (que actuará como aceite) y un alcohol (que actuará como coestabilizante) en presencia de moléculas de tensioactivo. Estas moléculas se van a

organizar en micelas inversas, es decir, las cabezas hidrófilas que son solubles en agua van a apuntar hacia el interior de las gotas mientras que las colas que son hidrofóbicas apuntan hacia el exterior donde se encuentra el disolvente orgánico (Fig. 17).

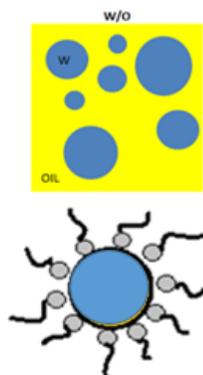


Fig. 17. Esquema de la estructura de una microemulsión W/O

Posteriormente, se pone en contacto esta fase orgánica con la fase acuosa que consiste en una disolución acuosa en la que se encuentra el biopolímero y este se difunde rápidamente en la regiones hidrófilas de las micelas tensioactivas, dando lugar a la formación de regiones hidrófilas nanométricas ricas en biopolímero con diámetros generalmente inferiores a 100 nm. Estas pequeñas regiones de agua servirán más adelante como plantillas para la obtención de las nanopartículas de biopolímero, pudiendo denominarse nanoreactores (Asgari et al, 2019). A continuación, se describen detalladamente todos los pasos seguidos para la obtención de estas microemulsiones.

#### 3.3.1.1. Preparación de la fase acuosa

El primer paso es preparar la fase acuosa que consiste en una disolución al 1% (p/v) de almidón de maíz, en donde se disuelve el almidón en un sistema disolvente. Se estudian distintas formulaciones para determinar con cual de ellas se obtienen mejores resultados. Las disoluciones en las que es disuelto el almidón son las siguientes:

- Agua milli-Q
- NaOH 8% (p/v)
- NaOH 8% (p/v) + urea 10% (p/v)

Estudios recientes demostraron que las interacciones entre la sosa y la urea juegan un papel importante en la mejora de la solubilidad de los polímeros, ya que la sosa rompe los enlaces de hidrógeno que presenta el almidón y la urea evita que las moléculas del almidón se asocien entre ellas (Chin, Pang y Tay, 2011).



Se preparan las disoluciones de sosa y la mezcla de sosa y urea en matraces de 100 ml y posteriormente se mezclan 0.2 g de almidón con 20 ml del sistema disolvente que se va a estudiar. Esta disolución se mantiene bajo agitación magnética constante a 1000 rpm y 80°C durante media hora hasta conseguir que el almidón este completamente disuelto obteniéndose una disolución totalmente homogénea. Estos parámetros se escogieron basándonos en trabajos previos realizados por el grupo de investigación (Gutiérrez et al, 2020).

### 3.3.1.2. *Formulación de microemulsiones*

Para formular estas microemulsiones se prepara una disolución orgánica que consiste en una mezcla de CTAB (tensoactivo), 1-butanol (coestabilizante) y 1-hexanol que actúa como fase orgánica manteniendo siempre un ratio másico de 3:2 entre el tensoactivo y el coestabilizante. El butanol se distribuye principalmente entre la capa interfacial y la fase orgánica actuando como coestabilizante en la capa interfacial y como codisolvente en la fase orgánica (Wang et al, 2016).

Se estudian seis formulaciones distintas variando las relaciones fase acuosa, fase orgánica, y estabilizantes (estas formulaciones, así como sus composiciones se presentan más adelante en la tabla I) para la obtención de las microemulsiones. En primer lugar, se adicionan por pesada el tensoactivo y el coestabilizante, los cuales se añaden a la fase orgánica. Posteriormente, dicha mezcla se mantiene bajo agitación elevada durante varios minutos hasta obtener una disolución homogénea.

Una vez esta disolución orgánica está totalmente homogénea se añade la fase acuosa preparada anteriormente, y se agita nuevamente la mezcla para obtener una microemulsión. Debido a que las gotas que se forman son muy pequeñas (valores inferiores a 1 micra), estas dejan pasar la luz a través de ellas y, por tanto, al comenzar la agitación la disolución se vuelve totalmente translúcida indicando la formación de la microemulsión.

### 3.3.2. **Síntesis de NPAs**

La síntesis de las NPAs se consigue al añadir un disolvente orgánico a la microemulsión preparada en el paso previo que hace que el almidón contenido en las pequeñas gotas de agua de la microemulsión W/O precipite en forma de nanopartículas dentro de estas. En este caso, se estudian dos disoluciones etanólicas que actúan como agente precipitante para determinar si la presencia o ausencia de sosa influye en el resultado final de las NPAs:

- NaOH 12% (p/v) + etanol 96%

- Etanol 96%

Se prepara la disolución de sosa y etanol en un matraz de 100 ml y se deja agitar durante aproximadamente 24 horas con elevada agitación y a temperatura ambiente ya que, a pesar de que la sosa es soluble en etanol, exhibe menor solubilidad en este disolvente que en agua y por tanto se requiere de mayor tiempo de agitación hasta obtener una disolución completamente homogénea.

La disolución etanólica se adiciona gota a gota a 20 mL de microemulsión, manteniendo en todo momento la mezcla bajo elevada agitación. La formación de las NPAs se aprecia visualmente ya que, a medida que se van adicionando las gotas, aparecen pequeños agregados de color blanco en la disolución. En el momento en que dichos agregados aparecen se detiene la adición de las gotas ya que las NPAs se han formado. Este proceso se presenta esquematizado en la Fig. 18 en donde se observa la aparición de las NPAs en el interior de las gotas formadas.

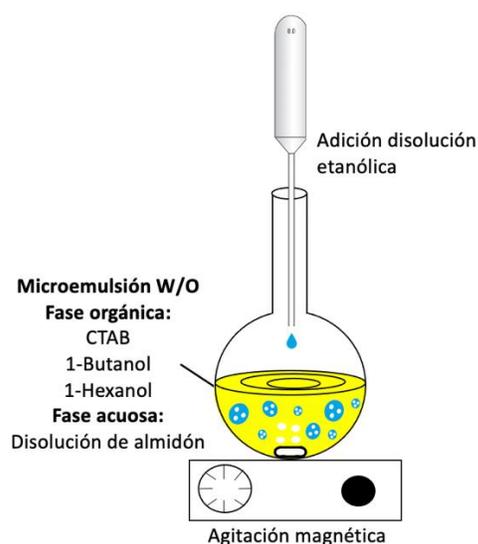


Fig. 18. Esquematización del proceso de síntesis de NPAs por el método de microemulsión

Como se mencionó previamente se estudiaron sistemas de microemulsión de distintas formulaciones. Para determinar cuál es la composición adecuada con la que se puedan obtener las NPAs, se determina una región de estabilidad de microemulsión a partir del método de valoración en un diagrama ternario. Este estudio fue llevado a cabo en estudios previos (Salvador et al, 2021) y en la siguiente Fig. 19 se presentan los 6 sistemas de microemulsión que determinaron dentro de la región de estabilidad (M1, M2, M3, M4, M5 y M6) y que son los que se van a emplear a su vez en este trabajo. Así mismo, en la tabla I se presentan las cantidades a añadir de cada reactivo que conforma la microemulsión, así como las cantidades de fase acuosa.

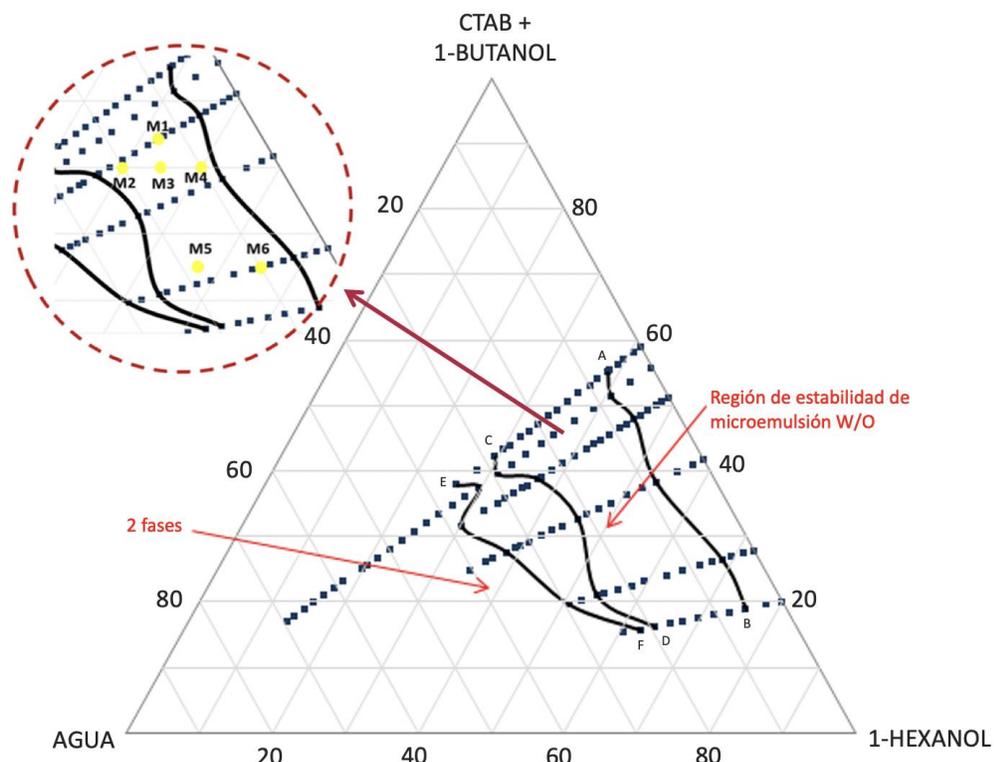


Fig. 19. Diagrama ternario que representa la región de estabilidad de la microemulsión y los seis sistemas de emulsión que se estudian

Tabla I. Composición de los sistemas de microemulsión estudiados para la síntesis

Sistema de microemulsión	Composición microemulsión (g)			
	CTAB	1-butanol	1-hexanol	Fase acuosa
M1	5	4	9	3
M2			8	4
M3	5	3	9	3
M4			10	2
M5	3	2	11	4
M6			13	2

Una vez obtenidas las partículas y previo a su caracterización, las muestras deben de ser lavadas correctamente para eliminar excesos de estabilizantes o disolventes. Para ello las muestras se lavan 6 veces alternando lavados con agua milli-q y etanol 96%. Estos lavados se

realizan mediante centrifugación durante 10 minutos a 10000 rpm y temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante y obteniendo las partículas en forma de pellet entre cada lavado.

El método de secado que se emplea previo a la caracterización de las muestras en SEM es el secado en estufa. Una pequeña cantidad de cada muestra se introduce en pequeños tubos de cristal de fondo plano y se deja secando durante 24 h a 80°C.

### 3.3.3. Caracterización de NPAs

Las NPAs formuladas se caracterizan en términos de tamaño, morfología, monodispersidad y cristalinidad. Se emplea la técnica de dispersión de luz dinámica para determinar el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (Pdl) u homogeneidad. Por otro lado, mediante microscopía electrónica de barrido se puede observar la forma final de las partículas, así como medir su tamaño. Finalmente, se determinan las fases cristalinas presentes en las NPAs a partir de difracción de rayos X.

#### 3.3.3.1. Dispersión de luz dinámica (DLS)

Se emplea el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Fig. 20) con el que se puede obtener una idea aproximada del tamaño y la homogeneidad de las partículas mediante dispersión de luz dinámica (DLS, Dynamic Light Scattering). Para utilizar este equipo, es necesario que las partículas se encuentren disueltas o suspendidas en un líquido.



Fig. 20. Equipo Malvern Zetasizer Nano ZS



Esta técnica está basada en el efecto Doppler. El principio en el que está fundamentada la determinación del tamaño de partícula mediante DLS consiste en que, cuando la luz láser incide en el medio en donde las partículas se encuentran disueltas y en movimiento, la frecuencia de la luz que se dispersa debido a estas se desplaza ligeramente en función de la velocidad que tengan, lo que a su vez va a depender también de su tamaño.

La intensidad de la luz que se dispersa es proporcional al tamaño de las partículas, es decir, las partículas grandes van a dispersar mucha más luz que las que son más pequeñas. Por otro lado, a la hora de determinar el tamaño promedio de partículas, las que tengan un mayor tamaño van a estar sobrerrepresentadas respecto a las de menor tamaño, esto quiere decir que la señal de las partículas pequeñas en las medidas puede verse enmascarada por la señal de las partículas grandes ([http://www.fata.unam.mx/servicios/dispersion\\_luz/info](http://www.fata.unam.mx/servicios/dispersion_luz/info)).

Por último, es importante destacar que cuando se analiza una muestra, lo que mide el equipo no es constante con el tiempo debido a que las partículas van a ir sedimentando, sobre todo, las de mayor tamaño. La velocidad con la que sedimenten va a depender de su tamaño, por tanto, primero comienzan sedimentando las más grandes, luego las medianas y por último las partículas más pequeñas. En consecuencia, las medidas que se obtienen con el equipo no son iguales ya que van a ir cambiando debido al movimiento browniano de las partículas producido por el choque de estas contra las moléculas del líquido en el que se encuentran disueltas. Para evitar esto, es conveniente no esperar largos periodos de tiempo para realizar las medidas una vez que la muestra está preparada.

Las muestras se midieron con el detector de retrodispersión de 173° introduciendo una alícuota de cada muestra a analizar en cubetas desechables de bajo volumen (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Reino Unido). A su vez, se selecciona el medio dispersante en el que se encuentran las partículas que en este caso se trata de agua.

### 3.3.3.2. *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

La microscopía de barrido se emplea también para la caracterización de las NPAs mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope). Este microscopio utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para obtener las imágenes. Para conseguirlo, el equipo posee un filamento que genera un haz de electrones que ilumina la muestra y mediante distintos detectores se recogen posteriormente los electrones que se han generado al interaccionar con la superficie de la muestra consiguiendo obtener una imagen que revela las características superficiales de esta. A su vez también se puede obtener información acerca de

la forma, la textura y la composición química de los constituyentes de la muestra que se está analizando (<http://www.scai.uma.es/areas/micr/sem/sem>).

El SEM se constituye por una cámara en cuya base se coloca la muestra que se quiere analizar, con la superficie de observación dispuesta hacia arriba. Un cañón electrónico que está colocado en una columna que se sitúa sobre la cámara, genera un haz continuo de electrones que están acelerados por un campo eléctrico. Este haz de electrones recorre todo el eje de la columna hasta que impacta con la superficie de la muestra pasando previamente a través de una lente electromagnética (lente condensadora) que lo focaliza consiguiendo que su diámetro se reduzca a escala micrométrica a la altura de un diafragma que lo filtra. Finalmente, el haz pasa a través de otra lente electromagnética (lente objetivo) que lo vuelve a focalizar consiguiendo esta que su diámetro se reduzca hasta escala nanométrica (Quintana García, 2011).

Unas bobinas electromagnéticas que se encuentran colocadas sobre la lente objetivo le proporcionan al haz de electrones un movimiento continuo de barrido sobre la superficie de la muestra contra la que está impactando, lo que lo hace recorrer sobre esta superficie una pequeña área semejante al área de la pantalla del monitor de la que dispone el microscopio. La relación de semejanza entre estas áreas son los aumentos a los que se observa en el monitor la imagen del área que se está barriendo. Por lo que, si se pretende observar una zona a mayores aumentos, se tendrá que barrer un área más pequeña sobre la superficie de la muestra, consiguiendo esto a partir de un menor ángulo de barrido con el que actúa el haz (Quintana García, 2011). En la siguiente Fig. 21 se muestra la esquematización de un microscopio SEM.

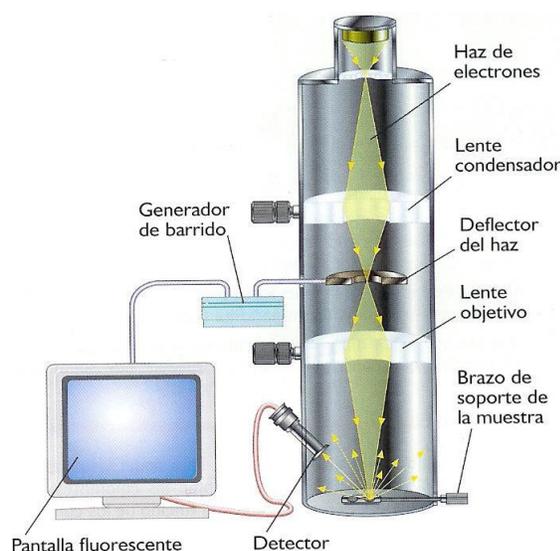


Fig. 21. Representación esquemática de un SEM

La forma y el tamaño final de las NPAs obtenidas se analizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo LV JEOL JSM-6610 (Fig. 22) a un voltaje de aceleración de 20 kV.



Fig. 22. Microscopio electrónico de barrido

Las muestras deshidratadas se fracturan con una espátula y los fragmentos se rocían sobre una cinta adhesiva de doble cara situada sobre unos portamuestras de cobre. Posteriormente se recubren con una película delgada de oro en un recubridor por pulverización catódica Balzers SCD 004 (Bal-Tec AG, Liechtenstein) antes del análisis, lo que consigue que se evite la acumulación de carga eléctrica bajo el haz de electrones. El tamaño de partícula promedio de las NPAs se determina a partir de mediciones aleatorias en las imágenes obtenidas utilizando el software ImageJ.

#### 3.3.3.3. Difracción de rayos X en polvo (XRPD)

La difracción de rayos X en polvo también es empleada para determinar la estructura cristalina de las NPAs formadas, así como de los gránulos de almidón. En este caso, los rayos X se producen por medio de alto voltaje, debido a la aceleración de los electrones desde un cátodo hacia un objetivo metálico, que se trata del ánodo. Los electrones acelerados van a chocar con los átomos del metal lo que remueve los electrones que se encuentran en los niveles internos provocando que los lugares que dejan vacíos sean ocupados por electrones de niveles superiores y el hueco que dejen estos a su vez por electrones de niveles aún más superiores, lo que consigue que se emitan fotones de rayos X. Estos rayos X generados se emplean para bombardear muestras cristalinas y poder obtener su patrón de difracción de rayos X.

En las muestras cristalinas, los átomos están agrupados de manera ordenada y periódica, por lo que, cuando reciben la radiación, se dispersan en todas direcciones produciendo fenómenos de interferencia, tanto constructiva como destructiva. Por lo general, las dispersiones son destructivas y se cancelan entre si, pero en ocasiones puede ocurrir que las ondas que se dispersan se encuentren en fase y se refuercen entre si, dando lugar al fenómeno de difracción. Por otro lado, es poco probable que la interferencia sea de tipo constructivo, lo que se debe al hecho de que los átomos de los cristales se encuentran ordenados de manera repetitiva y regular ([http://www.linan-ipicyt.mx/XRD\\_Bruker\\_D8\\_Advance.html](http://www.linan-ipicyt.mx/XRD_Bruker_D8_Advance.html)).

Los datos de difracción de rayos X en polvo para las muestras se recogieron a temperatura ambiente, usando radiación  $\text{CuK}_{\alpha 1,2}$  ( $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$  y  $1.54439 \text{ \AA}$ ) en una configuración de reflexión Bragg-Brentano, en un difractor Philips Panalytical X'Pert Pro (Fig. 23) en un rango de  $2\theta$  de  $5-27^\circ$ , con un tamaño de paso de  $0.08356$ .



Fig. 23. Difractor de rayos X

### 3.3.4. Encapsulación de compuestos bioactivos

La encapsulación consiste en una tecnología mediante la cual diferentes compuestos bioactivos se confinan en el interior de una matriz polimérica. A partir de este proceso se consigue crear un microambiente dentro del sistema que permite controlar las interacciones que ocurren entre el interior y el exterior de este (Borgagna et al, 2010).



Se pueden diferenciar dos tipos de encapsulación en función de cómo se realice el método de síntesis de las NPAs: encapsulación directa y encapsulación indirecta. Cuando se habla de encapsulación directa se refiere a que tanto la síntesis de las NPAs como la encapsulación del compuesto bioactivo se realizan de manera simultánea. Sin embargo, en el caso de la encapsulación indirecta primero se realiza la síntesis de las NPAs y una vez obtenidas se agrega el compuesto bioactivo.

En este trabajo el método de encapsulación seleccionado fue el indirecto. Para ello, se prepararon dos disoluciones acuosas al 0.01% (p/v) y 0.1% (p/v) del compuesto bioactivo que se quiere encapsular, en este caso vainillina, con el fin de determinar la influencia de la concentración de biocompuesto. Se disolvieron 2 mg y 20 mg de vainillina en 20 ml de agua milli-q y se dejaron agitando unos minutos hasta que la vainillina estuvo completamente disuelta. Posteriormente, se pusieron en contacto 7.5 mg de NPAs, que previamente fueron secadas, con 1.5 ml de las disoluciones de vainillina y se incubaron en un agitador oscilatorio durante 12 h a 1000 rpm. Una vez transcurrido el tiempo de agitación, las NPAs se lavaron nuevamente con etanol absoluto para eliminar restos de vainillina no encapsulada y se secaron durante dos días para su posterior caracterización.

### **3.3.5. Caracterización de NPAs encapsuladas**

#### *3.3.5.1. Espectrometría de resonancia magnética nuclear (NMR)*

La espectrometría de resonancia magnética nuclear, conocida de manera más común como espectrometría NMR, es empleada para determinar la cantidad de compuesto bioactivo encapsulado dentro de las NPAs. Se trata de una técnica cuyo análisis del espectro NMR unidimensional permite obtener información acerca del número y el tipo de entidades químicas presentes en una molécula.

Los núcleos activos de NMR absorben a una frecuencia característica que posee el isótopo cuando son situados dentro de un campo magnético. Tanto la frecuencia de resonancia, como la energía de absorción y la intensidad de la señal son proporcionales a la fuerza que tenga dicho campo.

En función del entorno químico local, los distintos protones que posee una molécula van a resonar a frecuencias ligeramente distintas. Debido a que, tanto este desplazamiento como la frecuencia de resonancia fundamental son directamente proporcionales a la fuerza del campo, el

desplazamiento de frecuencia se va a convertir en un campo independiente con valor adimensional que se conoce como desplazamiento químico. Mediante la comprensión de los diferentes entornos químicos, este desplazamiento químico se puede emplear para obtener información estructural sobre la molécula en la muestra que se desea analizar ([https://www.espectrometria.com/espectrometra\\_de\\_resonancia\\_magnitica\\_nuclear](https://www.espectrometria.com/espectrometra_de_resonancia_magnitica_nuclear)).

Los espectros de  $^1\text{H}$  NMR tanto de las NPAs como del almidón nativo y la vainillina, se obtuvieron empleando un espectrómetro Bruker AV600 con imán de 14.0 T apantallado (Fig. 24). Se disolvió una cierta cantidad de la muestra de ensayo en DMSO y los espectros fueron registrados a una temperatura de 333 K.



Fig. 24. Espectrómetro de resonancia magnética nuclear

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1. SÍNTESIS DE NPAs

### 4.1.1. Distribución de tamaño de partícula, tamaño y morfología

Como se ha explicado en los apartados 3.3.1. y 3.3.2., la síntesis de las NPAs se llevó a cabo bajo diferentes condiciones de síntesis, estudiando distintos sistemas de microemulsión (M1 a M6) así como distintas disoluciones etanólicas para conseguir la precipitación del almidón en forma de nanopartículas.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada sistema en relación a la distribución de tamaños de partícula y los índices de polidispersidad (Pdl) mediante DLS y el tamaño y la morfología final de las NPAs obtenidas en SEM. El proceso de obtención de estos resultados es el mismo en todos los casos, primero se realiza la síntesis con cada formulación estudiada, posteriormente se realizan los correspondientes lavados, se caracterizan las NPAs en DLS y finalmente son secadas y caracterizadas en SEM. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado con el fin de determinar la reproducibilidad de los mismos.

- NPAs a partir del sistema de microemulsión M1

En la siguiente tabla II se muestran los tamaños y el Pdl obtenidos para las NPAs formadas a partir del sistema de microemulsión M1, así como el valor medio de los tamaños obtenidos con el software ImageJ a partir de las micrografías realizadas mediante SEM.

Tabla II. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M1 mediante DLS e ImageJ

Muestra	Fase acuosa	Agente precipitante	Tamaño (nm)	Pdl	ImageJ (nm)
NPAs.M1A	Almidón + MQ	NaOH 12% + etanol 96%	165±19	0.75±0.03	86±26
NPAs.M1B	Almidón + MQ	Etanol 96%	-	-	-
NPAs.M1C	Almidón + NaOH 8%	Etanol 96%	21±3	0.49±0.06	-
NPAs.M1D	Almidón + NaOH 8% + urea 10%	Etanol 96%	43±5	0.60±0.06	-

A la vista de los resultados de tamaños obtenidos mediante DLS, se puede llegar a una primera conclusión de que los menores tamaños de partícula se obtienen cuando la presencia de sosa está en la fase acuosa donde a su vez se encuentra también el almidón, obteniendo tamaños relativamente pequeños tanto en presencia (NPAs.M1D) como en ausencia de urea (NPAs.M1C). Cabe destacar, que para el sistema que no contiene sosa (NPAs.M1B) no se obtiene ningún valor de tamaño y por tanto esta muestra no fue caracterizada mediante SEM.

En la Fig. 25 se presentan las micrografías obtenidas en SEM para las partículas formadas a partir del sistema de microemulsión M1.

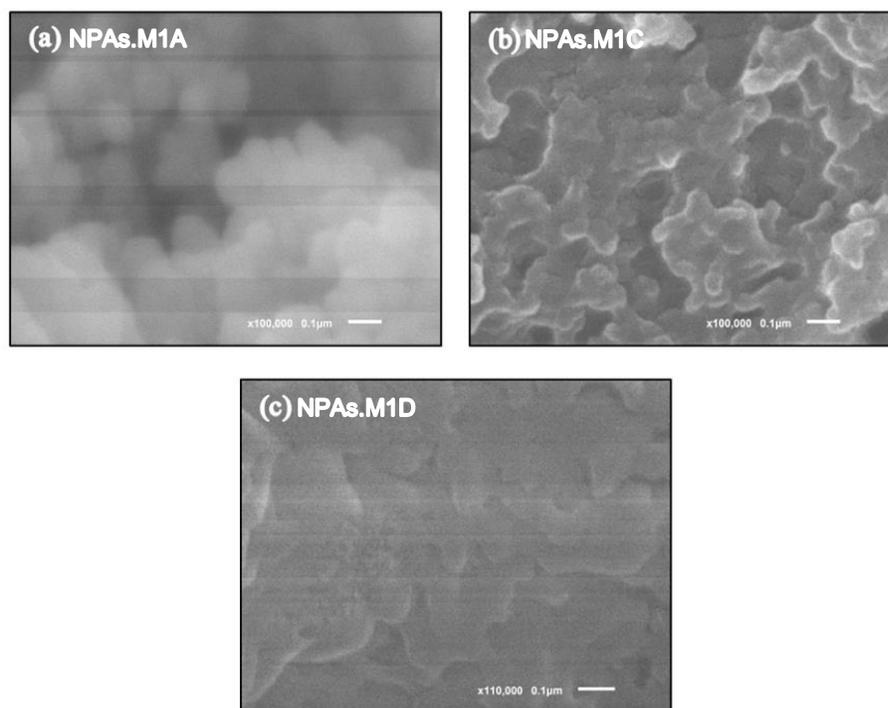


Fig. 25. Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M1 con: (a) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica NaOH 12% (p/v) y etanol 96% (b) fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (c) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96%

Se comprueba que se obtienen partículas esféricas solo con la primera formulación (NPAs.M1A), en donde la presencia de sosa se encuentra en la disolución etanólica y no en la fase acuosa, a diferencia de lo que se esperaba en un primer momento observando los datos obtenidos en DLS. Se presentan ligeramente aglomeradas, lo que podría explicar el tamaño tan elevado medido en DLS, ya que realmente los tamaños de partícula obtenidos al medir sobre la propia micrografía con ImageJ oscilan entre los 45 nm y 132 nm. En el caso de las otras dos

formulaciones (NPAs.M1C y NPAs.M1D) las partículas no han conseguido formarse del todo ya que se presentan como una masa sólida y no es posible distinguir unas de otras.

○ NPAs a partir del sistema de microemulsión M2

A continuación, en la tabla III se presentan los tamaños obtenidos y Pdl en DLS para las NPAs formadas a partir del sistema de microemulsión M2, así como el tamaño medio en ImageJ medidos a partir de las micrografías SEM (Fig. 26).

Tabla III. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M2 mediante DLS e ImageJ

Muestra	Fase acuosa	Agente precipitante	Tamaño (nm)	Pdl	ImageJ (nm)
NPAs.M2A	Almidón + MQ	NaOH 12% + etanol 96%	40±3	0.81±0.18	26±9
NPAs.M2B	Almidón + MQ	Etanol 96%	-	-	-
NPAs.M2C	Almidón + NaOH 8%	Etanol 96%	29±4	0.27±0.05	-
NPAs.M2D	Almidón + NaOH 8% + urea 10%	Etanol 96%	43±10	0.55±0.06	-

En el caso de las NPAs preparadas a partir de la microemulsión M2 todos los tamaños medios obtenidos en DLS son relativamente pequeños y, al igual que en el caso anterior, en la formulación cuya fase acuosa es una mezcla de agua milli-q y almidón y el agente precipitante etanol 96% (NPAs.M2B) no se obtiene ningún valor de tamaño y, por tanto, nuevamente no fue caracterizada mediante SEM.

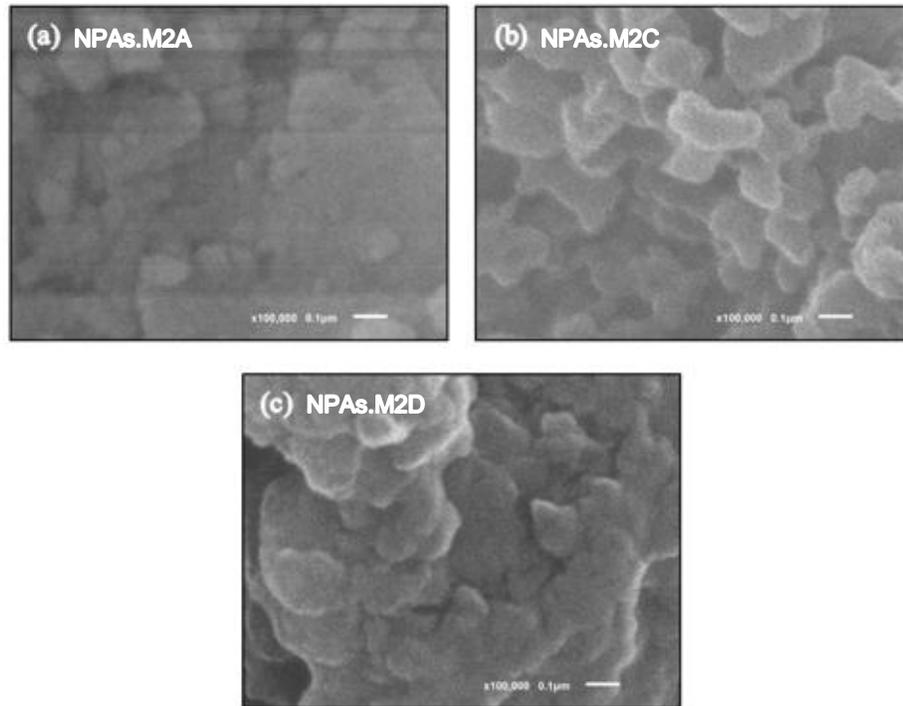


Fig. 26. Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M2 con: (a) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica NaOH 12% (p/v) y etanol 96% (b) fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (c) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96%

Al observar las micrografías se demuestra la existencia de partículas esféricas en el primer caso (NPAs.M2A), aunque la mayoría de ellas se presentan en forma de agregados. A pesar de esto, con dificultad, se midió su tamaño con ImageJ obteniéndose un rango de tamaños entre 12 nm y 47 nm. En los otros dos casos, correspondientes a las muestras en las que la sosa se encuentra en la fase acuosa, se presentan partículas no esféricas en el caso en el que no hay presencia de urea (NPAs.M2C), distinguiéndose unas de otras. Sin embargo, cuando hay presencia de urea (NPAs.M2D) no se observa la presencia de NPAs.

- NPAs a partir del sistema de microemulsión M3

En la siguiente tabla IV se presentan los tamaños obtenidos cuando el sistema de microemulsión empleado es el M3 y a su vez en la Fig. 27 se presentan las micrografías SEM obtenidas.

Tabla IV. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M3 mediante DLS e ImageJ

Muestra	Fase acuosa	Agente precipitante	Tamaño (nm)	Pdl	ImageJ (nm)
NPAs.M3A	Almidón + MQ	NaOH 12% + etanol 96%	34±10	0.77±0.12	32±8
NPAs.M3B	Almidón + MQ	Etanol 96%	-	-	-
NPAs.M3C	Almidón + NaOH 8%	Etanol 96%	31±4	0.54±0.10	38±11
NPAs.M3D	Almidón + NaOH 8% + urea 10%	Etanol 96%	38±6	0.55±0.09	-

Al igual que en el caso anterior, los tamaños obtenidos en DLS que se muestran son, en definitiva, pequeños y de nuevo en el caso en el que no hay presencia de sosa (NPAs.M3B) en ninguna de las fases no se obtuvieron resultados.

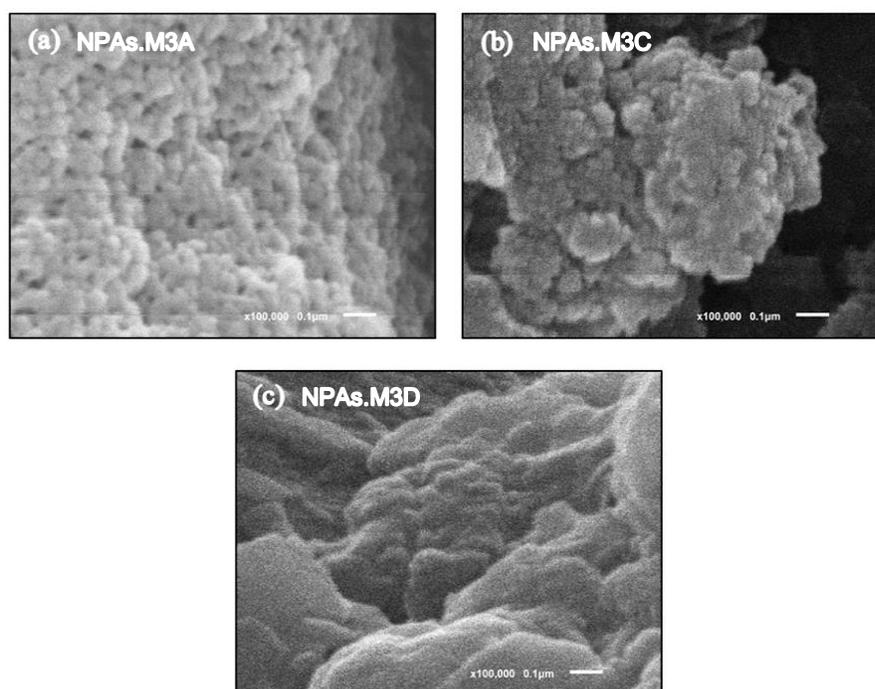


Fig. 27. Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M3 con: (a) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica NaOH 12% (p/v) y etanol 96% (b) fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (c) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96%

En vista de las micrografías, para este sistema de microemulsión se obtuvieron partículas esféricas en los dos primeros casos (NPAs.M3A y NPAs.M3C) como se puede observar en las imágenes. Se observa que en el caso en que la sosa se encuentra en la fase acuosa (NPAs.M3C) la cantidad de partículas obtenidas es mucho menor en comparación con el caso en que la sosa está presente en la disolución etanólica (NPAs.M3A). Adicionalmente cuando la sosa se encuentra en la fase acuosa (NPAs.M3C), las partículas obtenidas presentan mayor aglomeración. Los tamaños obtenidos en ImageJ para ambos experimentos son pequeños, siendo entre 20 nm y 48 nm para la muestra NPAs.M3C y de entre 27 nm y 74 nm para la muestra NPAs.M3A. Por último, cuando hay presencia de urea (NPAs.M3D) las partículas no llegan a formarse observándose únicamente un precipitado amorfo y voluminoso

- NPAs a partir del sistema de microemulsión M4

En la siguiente tabla V se presentan los datos referentes al tamaño obtenidos en DLS para el sistema de microemulsión M4, mientras que en la Fig. 28 se muestran las micrografías SEM.

Tabla V. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M4 mediante DLS e ImageJ

Muestra	Fase acuosa	Agente precipitante	Tamaño (nm)	Pdl	ImageJ (nm)
NPAs.M4A	Almidón + MQ	NaOH 12% + etanol 96%	-	-	-
NPAs.M4B	Almidón + MQ	Etanol 96%	-	-	-
NPAs.M4C	Almidón + NaOH 8%	Etanol 96%	28±5	0.48±0.07	-
NPAs.M4D	Almidón + NaOH 8% + urea 10%	Etanol 96%	48±3	0.58±0.14	42±10

En este caso, se obtienen tamaños pequeños cuando la presencia de sosa se encuentra en la fase acuosa con el almidón (NPAs.M4C y NPAs.M4D). A su vez, nuevamente, en el caso de ausencia de sosa en el experimento (NPAs.M4B), el equipo no detectó la presencia de NPAs. Hay que mencionar que, para este sistema, en el caso en que la sosa estaba presente en la disolución etanólica (NPAs.M4A), la suspensión final se cristalizó por completo por lo que no fue posible realizar su caracterización.

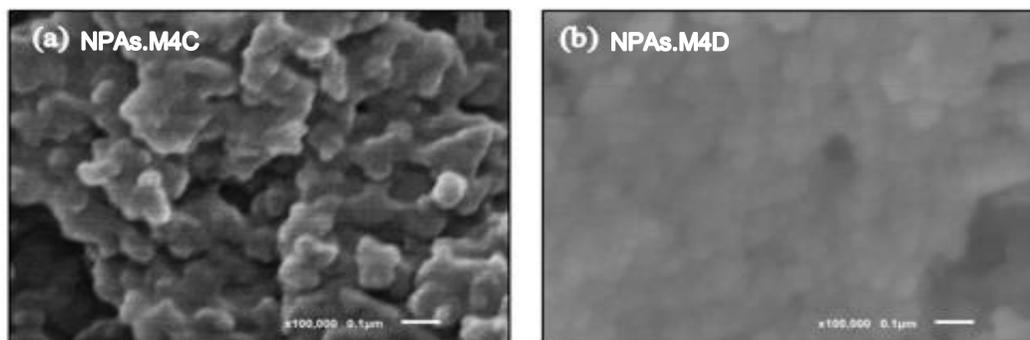


Fig. 28. Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M4 con: (a) fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (b) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96%

Se puede observar que en este caso las partículas esféricas se forman cuando hay presencia de urea en la fase acuosa (NPAs.M4D), presentando un rango de tamaños entre 28 nm y 62 nm. A su vez, en el caso de ausencia de urea (NPAs.M4C) las partículas no se han formado por completo, presentándose en forma de agregados, pero sin una forma concreta.

○ NPAs a partir del sistema de microemulsión M5

En la tabla VI se presentan los datos correspondientes al tamaño para el sistema de microemulsión M5, así como sus correspondientes micrografías en la Fig. 29.

Tabla VI. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M5 mediante DLS e ImageJ

Muestra	Fase acuosa	Agente precipitante	Tamaño (nm)	Pdl	ImageJ (nm)
NPAs.M5A	Almidón + MQ	NaOH 12% + etanol 96%	36±7	0.98±0.04	36±8
NPAs.M5B	Almidón + MQ	Etanol 96%	-	-	-
NPAs.M5C	Almidón + NaOH 8%	Etanol 96%	66±13	0.47±0.01	41±13
NPAs.M5D	Almidón + NaOH 8% + urea 10%	Etanol 96%	47±4	0.61±0.09	47±13

Nuevamente, los tamaños obtenidos son relativamente pequeños, aunque a diferencia de los casos anteriores, los menores tamaños se obtienen cuando la presencia de sosa se encuentra

en la disolución precipitante (NPAs.M5A). Una vez más, no se detectó la presencia de NPAs en ausencia de sosa (NPAs.M5B).

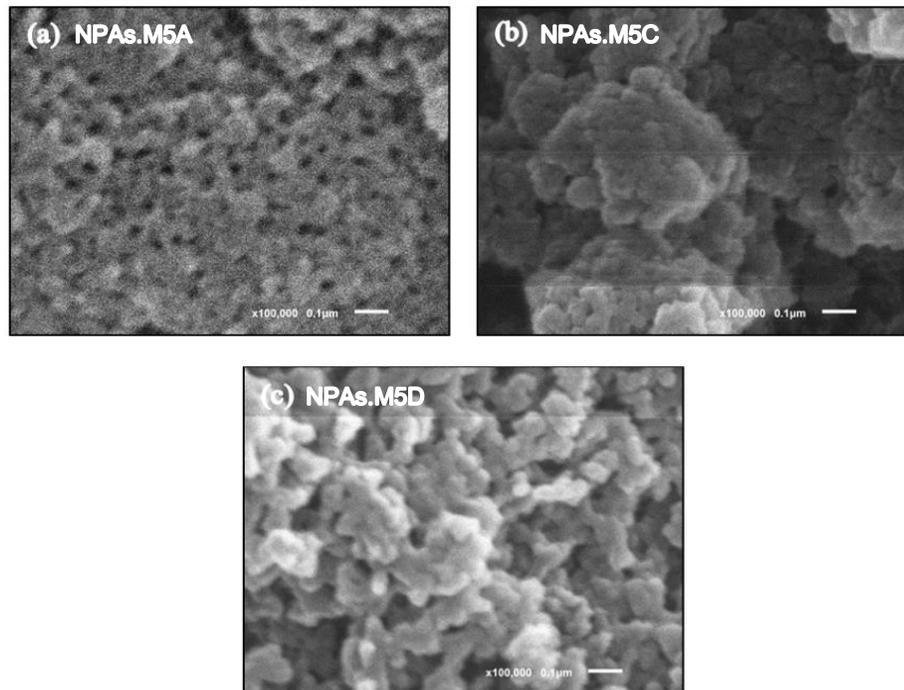


Fig. 29. Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M5 con: (a) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica NaOH 12% (p/v) y etanol 96% (b) fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (c) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96%

En vista de los resultados, se confirma que efectivamente, los menores tamaños de partícula se obtuvieron en el primer caso (NPAs.M5A) con una distribución de tamaños de 24 nm a 51 nm. En cuanto a los otros dos casos (NPAs.M5C y NPAs.M5D), se observa que se obtuvieron partículas esféricas en pequeña cantidad ya que la mayoría se presentan como agregados. La distribución de tamaños obtenida cuando no hay presencia de urea (NPAs.M5C) es de 28 nm a 75 nm mientras que cuando sí hay presencia de urea (NPAs.M5D) los tamaños obtenidos varían entre 29 nm y 70 nm siendo unos rangos de tamaño muy similares.

- NPAs a partir del sistema de microemulsión M6

Finalmente, en la tabla VII se presentan los valores correspondientes al tamaño para las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M6 y en la Fig. 30 sus respectivas micrografías SEM.

Tabla VII. Caracterización de tamaños de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M6 mediante DLS e ImageJ

Muestra	Fase acuosa	Agente precipitante	Tamaño (nm)	Pdl	ImageJ (nm)
NPAs.M6A	Almidón + MQ	NaOH 12% + etanol 96%	40±4	0.64±0.15	121±26
NPAs.M6B	Almidón + MQ	Etanol 96%	-	-	90±32
NPAs.M6C	Almidón + NaOH 8%	Etanol 96%	24±3	0.42±0.02	29±12
NPAs.M6D	Almidón + NaOH 8% + urea 10%	Etanol 96%	58±17	0.52±0.09	-

Para este último sistema de microemulsión estudiado los tamaños obtenidos mediante DLS son en todos los casos pequeños y nuevamente no se obtienen resultados cuando hay ausencia de sosa (NPAs.M6B). En esta ocasión, se decidió caracterizar este experimento también para confirmar si realmente no existía formación de partículas tal y como indicaban las medidas obtenidas mediante DLS.

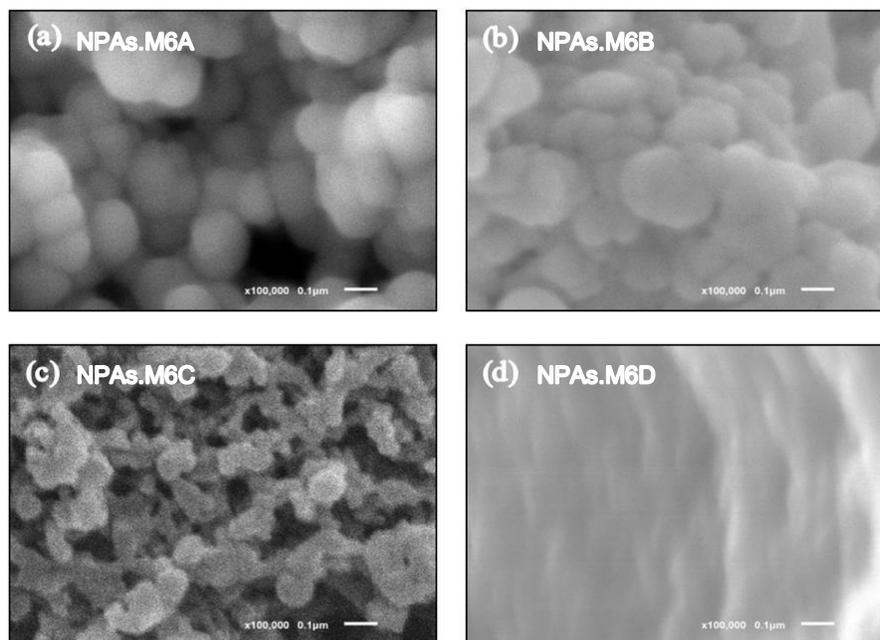


Fig. 30. Micrografía SEM de las NPAs obtenidas a partir del sistema de microemulsión M6 con: (a) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica NaOH 12% (p/v) y etanol 96% (b) fase acuosa almidón + MQ y disolución etanólica etanol 96% (c) fase acuosa almidón + NaOH 8% (p/v) y disolución etanólica etanol 96% y (d) fase acuosa almidón + NaOH 8% + urea 10% (p/v) y disolución etanólica etanol 96%

Para este último sistema de microemulsión se presentan partículas esféricas de gran tamaño, a diferencia de los pequeños tamaños que se esperaban con los resultados de DLS, cuando la sosa se encuentra en la disolución etanólica precipitante (NPAs.M6A) con un rango de tamaños que varía entre 64 nm y 180 nm, a su vez también existe presencia de algún agregado de partículas. Sorprendentemente, al caracterizar el experimento en el que no existe presencia de sosa (NPAs.M6B) en ninguna de las fases, se obtienen partículas esféricas a diferencia de lo que se creía en un primer momento al no haber obtenido ningún resultado en DLS. Las partículas que se obtienen son relativamente grandes y se observa que muchas no tienen forma definida, permaneciendo aglomeradas entre ellas y se presentan como partículas grandes formadas por varias partículas más pequeñas, el rango de tamaños que se obtiene varía entre 59 nm y 204 nm. En cuanto al experimento en el que no hay presencia de urea y la sosa se encuentra disuelta junto con el almidón (NPAs.M6C), existe presencia de partículas esféricas, pero a su vez al igual que en el caso anterior, numerosas partículas están formadas por partículas más pequeñas. En esta ocasión, el rango de tamaños que se obtiene se encuentra entre 14 nm y 57 nm, siendo este mucho menor en comparación con los otros casos. Finalmente, en el caso en el que la urea está presente en la fase acuosa (NPAs.M6D), no se obtienen NPAs, observándose únicamente un precipitado de gran tamaño.

En vista de las micrografías y los tamaños obtenidos, se puede concluir que los mejores resultados se consiguen cuando se emplea una fase acuosa constituida por el almidón y agua milli-q y una disolución precipitante que consiste en una mezcla de NaOH 12% (p/v) y etanol 96%, obteniéndose prácticamente en todos los casos partículas esféricas. Como se mencionó anteriormente, la sosa rompe los enlaces de hidrógeno existentes entre el agua y el almidón, esto da como resultado la interrupción de los órdenes moleculares existentes dentro de los gránulos de almidón (Neelam, Vijay y Lalit, 2012), lo que consigue que se mejore la solubilidad del almidón en agua (Han y Lim, 2004).

A su vez, con dichos parámetros, los sistemas de microemulsión M3 y M5 presentan además de partículas de pequeño tamaño, con un rango de 20 nm a 48 nm (muestra NPAs.M3A) y de 24 nm a 51 nm (muestra NPAs.M5A), tal y como se mencionó previamente, una cantidad de partículas mucho mayor que con en el resto de los sistemas, por lo que se puede concluir que estos son los sistemas óptimos para la obtención de NPAs de tamaño pequeño y homogéneo por el método de microemulsión.

#### **4.1.2. Determinación de materia seca**

Para los parámetros y sistemas óptimos de microemulsión obtenidos en el apartado anterior, se determina la cantidad de NPAs obtenidas por cantidad de almidón añadida en la fase acuosa.

En esta ocasión, los lavados se alteran de tal manera que se realizan cuatro lavados en lugar de seis como se había hecho previamente para la caracterización y alternándose lavados con agua milli-q y etanol absoluto en lugar de etanol de 96%. Esto se realiza debido a que en un primer lugar se realizaron los 6 lavados de la misma manera que para la caracterización, pero, al dejar secando las muestras, además de requerir largos tiempos para obtener las muestras en sequedad total (tiempos próximos a una semana), el aspecto final obtenido de las partículas era un precipitado aglomerado y aceitoso, en lugar del polvo blanco esperado. Esto podría ser debido al porcentaje de agua que tiene el etanol de 96% ya que no se habría evaporado en su totalidad y dificultaría la eliminación del aceite, no consiguiéndose un correcto secado de las partículas. A su vez, en estudios preliminares en los que se sustituyó el etanol 96% por etanol absoluto se llegó a la conclusión de que 4 lavados eran suficientes para obtener las partículas perfectamente secas, necesitando solo 3 días para su completo secado.

Se realizaron estos experimentos por triplicado para los dos sistemas de microemulsión óptimos y finalmente se obtuvo una cantidad de partículas de 0.029 g por cada 0.2 g de almidón en la fase acuosa para el sistema M3, mientras que para el sistema M5 solamente se obtuvieron 0.005 g de NPAs por cada 0.2 g de almidón añadido en la fase acuosa. El rendimiento porcentual de NPAs obtenido fue de 14.5% para el sistema M3 mientras que para el sistema M5 se obtuvo un rendimiento del 2.5%.

#### 4.1.3. Análisis de difracción de rayos X en polvo (XRPD)

Con el fin de determinar si los lavados con etanol 96% afectan realmente a la estructura cristalina de las NPAs, se caracterizan y comparan las partículas obtenidas cuando los lavados se realizan con etanol 96% y con etanol absoluto mediante difracción de rayos X. A su vez, dichos resultados se compararon también con la estructura cristalina de los gránulos del almidón de maíz empleado para la síntesis. Se realizan los análisis para el sistema de microemulsión M3 ya que la cantidad de materia seca obtenida fue mucho mayor que en el caso del sistema M5 en el que la cantidad fue tan baja que no había suficiente cantidad de muestra para dicha caracterización. En la Fig. 31 se presentan los espectros obtenidos para cada caso.

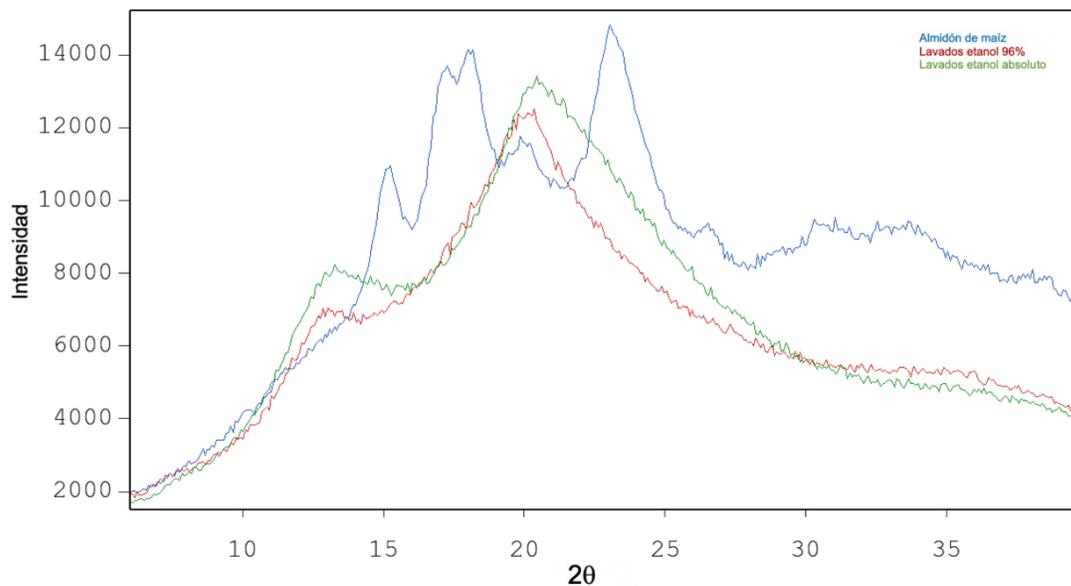


Fig. 31. Espectro XRPD del almidón de maíz y comparación de lavados

Como se puede observar, los gránulos de almidón de maíz presentan picos con ángulos de Bragg ( $2\theta$ ) a  $15^\circ$ ,  $17^\circ$ ,  $18^\circ$  y  $23^\circ$  lo que indica que los patrones de difracción de rayos X para este almidón son de tipo A lo que, a su vez, concuerda con estudios previos (Lin et al, 2020).

En cuanto a las NPAs en ambos casos se pueden observar picos de difracción principal en torno a  $13^\circ$  y  $20^\circ$ , lo que se corresponde con una estructura cristalina de tipo V y que, a su vez, también concuerda con estudios previos (Qiu et al, 2016; Lin et al, 2020). Estos picos manifestaron que el almidón de maíz y el CTAB formaron un complejo amilosa-emulsionante durante la síntesis de las partículas.

A su vez, se puede concluir que el tipo de alcohol empleado en los lavados de las NPAs no afecta a su estructura cristalina ya que en ambos casos el resultado es prácticamente el mismo.

## 4.2. ENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

### 4.2.1. Encapsulación de vainillina

A continuación, en las Fig. 32 y Fig. 33 se presentan los espectros  $^1\text{H}$  NMR del almidón nativo y de la vainillina respectivamente, con el fin de determinar si ambos compuestos interactúan entre ellos a la hora de llevar a cabo la encapsulación del biocompuesto con las NPAs.

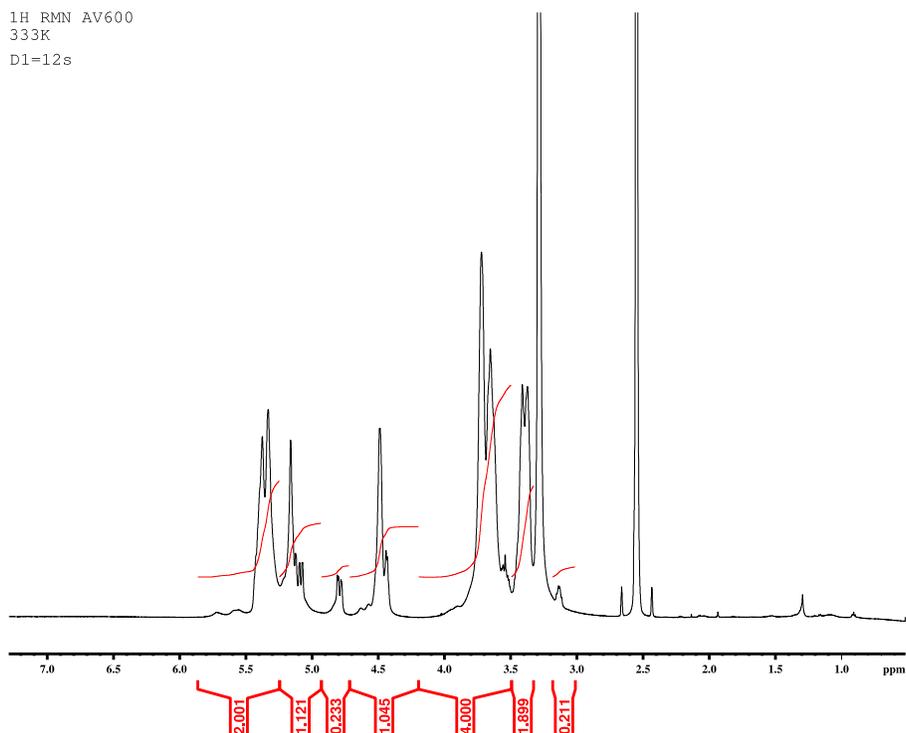


Fig. 32. Espectro  $^1\text{H}$  NMR del almidón nativo

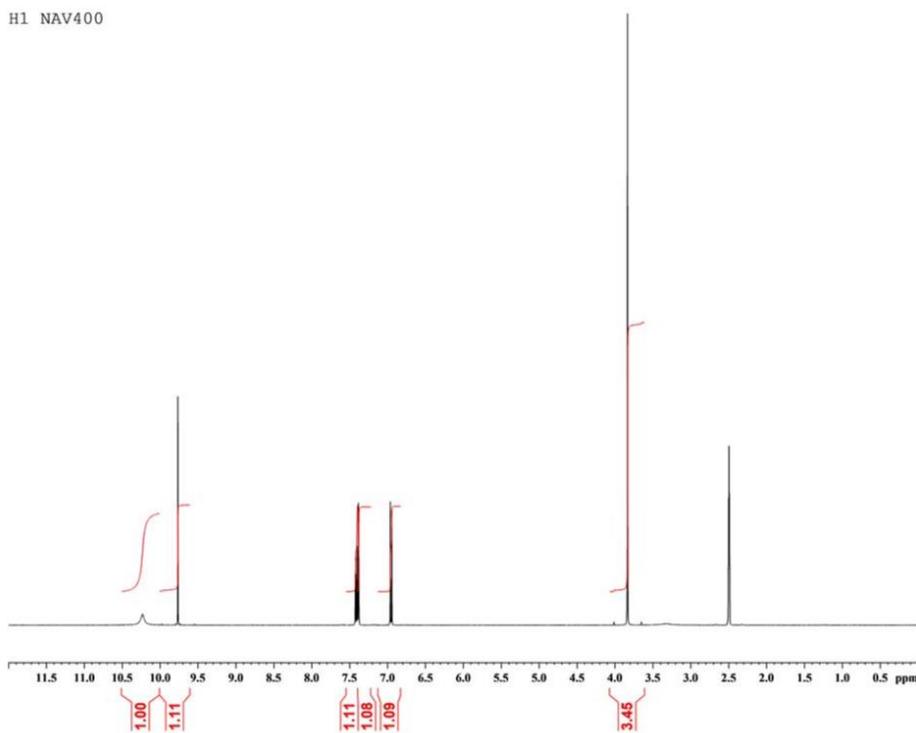


Fig. 33. Espectro  $^1\text{H}$  NMR de la vainillina

Se observa que los picos principales del espectro del almidón nativo se encuentran en torno a 2.5 ppm, 3.3 ppm y 3.7 ppm, mientras que para el caso de la vainillina el pico principal se encuentra en torno a los 4 ppm. Esto indica que las señales aromáticas de la vainillina no se superponen con las del almidón, lo que indica que ambos compuestos podrían ser claramente identificados al analizar una mezcla almidón-vainillina.

Como se mencionó previamente en el capítulo 3 de materiales y métodos (apartado 3.3.4.) se estudiaron dos concentraciones del compuesto bioactivo para determinar su influencia en la encapsulación de las NPAs, 0.01% (p/v) y 0.1% (p/v). Los espectros  $^1\text{H}$  NMR obtenidos en ambos casos, se muestran en las siguientes Fig. 34 y Fig. 35 respectivamente.

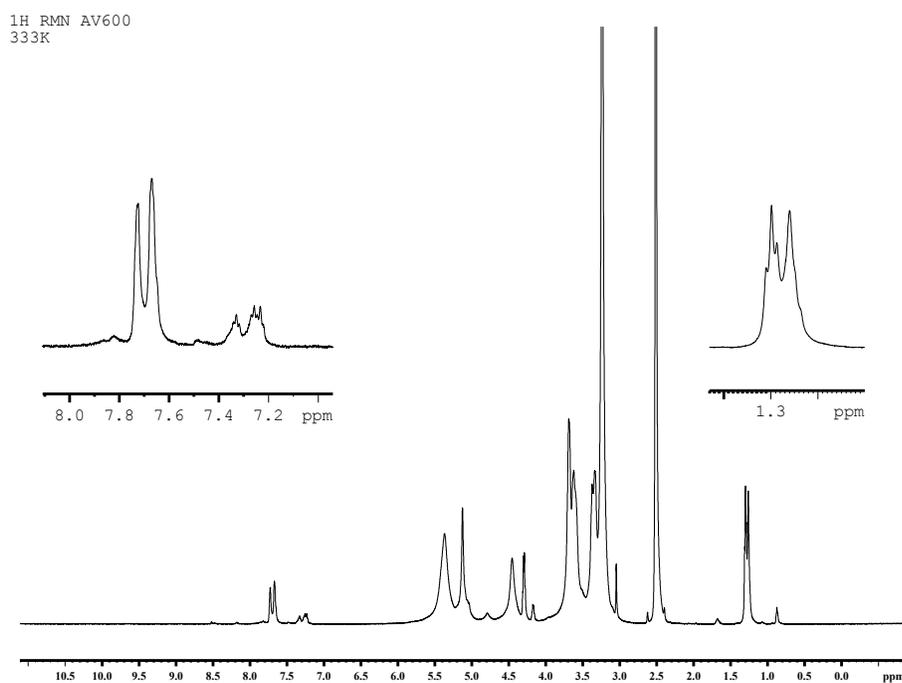


Fig. 34. Espectro  $^1\text{H}$  NMR de las NPAs con una concentración de vainillina del 0.01 % (p/v)

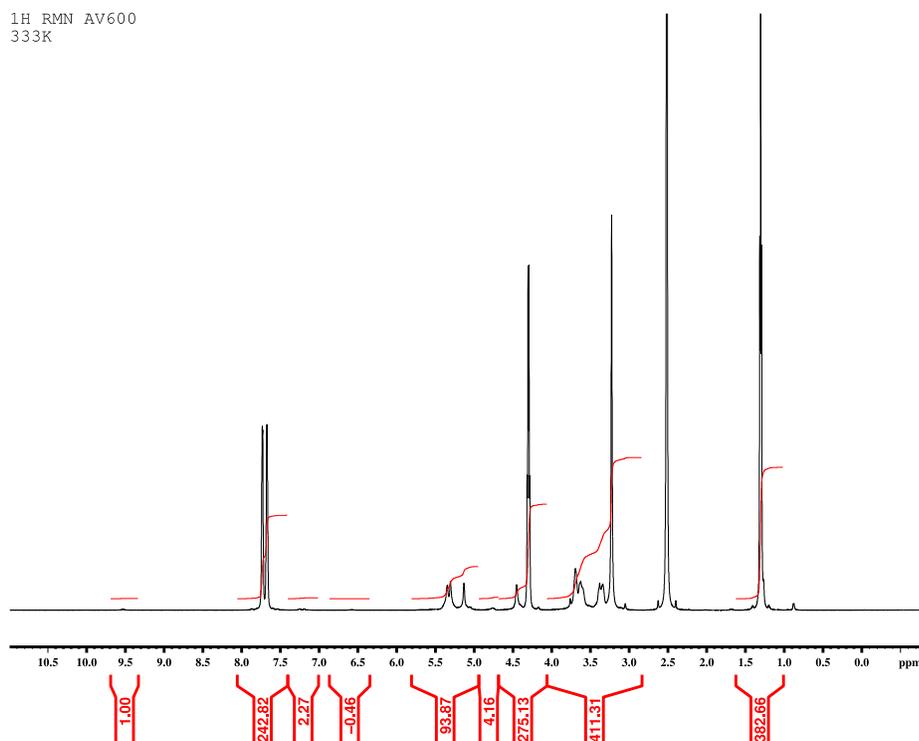


Fig. 35. Espectro  $^1\text{H}$  NMR de las NPAs con una concentración de vainillina del 0.1 % (p/v)

Los picos principales para la menor concentración de vainillina (Fig. 34) se encuentran en torno a 2.5 ppm, 3 ppm y 3.7 ppm al igual que en el espectro del almidón nativo, lo que indicaría que no hubo desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  para este caso. Sin embargo, para la mayor concentración de vainillina (Fig. 35), aparece un nuevo pico en torno a 1.3 ppm, además de los picos en 2.5 ppm, 3 ppm y 3.7 ppm que se corresponden nuevamente a los del espectro del almidón nativo, este pico puede deberse a la presencia de otros compuestos aromáticos que estuvieron presentes durante el proceso de síntesis de las NPAs. A su vez, en el caso de la menor concentración de vainillina no se observan las señales de esta (no se aprecian picos a 4 ppm), sin embargo, cuando la concentración de vainillina es mayor si se distinguen picos correspondientes a la vainillina, pero de baja intensidad.

Se realizaron a su vez experimentos mediante espectroscopía ordenada por difusión (DOSY) NMR donde se compararon los desplazamientos químicos con los coeficientes de difusión de los compuestos para determinar si ambas moléculas se encontraban entrelazadas o por el contrario se encontraban totalmente independientes. Los espectros de difusión DOSY indicaron que ambas moléculas (almidón y vainillina) no estaban interaccionando entre sí, ya que fluían libremente del mismo modo que lo hacían las moléculas por separado, y que por tanto las NPAs no llegaron a encapsular el biocompuesto.

## **5. CONCLUSIONES**

## 5.1. CONCLUSIONES

- Se ha demostrado la viabilidad para preparar NPAs mediante el método de microemulsión obteniéndose en la mayoría de los sistemas estudiados partículas esféricas con tamaños de partícula inferiores a 30 nm.
- Se prueba que la síntesis de las NPAs depende de la proporción y composición tanto de los reactivos empleados en los sistemas de microemulsión (fases acuosa y orgánica, estabilizante y coestabilizante) como de los agentes precipitantes.
- La presencia de sosa favorece la formación de NPAs, obteniéndose mejores resultados cuando esta se encuentra en la disolución etanólica en lugar de disuelta en la fase acuosa con el almidón, consiguiéndose partículas más esféricas y con menor presencia de agregados.
- La presencia de urea en la fase acuosa afecta de forma negativa a la formación de NPAs de almidón esféricas, no consiguiéndose la formación de partículas o únicamente obteniéndose agregados.
- Los sistemas M3 y M5 destacarían frente a los otros al obtenerse, además de partículas esféricas de pequeños tamaños (de 20 nm a 48 nm y de 24 nm a 51 nm respectivamente), partículas sin presencia de agregados. Por tanto, se puede concluir que estas son las formulaciones óptimas para la obtención de las NPAs esféricas, y a su vez, la mejor formulación para la fase acuosa consiste en una mezcla de almidón al 1% (p/v) y agua milli-q y una mezcla de NaOH 12% (p/v) y etanol 96% como agente de precipitación.
- Los rendimientos de obtención de NPAs son bajos, alcanzándose los valores más elevados para el sistema M3, con un valor del 14.5%.
- Se obtuvieron mejores resultados cuando se utilizó etanol absoluto en el proceso de lavado puesto que permitió mejorar el proceso de secado (ya que se redujo el tiempo y se consiguió obtener un polvo de aspecto suelto sin presencia de restos de disolventes).
- Las NPAs obtenidas con la formulación óptima (M3) presentaron una cristalinidad de tipo V.
- No se obtuvieron resultados satisfactorios en los ensayos de las NPAs como vehículos de carga de la vainillina. Sería necesario optimizar el proceso de incubación, así como las



concentraciones de las NPAs y el biocompuesto y estudiar la viabilidad con biocompuestos de diferente naturaleza.

## **6. PRESUPUESTO**

La elaboración del presupuesto se puede realizar diferenciando dos tipos de costes; costes directos y costes indirectos. Los costes directos se pueden desglosar en los siguientes apartados:

- Gastos de personal (tabla VIII): en los que se incluyen tanto la realización de análisis previos, como el porcentaje de tiempo que el investigador dedica al proyecto, y finalmente la elaboración de informes posteriores una vez ha terminado el proyecto.
- Materiales (tabla IX y tabla X): engloba tanto los reactivos necesarios como el material de laboratorio usados para llevar a cabo la investigación.
- Equipos (tabla XI): se enumeran los equipos necesarios para la ejecución del proyecto.
- Otros gastos (tabla XII): donde se recogen aquellos servicios de terceros que son necesarios para desarrollar parte de la investigación, así como aquellas actividades no relacionadas directamente con la investigación.

Para cada uno de los aspectos descritos se calculan los costes totales y su suma se expresa como el total del presupuesto en costes directos.

Los costes indirectos son aquellos que se requieren para procesos generales de mantenimiento del laboratorio y equipos, suministro de electricidad, agua, gas, materiales, etc. Normalmente es complicado calcular estos costes con exactitud por lo que se estima en un 3% de los costes directos.

De tal manera que el total del presupuesto lo constituye la suma del importe de los costes directos y de los costes indirectos.

## 6.1. COSTES DIRECTOS

### 6.1.1. Gastos de personal

Tabla VIII. Costes referidos al personal

Actividad	Tiempo (h)	Coste por hora (€/h)	Coste total (€)
Análisis previos	30	15	450
Tiempo de investigación	240	10	2400
Elaboración de informes	60	8	480

Por tanto, los gastos de personal ascienden a un total de 3330 €.

## 6.1.2. Materiales

### 6.1.2.1. Reactivos

Tabla IX. Gastos referidos a los reactivos empleados durante la investigación

Reactivos	Cantidad	Unidades	Coste por unidad (€/unid.)	Coste total (€)
Almidón de maíz	50 g	1	5	5
Hidróxido de sodio	500 g	1	13	13
Urea	500 g	1	7	7
Agua milli-Q	1000 mL	10	3	30
CTAB	100 g	1	32	32
1-Hexanol	1000 mL	2	47	94
1-Butanol	1000 mL	1	45	45
Etanol 96%	5000 mL	1	140	140
Etanol absoluto	5000 mL	1	150	150
Vainillina	100 g	1	30	30

### 6.1.2.2. Material de laboratorio

Tabla X. Gastos referidos a los materiales de laboratorio empleados durante la investigación

Material	Unidades	Coste por unidad (€/unid.)	Coste total (€)
Matraz aforado 100 mL	5	3	15
Frascos 50 mL	2	10	20
Vasos de precipitados 50 mL	6	4.5	27
Tubos Falcon 15 ml	100	0.4	40
Tubos Falcon 50 ml	100	0.5	50
Tubos cristal síntesis	25	2	50
Tubos cristal secado	25	1	25
Celdas de cuarzo	20	1.5	30
Tubos Eppendorf 1.5 ml	100	0.75	75
Pipetas Pasteur plástico	500	0.15	75

Los gastos de material son por tanto la suma de los costes de los reactivos empleados, siendo estos costes de 546 € y los costes en cuanto al material del laboratorio utilizado, que ascienden a un total de 407 €. Por consiguiente, la suma de los costes totales de material es de 953 €.

### 6.1.3. Equipos

Los costes derivados del uso de los equipos se calculan teniendo en cuenta la amortización de cada uno, esto es, la pérdida de valor de los equipos con el paso del tiempo. Esta amortización se calcula como el cociente entre el coste total del equipo y la vida útil de este. Luego solo hay que tener en cuenta el tiempo que se usó cada equipo durante la realización de la investigación para poder obtener el coste que supone dicha utilización.

Tabla XI. Gastos referidos a los equipos utilizados durante la investigación

Equipo	Coste inicial (€)	Vida útil (días)	Amortización (€/día)	Tiempo de uso (días)	Coste por uso (€)
Baño termostático	1000	3650	0.27	30	8.10
Balanza	300	5475	0.05	40	2.00
Agitador magnético	250	3650	0.07	40	2.80
Agitador magnético sumergible	800	5475	0.15	30	4.50
Microcentrífuga	885	3650	0.24	15	3.60
Centrífuga Kubota	8000	7300	1.10	10	11.0
Estufa de secado	1500	3650	0.41	20	8.20
Agitador oscilatorio	772	3650	0.21	5	1.05
Malvern Zetasizer Nano ZS	50000	7300	6.85	15	103

El coste de adquisición de los equipos asciende a un total de 63507 € mientras que el coste total del uso de todos los equipos es de 144 €.

### 6.1.4. Otros gastos

Donde se incluyen los costes debidos al uso de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo, en el presente trabajo se requirió de los Servicios del SEM, XRDP y NMR.

Tabla XII. Gastos de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo

Otros gastos	Tiempo de uso (h)	Nº muestras	Coste por muestra (€/muestra)	Coste total (€)
SEM	20	30	12	360
XRPD	2	3	35	105
NMR	6	6	24	144

El coste total por el uso de los Servicios Científico Técnico asciende a un total de 609 €.

De tal manera que la suma de los costes directos recogidos en las anteriores tablas (sin incluir el precio de compra de los equipos) ascienden a un total de 5036 €.

## 6.2. COSTES INDIRECTOS

Estos costes como se menciona previamente se calculan como el 3% del total de los costes directos, obteniéndose de esta manera un total de costes indirectos de 151 €.

Por tanto, el presupuesto del proyecto suma un total de 5187 €.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AHMAD, M., MUDGIL, P., GANI, A., HAMED, F., MASOODI, F.A. y MAQSOOD, S. (2019a). Nano encapsulation of catechin in starch nanoparticles: Characterization; release behaviour and bioactivity retention during in-vitro digestion. *Food Chemistry* 270, 95–104.

ALILA, S., ALOULOU, F., THIELEMANS, W. y BOUFI, S. (2011). Sorption potential of modified nanocrystals for the removal of aromatic organic pollutant from aqueous solution. *Industrial Crops and Products*, 33, 350-357.

ALP, E., DAMKACI, F., GUVEN, E. y TENNISWOOD, M. (2019). Starch nanoparticles for delivery of the histone deacetylase inhibitor cg-1521 in breast cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine* 14, 1335–1346.

ANGELLIER, H., PUTAUX, J., MOLINA-BOISSEAU, S., DUPEYRE, D. y DUFRESNE, A. (2005). Starch nanocrystal fillers in an acrylic polymer matrix. *Macromol. Symp.* 221 (1).

ASGARI, S., SABERI, A.H., MCCLEMENTS, D.J. y LIN, M. (2019). Microemulsions as nanoreactors for synthesis of biopolymer nanoparticles. *Trends in Food Science & Technology* 86, 118-130.

AVGOUSTAKIS, K. (2004). Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr. Drug Deliv.*, 1, nº 4, 321– 33.

AVVARU, B., PATIL, M.N., GOGATE, P.R. y PANDIT, A.B. (2006). Ultrasonic atomization: effect of liquid phase properties. *Ultrasonics* 44 (2), 146–158.

BARRERAS, F., AMAVEDA, H. y LOZANO, A. (2002). Transient high-frequency ultrasonic water atomization. *Exp. Fluid* 33, (3) 405–413.

BINKS, B.P. y WHITBY, C.P. (2004). Silica particle-stabilized emulsions of silicone oil and water. *Langmuir*, 20, 1130-1137.

BLOEMBERGEN, S., MCLENNAN, I., LEE, D.I. y LEEUWEN, J.V. (2008). Paper binder performance with biobased nanoparticles. *Paper*, 360, 46-48.

BORGAGNA, M., BELLICH, B., ZORZIN, L., LAPASIN, R. y CESÀRO, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterization of non-convectonal gelling system. *Food chemistry*, 122 (2), 416-423.

CFATA (Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada) [en línea] [fecha de consulta: 12 diciembre 2020]. Disponible en: [http://www.fata.unam.mx/servicios/dispersion\\_luz/info](http://www.fata.unam.mx/servicios/dispersion_luz/info)

CHANG, Y., YAN, X., WANG, Q., REN, L., TONG, J. y ZHOU, J. (2017). High efficiency and low-cost preparation of size-controlled starch nanoparticles through ultrasonic treatment and precipitation. *Food Chemistry* 227, 369–375.

CHEN, Y., CAO, X., CHANG, P.R. y HUNEALULT, M.A. (2008). Comparative study on the films of poly (vinyl alcohol)/pea starch nanocrystals and poly (vinyl alcohol)/native pea starch. *Carbohydrate Polymers*, 73 (1), 8-17.

CHENA ALDAO, D., ŠÁRKA, E., ULBRICH, P. y MENSIKOVÁ, E. (2018). Starch nanoparticles-two ways of their preparation. *Czech J. Food Sci.* 36, 133–138.

CHIN, S.F., AZMAN, A. y PANG, S.C. (2014). Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a microemulsion method. *Journal of Nanomaterials* 86, (763736), 1–7.

CHIN, S.F., PANG, S.C. y TAY, S.H. (2011). Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1817-1819.

CHROMOPOULOU, L., FRATODDI, I., PALOCCI, C., VENDITTI, I., y RUSSO, M. (2009). Osmosis based method drives the self-assembly of polymeric chains into micro- and nanostructures. *Langmuir*, 25, 11940–11946.

CUI, W. (2019). Study on the influence of the application of nano-starch about the paper properties as spray-starch. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, p. 300 052014.

DAI, L., LI, C., SHANG, J. y CHENG, F. (2018). Preparation and characterization of starch nanocrystals combining ball milling with acid hydrolysis. *Carbohydr. Polym.* 180, 122–127.

DENG, S., HUANG, R., ZHOU, M., CHEN, F. y FU, Q. (2016). Hydrophobic cellulose films with excellent strength and toughness via ball milling activated acylation of microfibrillated cellulose. *Carbohydr. Polym.* 154, 129–138.

DUFRESNE, A., CAVAILLE, J. y HELBERT, W. (1996). New nanocomposite materials: Microcrystalline starch reinforced thermoplastic. *Macromolecules*, 29 (23), 7624-7626.



EL-NAGGAR, M.E., EL-RAFIE, M.H., EL-SHEIKH, M.A., EL-FEKY, G.S. y HEBEISH, A. (2015). Synthesis, characterization, release kinetics and toxicity profile of drug-loaded starch nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 81, 718–729.

EL-SHEIKH, M. (2017). New technique in starch nanoparticles synthesis. *Carbohydrate Polymers* 176, 214–219.

Espectrometría.com [en línea] [fecha de consulta: 13 diciembre 2020]. Disponible en: [https://www.espectrometria.com/espectrometra\\_de\\_resonancia\\_magntica\\_nuclear](https://www.espectrometria.com/espectrometra_de_resonancia_magntica_nuclear)

FANG, Y.Y., WANG, L.J., LI, D., LI, B.Z., BHANDARI, B., CHEN, X.D. y MAO, Z.H. (2008). Preparation of crosslinked starch microspheres and their drug loading and releasing properties. *Carbohydr. Polym.* 74, 379-384.

FRASSEN, O. y HENNINK, W.E. (1998). A novel preparation method for polymeric microparticles without the use of organic solvents. *Int. J. Pharm.* 168, 1-7.

GUTIÉRREZ, G., MORÁN, D., MAREFATI, A., PURHAGEN, J., RAYNER, M. y MATOS, M. (2020). Synthesis of controlled size starch nanoparticles (SNPs). *Carbohydrate Polymers, Volume 250*, 116938.

HAAJ, S.B., MAGNIN, A., PÉTRIER, C. y BOUFI, S. (2013). Starch in food: Structure, function and applications. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1625.

HAAJ, S.B., THIELEMANS, W., MAGNIN, A. y BOUFI, S. (2016). Starch nanocrystals and starch nanoparticles from waxy maize as nanoreinforcement: a comparative study. *Carbohydr Polym*, 143, 310-317.

HAN, J.A. y LIM, S.T. (2004). Structural changes in corn starches during alkaline dissolution by vortexing. *Carbohydrate Polymers*, 55, 193-199.

HU, J., CHEN, M., FANG, X. y WU, L. (2011). Fabrication and application of inorganic hollow spheres. *Chemical Society Reviews*, 40, 5472–5491.

JAIN, A.K., KHAR, R.K., AHMED, F.J. y DIWAN, P.V. (2008). Effective insulin delivery using starch nanoparticles as a potential trans-nasal mucoadhesive carrier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 426–435.

JAIN, R., DANDEKAR, P., LORETZ, B., MELERO, A., STAUNER, T., WENZ, G., KOCH, M. y LEHR, C.M. (2011). Enhanced cellular delivery of idarubicin by surface modification of propyl starch nanoparticles employing pteric acid conjugated polyvinyl alcohol. *Int. J. Pharm.* 420, 147–155.

KIM, J.Y., PARK, D.J. y LIM, S.T. (2008). Fragmentation of waxy rice starch granules by enzymatic hydrolysis. *Cereal Chemistry*, 85 (2), 182-187.

KIM, H.Y., PARK, S.S. y LIM, S.T. (2015). Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 607-620.

KRISTO, E. y BILIADERIS, C.G. (2007). Physical properties of starch nanocrystals reinforced pullulanfilms. *Carbohydrates Polymers*, 68 (1), 146-158.

LABET, M., THIELEMANS, W. y DUFRESNE, A. (2007). Polymer grafting onto starch nanocrystals. *Biomacromolecule*, 8, 2916-2927.

LECORRE, D., BRAS, J. y DUFRESNE, A. (2010). Starch Nanoparticles: A Review. *Biomacromolecules* 11, 1139–1153.

LECORRE, D., BRAS, J. y DUFRESNE, A. (2010). Evidence of micro- and nanoscaled particles during starch nanocrystals preparation and their isolation. *Biomacromolecules*, 12, 3039-3046.

LI, C., LI, Y., SUN, P. y YANG, C. (2012). Starch nanocrystals as particle stabilizers of oil-in-water emulsions. *Journal of Science of Food Agriculture*, 94, 1802-1807.

LIN, Q., JI, N., LI, M., DAI, L., XU, X., XIONG, L. y SUN, Q. (2020). Fabrication of debranched starch nanoparticles via reverse emulsification for improvement of functional properties of corn starch films. *Food Hydrocolloids* 104, 105760.

LINAN (Laboratorio Nacional de Investigación en Nanociencias y Nanotecnología) [en línea] [fecha de consulta: 13 diciembre 2020]. Disponible en: [http://www.linan-ipicyt.mx/XRD\\_Bruker\\_D8\\_Advance.html](http://www.linan-ipicyt.mx/XRD_Bruker_D8_Advance.html)

LIU, C., GE, S., YANG, J., XU, Y., ZHAO, M., XIONG, L. y SUN, Q. (2016). Adsorption mechanism of polyphenols onto starch nanoparticles and enhanced antioxidant activity under adverse conditions. *Journal of Functional Foods* 26, 632–644.



LIU, D., WU, Q., CHEN, H. y CHANG, P.R. (2009). Transitional properties of starch colloid with particle size reduction from micro- to nanometer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 339 (1), 117-124.

MA, X., JIAN, R., CHANG, P.R. y YU, J. (2008). Fabrication and characterization of citric acid- modified starch nanoparticles/plasticized-starch composites. *Biomacromolecules* 20089 (11), 3314–3320.

MANAL, A.E.S. (2017). New technique in starch nanoparticles synthesis. *Carbohydrate Polymers* 176, 214–219.

MIDMORE, B.R. (1998). Preparation of novel silica–stabilize oil/water emulsion. *Colloids and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects*, 132, 257-265.

NAKASHIMA, T. y KIMIZUKA, N.J. (2003). Interfacial synthesis of hollow TiO<sub>2</sub> microspheres in ionic liquids. *American Chemical Society*, 125, 6386.

NAMAZI, H., FATHI, F. y DADKHAH, A. (2011). Hydrophobically modified starch using long chain fatty acids for preparation of nanosized starch particles. *Scientia Iranica C*, 18, 439–445.

NEELAM, K., VIJAY, S. y LALIT, S. (2012). Various techniques for the modification of starch and the applications of its derivatives. *International Research Journal of Pharmacy*, 3, 25–31.

PROTESESCU, L., YAKUNIN, S., NAZARENKO, O., DIRIN, D.N. y KOVALENKO, M.V. (2018). Low-Cost Synthesis of Highly Luminescent Colloidal Lead Halide Perovskite Nanocrystals by Wet Ball Milling. *ACS Appl. Nano Mater.*, 1, 1300–1308.

PUTAUX, J.L., MOLINA-BOISSEAU, S., MOMAUR, T. y DUFRESNE, A. (2003). Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. *Biomacromolecules*, 4, 1198-1202.

PUTSEYS, J.A., KAMBERTS, L. y DELCOUR, J.A. (2010). Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. *Journal of Cereal Science*, 51, 238–247.

QI, J., LAI, X., WANG, J., TANG, H., REN, H., YANG, Y., JUN, Q., ZHANG, L., YU, R., MA, G., SU, Z., ZHAO, H. y WANG, D. (2015). Multi-shelled hollow micro-/nanostructures. *Chemical Society Reviews*, 44, 6749–6773.



QIN, Y., WANG, J., QIU, C., HU, Y., XU, X. y JIN, Z. (2019). Effects of degree of polymerization on size, crystal structure, and digestibility of debranched starch nanoparticles and their enhanced antioxidant and antibacterial activities of curcumin. *ACS Sustain Chem Eng*, 7, pp. 8499-8511.

QUINTANA GARGÍA, A. J. (2011). Exposición sobre la Microscopía Electrónica de Barrido y el Microanálisis EDX, y el servicio que se proporciona en el edificio Severo Ochoa, de la Universidad de Oviedo, con los microscopios JEOL JSM-6100 con microanálisis EDX Inca energy-200 y JEOL JSM- 6610 LV con microanálisis EDX Inca energy-350.

RAJISHA, K.R., MARIA, H.J., POTHAN, L.A., AHMAD, Z. y THOMAS, S. (2014). Preparation and characterization of potato starch nanocrystals reinforced natural rubber nanocomposites. *International journal of Biological Macromolecules*, 67, 147-153.

RAMADHAN, K. y FOSTER, T.J. (2018). Effects of ball milling on the structural, thermal, and rheological properties of oat bran protein flour. *J. Food Eng.* 229, 50–56.

RAMISETTY, K.A., PANDIT, A.B. y GOGATE, P.R. (2013). Investigations into ultrasound induced atomization. *Ultrason. Sonochem.* 20 (1), 254–264.

RAO, J. P. y GECKELER, K. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36, 887–913.

ROSTAMABADI, H., FALSAFI, S.R. Y JAFARI, S.M. (2019). Starch-based nanocarriers as cutting-edge natural cargos for nutraceutical delivery. *Trends Food Sci Technol*, 88, 397-415.

SALONEN, J., LAITINEN, L., KAUKONEN, A.M., TUURA, J., BJÖRKQVIST, M., HEIKKILÄ, T., VÄHÄ-HEIKKILÄ, K., HIRVONEN, J. y LEHTO, V.P. (2005). Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: loading and release of five model drugs. *J. Control. Release* 108, 362–374.

SALVADOR, M., GUTIÉRREZ, G., NORIEGA, S., MOYANO, A., BLANCO-LÓPEZ, M.C. y MATOS, M. (2021). Microemulsion Synthesis of Superparamagnetic Nanoparticles for Bioapplications. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 427. <https://doi.org/10.3390/ijms22010427>

SANT, S. B. (2012). Nanoparticles: From Theory to Applications, Materials, and Manufacturing Processes - G. Schmid, 2nd ed., Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2010, vol 27, 1462-1463.



SCAI (Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación) [en línea] [fecha de consulta: 12 diciembre 2020]. Disponible en: <http://www.scai.uma.es/areas/micr/sem/sem.html>

SHI, A.M., LI, D., WANG, L.J., LI, B.Z., y ADHIKARI, B. (2011). Preparation of Starch-Bases Nanoparticles through High-Pressure Homogenization and miniemulsion Cross-Linking: Influence of Various process parameters on particle size and stability. *Carbohydr. Polym.* 83, 1604-1610.

SILVA, N.M.C., CORREIA, P.R.C., DRUZIAN, J.I., FAKHOURI, F.M. y FIALHO, R.L.L. (2017). PBAT/TPS composite films reinforced with starch nanoparticles produced by ultrasound. *International Journal of Polymer Science*, 4308261, 1–10.

SLIMINSKA, L., SZOSTED, A. y GRZESKOWIAK, A. (2002). Studies on enzymatic continuous production of cyclodextrins in an ultrafiltration membrane bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 50, 423-428.

SONG, D., THIO, Y.S. y DENG, Y. (2011). Starch nanoparticle formation via reactive extrusion and related mechanism study. *Carbohydrate Polymers*, 85, 211-214.

STEICHEN, S.D., MOORE, M.C. y PEPPAS, N.A. (2013). A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 416–427.

SUN, Q., FAN, H. y XIONG, L. (2014). Preparation and characterization of starch nanoparticles through ultrasonic-assisted oxidation methods. *Carbohydrate Polymers* 106, 359-364.

SUN, X., LIU, J. y LI, Y. (2006). Use of carbonaceous polysaccharide microspheres as templates for fabricating metal oxide hollow spheres. *Chemistry*, 12, 2039.

TARI, T.A., ANNAPURE, U.S., SINGHAL, R.S. y KULKARNI, P.R. (2003). Starch-based spherical aggregates: Screening of small granule sized starches for entrapment of a model flavouring compound, vanillin. *Carbohydrate Polymers*, 53 (1), 45-51.

THIELEMANS, W., BELGACEM, M.N. y DUFRESNE, A. (2006). Starch nanocrystals with large chain surface modifications. *Langmuir*, 22, 4804-4810.



TZOUMAKI, M.V., MOSCHAKIS, T. y BILIADERIS, C.G. (2011). Mixed aqueous chitin nanocrystal–whey protein dispersions: Microstructure and rheological behavior. *Food Hydrocolloids*, 25, 935-942.

WANG, R. (2004). The Chemistry of Nanomaterials - CNR Rao, A. Müller, AK Cheetham (eds), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2004. *Colloid. Polym. Sci.* 283, 234.

WANG, X., CHEN, H., LUO, Z. y FU, X. (2016). Preparation of starch nanoparticles in water in oil microemulsion system and their drug delivery properties. *Carbohydrate Polymers* 138, 192-200.

XU, Y., ZI, Y., LEI, J., MO, X., SHAO, Z., WU, Y., TIAN, Y., LI, D. y MU, C. (2020). pH-Responsive nanoparticles based on cholesterol/imidazole modified T oxidized-starch for targeted anticancer drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 233, 115858.

YIN, Y., LU, Y., GATES, B. y XIA, Y. J. (2001). Template-assisted self-assembly: A practical route to complex aggregates of monodispersed colloids with well-defined sizes, shapes, and structures. *American Chemical Society*, 123, 8718.

YUSOFF, A. y MURRAY, B.S. (2011). Modified starch granules as particle stabilizers of oil–in–water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25, 42-55.

## **APÉNDICES**



## A. LISTA DE SÍMBOLOS

- DLS: Dynamic Light Scattering
- EE: Eficacia de encapsulación / encapsulation efficiency
- NMR: Nuclear Magnetic Resonance
- NPAs: Nanopartículas de almidón
- O/W: Oil in Water
- O/W/O: Oil in Water in Oil
- SEM: Scanning Electron Microscope
- SNPs: Starch nanoparticles
- W/O: Water in Oil
- W/O/W: Water in Oil in Water
- XRPD: X-Ray Powder Diffraction