

ESTUDIO DEL PROCESO DE NANOENCAPSULACIÓN DE QUERCETINA POR
MEDIO DE NANO-PRECIPITACIÓN

CARLOS ALBERTO RIVERA PARRA

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
PROGRAMA DE QUÍMICA CON ÉNFASIS EN BIOQUÍMICA
SANTIAGO DE CALI

2017

ESTUDIO DEL PROCESO DE NANOENCAPSULACIÓN DE QUERCETINA POR
MEDIO DE NANO-PRECIPITACIÓN

CARLOS ALBERTO RIVERA PARRA

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO Y QUÍMICO

TUTOR

CONSTAIN HUGO SALAMANCA MEJÍA, Ph.D

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

PROGRAMA DE QUÍMICA CON ÉNFASIS EN BIOQUÍMICA

SANTIAGO DE CALI

2017

APROBADO POR:

Evaluador

Constain Salamanca Mejía, Ph.D

Tutor del Proyecto

Cali, Valle del Cauca

Enero 10 de 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le agradezco a Dios por darme paciencia y sabiduría durante toda mi carrera profesional. De igual forma a la Universidad Icesi por haberme formado como un profesional íntegro, por brindarme todas las herramientas y espacios necesarios para culminar ambas carreras. A mi tutor y amigo Constan Salamanca, por su gran apoyo en la planeación y realización del proyecto; por su atención, sus regaños y enseñanzas, las cuales aportan mucho en mi desarrollo profesional. De igual forma, quiero agradecer al Dr. Guillermo Montoya por su ayuda incondicional con el uso de los rotaevaporadores, los cuales fueron indispensables para culminar el proyecto. A Duvan Castillo por su gran colaboración y por su vocación en la enseñanza, ya que gracias a él aprendí muchas cosas. Quiero agradecer a cada uno de los miembros del Grupo de Investigación de Físicoquímica Farmacéutica, por la colaboración y el aprendizaje de todos estos años, especialmente a Juan Diego Echeverri y Mario Andrés Palacio, ya que con ellos saque adelante estas dos carreras, así como todas y cada una de las experiencias que hemos vivido en estos seis años, llegando a tal punto que los considero como mis hermanos. Por otra parte, quiero agradecer a Coco, Manuela y Carolina (los de la ofi), también a Pablito y Jhony por todos los buenos y malos momentos vividos en estos años. A Valentina Gómez, porque ha sido una persona indispensable en estos últimos años (aunque ella no lo crea), porque ha sido mi mejor amiga tanto en la carrera como en mi vida, en las buenas y en las malas. Finalmente quiero agradecer a mis hermanas por toda la paciencia y el apoyo que me han dado durante estos años y a mis padres, por apoyarme en cada decisión que he tomado y por todo su apoyo incondicional, porque han luchado mucho para darme la oportunidad de estudiar, porque son las personas que me han formado desde pequeño y por ellos es que estoy culminando esta grandiosa etapa.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN DEL PROYECTO	11
2. ABSTRACT	12
3. INTRODUCCIÓN	13
4. DESCRIPCION DEL TRABAJO	14
4.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	14
4.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	15
4.2.1 Aspectos generales de la quercetina	15
4.2.2 Aspectos generales de los polímeros.....	15
4.2.3 Nanopartículas	16
4.2.3.1 Generalidades.....	16
4.2.3.2 Método de Nanoprecipitación	17
4.2.3.3 Consideraciones y parámetros fisicoquímicos	19
4.2.3.4 Factores que afectan los parámetros fisicoquímicos de las nanocapsulas.....	21
4.3 OBJETIVOS.....	23
4.3.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4.4 METODOLOGÍA PROPUESTA	24
4.4.1 Materiales.....	24
4.4.2 Obtención de nanocápsulas y optimización.	24
4.4.2.1 Nanoprecipitación	24
4.4.3 Concentración y purificación de las nanocápsulas.....	26
4.4.4 Caracterización de las nanocápsulas.....	26
4.4.4.1 Efecto de la concentración del polímero, la concentración del estabilizante y la velocidad de agitación.	27
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.5.1 Obtención de nanocápsulas mediante el método de nanoprecipitación	28
4.5.2 Concentración y purificación de las nanocápsulas.....	28
4.5.3 Caracterización de las nanocápsulas.....	29

4.5.3.1	<i>Efecto de la concentración de polímero</i>	36
4.5.3.2	<i>Efecto de la concentración de estabilizante</i>	37
4.5.3.3	<i>Efecto de la velocidad de agitación</i>	38
4.5.4	Análisis estadístico adicional.....	39
4.6	CONCLUSIONES.....	42
4.7	RECOMENDACIONES.....	43
5.	REFERENCIAS.....	44
6.	Anexos.....	47
6.1	Anexo 1. Curva de calibración de la quercetina.....	47
6.2	Anexo 2. Análisis complementario.....	48
6.2.1	Análisis estadístico.....	48
6.2.2	Superficie de respuesta.....	51

Listado de Tablas

Tabla 1. <i>Formulación sugerida para el método de Nanoprecipitación.....</i>	17
Tabla 2. <i>Formulación de la fase orgánica para el método de Nanoprecipitación. .</i>	24
Tabla 3. <i>Formulación de la fase acuosa para el método de Nanoprecipitación. ...</i>	25
Tabla 4. <i>Sistemas desarrollados a partir de los rangos establecidos en la literatura.</i>	27
Tabla 5. <i>Sistemas desarrollados utilizando valores centrales y axiales a partir de los rangos reportados en la literatura.....</i>	27
Tabla 6. <i>Valores de potencial zeta en agua para cada componente de la formulación.</i>	35
Tabla 7. <i>Variables codificadas y no codificadas utilizadas en el diseño central compuesto.</i>	39
Tabla 8. <i>Resultados del ANOVA y coeficientes de regresión sobre las variables de respuesta en función de los factores estudiados para el PCL.</i>	39
Tabla 9. <i>Resultados del ANOVA y coeficientes de regresión sobre las variables de respuesta en función de los factores estudiados para el PVA.</i>	40
Tabla 10. <i>Datos de la curva de calibración de la quercetina.</i>	47
Tabla 11. <i>Resultados del polímero PCL para el diámetro hidrodinámico (DH), potencial zeta (ζ) y eficiencia de encapsulación (%EE).</i>	49
Tabla 12. <i>Resultados del polímero PVA para el diámetro hidrodinámico (DH), potencial zeta (ζ) y eficiencia de encapsulación (%EE).</i>	50

Listado de Graficas

Gráfica 1. Caracterización de las nanopartículas de PCL utilizando rangos reportados en la literatura. Resultados de A) Diámetro hidrodinámico, B) Dispersidad, C) Potencial Zeta y D) Eficiencia de encapsulación.....	29
Gráfica 2. Caracterización de las nanopartículas de PCL utilizando puntos centrales y axiales. Resultados de A) Diámetro hidrodinámico, B) Dispersidad, C) Potencial Zeta y D) Eficiencia de encapsulación.	30
Gráfica 3. Caracterización de las nanopartículas de PVA utilizando rangos reportados en la literatura. Resultados de A) Diámetro hidrodinámico, B) Dispersidad, C) Potencial Zeta y D) Eficiencia de encapsulación.....	31
Gráfica 4. Caracterización de las nanopartículas de PVA utilizando puntos centrales y axiales. Resultados de A) Diámetro hidrodinámico, B) Dispersidad, C) Potencial Zeta y D) Eficiencia de encapsulación.	32
Gráfica 5. Distribución de tamaños de partícula para nanocápsulas de A) PCL y A) PVA.....	33
Gráfica 6. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para el Diámetro hidrodinámico (DH) del PCL en función de A) velocidad de agitación y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de estabilizante y C) cantidad de estabilizan.	51
Gráfica 7. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para el potencial zeta (ζ) del PCL en función de A) cantidad de estabilizante y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de polímero y C) velocidad de agitación y cantidad.	51
Gráfica 8. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para la eficiencia de encapsulación (%EE) del PCL en función de A) cantidad de estabilizante y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de estabilizante y C) velocidad de agitación y cantidad de polímero.	52
Gráfica 9. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para el Diámetro hidrodinámico (DH) del PVA en función de A) cantidad de estabilizante y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de estabilizante y C) velocidad de agitación y cantidad de polímero.	52
Gráfica 10. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para el potencial zeta (ζ) del PVA en función de A) cantidad de estabilizante y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de estabilizante y C) velocidad de agitación y cantidad de polímero.	52
Gráfica 11. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para la eficiencia de encapsulación (%EE) del PVA en función de A) cantidad de estabilizante y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de estabilizante y C) velocidad de agitación y cantidad de polímero.	53
Gráfica 12. Contorno en 3D para PCL que involucra los tres factores de estudio para determinar A) DH (nm), B) ζ (mV) y C) Eficiencia de encapsulación (%EE). 53	53

Gráfica 13. Contorno en 3D para PVA que involucra los tres factores de estudio para determinar A) DH (nm), B) ζ (mV) y C) Eficiencia de encapsulación (%EE). 53

Listado de Figuras

Figura 1. Estructura química de la quercetina.....	15
Figura 2. Estructura química del PCL.	16
Figura 3. Estructura química del PVA.	16
Figura 4. Esquema del proceso de preparación de nanocápsulas por el método de Nanoprecipitación.	18
Figura 5. Estructura química del Poloxámero 188.	19
Figura 6. Estructura química del Miglyol.	19
Figura 7. Patrones de dispersión en partículas de diferentes tamaños, mostrando la diferencia entre la dispersión de Rayleigh y la dispersión de Mie. Tomado de (Bhattacharjee, 2016).	20
Figura 8. Diagrama que explica el modelo de la doble capa eléctrica. Tomado de (Bhattacharjee, 2016).	21
Figura 9. Sistema de dosificación de la fase orgánica en la acuosa.	25
Figura 10. A. Apariencia traslucida de la fase acuosa, B. Apariencia traslucida de la fase orgánica, C. Aparición del efecto Tyndall por la adición de la fase orgánica en la acuosa.....	28
Figura 11. Reacción de hidrólisis del Polivinil acetato para producir Polivinil alcohol.	34
Figura 12. Reacción de hidrólisis del PCL.	34
Figura 13. Reacción de hidrólisis del triglicérido componente del Miglyol.....	35
Figura 14. Curva de calibración de Quercetina.....	47

1. RESUMEN DEL PROYECTO

Este proyecto busca proveer información sobre los efectos de las variables de desarrollo de nanocapsulas de quercetina, la cual corresponde a un ingrediente natural con actividad antioxidante y con potencial aplicación para el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer. Para el desarrollo de las nanocápsulas se utilizaron los materiales poliméricos Policaprolactona (PCL) y Polivinil Alcohol (PVA) y se empleó la técnica de nanoprecipitación. Para cada nano sistema se realizó una caracterización fisicoquímica donde se evaluaron los efectos de concentración del polímero utilizado, la cantidad del estabilizante usado y la velocidad de agitación sobre el diámetro hidrodinámico, la dispersidad de tamaño, el potencial zeta y la eficiencia de encapsulación de la quercetina. Se encontró que los diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas presentaron tamaños con valores que oscila entre 120 y 650 nm para ambos polímeros, presentando mayores tamaños para PCL en comparación con PVA. Por otra parte, que los valores de potenciales zeta fueron negativos y menores a -30 mV para todos los sistemas evaluados. Además, se encontró que las eficiencias de encapsulación estuvieron entre el 80 y 99% para ambos polímeros. Para concluir, la concentración de polímero influye en el tamaño, la dispersidad y la eficiencia de encapsulación de las nanocapsulas de PCL; mientras que, para las nanocapsulas de PVA solo influye en el potencial zeta. Con respecto a la concentración de estabilizante, esta presenta influencia en el tamaño de los sistemas de PCL y también influye en el tamaño y eficiencia de encapsulación de los sistemas de PVA. Finalmente, la velocidad de agitación influye en el tamaño y la eficiencia de encapsulación de las nanopartículas de PCL, por el contrario, ésta solo influye en la dispersidad del PVA.

Palabras clave: nanoprecipitación, quercetina, nanocápsulas.

2. ABSTRACT

This project seeks to obtain information about the effects of the variables on the development of nanocapsules of quercetin, which corresponds to a natural ingredient with antioxidant activity and a potential application in the treatment of Alzheimer's disease. For the development of the nanocapsules, polymeric materials Policaprolactone (PCL) and Polivinil Alcohol (PVA) and the technique of nanoprecipitation were used. For each nanosystem, a physical chemistry characterization was conducted to evaluate the effects of the concentration of the polymer used, the amount of stabilizer used and the agitation rate on the hydrodynamic diameter, the size dispersal, the zeta potential and the efficiency of the encapsulation of the quercetin. The hydrodynamic diameters of the nanoparticles showed sizes with values between 120 and 650 nm for both polymers with PCL sizes being larger than PVA. On the other hand, the values of the zeta potential were negative and lower than -30mV for all the evaluated systems. Additionally, the encapsulation efficiencies were between 80 and 99% for both polymers. To conclude, the concentration of polymer employed influences the size, the dispersal and the efficiency of encapsulation of the PCL nanocapsules whereas the concentration of PVA only influences the zeta potential of the nanocapsules. Furthermore, the stabilizer concentration influences the size of the PCL system and the size and encapsulation efficiency of the PVA system. Finally, the agitation rate affects the size and encapsulation efficiency of PCL nanoparticles while only affecting the size dispersal of PVA nanoparticles.

Keywords: nanoprecipitation, quercetine, nanocapsules

3. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la nanotecnología es una de las áreas de investigación más atractivas, debido a la inmensidad de aplicaciones y su importancia en varios sectores como el farmacéutico y alimenticio (Noronha et al., 2013). En cuanto al sector farmacéutico, el estudio de nanosistemas es atractivo debido a la capacidad de entregar el medicamento en el lugar correcto, a la dosis correcta y en el momento correcto (Motwani et al., 2008). Adicionalmente, las nanopartículas pueden mejorar características, como la baja solubilidad o la baja permeabilidad, de las sustancias que estén transportando, tales como la solubilidad de sustancias poco miscibles en agua, incremento en la permeabilidad de membranas biológicas, protección contra cambios bruscos de pH, degradación enzimática, oxidación entre otros (Khoee & Yaghoobian, 2009).

Existen diferentes metodologías para la nanoencapsulación de sustancias, tales como nanoprecipitación, emulsificación – difusión, emulsificación – coacervación, doble emulsificación, recubrimiento de polímero y capa por capa (Mora-Huertas, Fessi, & Elaissari, 2010). Todas estas técnicas difieren en la metodología de preparación, las diferencias de tamaños obtenidas y la eficiencia de encapsulación de la sustancia de interés. Cabe resaltar que la técnica más utilizada es nanoprecipitación, ya que es más fácil su preparación y la alta eficiencia de encapsulación que se puede conseguir. Existen reportes de nanoencapsulación de medicamentos como Indometacina (Raffin Pohlmann, Weiss, Mertins, Pesce da Silveira, & Stanisçuaski Guterres, 2002), Tacrolimus (Nassar, Rom, Nyska, & Benita, 2009) y algunas sustancias con fines alimenticios como el α – tocoferol (Noronha et al., 2013). Por otra parte, la quercetina es un flavonoide el cual es utilizado para prevenir estrés oxidativo en pacientes con Alzheimer. Estas características antioxidantes son conferidas por su estructura química, pero al mismo tiempo hace que su solubilidad en agua sea muy baja, sin dejar de lado que su permeabilidad de membranas es limitada. Todas estas características hacen de este fármaco no sea la primera elección en dichas patologías.

Con base en los anteriores antecedentes, el proyecto fue desarrollado con el objetivo de optimizar las condiciones para el desarrollo de nano capsulas de quercetina empleando dos utilizando dos materiales poliméricos correspondientes a Policaprolactona y Polivinil Alcohol. Para ello, se evaluaron los efectos de la concentración del polímero utilizado, la cantidad del estabilizante usado y la velocidad de agitación sobre el diámetro hidrodinámico, la dispersidad de tamaño, el potencial zeta y la eficiencia de encapsulación.

4. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

4.1 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

La nanoencapsulación de fármacos por medio de la metodología de Nanoprecipitación ha sido ampliamente utilizada en la actualidad, debido a que se consiguen eficiencias de encapsulación por arriba del 80% (Stella et al., 2007). Existen reportes de la encapsulación de algunos antibióticos, antioxidantes, antineoplásicos, inmunosupresores entre otras sustancias. Por otra parte, se ha reportado la nanoencapsulación de Indometacina por medio de Nanoprecipitación, utilizando polímeros como PCL o PLA, con un núcleo oleoso compuesto de aceite mineral o monoésteres de sorbitan, donde el solvente es acetona y el no solvente es agua acompañada de polisorbato 80 como agente estabilizante (Pohlmann et al., 2008; Raffin Pohlmann et al., 2002). Igualmente, para solventar el problema de la biodisponibilidad del Tacrolimus (fármaco inmunosupresor) administrado por vía oral, se nanoencapsuló por esta misma metodología, utilizando Eudragit RS y Eudragit L como polímeros, aceite de argan (Nassar et al., 2009). Finalmente, la cantidad de fármacos que se han encapsulado, muestra que estos sistemas son una gran alternativa para solucionar problemas como la degradación enzimática, la baja biodisponibilidad o cualquier otro problema que afecte la funcionalidad del fármaco (Quintanar-Guerrero, Allémann, Doelker, & Fessi, 1998). Finalmente, es importante conocer que existen variables operacionales que pueden afectar características como el tamaño de partícula, el potencial zeta y la eficiencia de encapsulación; entre las cuales destacan la cantidad de polímero, la cantidad de estabilizante y la velocidad de agitación (Mora-Huertas et al., 2010).

La propuesta del proyecto consiste en la optimización del proceso de nanoencapsulación del fármaco quercetina (el cual presenta baja solubilidad en agua y posee una capacidad limitada para permear membranas biológicas, la cual hace que sea un fármaco modelo excepcional para el estudio), con el fin de proveer información acerca de la influencia de las variables de estudio sobre las tres diferentes respuestas.

4.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.2.1 Aspectos generales de la quercetina

La quercetina (figura 1), es un flavonoide que se utiliza para combatir el estrés oxidativo generado por la enfermedad del Alzheimer (Bei et al., 2007). Esta molécula se puede encontrar en extractos herbales con efectos neuroprotectores. Su estructura química se compone de un núcleo C6-C3 (un anillo aromático unido a un heterociclo de oxígeno), de igual forma esta estructura se enlaza a otro núcleo C6 (anillo aromático de 6 miembros). Adicionalmente, se puede apreciar la presencia de 6 grupos hidroxilo en la estructura, lo cual le confiere la capacidad de oxidarse (Afanas'ev, Dcrozko, Brodskii, Kostyuk, & Potapovitch, 1989), la cual se favorece por la estabilidad que confiere los anillos aromáticos a los radicales que se forman en dicho proceso. Por otra parte, la estructura hidrocarbonada hace que la molécula sea apolar, lo cual limita la solubilidad en medio acuoso.

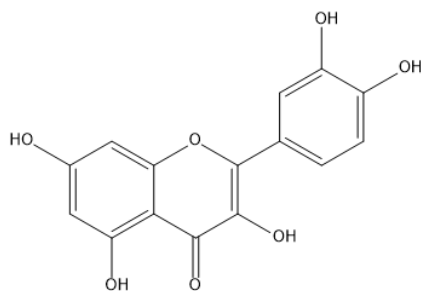


Figura 1. Estructura química de la quercetina.

4.2.2 Aspectos generales de los polímeros

El polímero poli-ε-caprolactona (PCL) es un poliéster de bajo peso molecular (Ver figura 1), el cual es susceptible a hidrólisis en condiciones fisiológicas. Esta característica hace que el PCL se utilice como polímero en sistemas de liberación modificada e implantes médicos, estas aplicaciones son debidas a las propiedades del polímero pero también se debe a su alta biocompatibilidad con el cuerpo humano, el único inconveniente asociado es la presencia de una irritación en la zona donde se ubica el implante.

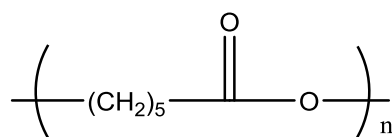


Figura 2. Estructura química del PCL.

Por otra parte, el polivinil alcohol (PVA) es un polímero sintético altamente soluble en agua y biodegradable (figura 2). El PVA tiene la capacidad de generar películas lo cual hace que sea un candidato favorable para la formación de nanocápsulas.

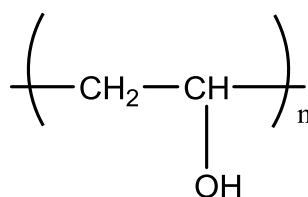


Figura 3.Estructura química del PVA.

4.2.3 Nanopartículas

4.2.3.1 Generalidades

Las nanopartículas se definen como sistemas coloidales sólidos, cuyo tamaño se encuentra dentro de la escala nanométrica, generalmente entre 100 – 500 nm, con un límite superior de aproximadamente 1000 nm. Asimismo, estos sistemas tienen la capacidad de almacenar, transportar y liberar gran variedad de sustancias. Por otra parte, las características de las nanopartículas confieren una mejoría en la solubilidad de sustancias poco miscibles con el agua y un incremento en la permeabilidad de membranas biológicas; además, crea un ambiente en donde el fármaco o sustancia es aislado de factores externos que puede afectar su estabilidad, como el pH, oxígeno, enzimas, entre otros (Khoee & Yaghoobian, 2009). Adicionalmente, estos sistemas llegan a ser biocompatibles con tejidos y células, si se desarrollan con materiales biodegradables.(Guinebretière, Briançon, Fessi, Teodorescu, & Blanchin, 2002).

Las nanoesferas y las nanocápsulas son sistemas nanoparticulados muy utilizados, la diferencia entre estas dos radica en la morfología y en la arquitectura del cuerpo. Las nanoesferas se encuentran formadas por una densa matriz de polímero, mientras que las nanocápsulas se componen de una membrana

polimérica que rodea un núcleo líquido, generalmente aceitoso, que se puede definir como una estructura núcleo – corteza (Quintanar-Guerrero, Allémann, Fessi, & Doelker, 1998); por otro lado, dicho núcleo puede contener fármaco en estado sólido, líquido o en forma de dispersión molecular. Sin embargo, dependiendo del método de preparación las nanocápsulas pueden transportar la sustancia activa en el interior del sistema o adsorbido a la superficie de la membrana polimérica. Adicionalmente, existen varias metodologías para la preparación de nanocápsulas, tales como, nanoprecipitación, emulsificación – difusión, emulsificación – coacervación, doble emulsificación, polímero – recubrimiento y capa por capa, en donde las primeras dos son las técnicas más utilizadas para la preparación de las nanocápsulas.

4.2.3.2 Método de Nanoprecipitación

La síntesis de nanocápsulas por esta metodología requiere del uso de una fase de solvente (fase orgánica) y una fase de no solvente (fase acuosa) (Fessi, Puisieux, Devissaguet, Ammoury, & Benita, 1989). En caso de que el fármaco sea hidrófobo, la fase orgánica se compone de un solvente apolar, un polímero (el cual servirá de recubrimiento del núcleo oleoso), un surfactante w/o (el cual emulsionará el agua en el aceite), un aceite (que será el núcleo del nanosistema y será medio para disolver el fármaco) y por último una sustancia activa. Por otra parte, la fase acuosa se compone de generalmente de agua como solvente y un agente estabilizante. En la tabla 1 se muestra una formulación con composiciones aproximadas para esta metodología (Mora-Huertas et al., 2010). Este procedimiento no es tan eficiente para encapsular fármacos hidrófilos (Pinto Reis, Neufeld, Ribeiro, & Veiga, 2006).

Tabla 1. Formulación sugerida para el método de Nanoprecipitación

Componente	Composición
Solvente	25 mL
Fármaco	10-25 mg
Polímero	0,2-0,5% (en gramos) del solvente
Aceite	1,0-5,0% (en gramos) del solvente
Agua	50 mL
Agente estabilizante	0,2-05% (en gramos) del no solvente

La formación rápida de las nanopartículas se puede explicar como un proceso debido a las diferencias en la tensión superficial, conocido como el efecto Gibbs-Marangoni (Mcmanamey, Davies, & Coe, 1973). Puesto que un líquido con una alta tensión superficial tira fuertemente sobre el líquido circundante en comparación con un líquido de baja tensión superficial. La diferencia entre las tensiones superficiales genera una turbulencia interfacial, la cual conlleva a la formación continua de remolinos en la interface de ambos líquidos. Por lo tanto, se da un desplazamiento violento del solvente desde la fase orgánica hasta la acuosa, por tanto, el polímero tiende a agregarse en la superficie de las gotículas de aceite y de esta manera se da la formación de las nanocápsulas (Quintanar-Guerrero, Allémann, Fessi, et al., 1998).

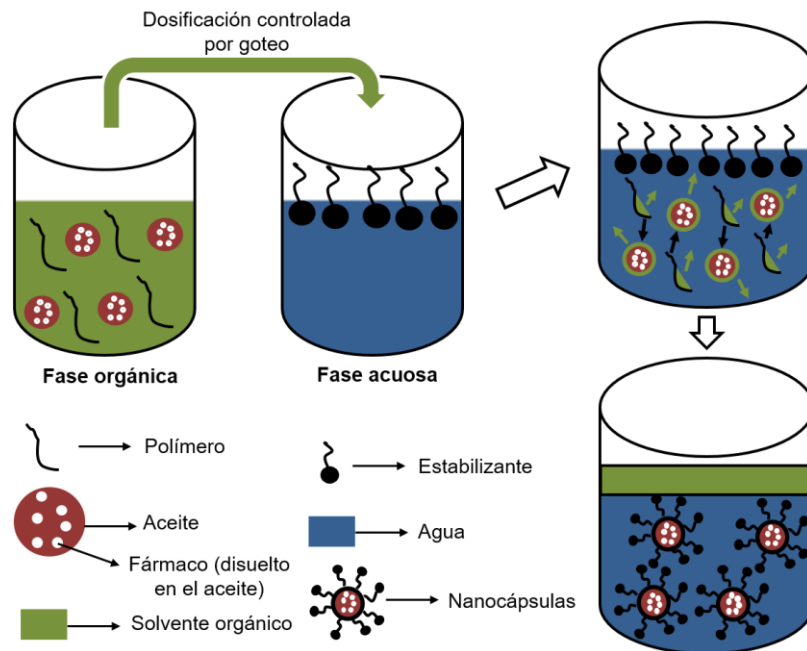


Figura 4. Esquema del proceso de preparación de nanocápsulas por el método de Nanoprecipitación.

Para esta metodología, suelen usarse polímeros biodegradables y biocompatibles. Poliésteres como la Policaprolactona (PCL), y polialcoholes como el Polivinil alcohol (PVA), son ampliamente utilizados (Mora-Huertas et al., 2010). De igual forma, se elige que el aceite y el estabilizante sean amigables con el medio ambiente y con el cuerpo humano, pero que a su vez eviten la solubilización del polímero, pues si sucede esto no se formarían las nanocapsulas. El poloxamer 188 (Ver figura 5) es un surfactante neutro, el cual se utiliza por su eficiencia para estabilizar sistemas heterogéneos y por su biodegradabilidad. Por otro lado,

aceites derivados de ácidos cáprico y caprílico, tienen la capacidad de disolver una gran cantidad de fármacos apolares. Por ejemplo, el Mygliol (Ver figura 6).

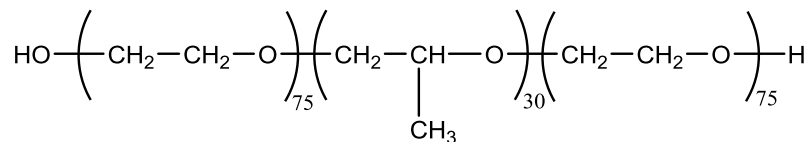


Figura 5. Estructura química del Poloxámero 188.

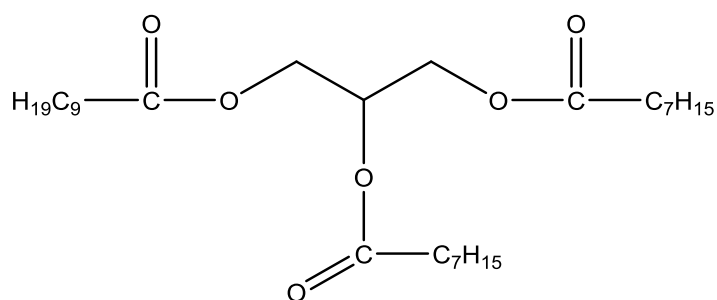


Figura 6. Estructura química del Miglyol.

4.2.3.3 Consideraciones y parámetros fisicoquímicos

Después de formar las nanocápsulas, estas deben pasar por unos pasos consecutivos en donde se remueve el solvente orgánico, el solvente acuoso y se purifican las nanocápsulas. Primero se requiere eliminar el solvente orgánico utilizando un equipo de rotaevaporación (facilita la remoción del solvente aumentando la presión y no la temperatura); posteriormente, se purifica la muestra ya sea realizando diafiltración (diálisis) o una filtración en gel. Después de este paso, se debe recuperar la fracción de nanocápsulas por medio de ultracentrifugación y finalmente, se realiza la caracterización fisicoquímica de los nanosistemas.

Adicionalmente, se determina el diámetro hidrodinámico promedio (tamaño promedio) de las nanocápsulas por medio de técnicas de dispersión de luz dinámica o DLS por sus siglas en inglés (Dynamic Light Scattering) (Alshamsan, 2014). Esta técnica relaciona el tamaño de partícula con el patrón de ángulos con que se dispersa la luz. Dependiendo del tamaño de la partícula, se da un tipo de dispersión diferente, cuando el tamaño de la partícula es menor a 1/10 de la longitud de onda incidente, se da una dispersión de tipo Rayleigh, es decir que la

luz dispersa, transporta la misma energía que la luz incidente. Por otra parte, cuando el tamaño de la partícula supera $1/10$ de la longitud de onda, la dispersión es de tipo Mie, es decir que la luz dispersa no tiene la misma energía que la incidente (ver figura 7)(Bhattacharjee, 2016).

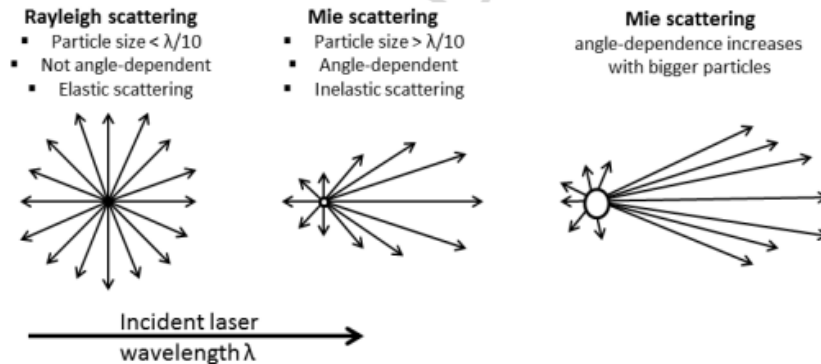


Figura 7. Patrones de dispersión en partículas de diferentes tamaños, mostrando la diferencia entre la dispersión de Rayleigh y la dispersión de Mie. Tomado de (Bhattacharjee, 2016).

Así mismo, es de vital importancia conocer el potencial zeta (ζ), que es la medida de la carga superficial que tienen las nanopartículas con respecto al medio en donde se encuentra, físicamente se puede entender como la diferencia entre el potencial superficial y la capa de deslizamiento (Bhattacharjee, 2016), adicionalmente, es importante conocer esta medida ya que se relaciona con la estabilidad del sistema, en la literatura se menciona que valores mayores a ± 20 mV se relacionan con una buena estabilidad. En la figura 8 se esquematiza el modelo de la doble capa eléctrica, la cual sirve para entender la medida del potencial zeta. Cuando una partícula está cargada, alrededor de esta se forma una capa de contraiones la cual es compacta, denominada como capa de Stern. Luego, los iones del medio se acomodan en torno a la capa de Stern por medio de interacciones de largo alcance, la cual se denomina como capa de deslizamiento.

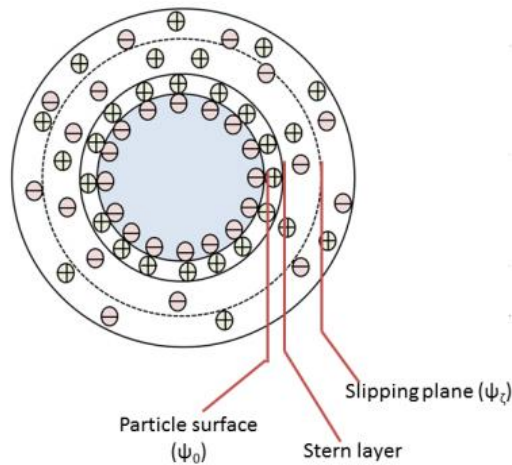


Figura 8. Diagrama que explica el modelo de la doble capa eléctrica. Tomado de (Bhattacharjee, 2016).

Para finalizar, un parámetro de mucho interés es la eficiencia de encapsulación, la cual da una idea de la cantidad de fármaco que se encuentra asociado o encapsulado a las nanopartículas. Dicho parámetro se determina de manera indirecta por medio de un espectrofotómetro UV. Antes de realizar la medición, la muestra se debe someter a ultracentrifugación, para posterior análisis de la concentración del fármaco libre en el sobrenadante (Miladi, Sfar, Fessi, & Elaissari, 2015). La eficiencia de encapsulación (%EE) se define matemáticamente como (1).

$$\%EE = 100 - \left(\frac{\text{Cantidad de fármaco libre en la muestra}}{\text{Cantidad total de fármaco en la formulación}} \times 100 \right) \quad (1)$$

4.2.3.4 Factores que afectan los parámetros fisicoquímicos de las nanocapsulas

Diversos factores operacionales y de los materiales, pueden afectar el tamaño de partícula, la dispersidad, el potencial zeta y la eficiencia de encapsulación de los nanosistemas. Entre las cuales destacan, la velocidad a la cual se agrega la fase orgánica en la acuosa, la velocidad de agitación del sistema, la cantidad de polímero a utilizar, la cantidad de estabilizante a usar, entre otras (Mora-Huertas et al., 2010).

Adicionalmente, también existen variables con respecto al polímero que pueden afectar las características de las nanopartículas. Entre las cuales destacan, la solubilidad del polímero y el peso molecular del polímero, el cual, entre más alto, genera mayor restricción para el desplazamiento del solvente orgánico, dificultando el proceso de formación de los nanosistemas (Romero-cano & Vincent, 2002).

4.3 OBJETIVOS

4.3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones óptimas, a escala de laboratorio, para la nanoencapsulación de quercetina utilizando los polímeros Policaprolactona (PCL) y Polivinil alcohol (PVA), por medio de la técnica de Nanoprecipitación.

4.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar nanocápsulas de quercetina mediante el método de Nanoprecipitación, a partir de dos materiales poliméricos correspondientes a Policaprolactona (PCL) y Polivinil Alcohol (PVA).
- Evaluar el efecto de la concentración del polímero sobre el diámetro hidrodinámico (D_H), la dispersidad de tamaño, el potencial zeta (ζ) y el porcentaje de encapsulación.
- Evaluar el efecto de la concentración del estabilizante sobre el diámetro hidrodinámico (D_H), la dispersidad de tamaño, el potencial zeta (ζ) y el porcentaje de encapsulación.
- Evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre el diámetro hidrodinámico (D_H), la dispersidad de tamaño, el potencial zeta (ζ) y el porcentaje de encapsulación.

4.4 METODOLOGÍA PROPUESTA

4.4.1 Materiales

La quercetina y los materiales poliméricos PVA y fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, y se usaron como se recibieron. El número molecular (Mn por sus siglas en inglés, molecular number) del PCL es de 45000 Da. Por otro lado, el PVA fue adquirido en rangos de peso molecular (Mw por sus siglas en inglés, molecular weight) el cual fue de 31000-50000 Da. Así mismo, el almacén de la universidad Icesi, fue el proveedor del estabilizante (Poloxámero 188), el aceite (Miglyol) y el solvente orgánico (acetona), estos fueron usados como se recibieron, sus correspondientes estructuras se encuentran más abajo. Finalmente, el agua ultra-pura fue producida con un sistema de purificación de agua Millipore Elix Essential, el cual se encuentra en las instalaciones de la Universidad Icesi.

4.4.2 Obtención de nanocápsulas y optimización.

4.4.2.1 Nanoprecipitación

La metodología para la obtención de nanocápsulas por nanoprecipitación está basada en la propuesta por Fessi et al. (Fessi et al., 1989). Se requieren de dos fases para la obtención de las nanocápsulas. La fase orgánica está compuesta por los siguientes componentes:

Tabla 2. Formulación de la fase orgánica para el método de Nanoprecipitación.

Componente	Material	Cantidad
Fármaco	Quercetina	15 mg
Aceite	Miglyol	0,5 mL
Solvente	Acetona	25 mL
Polímero	PCL (Policaprolactona) o PVA (Polivinil alcohol)	50 mg / 125 mg

Por otra parte, la formulación de la fase acuosa es la siguiente:

Tabla 3. Formulación de la fase acuosa para el método de Nanoprecipitación.

Componente	Material	Cantidad
No solvente	Agua	50 mL
Estabilizante	Poloxámero 188	100 mg / 250 mg

El desarrollo de las nanocápsulas se realizó, tal y como se describe a continuación: La fase orgánica se prepara, añadiendo la cantidad estipulada de polímero en 25 mL de acetona, la cual se agita a 500 RPM por una hora (recipiente A). Por otra parte, en un recipiente rotulado como B, se disuelven 15 mg de quercetina en 0,5 mL de Miglyol, luego de alcanzar una completa disolución, dicho contenido se adiciona por completo al recipiente A y se agita por 30 minutos más. Seguidamente, la fase acuosa, rotulada como C, se compone de la cantidad estipulada del estabilizante y 50 mL de agua ultra-pura, la cual se agita a 500 RPM hasta conseguir completa disolución. Cuando ambas fases están completas, se procede a la preparación de las nanocápsulas. Para ello, se debe adicionar de manera controlada la fase orgánica en la acuosa, utilizando un sistema de dosificación, ya sea por controlado manualmente, por medio de una bureta (ver figura 9). La fase orgánica se adiciona aproximadamente a 2mL/min y la agitación del sistema varía según el experimento. Una vez adicionada toda la fase orgánica, se deja el sistema en agitación por 10 minutos.

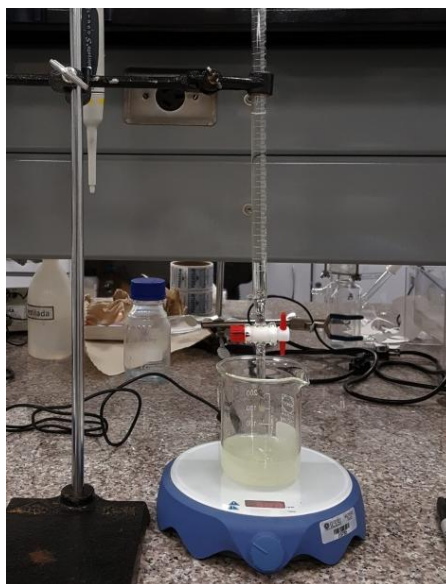


Figura 9. Sistema de dosificación de la fase orgánica en la acuosa.

4.4.3 Concentración y purificación de las nanocápsulas

La eliminación del solvente orgánico, se llevó a cabo mediante la aplicación de vacío y calor con un rotaevaporador marca Heidolph. Se utilizó un vacío inicial de 400 mbar, y se hicieron disminuciones de 100 mbar cada 10 minutos, hasta llegar a 100 mbar. La temperatura aplicada fue de 55°C y la velocidad de rotación 155 rpm. Adicionalmente, se eliminó el exceso de polímero precipitado por medio de filtración en vacío, utilizando un papel filtro cuantitativo. Por último, se midió el volumen resultante de la suspensión.

4.4.4 Caracterización de las nanocápsulas

La caracterización se realizó por medio de la determinación del diámetro hidrodinámico (D_H), la polidispersidad de tamaño y el potencial zeta (ζ), las cuales fueron determinadas mediante el equipo Z-sizer nano-ZSP, comercializado por Malvern Instrument. En cuanto a la preparación de la muestra, esta se hizo con dilución de 5:5000 (v/v) de la misma en agua y por triplicado.

El diámetro hidrodinámico fue medido por dispersión de luz dinámica, con un ángulo de detección de 173° a 25°C. Adicionalmente, el potencial zeta (ζ) se midió a través de la movilidad electroforética (μ). Adicionalmente, se evaluó la eficiencia de encapsulación de la quercetina mediante (1). La centrifugación se llevó a cabo con una microcentrífuga Hettich a una velocidad de 9700 RPM, y la muestra fue puesta en tubos VWR con filtro de 0,2 μm para optimizar la separación de las nanocápsulas y el sobrenadante. Para poder determinar la cantidad de fármaco libre en el sobrenadante, se realizaron medidas de absorbancia utilizando un espectrofotómetro Shimadzu acoplado a una termocupla. Para determinar la longitud de onda de máxima absorción, se realizó un barrido de 200-800 nm de la quercetina en una solución de 300 ppm en etanol-agua 4:1 respectivamente, debido a la baja solubilidad del fármaco en agua. El resultado fue 374 nm. Con este valor de longitud de onda, se realizó la curva de calibración, la cual se muestra en el anexo 1.

4.4.4.1 *Efecto de la concentración del polímero, la concentración del estabilizante y la velocidad de agitación.*

Inicialmente, se definieron condiciones de trabajo basados en la literatura y las cuales se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Sistemas desarrollados a partir de los rangos establecidos en la literatura.

Cantidad de polímero (mg)	Cantidad de estabilizante (mg)	Velocidad de agitación (RPM)
50	250	500
50	250	200
50	100	500
50	100	200
125	100	200
125	250	200
125	250	500
125	100	500

Posteriormente, se definieron tres condiciones más, utilizando valores centrales (entre los valores anteriores de cada variable) para mantener condiciones fijas, y valores superiores e inferiores, las cuales se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Sistemas desarrollados utilizando valores centrales y axiales a partir de los rangos reportados en la literatura.

Cantidad de polímero (mg)	Cantidad de estabilizante (mg)	Velocidad de agitación (RPM)
26,2625	175	350
148,7375	175	350
87,5	52,525	350
87,5	297,475	350
87,5	175	594,95
87,5	175	105,05
87,5	175	350

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1 Obtención de nanocápsulas mediante el método de nanoprecipitación

Al adicionar la fase orgánica en la acuosa, se empezaron a formar las nanopartículas, las cuales se encuentran en un rango de tamaño entre 1nm y 1000nm. Por esta razón, se da un cambio en la apariencia del medio, tornándose opalescente debido al efecto Tyndall. En la figura 10 se puede apreciar la apariencia de la fase acuosa, orgánica y el cambio al adicionar la fase orgánica en la acuosa.

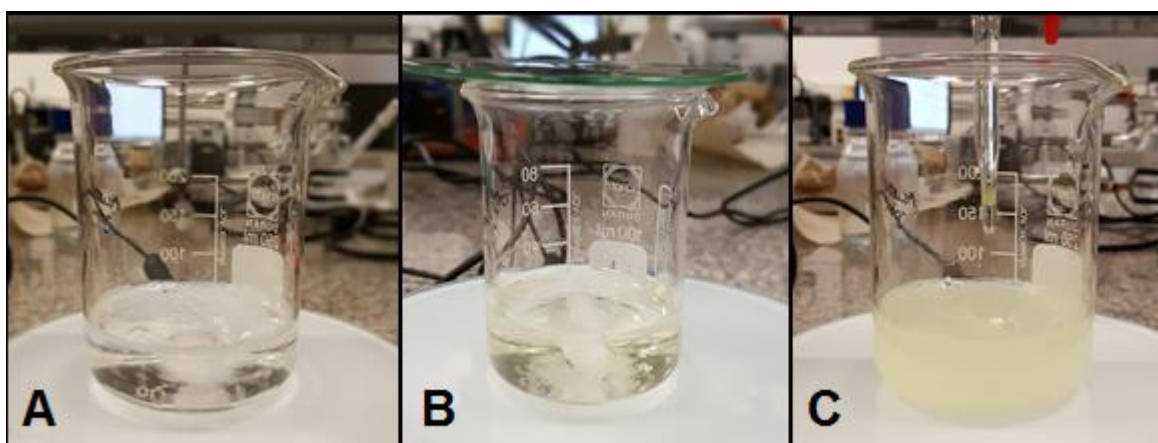


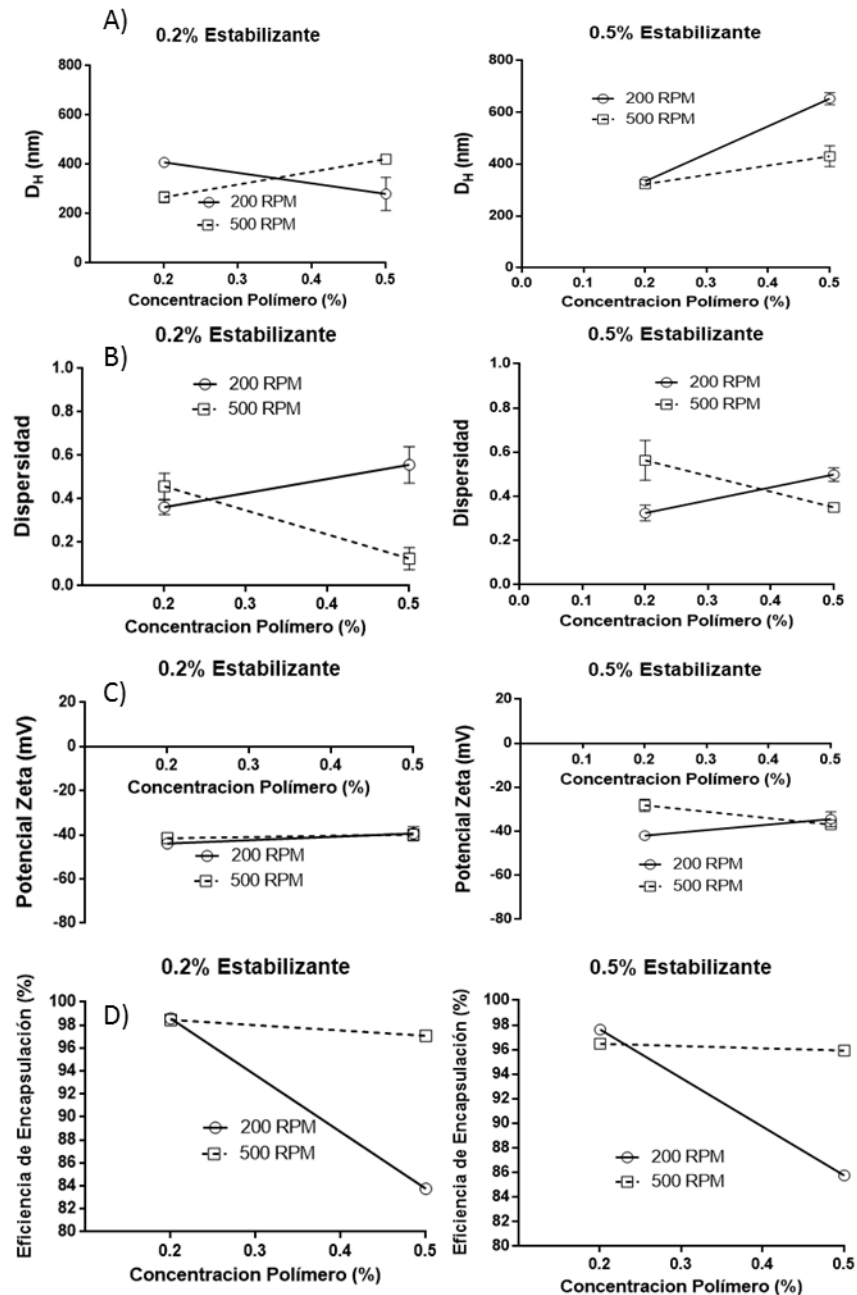
Figura 10. A. Apariencia traslucida de la fase acuosa, B. Apariencia traslucida de la fase orgánica, C. Aparición del efecto Tyndall por la adición de la fase orgánica en la acuosa.

4.5.2 Concentración y purificación de las nanocápsulas

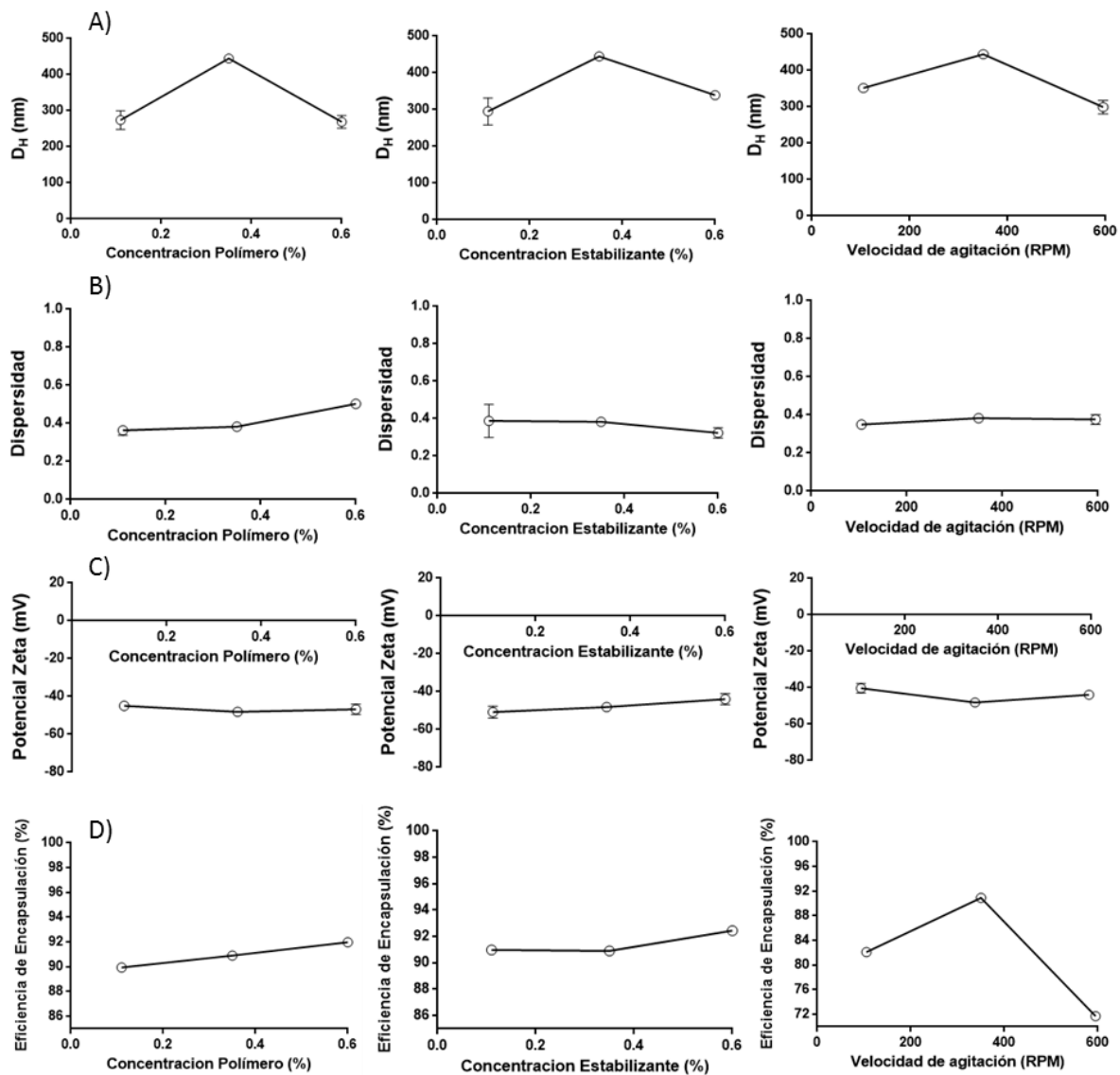
Cada suspensión fue rotaevaporada hasta eliminar la mayor parte de la acetona, para ello, se redujo el volumen a 50 mL o menos. Puesto que, el volumen total del sistema es aproximadamente 75 mL, correspondientes a 25 mL de la fase orgánica y 50 mL de la fase acuosa.

4.5.3 Caracterización de las nanocápsulas.

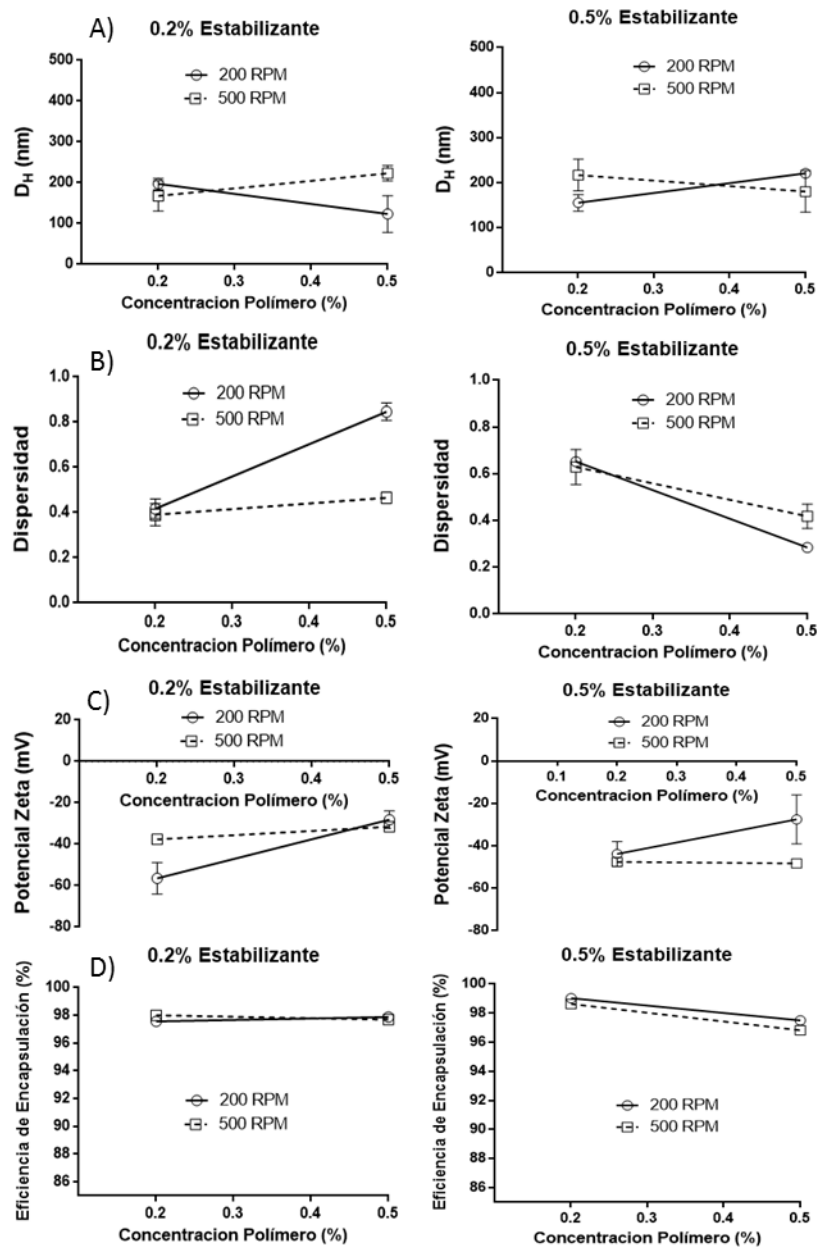
Inicialmente, se trabajó con los parámetros establecidos en la literatura, con el fin de observar si aumentaba, disminuía o se mantenía cada una de las respuestas.



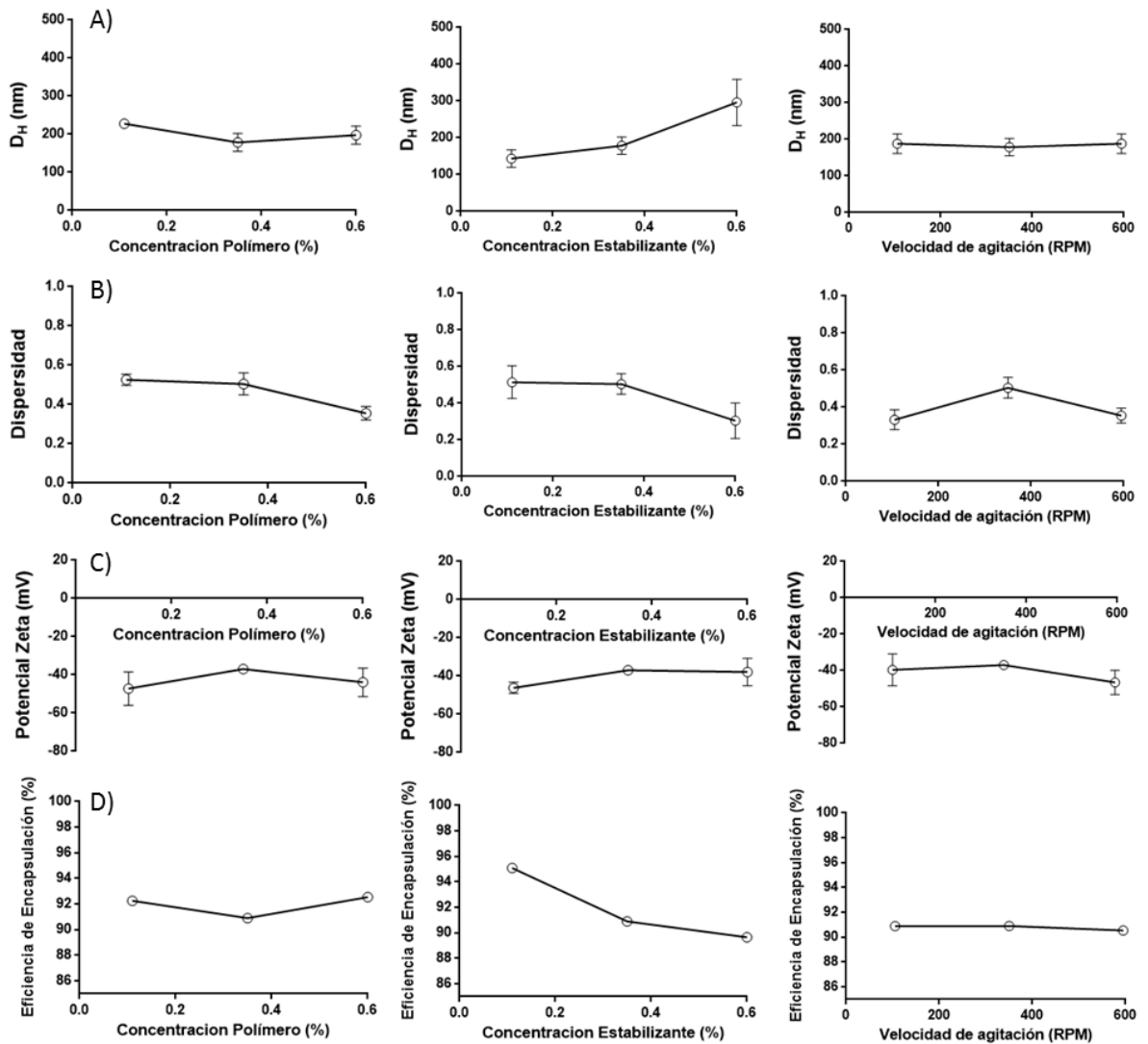
Gráfica 1. Caracterización de las nanopartículas de PCL utilizando rangos reportados en la literatura. Resultados de A) Diámetro hidrodinámico, B) Dispersidad, C) Potencial Zeta y D) Eficiencia de encapsulación.



Gráfica 2. Caracterización de las nanopartículas de PCL utilizando puntos centrales y axiales. Resultados de A) Diámetro hidrodinámico, B) Dispersidad, C) Potencial Zeta y D) Eficiencia de encapsulación.



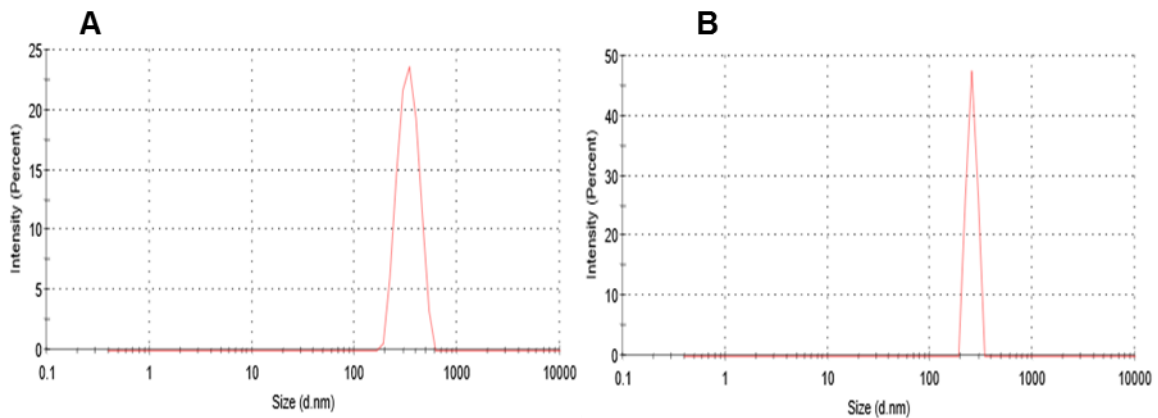
Gráfica 3. Caracterización de las nanopartículas de PVA utilizando rangos reportados en la literatura. Resultados de A) Diámetro hidrodinámico, B) Dispersidad, C) Potencial Zeta y D) Eficiencia de encapsulación.



Gráfica 4. Caracterización de las nanopartículas de PVA utilizando puntos centrales y axiales. Resultados de A) Diámetro hidrodinámico, B) Dispersidad, C) Potencial Zeta y D) Eficiencia de encapsulación.

En términos generales, para PCL se presentaron diámetros hidrodinámicos en un rango entre 250 y 670 nm, mientras que, para PVA, D_H se encuentra entre 120 y 350 nm. Ambos resultados son coherentes con los reportados en la literatura para

el método de nanoprecipitación (Mora-Huertas et al., 2010). Adicionalmente, el comportamiento es monomodal, en la gráfica 5 se muestra un ejemplo de tamaño de partícula para ambos polímeros, mostrando la distribución de una sola población de nanosistemas.



Gráfica 5. Distribución de tamaños de partícula para nanocápsulas de A) PCL y B) PVA.

Existe una clara diferencia en el tamaño de las nanopartículas de PCL y PVA. Esta diferencia puede deberse a que el PVA posee un monómero más polar que el PCL, razón por la cual tiene la capacidad de disolverse más fácil en medio acuoso. Claramente, cuando la fase orgánica, que contiene PVA, entra en contacto con la fase acuosa, el polímero se favorece más que el PCL en término de interacciones. Por ende, el desplazamiento del solvente es más efectivo, las nanocapsulas se forman con D_H más pequeños, debido a que no se da tiempo para que el polímero se agregue.

La dispersidad de los D_H del PCL, se encuentra en rangos entre 0.2 y 0.6, manteniéndose cercano a 0.3, lo cual indica buena homogeneidad en el D_H . Por otra parte, para el PVA, se encuentran dispersidades entre 0.3 y 0.8, manteniéndose cercano a 0.5. Cabe resaltar que el PVA se obtiene por la hidrólisis de acetato de polivinilo (ver figura 11)(Helvenston & Stewart, 1970), dicha reacción no es homogénea en todos los monómeros del acetato de polivinilo, por lo tanto, se generan fragmentos de diferentes tamaños moleculares. Por este motivo, el PVA se comercializa en un rango de pesos moleculares, lo cual afecta directamente en la dispersidad de los nanosistemas.

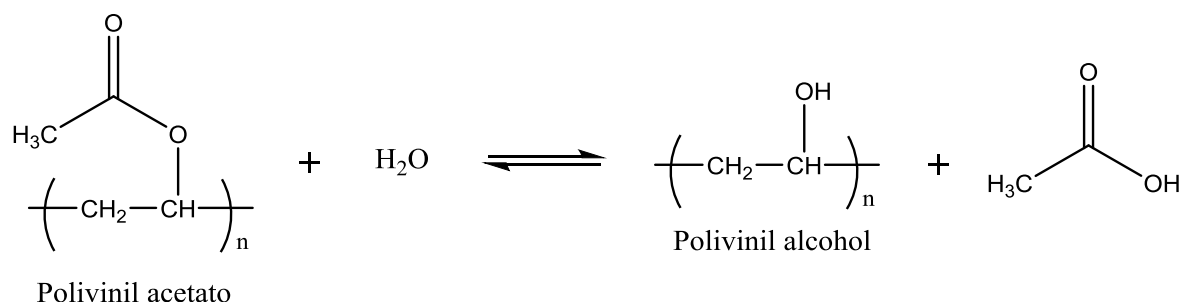


Figura 11. Reacción de hidrolisis del Polivinil acetato para producir Polivinil alcohol.

Los valores de potencial zeta para ambos polímeros se encuentran entre -29 y -55 mV, por lo que todos los sistemas se consideran termodinámicamente estables. El valor negativo del potencial zeta para las nanocápsulas preparadas a partir de PCL, se le atribuye principalmente al polímero, debido a la formación de ácidos carboxílicos ionizables, producto de la hidrolisis de los monómeros de dicho polímero (ver Figura 12), generando moléculas de ácido hexanóico el cual posee un pK_a de 4,88. Adicionalmente, es importante recalcar que el pH de los sistemas oscila entre 5,5 y 7,8 por lo que la superficie de las nanopartículas se van a encontrar cargadas negativamente, debido a que el pH está por arriba del pK_a del monómero.

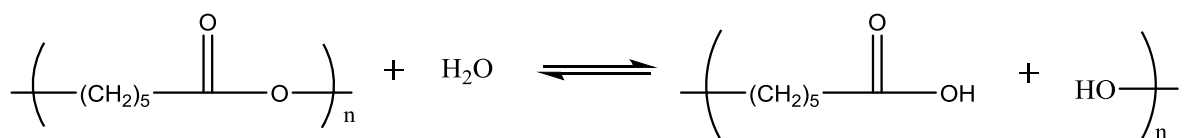


Figura 12. Reacción de hidrolisis del PCL.

No obstante, es interesante que un sistema preparado a partir de un polímero neutro, como el PVA, presente valores de potencial zeta negativos, cuando se esperarían valores neutros. A partir de esto, se sugiere que estos valores negativos se le pueden atribuir a los otros componentes de la formulación. Para comprobar dicha hipótesis, se realizó una serie de mezclas entre cada componente por separado con agua. Finalmente, se determinó el potencial zeta por triplicado para cada mezcla, mostrando el promedio de estos valores en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de potencial zeta en agua para cada componente de la formulación.

Mezcla binaria	Potencial Zeta (mV)
Agua - PVA	4,57
Agua - Poloxámero 188	-11,6
Agua - Miglyol	-18,9

A partir de los resultados anteriores, se evidencia que el PVA genera potenciales zeta muy cercanos a cero, como se esperaba. Por otro lado, el poloxámero 188 es un estabilizante neutro, pero puede generar potencial zeta negativos debido a impurezas remanente de la ruta sintética (Hassanzadeh, Feng, Pettersson, & Hakkarainen, 2015).

Siguiendo con la misma línea, el Miglyol se compone de un triglicérido proveniente de la esterificación entre el glicerol y los ácidos octanóico y decanóico, con valores de pK_a de 4,85 y 4,9, respectivamente (Moffat & Beckett, 1968). Por lo tanto, el Miglyol tiene la capacidad de hidrolizarse (ver figura 13). En consecuencia, el Miglyol que no fue encapsulado, está en constante interacción con la superficie de las nanocápsulas, sus parte apolar interacción con las cadenas alquílicas del polímero, mientras que los ésteres interaccionan con el medio acuoso, facilitando la hidrolisis y generando los respectivos ácidos carboxílicos que se encuentran ionizados ya que el pH del medio es mayor al pK_a de cada ácido; explicando así esos valores negativos de potencial zeta para las nanocápsulas de PVA.

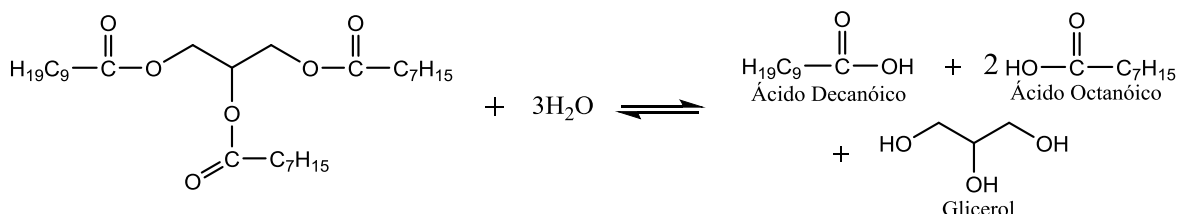


Figura 13. Reacción de hidrolisis del triglicérido componente del Miglyol.

Finalmente, las eficiencias de encapsulación para ambos polímeros, a excepción de una de PCL, oscilan entre 82 y 99%.

4.5.3.1 Efecto de la concentración de polímero.

Anteriormente, se discutió que el PCL genera nanocápsulas con diámetros hidrodinámicos más grandes en comparación con los nanosistemas de PVA, esto puede ser posible debido a la menor solubilidad que posee PCL en medio acuoso, afectando el desplazamiento del solvente. Dicho efecto se puede observar en la gráfica 2A, ya que al pasar de una concentración de 0.11% a 0.35% el D_H incrementa, pues el medio está más saturado. Por otra parte, al pasar de una concentración de 0.35% a 0.6%, el D_H decrece, este comportamiento se puede atribuir a la gran cantidad de polímero en el medio, el cual se puede agregar antes de formar nanosistemas, pero que al mismo tiempo deja una cierta cantidad disuelta de polímero el cual forma nanosistemas de D_H cercanos a 300 nm. De igual manera, en la gráfica 1A se puede apreciar un comportamiento diferente cuando se tiene una concentración de 0.2% del estabilizante, mientras que el D_H sigue esta misma tendencia cuando se tiene una concentración de 0.5% de estabilizante, este efecto se estudiara más a fondo en el siguiente apartado. Con respecto al PVA, no se observa la tendencia anterior; al ver la gráficas 3A – 4A, se puede mirar que no hay un cambio marcado en el D_H a medida que aumenta la concentración del polímero.

Con respecto a la dispersidad, al aumentar la concentración de PCL se generan dispersidades más altas (ver gráfica 2B), sin embargo al mirar la gráfica 1B se puede ver como este efecto cambia dependiendo de la velocidad de agitación, el cual se discutirá más abajo. Cabe resaltar que al formar nanosistemas de tamaños más grandes, las moléculas de polímero generan menos movimientos aleatorios, por lo tanto, las nanopartículas se pueden organizar de cierta manera la cual produce un menor número de poblaciones con diferentes tamaños. Por otro lado, no se observa una dependencia de la concentración de polímero con respecto a la dispersidad en el caso del PVA, sin embargo, los valores son altos en comparación con los obtenidos para el PCL. Lo anterior se explica en el apartado anterior.

Como se mencionó anteriormente, el PCL presenta valores negativos de potencial zeta debido a la hidrólisis del polímero. Observando las gráficas 1C y 2C, se puede apreciar que no existe una tendencia marcada al aumentar la concentración de polímero. Por otra parte, en el caso del PVA no se observa una tendencia en el potencial zeta.

Finalmente, la eficiencia de encapsulación de las nanopartículas de PCL, no presentan una dependencia con respecto a la concentración de polímero. Por otra parte, la eficiencia de encapsulación disminuye al aumentar la concentración de PVA.

4.5.3.2 Efecto de la concentración de estabilizante.

Al observar la gráfica 2A, para PCL, se puede apreciar como aumenta el D_H al pasar de una concentración de estabilizante baja a una concentración media, adicionalmente se puede apreciar como dicho D_H decrece al pasar a una concentración alta de estabilizante. El efecto anterior se puede explicar a partir de la estructura de una nanopartícula, ya que el estabilizante se puede ubicar en la capa que forma el nanosistema. A partir de lo anterior, a concentraciones bajas de estabilizante, pocas moléculas se podrán ubicar en la superficie que forma el nanosistema. A medida que aumenta la concentración de estabilizante, más moléculas se ubicaran en dicha capa aumentando el tamaño de las mismas. Con respecto a la gráfica 1A, se puede observar que al aumentar la concentración del estabilizante, aumenta el D_H . Por otra parte, para el PVA se puede observar que al aumentar la concentración de estabilizante, aumenta el DH (ver gráfica 4A). Con respecto a la gráfica 3A, se puede ver que al aumentar la concentración de estabilizante, aumenta, en algunos casos, el DH mientras que en otros decrece pero no considerablemente. El efecto anterior va muy de la mano con el cambio en la velocidad de agitación y la concentración del polímero.

La concentración de estabilizante, no parece afectar en gran medida la dispersidad. Al observar las gráfica 2B, se puede ver como la dispersidad no cambia al aumentar la concentración de estabilizante, de igual forma se puede observar en la gráfica 1B como la dispersidad tiene la misma tendencia para ambas concentraciones de polímero, lo cual indica que el cambio en estas depende más de la velocidad de agitación y la concentración de polímero. Con respecto al PVA, en la gráfica 4B se observa como hay cambios en la dispersidad, pero no son cambios muy drásticos por lo que no se le atribuye un efecto a la concentración de estabilizante. Por otra parte, en la gráfica 5B se observa como la dispersidad varia al aumentar la concentración de estabilizante, pero también va muy de la mano con la concentración de polímero y la naturaleza del polímero, lo cual se mencionó anterior.

Con respecto al potencial zeta, para el PCL no se aprecia una tendencia marcada al aumentar la concentración de estabilizante (ver gráfica 2C). Adicionalmente, en la gráfica 1C, se puede ver que no hay un efecto por parte de la concentración del estabilizante. Por otra parte, se puede apreciar que no existe un efecto por parte del cambio en la concentración de estabilizante (ver gráfica 4C), mientras que en la gráfica 3C, no se ven cambios en el potencial zeta.

Finalmente, no se aprecia un efecto marcado en la eficiencia de encapsulación de los sistemas preparados con PCL (ver gráfico 2D). Este mismo resultado se puede

ver en la gráfica 1D, se mantiene la tendencia para ambas concentraciones de estabilizante. Sin embargo, la eficiencia de encapsulación disminuye drásticamente pero en velocidades de 200 RPM, lo cual se va a discutir en el siguiente apartado. Con respecto al PVA, se presenta una disminución en la eficiencia de encapsulación a medida que aumenta la concentración del estabilizante (Ver gráfica 4D).

4.5.3.3 Efecto de la velocidad de agitación.

Para el PCL, se observa la misma tendencia que en los efectos anteriores, es decir que el D_H incrementa cuando se pasa de velocidades bajas a intermedias y disminuye cuando se pasa de velocidades intermedias a velocidades altas (ver gráfica 2A). Con respecto al PVA, no se observa dicha tendencia, los valores de D_H no se ven afectados de manera significativa por la velocidad de agitación.

Como se mencionó anteriormente, la dispersidad se asocia más a la polidispersidad del polímero. Observando la gráfica 2B, se puede ver que la velocidad no afecta mucho la dispersidad de los nanosistemas de PCL cuando se encuentra bajo las condiciones fuera de las reportadas en la literatura. En cambio, en la gráfica 1B, se puede ver que hay un efecto por parte de la velocidad de agitación. Por otra parte, en el caso del PVA, se puede ver que la dispersidad si cambia dependiendo de la velocidad de agitación (ver gráficas 3B – 4B). Lo anterior, también se puede relacionar con la naturaleza del polímero, debido a que la gran diferencia de pesos moleculares hace que a la hora de agitar se formen diferentes poblaciones de nanosistemas.

Para el PCL, no se observa un efecto de la velocidad de agitación sobre el potencial zeta (ver gráfica 2D). De igual manera, en la gráfica 1D se ve que la velocidad de agitación no afecta esta respuesta. Con respecto al PVA, se llega a la misma conclusión.

Finalmente, al observar la gráfica 2D, se puede ver como la eficiencia de encapsulación aumenta cuando se pasa de velocidades pequeñas a medianas pero decrece cuando se pasa de velocidades medianas a altas. Esto puede suceder si las altas velocidades facilitan la formación de nanocapsulas, evitando así que parte del fármaco disuelto en el aceite ingrese en el nanosistema. Por otra parte, al observar la gráfica 1D se puede ver que existe una gran diferencia en la eficiencia de encapsulación entre 200 RPM y 500 RPM, En cuanto al PVA, no se observa un efecto marcado en la eficiencia de encapsulación por parte de la velocidad de agitación (Ver gráficas 3D - 4D).

4.5.4 Análisis estadístico adicional.

De manera complementaria, se realizó un análisis por superficie de respuesta. En la tabla x se encuentran las variables de entrada con sus respectivos niveles de estudio (Ver Anexo 2).

Tabla 7. Variables codificadas utilizadas en el diseño central compuesto.

Variables no codificadas	Variable codificada	Niveles				
		*	-1	0	1	*
Cantidad de polímero (mg)	X ₁	26,3	50	87,5	125	148,7
Cantidad de estabilizante (mg)	X ₂	52,5	100	175	250	297,5
Velocidad de agitación (RPM)	X ₃	105,1	200	350	500	594,9

Los análisis de varianza (ANOVA) para el PCL (tabla 8) y para el PVA (tabla 9) mostraron que los datos experimentales no se ajustan adecuadamente al modelo estadístico. Debido a que, los coeficientes de regresión (R^2) para las respuestas de DH, ζ y %EE para el PCL son de 55,07%, 55,86%, 51,26%, respectivamente y para el PVA son de 49,45%, 70,96%, 45,37%, respectivamente. Por otra parte, El valor de R2 debe ser al menos del 85% para tener un buen ajuste al modelo (Noronha et al., 2013). Por este motivo, los modelos polinomiales cuadráticos obtenidos a partir de los datos experimentales no son adecuados para explicar el comportamiento de las variables independientes. Por los motivos anteriores, es recomendable ampliar un poco los niveles de estudio para encontrar una mejor curvatura.

Tabla 8. Resultados del ANOVA y coeficientes de regresión sobre las variables de respuesta en función de los factores estudiados para el PCL.

Termino	D _H (nm)		ζ (mV)		%EE	
	Coefficiente	Valor P	Coefficiente	Valor P	Coefficiente	Valor P
b_0	76	0,000	-25,1	0,000	114,7	0,000
b_1	1,98	0,183	- 0,079	0,930	- 0,512	0,294
b_2	1,10	0,192	- 0,083	0,135	- 0,135	0,989
b_3	0,71	0,389	- 0,0944	0,733	0,0666	0,824
b_{11}	- 0,0290	0,130	0,00165	0,175	0,00137	0,290
b_{22}	- 0,00419	0,363	0,000316	0,292	0,000392	0,229
b_{33}	- 0,00091	0,427	0,000167	0,040	- 0,000149	0,080

b_{12}	0,0188	0,127	- 0,000333	0,657	0,000168	0,835
b_{13}	0,00212	0,715	- 0,000424	0,271	0,00055	0,191
b_{23}	- 0,00233	0,428	0,000104	0,580	- 0,000046	0,818
R^2	55,07%		55,86%		51,26%	
R^2 -adj	14,64%		16,13%		7,40%	

b_0 = coeficiente de regresión, b_i = coeficiente lineal, b_{ij} = coeficiente cuadrático y b_{ij} = coeficiente de interacción. $D_H = Y1$, $\zeta = Y2$ y $\%EE = Y3$. Valores $p < 0,05$ son considerados significantes.

Tabla 9. Resultados del ANOVA y coeficientes de regresión sobre las variables de respuesta en función de los factores estudiados para el PVA.

Termino	D_H (nm)		ζ (mV)		%EE	
	Coeficiente	Valor P	Coeficiente	Valor P	Coeficiente	Valor P
b_0	229	0,000	-134,9	0,000	116,8	0,000
b_1	- 1,82	0,930	0,846	0,024	- 0,211	0,835
b_2	- 0,433	0,028	0,289	0,997	- 0,1087	0,563
b_3	0,237	0,618	0,1857	0,345	- 0,0364	0,919
b_{11}	0,00465	0,526	- 0,00162	0,178	0,001364	0,087
b_{22}	0,00165	0,373	- 0,000172	0,552	0,000340	0,088
b_{33}	- 0,000373	0,419	- 0,000060	0,408	0,000057	0,231
b_{12}	0,00324	0,493	- 0,000839	0,268	- 0,000149	0,754
b_{13}	0,00118	0,614	- 0,000873	0,035	- 0,000020	0,933
b_{23}	- 0,00026	0,826	- 0,000443	0,033	- 0,000015	0,901
R^2	49,45%		70,96%		45,37%	
R^2 -adj	3,96%		44,83%		0,00%	

b_0 = coeficiente de regresión, b_i = coeficiente lineal, b_{ij} = coeficiente cuadrático y b_{ij} = coeficiente de interacción. $D_H = Y1$, $\zeta = Y2$ y $\%EE = Y3$. Valores $p < 0,05$ son considerados significantes.

Las siguientes ecuaciones de segundo orden ilustran la relación de las tres variables con el tamaño de partícula, para PCL (2) y para PVA (3).

$$D_H = 76 + 1,98X_1 + 1,10X_2 + 0,71X_3 - 0,0290X_1^2 - 0,00419X_2^2 - 0,00091X_3^2 + 0,0188X_1X_2 + 0,00212X_1X_3 - 0,00233X_2X_3 \quad (2)$$

$$D_H = 229 - 1,82X_1 - 0,433X_2 + 0,237X_3 + 0,00465X_1^2 + 0,00165X_2^2 - 0,000373X_3^2 + 0,00324X_1X_2 + 0,00118X_1X_3 - 0,00026X_2X_3 \quad (3)$$

Las siguientes ecuaciones de segundo orden ilustran la relación de las tres variables con el ζ , para PCL (4) y para PVA (5).

$$\zeta = -25,1 - 0,079X_1 - 0,083X_2 - 0,0944X_3 + 0,00165X_1^2 + 0,000316X_2^2 + 0,000167X_3^2 - 0,000333X_1X_2 - 0,000424X_1X_3 + 0,000104X_2X_3 \quad (4)$$

$$\zeta = -134,9 + 0,846X_1 + 0,289X_2 + 0,1857X_3 - 0,00162X_1^2 - 0,000172X_2^2 - 0,000060X_3^2 - 0,000839X_1X_2 - 0,000873X_1X_3 - 0,000443X_2X_3 \quad (5)$$

Las siguientes ecuaciones de segundo orden ilustran la relación de las tres variables con el ζ , para PCL (6) y para PVA (7).

$$\%EE = 114,7 - 0,512X_1 - 0,135X_2 + 0,0666X_3 + 0,00137X_1^2 + 0,000392X_2^2 - 0,000149X_3^2 + 0,000168X_1X_2 + 0,000550X_1X_3 - 0,000046X_2X_3 \quad (6)$$

$$\%EE = 116,8 - 0,211X_1 - 0,1087X_2 - 0,0364X_3 + 0,001364X_1^2 + 0,000340X_2^2 + 0,000057X_3^2 - 0,000149X_1X_2 - 0,000020X_1X_3 - 0,000015X_2X_3 \quad (7)$$

4.6 CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la preparación de las nanocápsulas de quercetina, utilizando los polímeros PCL y PVA, por medio del método de nanoprecipitación. Esto se puede evidenciar por medio de la caracterización del diámetro hidrodinámico (D_H), los cuales se encuentran en escala nanométrica para ambos polímeros; así mismo, se realizó una caracterización de la carga superficial de cada sistema, encontrando que para ambos polímeros el potencial zeta (ζ) es siempre menor a -27 mV, indicando que los sistemas son estables. Por otra parte, se encontró que todos los sistemas, para ambos polímeros, encapsulan en un rango entre el 82% y 99%, a excepción de una eficiencia de encapsulación del PCL.

El diámetro hidrodinámico, de los sistemas de PCL, depende en gran medida de la concentración del polímero, la concentración del estabilizante y la velocidad de agitación. Por otra parte, los D_H del PVA, no dependen de la concentración de polímero ni de la velocidad de agitación, pero sí están en función de la concentración del estabilizante.

Adicionalmente, se encontró que la dispersidad del PCL depende en gran medida de la interacción entre la velocidad de agitación y la concentración del polímero, pero no depende de la concentración del estabilizante. Ahora bien, para el PVA, se encuentra una leve desentendencia por parte de la concentración del estabilizante y la velocidad de agitación, pero dicho efecto también va de la mano por la alta polidispersidad del polímero.

Así mismo, se explicó el valor negativo del potencial zeta de todos los nanosistemas, el cual se debe a la hidrólisis de los triglicéridos del aceite, la hidrólisis del PCL, para este caso, y la ruta sintética del Poloxamer 188. Adicionalmente, para el PCL, no existe una influencia de la concentración del polímero, la concentración del estabilizante ni la velocidad de agitación en el potencial zeta para ambos polímeros.

Finalmente, para PCL se encuentra que la velocidad de agitación genera eficiencias de encapsulación más bajas. Con respecto al PVA, solo se encontró que al aumentar la concentración de estabilizante y la concentración de polímero, disminuyen la eficiencia de encapsulación.

4.7 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés, Scanning Electron Microscope), o de microscopía de transmisión electrónica (TEM por sus siglas en inglés, Transmission Electron Microscopy), para tener información más acertada de la morfología de las nanocápsulas. Por otra parte, se recomienda profundizar los estudios sobre la disposición del fármaco en las nanocápsulas, con el fin de conocer si la quercetina se encuentra en el interior del sistema o se encuentra a nivel superficial.

Adicionalmente, se recomienda realizar una optimización de los parámetros operaciones teniendo en cuenta que se deben ajustar los niveles de cada factor, con el fin de encontrar una curvatura que permita dicha optimización.

5. REFERENCIAS

- Afanas'ev, I. B., Dcrozsko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., & Potapovitch, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, *38*(11), 1763–1769. [http://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90410-3](http://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90410-3)
- Alshamsan, A. (2014). Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *22*(3), 219–222. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.002>
- Bei, W., Peng, W., Zang, L., Xie, Z., Hu, D., & Xu, A. (2007). Neuroprotective effects of a standardized extract of Diospyros kaki leaves on MCAO transient focal cerebral ischemic rats and cultured neurons injured by glutamate or hypoxia. *Planta Medica*, *73*(7), 636–643. <http://doi.org/10.1055/s-2007-981532>
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Chopra, S., Patil, G. V., & Motwani, S. K. (2007). Release modulating hydrophilic matrix systems of losartan potassium: Optimization of formulation using statistical experimental design. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *66*(1), 73–82. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.09.001>
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, *55*(1), 1–4. [http://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](http://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)
- Guinebretière, S., Briançon, S., Fessi, H., Teodorescu, V. ., & Blanchin, M. . (2002). Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. *Materials Science and Engineering: C*, *21*(1–2), 137–142. [http://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00073-5](http://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00073-5)
- Hassanzadeh, S., Feng, Z., Pettersson, T., & Hakkarainen, M. (2015). A proof-of-concept for folate-conjugated and quercetin-anchored pluronic mixed micelles as molecularly modulated polymeric carriers for doxorubicin. *Polymer (United Kingdom)*, *74*, 193–204. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.08.005>
- Helvenston, E. P., & Stewart, D. A. (1970). *United States Patent 0*.

- Khoee, S., & Yaghoobian, M. (2009). An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *44*(6), 2392–2399. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.09.045>
- Mcmanamey, W. J., Davies, J. T., & Coe, J. R. (1973). The influence of molecular diffusion on mass transfer between turbulent liquids. *Chemical Engineering Science*, *28*, 1061–1069.
- Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H., & Elaissari, A. (2015). Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to in vitro studies. *Industrial Crops and Products*, *72*, 24–33. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.079>
- Moffat, A. C., & Beckett, A. H. (1968). The influence of alkyl substitution in acids on their performance in the buccal absorption test. *J. Pharm. Pharmac.*, *20*(Suppl.), 239–247. <http://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1968.tb09889.x>
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, *385*(1–2), 113–142. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>
- Motwani, S. K., Chopra, S., Talegaonkar, S., Kohli, K., Ahmad, F. J., & Khar, R. K. (2008). Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *68*(3), 513–525. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.09.009>
- Nassar, T., Rom, A., Nyska, A., & Benita, S. (2009). Novel double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of tacrolimus, a P-gp substrate drug. *Journal of Controlled Release*, *133*(1), 77–84. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.08.021>
- Noronha, C. M., Granada, A. F., de Carvalho, S. M., Lino, R. C., Matheus, M. V., & Barreto, P. L. M. (2013). Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. *Industrial Crops and Products*, *50*, 896–903. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.015>
- Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *2*(1), 8–21. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- Pohlmann, A. R., Mezzalira, G., Venturini, C. de G., Cruz, L., Bernardi, A., Jäger, E., ... Guterres, S. S. (2008). Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A

relation between light scattering and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, 359(1–2), 288–293.
<http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.007>

Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Doelker, E., & Fessi, H. (1998). Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research*, 15(7), 1056–62. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688060>

Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1998). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24(12), 1113–28. <http://doi.org/10.3109/03639049809108571>

Raffin Pohlmann, A., Weiss, V., Mertins, O., Pesce da Silveira, N., & Stanisçuaski Guterres, S. (2002). Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: Development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(4–5), 305–312.
[http://doi.org/10.1016/S0928-0987\(02\)00127-6](http://doi.org/10.1016/S0928-0987(02)00127-6)

Romero-cano, M. S., & Vincent, B. (2002). Controlled release of 4-nitroanisole from poly (lactic acid) nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 82, 127–135. [http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00130-X](http://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00130-X)

Stella, B., Arpicco, S., Rocco, F., Renoir, J., Cattel, L., & Couvreur, P. (2007). Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules, 344, 71–77.
<http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.06.006>

6. Anexos

6.1 Anexo 1. Curva de calibración de la quercetina

Tabla 10. Datos de la curva de calibración de la quercetina.

Absorbancia	Concentración (ppm)
0,057	1
0,153	2,5
0,385	5
0,553	7,5
0,746	10

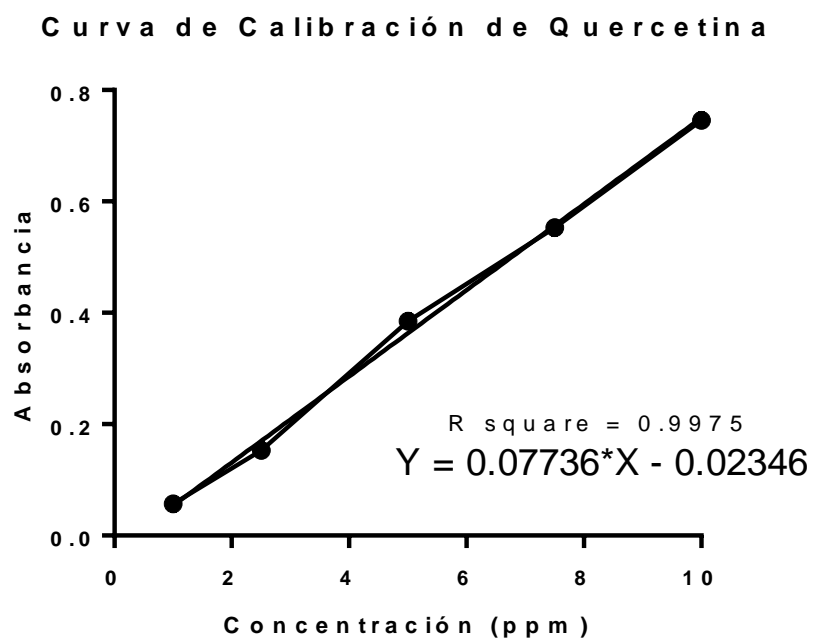


Figura 14. Curva de calibración de Quercetina.

6.2 Anexo 2. Análisis complementario

6.2.1 Análisis estadístico

Un diseño central compuesto es un diseño factorial con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales, los cuales permiten estimar la curvatura. Este se utiliza con el fin de optimizar una respuesta y evaluar los principales efectos, efectos cuadráticos y efectos de interacción de los factores sobre las respuestas de interés. A partir de este diseño estadístico, y utilizando un software estadístico, se definen los modelos no lineales cuadráticos para cada variable de respuesta el cual está dado por (8).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (8)$$

Donde Y es la respuesta asociada a combinación de factores; b_0 es el intercepto; b_1 a b_{33} son coeficientes de regresión calculados a partir de los valores experimentales observados de Y ; y X_1 , X_2 y X_3 son los niveles codificados de las variables independientes. Los términos X_1X_2 y X_i^2 ($i = 1, 2$ o 3) representan los términos de interacción y cuadráticos, respectivamente (Chopra, Patil, & Motwani, 2007).

Tabla 11. Resultados del polímero PCL para el diámetro hidrodinámico (DH), potencial zeta (ζ) y eficiencia de encapsulación (%EE).

Corrida	Variables independientes			Variables dependientes		
	X ₁ (mg)	X ₂ (mg)	X ₃ (RPM)	Y ₁ D _H (nm)	Y ₂ ζ (mV)	Y ₃ EE (%)
1	50	100	200	408,2	-43,9	98,57
2	125	100	200	280,2	-39,4	83,76
3	50	250	200	334,0	-42,0	97,63
4	125	250	200	652,8	-34,5	85,76
5	50	100	500	266,8	-41,5	98,45
6	125	100	500	421,8	-39,8	97,07
7	50	250	500	322,8	-28,2	96,47
8	125	250	500	454,0	-37,0	95,93
9	26,2625	175	350	274,0	-45,0	89,94
10	148,7375	175	350	269,0	-46,8	91,98
11	87,5	52,525	350	295,1	-50,8	90,98
12	87,5	297,475	350	339,5	-43,9	92,44
13	87,5	175	105,05	351,7	-40,3	82,12
14	87,5	175	594,95	299,3	-43,9	71,71
15	87,5	175	350	417,5	-50,1	93,29
16	87,5	175	350	473,8	-51,1	89,46
17	87,5	175	350	440,0	-36,7	88,71
18	87,5	175	350	479,7	-50,7	92,56
19	87,5	175	350	409,2	-49,1	91,89
20	87,5	175	350	449,3	-51,0	89,46

X₁= Cantidad de polímero, X₂ = Cantidad de estabilizante, X₃ = Velocidad de agitación.

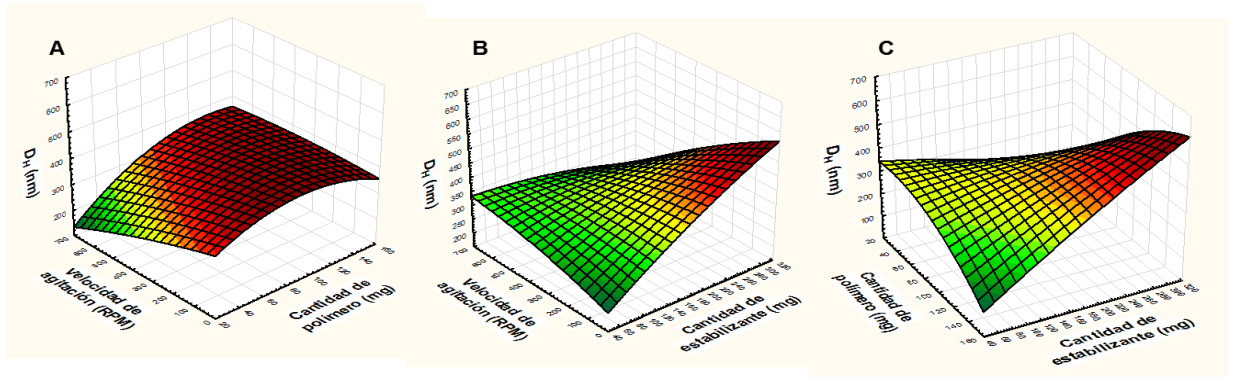
Tabla 12. Resultados del polímero PVA para el diámetro hidrodinámico (DH), potencial zeta (ζ) y eficiencia de encapsulación (%EE).

Corrida	Variables independientes			Variables dependientes		
	X ₁ (mg)	X ₂ (mg)	X ₃ (RPM)	Y ₁ D _H (nm)	Y ₂ ζ (mV)	Y ₃ EE (%)
1	50	100	200	197,2	-56,4	97,57
2	125	100	200	123,6	-28,1	97,88
3	50	250	200	155,6	-43,8	99,03
4	125	250	200	220,9	-27,5	97,50
5	50	100	500	167,8	-37,6	98,00
6	125	100	500	223,3	-31,6	97,70
7	50	250	500	217,2	-47,6	98,63
8	125	250	500	206,6	-48,3	96,82
9	26,2625	175	350	227,5	-47,2	92,25
10	148,7375	175	350	197,7	-43,9	92,54
11	87,5	52,525	350	143,5	-46,2	95,09
12	87,5	297,475	350	296,4	-37,9	89,66
13	87,5	175	105,05	188,0	-39,6	90,89
14	87,5	175	594,95	157,6	-46,6	90,54
15	87,5	175	350	180,6	-27,3	91,86
16	87,5	175	350	180,9	-39,7	89,66
17	87,5	175	350	194,0	-36,2	92,88
18	87,5	175	350	192,6	-39,7	90,66
19	87,5	175	350	168,6	-39,1	92,76
20	87,5	175	350	200,0	-39,1	87,84

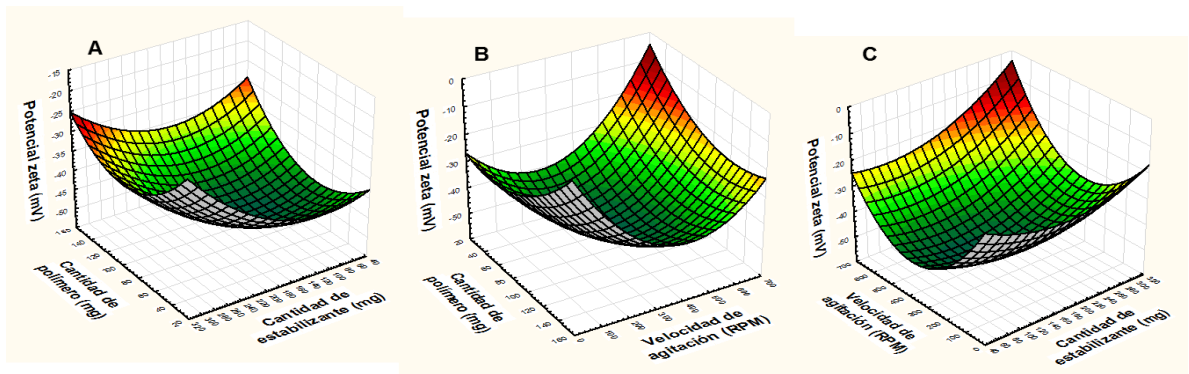
X₁= Cantidad de polímero, X₂ = Cantidad de estabilizante, X₃ = Velocidad de agitación.

6.2.2 Superficie de respuesta

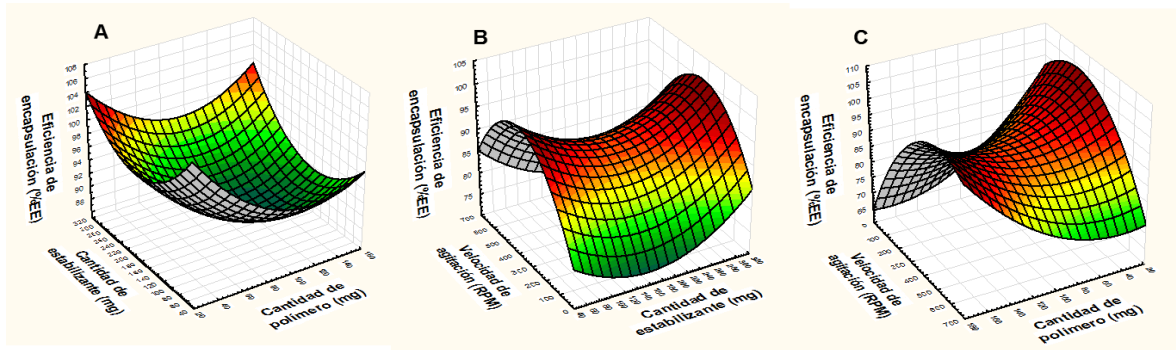
En las gráficas 6 - 11 se muestran las superficies de respuesta, las cuales son muy útiles para ver la interacción entre las variables independientes y casa una de las respuestas. En estos gráficos se puede ver el efecto de dos factores sobre una determinada respuesta, manteniendo los otros factores constantes (Motwani et al., 2008).



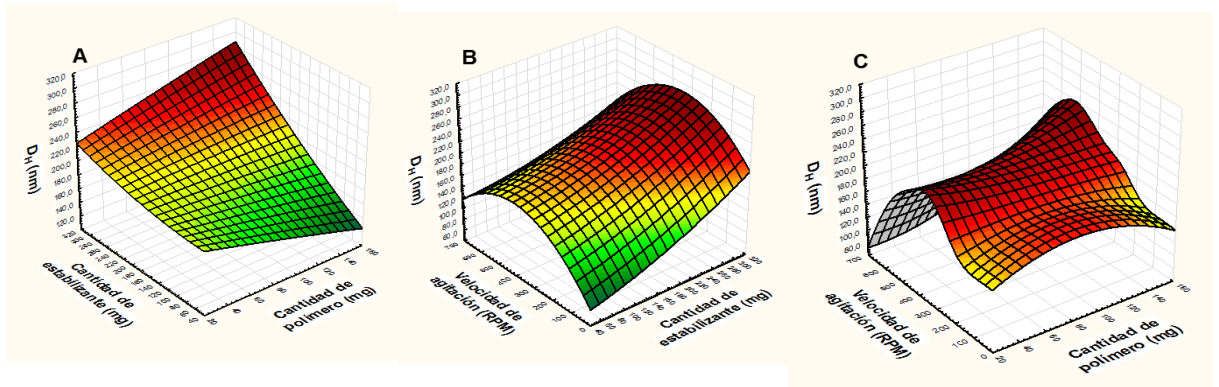
Gráfica 6. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para el Diámetro hidrodinámico (DH) del PCL en función de A) velocidad de agitación y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de estabilizante y C) cantidad de estabilizante.



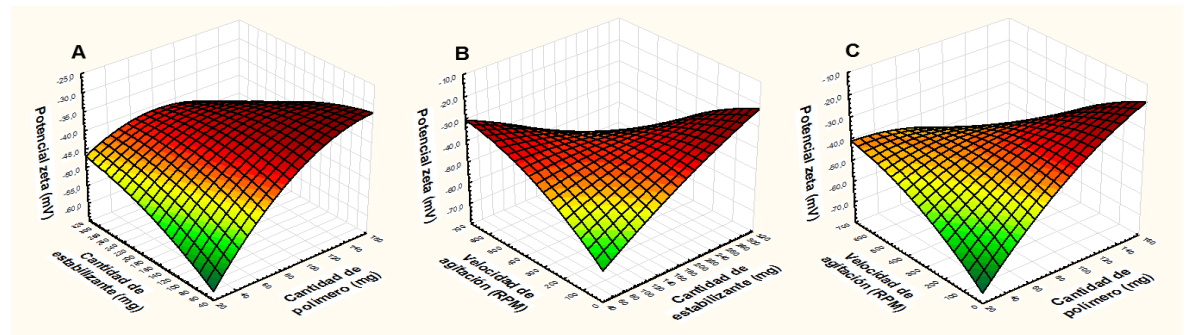
Gráfica 7. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para el potencial zeta (ζ) del PCL en función de A) cantidad de estabilizante y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de polímero y C) velocidad de agitación y cantidad de estabilizante.



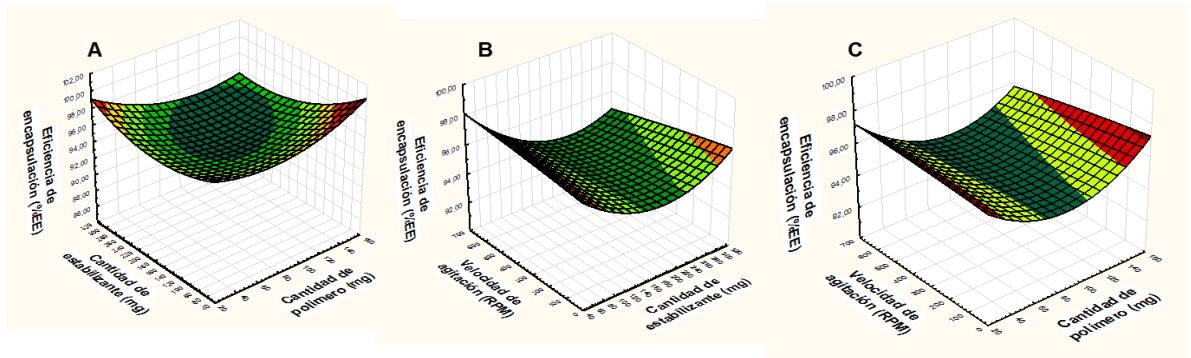
Gráfica 8. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para la eficiencia de encapsulación (%EE) del PCL en función de A) cantidad de estabilizante y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de estabilizante y C) velocidad de agitación y cantidad de polímero.



Gráfica 9. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para el Diámetro hidrodinámico (DH) del PVA en función de A) cantidad de estabilizante y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de estabilizante y C) velocidad de agitación y cantidad de polímero.

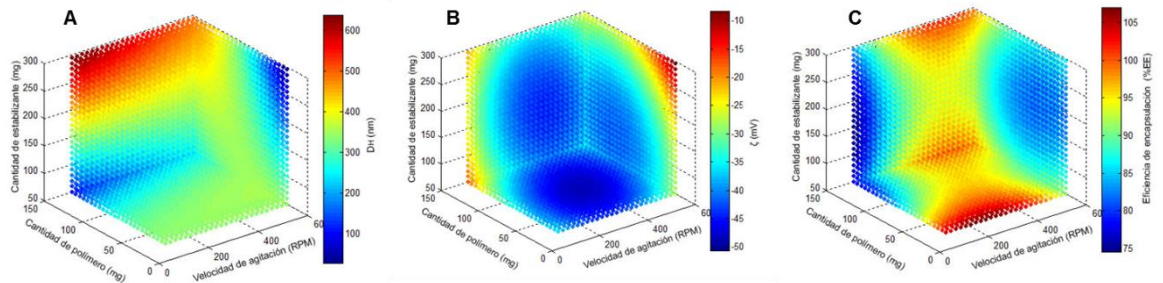


Gráfica 10. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para el potencial zeta (ζ) del PVA en función de A) cantidad de estabilizante y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de estabilizante y C) velocidad de agitación y cantidad de polímero.

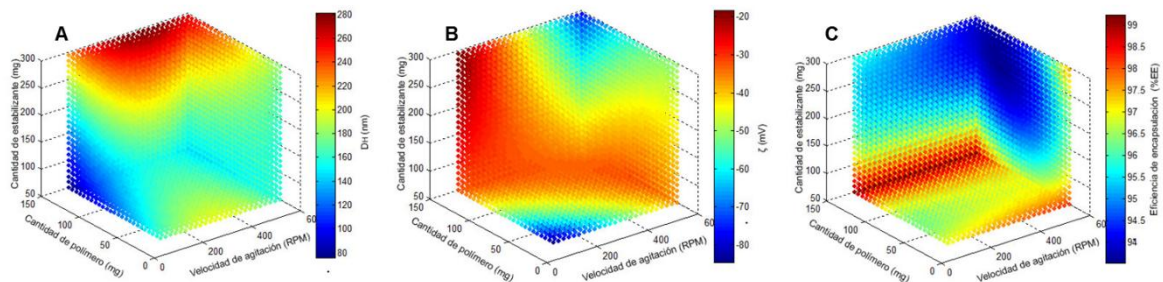


Gráfica 11. Superficie de respuesta obtenida del diseño central compuesto para la eficiencia de encapsulación (%EE) del PVA en función de A) cantidad de estabilizante y cantidad de polímero, B) velocidad de agitación y cantidad de estabilizante y C) velocidad de agitación y cantidad de polímero.

Adicionalmente, se realizó graficas de contornos en 3D, las cuales involucran los efectos de los tres factores sobre la respuesta, para PCL (gráfica 12) y para PVA (gráfica 13).



Gráfica 12. Contorno en 3D para PCL que involucra los tres factores de estudio para determinar A) DH (nm), B) ζ (mV) y C) Eficiencia de encapsulación (%EE).



Gráfica 13. Contorno en 3D para PVA que involucra los tres factores de estudio para determinar A) DH (nm), B) ζ (mV) y C) Eficiencia de encapsulación (%EE).