



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Química**

**Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la Republica (PROPAC)**

**“Caracterización de nanopartículas cargadas con ácido fólico (vitamina B9) y ácido ascórbico (vitamina C) elaboradas con alginato-quitosano como material de pared”**

**TESIS**

Como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

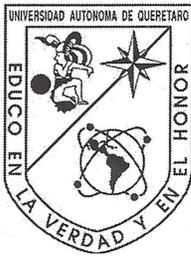
Presenta:

IB. María de Jesús Mendoza Sánchez

Dirigido Por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. DICIEMBRE DEL 2015



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Caracterización de nanopartículas cargadas con ácido fólico (vitamina B9) y ácido ascórbico (vitamina C) elaboradas con alginato-quitosano como material de pared”**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:  
Maestro en ciencias de los Alimentos

**Presenta:**

IB. María de Jesús Mendoza Sánchez

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

PRESIDENTE

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

SECRETARIO

Firma

Dra. Rocío Campos Vega

VOCAL

Firma

Dra. Marcela Gaytán Martínez

SUPLENTE

Firma

M. en C. Alexandra del Socorro Cárdenas Hernández

SUPLENTE

Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro Qro.  
Diciembre 2015

## RESUMEN

El ácido fólico (vitamina B9) es una vitamina que se encuentra presente en una gran variedad de hortalizas, especialmente las de hojas verdes y en menor proporción en algunos frutos y cereales; en forma de folatos o folacinas. Es de gran importancia ya que está involucrada en una serie de procesos biológicos como, la división celular y mantenimiento de células nuevas. A la deficiencia de esta vitamina se han asociado una serie de complicaciones como anemias megaloblásticas, defectos del tubo neural y más recientemente estados de depresión. Por otro lado el ácido ascórbico (vitamina C) aparte de participar en rutas metabólicas y en respuesta al sistema inmunológico. Durante el procesamiento de los alimentos se pierden una gran cantidad de esta vitamina, dado que los folatos son altamente inestables a altas temperaturas, luz, y pH's extremos y el ácido ascórbico tiende a ser muy inestable en presencia de oxígeno. La encapsulación ofrece una alternativa para compensar las pérdidas de folatos y vitamina C en los alimentos y además dirigir y controlar la liberación del activo. El objetivo del presente trabajo es encapsular al ácido fólico y al ácido ascórbico en una matriz de quitosano-alginato. Las cápsulas se elaboraron mediante la técnica de gelificación iónica o reticulación con  $\text{CaCl}_2$ . Se evaluó la eficiencia de encapsulación, estabilidad de las cápsulas a la luz ultravioleta, perfiles de liberación

**Palabras clave:** ácido fólico, ácido ascórbico, quitosano, alginato.

## SUMMARY

Folic acid (vitamin B9) is a vitamin that is present in a variety of vegetables, especially green leafy and to a lesser extent in some fruits and cereals; as folate or folacin. It is of great importance because it is involved in a number of biological processes as cell division and maintenance of new cells. A deficiency of this vitamin are associated a number of complications such as anaemias, neural tube defects and more recently states of depression. Furthermore ascorbic acid (vitamin C) in addition to metabolic pathways and participate in the immune system response. During food processing a lot of this vitamin are lost, as folates are highly unstable at high temperatures, light, and extreme pH and ascorbic acid tends to be very unstable in the presence of oxygen. Encapsulation offers an alternative to compensate for losses of folate and vitamin C in food and also direct and control the release of active. The aim of this study is to encapsulate folic acid and ascorbic acid in a matrix of chitosan-alginate. The capsules are prepared by ionic gelation technique or crosslinking with  $\text{CaCl}_2$ . Encapsulation efficiency, stability of the capsules to ultraviolet light, release profiles were evaluated

**Keywords:** folic acid, ascorbic acid, chitosan, alginate.

**A dios mis señor, sin ti nada soy  
y mi familia con todo mi amor.**

*Nada como la fuerza del amor y la voluntad...*

## AGRADECIMIENTOS

Porque gracias a ti mi señor tuve la oportunidad de vivir esta aventura y emprender el viaje en el mundo del saber. *“mi señor sin ti nada soy”*.

También dedico este trabajo, junto con un enorme agradecimiento a la Dra. Sandra O. Mendoza Díaz. Gracias por darme la oportunidad de vivir esta etapa con su equipo de trabajo. Dios la llene de bendiciones y que su trabajo fructifique para mejorar la calidad de vida en pro de la humanidad.

Agradezco a los miembros de mi comité, por el tiempo y todo el apoyo. A la Dra, Rocío Campos V., Dra, Marcela Gaytán, Dra. Flavia Loarca y la M. en C. Alexandra del socorro.

Un especial agradecimiento al CONACYT, por el apoyo otorgado estos dos años.

Gracias a la Universidad Autónoma de Querétaro, en especial a la Facultad de Química, y al programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la Republica (PROPAC) por abrirme las puertas y ser mí casa por dos bellos años.

A mis sobrinos hermosos, que amo y quiero con toda el alma, Cristofer Alexandro y Sara Dulcinea.

Gracias a mi familia, mis padres José Mario y María soledad, por su confianza, apoyo y fe en mí, sin duda su ejemplo de vida es mi motor y modelo a seguir.

A mis hermanos, Noé, Pedro y Magdalena; mis grandes ejemplos: con todo mi amor.

A mi hermana Magdalena, por su apoyo incondicional y sobre todo por su fe en mí, incluso en los peores momentos, un gran ejemplo en mi vida, sin tu existencia hermanita mi vida sería un caos.

Dedico parte de mi trabajo a ti Martín Sandoval, dios te puso en mi camino, en este trayecto por una razón. Gracias por todos tus consejos y apoyo. Dios te bendiga, y ten por seguro que ahí estaré.

A mis amiguitas de la vida que hasta ahora su apoyo y consejos me dan ánimos para seguir en tiempos difíciles: Mary, may, viri, lau, pili, marce y angy

A mis compañeras y compañeros de laboratorio, especialmente a Maguie y Adri paz, así como a Sandra colchado y Héctor Pool, gracias por todo el aprendizaje, y todo su apoyo incondicional así como sus consejos. Éxito y mis mejores deseos.

A mis compañeros de generación...

A los administrativos el posgrado, Sra. Carmelita y Laura

Dr. Eduardo Castaño Tostado

DE TODO CORAZÓN A TODOS, GRACIAS

## ÍNDICE

INTRODUCCION .....	xii
I.- ANTECEDENTES .....	1
1.1 El ácido fólico .....	1
1.1.1 Composición y estructura química .....	1
1.1.2 Características físicas y químicas. ....	5
1.1.3 Importancia en la dieta y su impacto en la salud .....	6
1.1.4 Dosis recomendadas.....	8
1.2 El ácido ascórbico .....	8
1.2.1 Estructura química .....	9
1.2.3 Importancia en el organismo .....	10
1.2.4 Fuentes y requerimientos de ácido ascórbico .....	10
1.2.5 Deficiencias del ácido ascórbico .....	11
1.3 La encapsulación .....	12
1.4 Métodos de encapsulación.....	14
1.5 Materiales de encapsulación.....	14
1.6 Características de los materiales de encapsulación.....	14
1.7 Tendencia actual a la fortificación de alimentos .....	15
1.8 Estudios de nano y micro encapsulación de ácido fólico y su liberación en alimentos. ....	16
1.9 Quitosano .....	18
1.10 Alginato de sodio.....	19
HIPÓTESIS .....	21
JUSTIFICACIÓN .....	22
OBJETIVO GENERAL .....	23
Objetivos específicos .....	23

II.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
2.1 Materiales.....	24
2.2 Métodos.....	24
2.3 Formación de las nanopartículas .....	25
2.4 Caracterización de las nanopartículas cargadas con ácido fólico y ácido ascórbico .....	26
2.4.1 Microscopía Electrónica de Barrido.....	26
2.4.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier mediante reflectancia total atenuada (ART-FTIR).....	27
2.4.3 Difracción de Rayos X.....	27
2.4.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	28
2.4.5 Potencial Z .....	28
2.4.6 Microscopia de fluorescencia .....	28
2.4.7 Eficiencia de encapsulación .....	29
2.4.8 Cinética de liberación .....	30
2.4.9 Capacidad antioxidante .....	31
2.4.10 Pruebas de protección contra la degradación por radiación UV.....	32
III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
3.1 Tamaño de partícula .....	33
3.2 Morfología de las nanopartículas .....	33
3.3 Caracterización de las nanopartículas .....	35
3.3.1 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (ART-FT-IR) .....	35
3.3.2 Difracción de Rayos X.....	40
3.3.3 Calorimetría diferencial de barrido .....	42
3.3.4 Potencial Z .....	44
3.3.5 Microscopia de fluorescencia .....	46

3.4 Eficiencia de encapsulación (% EE) .....	47
3.5 Cinética de liberación .....	48
3.6 Capacidad antioxidante .....	49
3.6.1 Método de ABTS para ácido fólico .....	49
3.6.2 Método del ABTS para el ácido ascórbico.....	50
3.7 Pruebas de protección contra la degradación por radiación UV.....	52
IV.- CONCLUSIONES .....	54
BIBLIOGRAFÍA .....	56
.....	58

## Índice de figuras

Figura 1 Estructura del ácido pteroilglutámico o ácido fólico.....	2
Figura 2 Estructuras químicas de los folatos.....	4
Figura 3 Especies de folatos y su interconversión en el organismo (THF: tetrahidrofolato) (Mar.....	5
Figura 4 Participación del ácido fólico en la síntesis de ácidos nucleicos y los ciclos de metilación.....	7
Figura 5 Estructura química del ácido ascórbico.....	9
Figura 6 Lesiones en boca y piel ocasionadas por la deficiencia de Vitamina C.....	12
Figura 7 Estructura química de la quitina y el quitosano.....	19
Figura 8 Estructura química del alginato.....	20
Figura 9 Esquema general para la formación de nanopartículas de alginato-quitosano.....	25
Figura 10 Formación de nanopartículas de alginato-quitosano.....	26
Figura 11 Microscopio Electrónico de Barrido.....	27
Figura 12 Microscopio de Fluorescencia Zeiss.....	29
Figura 13 Cámara cromatografía acoplada a bomba de vacío.....	30
Figura 14 Micrografías Electrónicas de Barrido de las nanopartículas de alginato-quitosano.....	34
Figura 15 Espectro FTIR ácido fólico.....	38
Figura 16 Espectro FTIR ácido ascórbico.....	39
Figura 17 Difractogramas de Rayos X para los polímeros de encapsulación.....	41
Figura 18 Termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido.....	43
Figura 19 Micrografías de Fluorescencia.....	46
Figura 20 Cinética de liberación del ácido fólico.....	48
Figura 21 Método de ABTS: porcentaje de inhibición del radical ABTS por el ácido fólico.....	50
Figura 22 Método de ABTS: porcentaje de inhibición del radical ABTS por el ácido ascórbico.....	51
Figura 23 Espectro UV del ácido fólico.....	52
Figura 24 Espectro UV. Pruebas de fotodegradación del ácido fólico encapsulado.....	53

**Índice de cuadros**

Cuadro 1 Estructuras y nomenclaturas de las especies de folatos (Valera, 1999)..... 3  
Cuadro 2 Materiales de recubrimiento empleados en micro/nano encapsulación de aditivos alimentarios (Kashappa, 2005). ..... 15  
Cuadro 3 Potencial Z de las nanopartículas de Ácido Fólico. .... 45

## INTRODUCCION

En años recientes el aumento poblacional ha traído como una de muchas consecuencias un incremento en la demanda de alimentos. Dicha demanda debe traducirse en cantidad y calidad de los productos que se requieren. Dado que la tendencia en la época actual es consumir productos que sean de fácil acceso y rápida preparación, se están generando continuamente nuevos retos en la industria alimentaria, tanto en el área de la ciencia como de la tecnología, que permitan generar productos alimenticios innovadores que satisfagan los requerimientos nutricionales, sensoriales, ambientales, de inocuidad, y que posean características de calidad y sanidad, que les permitan ser competentes en un mercado tan amplio y diversificado como es el de los alimentos.

La nanotecnología ofrece un amplio campo de estudio para la generación de nuevos productos alimenticios e innovadores sistemas para mejorar sus parámetros de calidad. La micro y nano encapsulación ofrecen varias ventajas que van desde fortificar, enriquecer, o adicionar con compuestos nutricionales (vitaminas o minerales), nutraceuticos (antioxidantes); o simplemente para conservar atributos sensoriales del alimento (color, sabor, aromas) que pudieran verse degradados parcial o completamente en las diferentes etapas de procesamiento de las materias primas. Mediante su atrapamiento en matrices de grado alimentario se permite su retención y liberación controlada.

Las deficiencias nutrimentales y la aparición de enfermedades crónico degenerativas (generalmente relacionadas), son el resultado del impacto de la globalización en el estilo de vida actual en nuestro país. Una de tantas deficiencias en la dieta, está dada por el bajo consumo de ácido fólico (vitamina B<sub>9</sub>), compuesto necesario en diversas funciones biológicas tales como: biosíntesis de nucleótidos, división celular y expresión de genes. Es especialmente importante durante periodos de división celular acelerada, como el embarazo y la infancia siendo necesario incluir dosis específicas en la dieta diaria (Prasertmanakit, *et al.*, 2009; Stevanovic *et al.*, 2008). El consumo de ácido fólico, ayuda a prevenir defectos de nacimiento en el cerebro y la médula espinal denominados defectos del tubo neural (Santacruz *et al.*, 2013).

Aunque muchos alimentos principalmente hojas verdes, cítricos y algunas leguminosas y cereales como el maíz contienen una fuente importante de folatos y ascorbatos; por un lado, su contenido no satisface la demanda diaria de esta vitamina, y aun aquellos alimentos que presentan un alto contenido, una gran parte de estos compuestos tienden a perderse durante la cosecha, almacenamiento, producción y procesamiento de los alimentos (FAO/WHO, 1998). Por lo anterior, resulta de interés la generación de alimentos enriquecidos y/o fortalecidos con ácido fólico y también alimentos a los cuales se les adiciona una cantidad determinada de vitamina C.

## I.- ANTECEDENTES

### 1.1 El ácido fólico

El término ácido fólico proviene del latín *folium*, hoja. Se aplica a una gran diversidad de compuestos cuya estructura base es el ácido pteroilglutámico. Se le puede aludir una variedad de apelativos usados indiscriminadamente como, folato, folatos, folacina y ácido fólico (Valera, 1999; Gennaro, 2000).

El ácido fólico presente en los alimentos es altamente sensible a factores abióticos como: oxígeno, temperatura, pH y luz (Prasertmanakit, 2009).

Se presenta como una sustancia amarilla cristalina, y se ha encontrado en 150 formas diferentes, la mayoría presentes en los alimentos en formas reducidas, lábiles y de fácil oxidación (Suárez, 2003).

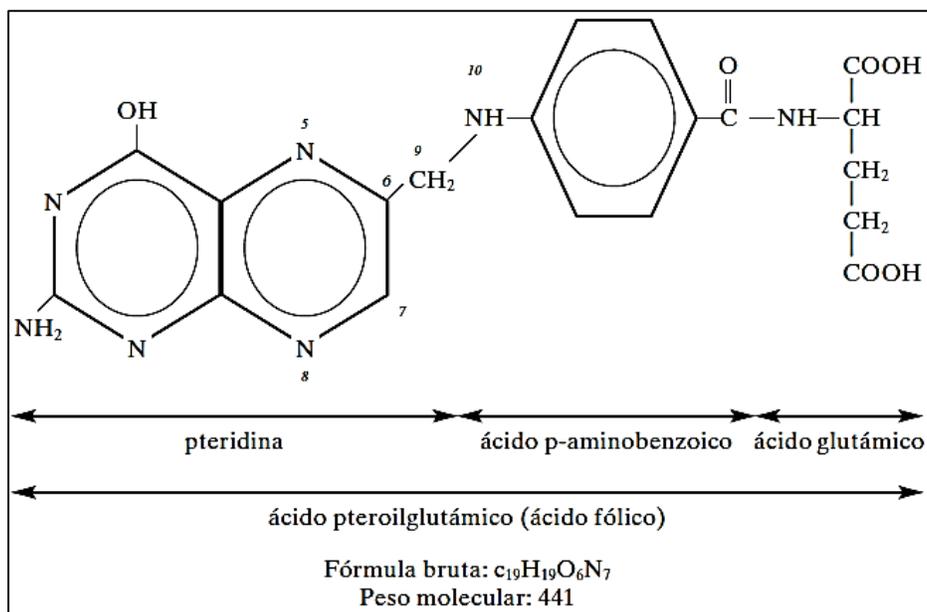
Es una vitamina esencial para el correcto funcionamiento del metabolismo del hombre y de amplio espectro en reacciones bioquímicas; sin embargo, solo puede ser sintetizado por bacterias y plantas. Como el hombre no puede sintetizarlo, debe adquirirlo de fuentes externas como vegetales, cereales o leguminosas (Litwack, 2008).

#### 1.1.1 Composición y estructura química

La estructura base de los folatos es el ácido pteroilglutámico molécula constituida por un anillo de pteridina unido por un puente metileno a un residuo de ácido *p*-aminobenzoico que a su vez se une por un enlace amida a un residuo de ácido glutámico. El anillo de pteridina, puede presentar varias formas reducidas y varios tipos de sustituciones, y en el residuo de *p*-aminobenzoglutamato, pueden

estar unidos en enlace peptídico un número variable de residuos de glutamato (Valera, 1999).

A la base de pteridina y ácido *p*-aminobenzoico pueden estar unidas de una hasta siete moléculas de ácido glutámico, siendo la forma activa en el organismo el ácido pteroilmonoglutámico (Figura 1) (Rosemberg, 1990).



**Figura 1** Estructura del ácido pteroilglutámico o ácido fólico (Valera, 1999).

El anillo de pteridina puede encontrarse parcialmente reducido en la posición 7 y 8 de los dihidrofolatos (DHF) o completamente reducido en las posiciones 5, 6, 7 y 8 de los tetrahidrofolatos (THF). El tetrahidrofolato es capaz de aceptar unidades de un sólo átomo de carbono que se fijan en las posiciones 5, 10 o ambas presentándose en diferentes estados de oxidación. En el Cuadro 1 se presentan de manera general las estructuras y nomenclaturas de las especies de folatos. Las posiciones N5 y N10 son los sitios activos de la molécula de los folatos, de los derivados reducidos de los poliglutamatos (monoglutamatos) son los que constituyen las formas biológicamente activas (Valera, 1999).

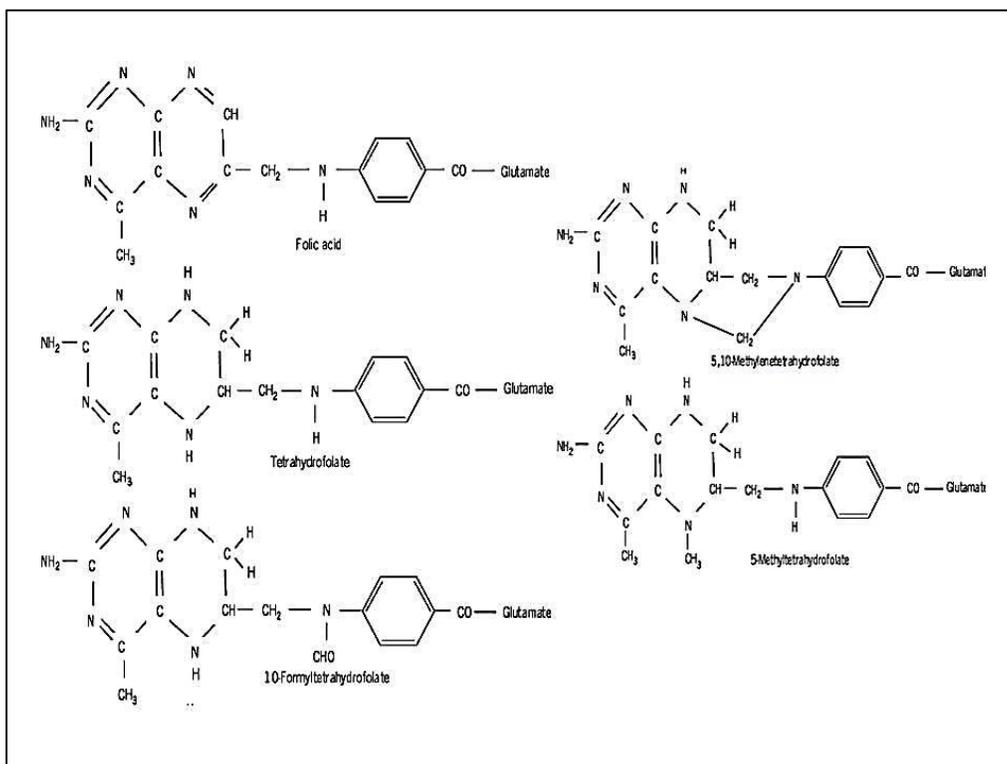
**Cuadro 1** Estructuras y nomenclaturas de las especies de folatos (Valera, 1999).

Nombre del compuesto	Característica estructural	Abreviaturas
Ácido pteroilglutámico ácido fólico	no reducido sin sustituciones	PteGlu
Dihidrofolato Ácido dihidrofólico	-H en 5,6	H2PteGlu DHF
Tetrahydrofolato Ácido Tetrahidrofólico	-H en 5,6,7,8	H4PteGlu THF
5-formiltetrahydrofolato Ácido formiltetrahidrofólico Ácido folínico	-CHO en 5	5-formil-H4PteGlu 5-formil-THF
10-formiltetrahydrofolato Ácido 10-formiltetrahidrofólico	-CHO en 10	10-formil-H4PteGlu 10-formil-THF
5,10-meteniltetrahydrofolato Ácido 5,10- meteniltetrahidrofólico	-CH= en 5,10	5,10-metenil- H4PteGlu  5,10-metenil-THF
5,10-metiléntetrahydrofolato Ácido 5,10- metiléntetrahidrofólico	-CH2- en 5,10	5,10-metilén- H4PteGlu  5,10-metilén-THF
5-metiltetrahydrofolato ácido 5-metiltetrahidrofólico	-CH3 en 5	5-metil-H4PteGlu 5-metil-THF

Los folatos aceptan unidades de un carbono de moléculas donantes y los pasan a través de varias reacciones biosintéticas. En su forma reducida la función de los folatos celulares esta conjugada con una cadena de poliglutamato. Estos folatos son una mezcla de tetrahydrofolatos poliglutamilos no sustituidos y diversas

formas de carbono sustituidos de tetrahidrofolato (por ejemplo, 10-formil-, 5,10-metileno-, y5-metil-tetrahidrofolato) (Figura 2).

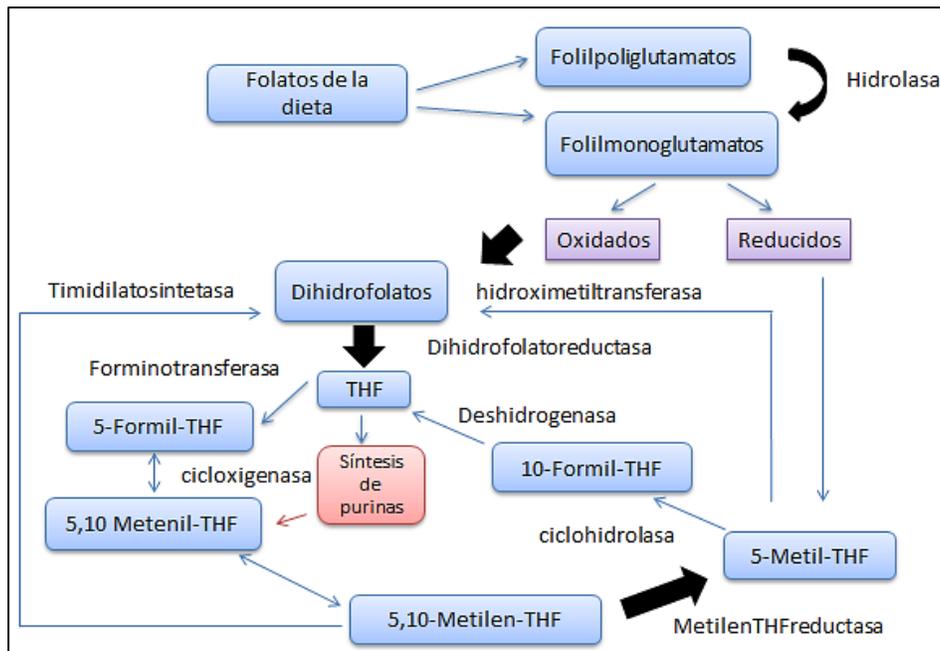
Las formas reducidas de la vitamina, particularmente las formas dihidrofolato y tetrahidrofolato sustituidos, son inestables químicamente. Fácilmente se dividen entre el enlace C-9 y N-10 para producir un pteridina y p-aminobenzoilglutamato que no tienen actividad biológica. La sustitución en N-5 o N-10 disminuye la tendencia de la molécula a dividirse, sin embargo, las formas sustituidas son también susceptibles a reordenamientos por oxidación química y, en consecuencia se presenta la pérdida de actividad. Los folatos nativos de los alimentos consisten de una mezcla de folatos o poliglutamatos reducidos. La mitad o inclusive tres cuartos de la actividad de los folatos se puede perder durante el procesamiento (FAO/WHO, 1998).



**Figura 2** Estructuras químicas de los folatos (forma sintética) y las formas naturales más importantes de los folatos (Öhrvik, 2009).

Algunas de las causas de variaciones en la estructura química pueden ser: estado de oxidación del anillo de pterina, número de residuos de glutamato y diastereoisomeria, es decir, para el 5-formiltetrahidrofolato y el 5,10-meteniltetrahidrofolato existen dos centros quirales que determinan la actividad de estos folatos. El estado de oxidación y sustitución sirve para alterar la estabilidad de la molécula de folato (Blakley, 1986; Öhrvik, 2009).

En la Figura 3 se muestran algunas de las especies de folatos y sus interconversiones dentro del organismo; a partir de los folatos de la dieta (Martínez *et al.*, 2001).



**Figura 3** Especies de folatos y su interconversión en el organismo (THF: tetrahidrofolato) (Martínez *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Características físicas y químicas.

El ácido fólico se presenta como un polvo cristalino de color amarillo anaranjado. Es ligeramente soluble en agua (0.5 g/L aproximadamente) pero fácilmente soluble en soluciones ácidas o básicas débiles. Es insoluble en alcohol,

acetona, éter y cloroformo. El ácido fólico cristalizado es estable al calor, al aire y en solución neutra, por el contrario, es sensible a la luz, la radiación ultravioleta, los ácidos, los álcalis, los oxidantes y los reductores. Los dihidrofolatos y tetrahidrofolatos son inestables en presencia de aire (Varela *et al.*, 1999).

El ácido fólico es estable a condiciones alcalinas, pero inestable a otras condiciones (Bergstrom, 1994).

### **1.1.3 Importancia en la dieta y su impacto en la salud**

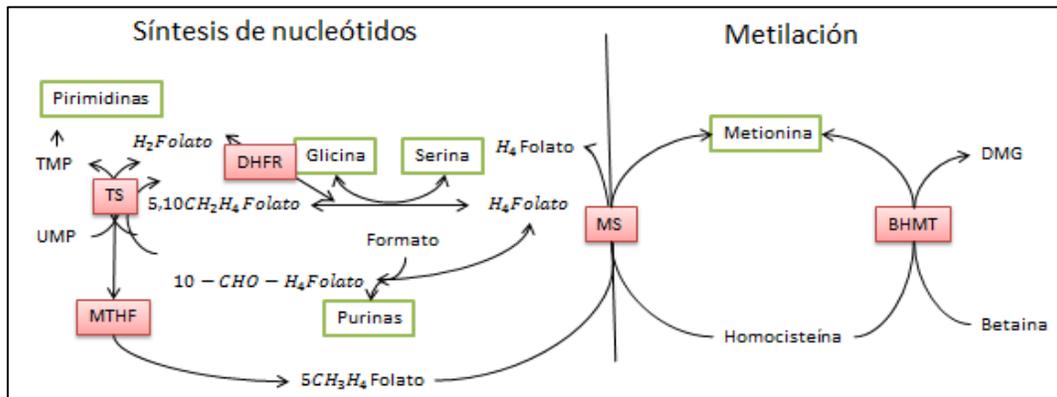
El ácido fólico juega un papel crucial en la biosíntesis de nucleótidos que son esenciales para el metabolismo de los ácidos nucleicos, división celular y expresión de genes. En años recientes se ha incrementado el interés por fortificar alimentos con esta vitamina principalmente por los estudios realizados que ligan la deficiencia de folatos con defectos del tubo neural principalmente en la formación del feto en el embarazo, enfermedades coronarias y anemia perniciosa o megaloblástica (Prasetmanakit, 2009).

Esta vitamina es necesaria para la producción y mantenimiento de las células nuevas, especialmente durante periodos de rápida división celular y crecimiento por ejemplo, en la infancia o durante el embarazo (Santacruz, 2013).

Es necesario tomar dosis específicas de ácido fólico diariamente. Los folatos son necesarios para la replicación de ADN. De ahí, que la deficiencia de esta vitamina dificulte la síntesis de ADN y la división celular (Stevanovic, 2008).

Tanto en la formación de ADN como en los ciclos de metilación (Figura 6), se regenera tetrahidrofolato. Sin embargo, hay pérdida en cantidad considerable proveniente del catabolismo del ácido fólico, y otra pequeña cantidad a través de la excreción por la orina, piel y bilis (Reed *et al.*, 2006).

Por lo tanto, hay una necesidad de reponer el ácido fólico necesario para el organismo, a partir de su ingestión mediante una alimentación balanceada. Una dieta deficiente en ácido fólico, puede alterar los procesos metabólicos antes mencionados (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés)/ Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) 1998; Öhrvik, 2009).



**Figura 4** Participación del ácido fólico en la síntesis de ácidos nucleicos y los ciclos de metilación. (TMP, timidinmonofosfato; UMP, uridinmonofosfato; MTHF, receptor de metiltetrahidrofolato; DHFR, receptor de dihidrofolato; MS, metioninsintasa; BHMT, betaina-homocisteína metil transferasa; TS, timidilato sintasa) (Reed *et al*, 2006).

El papel fundamental del ácido fólico es actuar como una coenzima necesaria para formar varios compuestos clave como nucleoproteínas necesarias en la división celular y en la transmisión de rasgos hereditarios. El ácido fólico desempeña el papel de transporte básico del grupo C, para la formación del grupo hemo, proteína de la hemoglobina. El ácido fólico es de fácil absorción en el sistema gastrointestinal y es llevado por la sangre a los tejidos, se almacena principalmente en el hígado y es excretado por la orina y heces fecales. La excreción de esta vitamina se hace en promedio de 40 µg por la orina y por las heces de 400 µg diarios; aunque esta última fracción es fundamentalmente de origen bacteriano-intestinal (Secretaría de salud, 2003).

#### **1.1.4 Dosis recomendadas**

En 1968 se describió por vez primera la relación entre niveles bajos de folatos en la gestación y defectos del tubo neural. En 1992 se recomienda la ingesta de 0.4 mg/día de ácido fólico en mujeres en edad reproductiva, para 1995 se permitió la suplementación de los cereales con ácido fólico y es hasta 1998 cuando se lleva a cabo la suplementación de harinas comerciales con 0.140 mg de ácido fólico por 100 g de harina, con lo que se añade 0.1 mg / día a la dieta normal, sugiriéndose incrementar la suplementación a 0.350 mg / 100 g de harina (Secretaría de salud, 2003).

A pesar de que el ácido fólico puede encontrarse en frutas, vegetales y granos, es difícil obtener la cantidad necesaria de esta vitamina sólo de la dieta. Sin embargo la dieta común de muchas mujeres no aporta en ningún caso más de 200 microgramos (Santacruz, 2013).

Es bien conocido el papel de los folatos en la hematopoyesis y la proliferación celular. Por tal motivo el ácido fólico ha sido utilizado en el tratamiento de las anemias macrocíticas del humano, en dosis que van de 0.05 a 15 mg/día, tanto por vía oral como parenteral (Secretaría de salud, 2003).

#### **1.2 El ácido ascórbico**

El ácido ascórbico es un antioxidante soluble en agua, fue aislado por primera vez en 1928, es un ácido inestable y altamente oxidable y puede ser destruido por el oxígeno, bases y alta temperatura. Los humanos no pueden sintetizar esta vitamina, así que deben adquirirla de su alimentación. La incapacidad de sintetizarla se debe a la ausencia de la enzima l-gulonolactona oxidasa del hígado. El cuerpo requiere de la vitamina C para las funciones fisiológicas normales. Ayuda en el metabolismo de la tirosina, ácido fólico y triptófano. Ayuda a disminuir los niveles de colesterol en sangre y contribuye a la

síntesis del aminoácido carnitina y catecolamina que regula el sistema nervioso (Khalid, 2004).

La vitamina C o ácido ascórbico también conocido como ácido cevilámico o anti escorbuto tiene características reductoras por sus dos grupos donantes de protones. También es hidrosoluble y termolábil y se oxida en el aire con facilidad. Interviene en muchas reacciones metabólicas importantes. De importancia en el metabolismo de carbohidratos y en controlar procesos infecciosos (Fenneman, 2001).

### 1.2.1 Estructura química

Ácido L-ascórbico ( $C_6H_8O_6$ ) es el nombre trivial de la vitamina C. El nombre químico es 2-oxo-L-treo-hexono-1, 4-lactona-2, 3-endiol. El ácido ascórbico es un compuesto soluble en agua se absorbe fácilmente, pero no se almacena en el cuerpo. Los principales metabolitos de ácido ascórbico en humanos son el ácido dehidroascórbico, 2, 3 ácido dicetoglucónico y ácido oxálico (Figura 5). La principal vía de eliminación de ácido ascórbico y sus metabolitos es a través de la orina. Se excreta sin cambios cuando se consumen altas dosis de ácido ascórbico. El ácido ascórbico es generalmente no tóxico pero a dosis altas (2-6g / día) puede causar trastornos gastrointestinales o diarrea (Matei *et al.*, 2006).

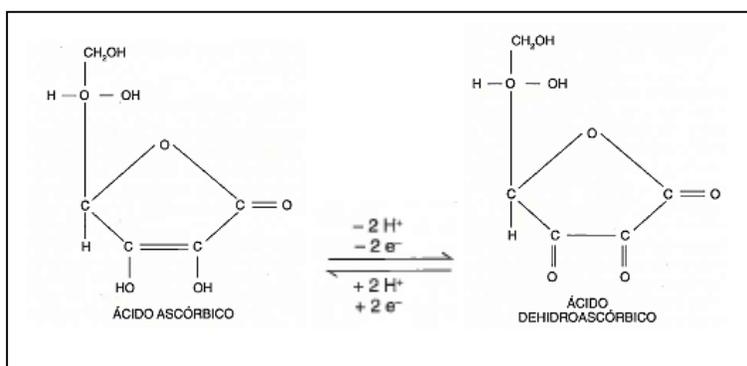


Figura 5 Estructura química del ácido ascórbico (Fenneman, 2001).

La mayoría de las reacciones metabólicas del ácido ascórbico se deben fuertemente a su poder reductor. Su actividad antioxidante se deriva del desplazamiento de ácido ascórbico a su forma oxidada L-dehidroascórbico; esto habilita a la molécula para combatir radicales oxidativos ( $\cdot\text{O}^-$  y  $\cdot\text{OH}^-$ ) (Khalid, 2004).

### **1.2.3 Importancia en el organismo**

El ácido ascórbico es una de las vitaminas hidrosolubles más importantes. Es esencial para la biosíntesis de colágeno, carnitina y neurotransmisores. El ácido L-ascórbico está presente en la fase acuosa extracelular y actúa en forma sinérgica con  $\alpha$ -tocoferol para proteger las membranas celulares contra la peroxidación lipídica. Las especies oxidantes son directamente interceptadas por el ácido L-ascórbico y las desactiva, esto se observó cuando el ácido ascórbico se une al  $\alpha$ -tocoferol en membranas celulares fotosensibilizadas (Matei *et al.*, 2006).

### **1.2.4 Fuentes y requerimientos de ácido ascórbico**

Las principales fuentes de vitamina C en la mayoría de las dietas son las frutas, las hortalizas y diversos tipos de hojas. En las tribus nómadas la leche con frecuencia es la fuente principal. Los plátanos y los bananos son el único alimento básico que contiene porciones adecuadas de vitamina C. Las hojas verdes de color oscuro, como el amaranto y la espinaca contienen mucha más vitamina C que las hojas pálidas como el repollo y la lechuga. Las hortalizas de raíz y las patatas contienen cantidades pequeñas pero útiles. El maíz tierno, así como los cereales germinados y las legumbres aportan en promedio de 27 mg de ácido ascórbico. Los productos animales (carne, pescado, leche y huevos) tienen cantidades reducidas. La cocción y envasado de los alimentos tienden a destruir la vitamina de la dieta. El requerimiento mínimo diario generalmente aceptado es de 30 mg / día y la cantidad diaria recomendada es 60 mg / día. El estrés, las infecciones las cirugías y el embarazo aumentan de 2 a 3 veces la cantidad diaria

recomendada. En el ser humano el ácido ascórbico es fácilmente absorbido en el yeyuno (Ferreiro, 2000).

El ácido ascórbico se mide en miligramos de la vitamina pura. Las opiniones sobre las necesidades humanas difieren mucho. Parece claro que se necesitan hasta 75 mg diarios para que el cuerpo permanezca saturado a plenitud con vitamina C. Sin embargo, las personas parecen mantenerse saludables con consumos tan bajos como 10 mg por día. Cifras de 25 mg para adultos, 30 mg para adolescentes, 35 mg en el embarazo y 45 mg durante la lactancia, parecen ser cantidades razonables (FAO, 2015).

### **1.2.5 Deficiencias del ácido ascórbico**

Como el calor destruye con facilidad la vitamina C, la cocción prolongada de cualquier alimento puede destruir gran cantidad de la vitamina C que contenga (Magearu, 2008). El escorbuto y otras manifestaciones clínicas son debidos a la falta de vitamina C. La carencia de vitamina C surge por aporte deficiente (carencia de vitamina C durante la vida intrauterina, leche materna pobre en vitamina C sin aporte suplementario obligado, leche de vaca sin complemento durante el primer año de vida, alcoholismo crónico, bajos recursos, modas alimentarias, etc.,) y aumento de las necesidades (enfermedades infecciosas con aumento del metabolismo y síntesis de anticuerpos, entre otras) (Ferreiro, 2000).

En el escorbuto, las paredes de los vasos sanguíneos son muy pequeños, los capilares, carecen de solidez y se vuelven frágiles, sangran y sufren hemorragias en diversos sitios (Figura 6). La carencia moderada de vitamina C puede incidir en la cicatrización pobre de las heridas. El ácido ascórbico aumenta la absorción de hierro y por lo tanto influye en la reducción de la anemia por carencia de hierro. Algunos anticonceptivos orales disminuyen la absorción de la vitamina C. Algunos de los síntomas ocasionados por la deficiencia de ácido ascórbico son: cansancio y debilidad, encías inflamadas que sangran fácilmente, hemorragias en la piel, sangrado nasal, anemia, entre otros. La anomalía en los niveles de vitamina C

puede contribuir a la anemia durante el embarazo. Debido al riesgo de muerte repentina por deficiencia de ácido ascórbico, no es aconsejable tratar el escorbuto tan solo con una dieta rica en vitamina C; es aconsejable más bien suministrar al enfermo 250 mg de ácido ascórbico por vía oral cuatro veces al día, e incluir una dieta rica en el mismo (FAO, 2015).



**Figura 6** Lesiones en boca y piel ocasionadas por la deficiencia de Vitamina C (ácido ascórbico) (FAO, 2015).

### 1.3 La encapsulación

La encapsulación es la técnica por la cual un material o una mezcla de materiales son cubiertos o atrapados dentro de otro material o sistema. El material recubierto se llama material activo o núcleo, y el material de revestimiento se llama coraza, material de la pared, portador o encapsulante. Actualmente la tecnología de encapsulación está bien desarrollada y aceptada (Madene *et al.*, 2006).

Según su diámetro los cápsulas son consideradas como microcápsulas en un intervalo de 1-1000  $\mu\text{m}$  mientras que las nanocápsulas presentan valores del diámetro en un intervalo entre 1-100 nm (Santacruz *et al.*, 2013).

La micro y nanoencapsulación permite que los materiales alimenticios resistan las condiciones de procesamiento, empaçado y almacenado, por otro lado mejorando la calidad en sabor, aroma, color, estabilidad, valor nutritivo y apariencia así como contribuir a la mejora y control de calidad de espumas y emulsiones (Santacruz *et al.*, 2013; Wilson, 2007).

La formación de nanopartículas, nanoemulsiones y nanocápsulas, podría permitir mejorar el valor nutricional de los productos y mejorar su absorción en el cuerpo, de forma que la biodisponibilidad y dispersión de los nutrientes de interés aumente (Almengor, 2009).

La micro y nanoencapsulación en la industria de los alimentos puede ofrecer numerosos beneficios tales como: incremento en la estabilidad de colorantes o sabores, evitando la interacción de estos con los otros componentes del alimento que pudieran producir cambios en los atributos sensoriales; retención de compuestos volátiles tales como aromas; enmascaramiento de sabores o aromas indeseados de importancia nutrimental (algunos astringentes como antocianinas o taninos solubles); liberación controlada, a diferentes estímulos, como pH, temperatura o presión, el principio encapsulado comienza su liberación teniendo un beneficio sobre el alimento; modificación de las características físicas, transformando una sustancia de líquida a sólida, como en el caso de encapsulación de aceites esenciales; reducción de la cantidad requerida de aditivo, por ejemplo, el uso de antioxidantes (ácido ascórbico) que aplicados en alimentos de manera directa pueden perderse rápidamente disminuyendo la vida de anaquel del producto, siendo uno de los beneficios de la encapsulación una disminución en la cantidad de aditivo que se agrega; incremento de la biodisponibilidad, ya que la matriz de encapsulación mantiene la estabilidad del ingrediente funcional encapsulado hasta su llegada y absorción al tracto gastrointestinal (encapsulación de vitaminas o minerales) (Madene *et al.*, 2007; Esparza *et al.*, 2011)

#### **1.4 Métodos de encapsulación.**

Existe una gran diversidad de métodos que son empleados para la micro y nano encapsulación, un solo proceso de encapsulación es adaptable a varios materiales o productos. Wilson *et al*, 2007, describe los métodos comunes utilizados para encapsular ingredientes alimentarios, generalmente incluyendo la formación de la pared alrededor del material, asegurando que no se produzcan fugas del compuesto encapsulado o la introducción de materiales no deseados.

#### **1.5 Materiales de encapsulación.**

Hay un número de materiales de cubierta aprobados y comercialmente disponibles (Cuadro 2). No todos los materiales de la cubierta cumplen con todas las funciones o tienen las propiedades que se requieren para encapsular un mismo producto, por lo que se utilizan a menudo combinaciones (Madene *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007). Los materiales de cubierta se pueden dividir en: carbohidratos, proteínas, lípidos y materiales inorgánicos (Esparza *et al.*, 2011).

#### **1.6 Características de los materiales de encapsulación.**

Es deseable que los materiales de recubrimiento cumplan con ciertas características que permitan su aceptabilidad en diversos puntos (Esparza *et al.*, 2011):

- Biodegradable
- Económico
- Capaz de proporcionar la máxima protección al material activo frente a agentes externos (oxígeno, calor, luz, humedad, etc.,)
- Insípido
- Adecuado al alimento al cual se va integrar
- Soluble en disolventes aprobados para su uso en alimentos

- No debe reaccionar con la sustancia a encapsular (con respectivas excepciones)

**Cuadro 2** Materiales de recubrimiento empleados en micro/nano encapsulación de aditivos alimentarios (Kashappa, 2005).

CATEGORÍA	MATERIAL DE RECUBRIMIENTO	MÉTODOS USADOS
Carbohidratos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Almidones</li> <li>2. Maltodextrinas</li> <li>3. Quitosano</li> <li>4. Sólidos de jarabe de maíz</li> <li>5. Dextranos</li> <li>6. Almidones modificados</li> <li>7. Ciclodextrinas.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Spray</li> <li>2. Secado por congelación</li> <li>3. Extrusión</li> <li>4. Coacervación</li> <li>5. Inclusión</li> <li>6. Complejación</li> </ol>
Celulosa	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Carboximetil celulosa</li> <li>2. Etilcelulosa</li> <li>3. Celulosa Acetato-ftalato</li> <li>4. Celulosa butirato-acetato-ftalato</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Coacervación</li> <li>2. Secado por aspersion</li> <li>3. Películas</li> </ol>
Gomas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Goma de acacia</li> <li>2. Agar</li> <li>3. Goma arabiga</li> <li>4. Alginato de sodio,</li> <li>5. Carragenano</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Secado por aspersion</li> <li>2. Método de la jeringa (perlas de gel)</li> </ol>
Lípidos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cera, parafina</li> <li>2. Cera de abejas</li> <li>3. Diacilgliceroles</li> <li>4. Aceites</li> <li>5. Grasas</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Emulsiones</li> <li>2. Liposomas</li> <li>3. Formación de películas</li> </ol>
Proteínas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gluten</li> <li>2. Caseínas</li> <li>3. Gelatina</li> <li>4. Albumina</li> <li>5. Péptidos</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Emulsiones</li> <li>2. Secado por aspersion</li> </ol>

### 1.7 Tendencia actual a la fortificación de alimentos

La fortificación de alimentos ha demostrado ser una de las medidas más seguras y rentables para mejorar el valor nutricional de los alimentos, especialmente los procesados, o aquellos que carecen de alguno en particular. Se

ha aplicado durante décadas para mejorar el estado nutricional de algunas poblaciones en varios países, mediante la adición de algún componente a los alimentos básicos simples y asequibles. De hecho, en muchos países la fortificación de alimentos básicos como la harina de trigo es obligatoria, para reemplazar los nutrientes perdidos por la elaboración de alimentos o para reducir la prevalencia de las deficiencias detectadas. Las deficiencias de micronutrientes no sólo afectan a los pobres. Quizás menos obvio pero no menos importante son los efectos de los estilos de vida de hoy en día en el mundo desarrollado en el estado nutricional. El ritmo frenético de la vida en estos países puede conducir a deficiencias en la dieta, por lo que también aquí, la gente está cada vez más a los alimentos enriquecidos para compensar los déficits (Li, 2009).

En el caso de deficiencias de ácido fólico, como se ha explicado anteriormente, de manera general, conlleva a trastornos del tubo neural en el feto, anemias megaloblásticas, alteraciones del ADN, crecimiento lento en niños e incluso se ha demostrado que la carencia de folatos está relacionada con trastornos psiquiátricos como la depresión. Antes de la implementación de la fortificación con ácido fólico el beneficio a la población debe ser evaluada, para evitar daños adversos a la salud (Wolfgang, 2011).

### **1.8 Estudios de nano y micro encapsulación de ácido fólico y su liberación en alimentos.**

En años recientes se han realizado estudios para la adición, fortificación o enriquecimiento de alimentos con ácido fólico, especialmente se ha iniciado la búsqueda de alternativas innovadoras y convenientes en la adición de esta vitamina. Se ha comenzado a trabajar con la micro y nanoencapsulación, con la finalidad de que al introducir el encapsulado de ácido fólico en el alimento, este sea liberado de manera específica y controlada en el mismo. La encapsulación lo protege de las condiciones del medio como son principalmente pH, temperaturas y exposición a la luz que tienden a degradar o modificar la estructura activa de este

compuesto y por consiguiente no es absorbido por el organismo (Soni, *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2013).

Santacruz y *et al.*, (2013) elaboraron un jugo de piña mínimamente procesado al que se le adicionaron micro y nano cápsulas de ácido fólico, estas fueron obtenidas por el método de secado por aspersion, el material encapsulante fue goma arábica. El efecto de la ingesta de ácido fólico en el jugo de piña fue evaluado en un modelo de ratas Wistar, a las que midieron el incremento en los valores de hematocritos, eritrocitos y el contenido de hemoglobina. De los resultados se concluye que el consumo adecuado del jugo adicionado con las micro y nanocápsulas de AF en la dieta diaria de las ratas madre durante el periodo de gestación incidió en una concentración mayor de hemoglobina en el plasma y un crecimiento mayor de sus crías.

Alborzi (2012), realizó un estudio en el que exploró el efecto de fibras electroestiradas a partir de alginato de sodio-pectina polióxido de etileno como un acarreador para estabilizar el ácido fólico ya que este compuesto es susceptible a degradarse cuando es expuesto a la luz o condiciones ácidas.

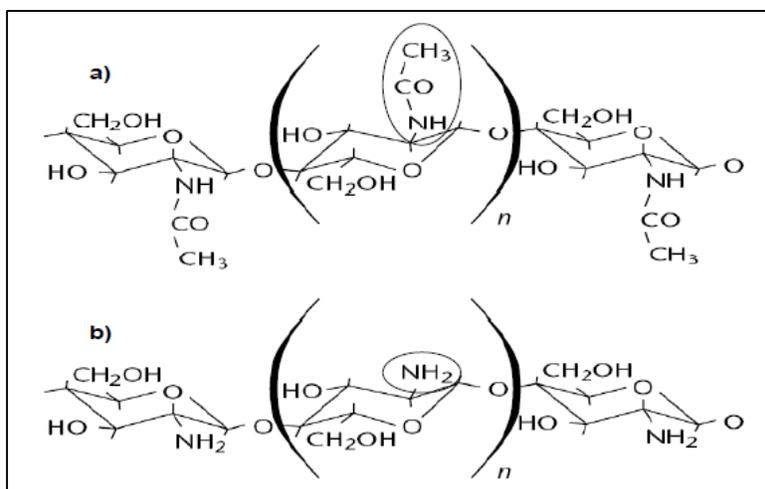
También investigó la estabilidad y las condiciones de electroestirado del polímero, así como la estabilidad de las nanofibras con el ácido fólico. Empleó espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y resonancia magnética nuclear (NMR) para elucidar la naturaleza de la interacción del ácido fólico-polímero. Realizó una simulación en condiciones similares a las gastrointestinales para evaluar el comportamiento de liberación. Las fibras electroestiradas producidas a partir de la combinación de alginato-pectina dieron como resultado una mayor retención de ácido fólico en comparación con la de alginato. El ácido fólico encapsulado en fibras logró la retención de aproximadamente el 100% cuando se almacenó en la oscuridad a pH 3 después de 41 días de almacenamiento. Se observó liberación mínima de ácido fólico de las fibras electroestiradas a pH 3. Por otro lado, la liberación de ácido fólico fue de

casi el 97% a un pH de 7.8, una condición que simula la condición de pH en el intestino.

### **1.9 Quitosano**

El quitosano es derivado de residuos de cangrejo y crustáceos, con diferentes grados de desacetilación y peso molecular; ampliamente producido y distribuido de manera comercial. Es insoluble en agua, pero soluble en soluciones ligeramente ácidas. Es un derivado de la quitina, se produce por desacetilación alcalina o enzimática; es un biopolímero no tóxico constituido por  $\beta$ -(1-4)-2-amino-D-glucosa, cuyas características pueden variar según el grado de desacetilación, peso molecular y de polimerización. Presenta actividad anti-fúngica (Meyers, 2007; Riveros, 2010).

El quitosano posee una distribución regular de los grupos aminos libres, que pueden ser protonados por ciertos ácidos cargándose positivamente lo que le confiere un comportamiento de polielectrolito. Este hecho permite explicar algunas propiedades del quitosano como son: la habilidad de enlazarse con sustancias cargadas negativamente tales como lípidos, proteínas, colorantes, entre otras. Una de sus propiedades radica en su estructura rígida, caracterizada por numerosos enlaces por puentes de hidrógeno, la cual le confiere una buena estabilidad térmica. Se descompone aproximadamente a 170°C y se degrada antes de fundir, lo cual es característico de polisacáridos que poseen muchos enlaces por puentes de hidrógeno (Rincon, 2008).

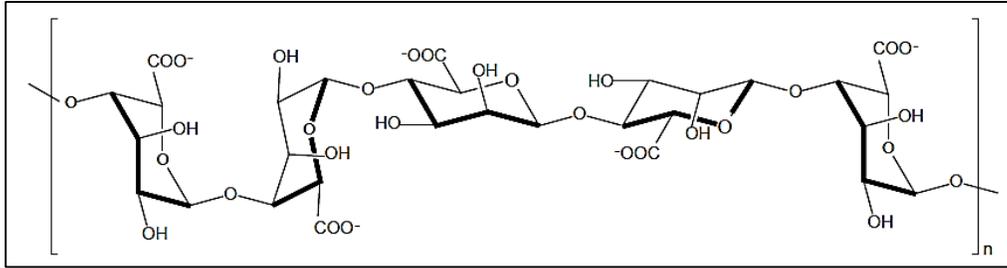


**Figura 7** Estructura química de la quitina y el quitosano. a) Quitina, b) Quitosano. Su diferencia estructural radica en el carbono -2-(marcados entre paréntesis), con su grupo acetilo y amino. (Rincon, 2008).

En cuanto al grado de acetilación se ha establecido, que la quitina con más de un 50 % de desacetilación debe ser considerada quitosano e incluso algunos investigadores la definen como tal con un grado de desacetilación superior al 60 %. Usualmente en el caso del quitosano el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 60-98 %. Sin embargo, también se ha reportado que para lograr una mayor actividad biológica, el contenido de los acetilos debe encontrarse alrededor de un 40 % (Rodríguez *et al.*, 2009).

### 1.10 Alginato de sodio

El alginato es un polisacárido natural, biodegradable, no ramificado, que consiste de la unión de monómeros de ácido  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico en proporciones variables. Es extraído de las algas café y algas marinas tal como: *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*. Los grupos ácidos carboxílicos de las unidades de ácido manurónico y gulurónico están cargados negativamente e interactúan electrostáticamente con los grupos amino del quitosano, los cuales están cargados positivamente (Hamman, 2010).



**Figura 8** Estructura química del alginato (Hammer, 2010).

Este polímero es soluble en agua, biocompatible, inerte frente a proteínas y bioadhesivos; en estudios de encapsulación con alginato, se observó un aumento en el tiempo de residencia y tiempo de absorción en el intestino (Erdic & Neufeld, 2011).

Los hidrogeles a base de alginato, tienen potencial para numerosas aplicaciones farmacéuticas y biomédicas tales como sistemas de entrega de fármacos y encapsulación de células. Las micro y nanocápsulas de alginato se pueden obtener fácilmente por gelificación con iones calcio (Li *et al*, 2008). Recientemente se han hecho estudios del uso de alginato para la encapsulación de compuestos bioactivos y su liberación en algunos alimentos (Madziva *et al.*, 2005).

## **HIPÓTESIS**

El uso de alginato y quitosano como material de pared para la formación de nanocápsulas cargadas con ácido fólico (vitamina B9) y ácido ascórbico (vitamina C), confieren estabilidad a la molécula encapsulada a los diversos factores ambientales que comprometen la integridad en su estructura.

## JUSTIFICACIÓN

La forma de alimentación y estilo de vida actual es causado por el incremento poblacional y un ritmo de vida acelerado, esto ha aumentado la tendencia al consumo de alimentos procesados o mínimamente procesados. Compuestos presentes en los alimentos, como las vitaminas, son indispensables para el correcto funcionamiento del organismo, interactuando principalmente como cofactores en diferentes rutas metabólicas. Sin embargo algunas vitaminas como el ácido fólico y el ácido ascórbico que están presentes en los alimentos de manera natural; se encuentran en una gran variedad de vegetales verdes, cítricos, cereales y leguminosas, pero son susceptibles a degradación por diversos factores ambientales, con tiempos de vida media relativamente cortos, y generalmente tienden a disminuir las concentraciones de estas vitaminas en los procesos de preparación de los alimentos, lo que los vuelve fuentes escasas de estos importantes compuestos. Algunos de los factores que impactan en la integridad de estas moléculas son la temperatura, radiación UV, oxidación, entre otros. Es por esto que se han buscado alternativas para mantener la estabilidad de estas moléculas, y poder integrarlas a matrices alimentarias para la generación de alimentos enriquecidos o fortificados según sea el caso. Los sistemas nanoparticulados pueden ser definidos como un tipo de nanoencapsulación la cual ofrece una alternativa para poder conferir protección a las moléculas de diferente naturaleza, entre esta las vitaminas. Algunos métodos de nanoencapsulación como la gelificación iónica y el uso de polímeros de costo relativamente bajo como alginato de sodio en combinación con el quitosano podrían garantizar la integridad de las moléculas resguardadas, así como su liberación controlada en alimentos y puede promoverse una ingesta adecuada de estos compuestos, basándose en los índices diarios recomendados.

## **OBJETIVO GENERAL**

Elaborar y caracterizar nanopartículas con alginato y quitosano como material de pared, reticuladas con  $\text{CaCl}_2$  y cargadas con ácido fólico y ácido ascórbico.

## **Objetivos específicos**

- Elaborar nanopartículas de ácido fólico y nanopartículas de ácido ascórbico mediante la técnica de gelificación iónica empleando los polímeros alginato de sodio y quitosano como material de pared.
- Caracterizar las nanopartículas de alginato-quitosano cargadas con ácido fólico y ácido ascórbico mediante diversas técnicas físicas y químicas.
- Evaluar el efecto de protección conferido por la matriz de alginato-quitosano sobre la integridad de las moléculas de ácido fólico y ácido ascórbico.

## II.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

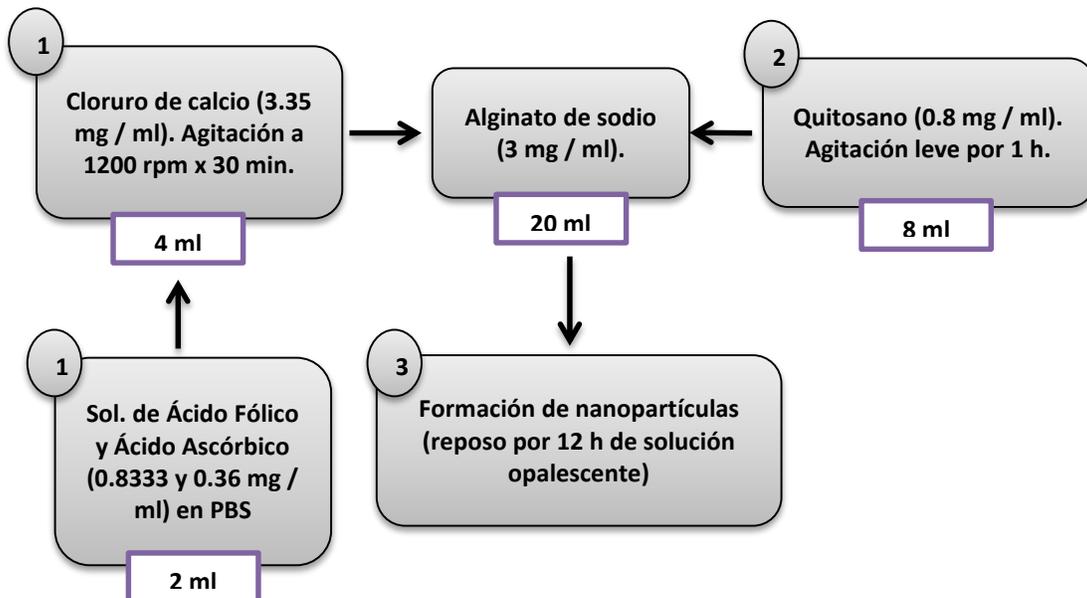
Para la formación de las nanopartículas se emplearon los siguientes materiales: alginato de sodio, quitosano (grado de desacetilación media), ácido fólico y ácido ascórbico, todos adquiridos de Sigma-Aldrich, cloruro de calcio anhidro ( $\text{CaCl}_2$ ), fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de potasio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (Buffer de fosfatos 75 mM, pH 7) adquiridos de J. T. Baker.

### 2.2 Métodos

La técnica empleada para la formación de las nanopartículas fue la gelificación iónica, mediante reticulación con ayuda de  $\text{CaCl}_2$ . Esta técnica consiste en formar una especie de gel cuando el cloruro de calcio interacciona con los grupos  $-\text{COO}^-$  del ácido gulurónico y malurónico del alginato, formando una especie de red o también conocida caja de huevo donde se retiene el compuesto. Se elaboraron mediante esta técnica con la finalidad de observar las propiedades que confiere la reticulación del alginato-quitosano para la encapsulación de estos dos compuestos; esto mediante una caracterización física y química de los sistemas obtenidos, analizando las interacciones moleculares entre las matrices de encapsulación y los activos encapsulados, así como también una serie de técnicas químicas para evaluar la integridad de la molécula a factores como exposición a radiación UV, capacidad antioxidante y se evaluó la liberación controlada del activo a diferentes pH's. Para la determinación de actividad antioxidante, eficiencia de encapsulación, cuantificación de ácido fólico (AF) y ácido ascórbico (AA) y espectros de degradación, se empleó el espectrofotómetro Spectramax 180.

### 2.3 Formación de las nanopartículas

La metodología utilizada fue la descrita por Li *et al.*, (2008) con modificaciones. En 20 ml de una solución de alginato de sodio (3 mg / ml) bajo agitación en Ultra Turrax t18 basic® se adicionaron 4 ml de CaCl<sub>2</sub> (3.35 mg / ml). A la solución de cloruro de calcio se adicionan 2 ml de una solución de ácido fólico (0.833 mg / ml) gota a gota. Para la formación de las nanopartículas cargadas con ácido ascórbico se adicionaron 2 ml de una solución de (AA) (0.36 mg / ml). La solución se agitó por 30 min, posteriormente se adicionaron 8 ml de una solución de quitosano (0.8 mg/ ml) y se agitaron por una hora (Figura 9 y 10).



**Figura 9** Esquema general para la formación de nanopartículas de alginato-quitosano.



**Figura 10** Formación de nanopartículas de alginato-quitosano.

## **2.4 Caracterización de las nanopartículas cargadas con ácido fólico y ácido ascórbico**

### **2.4.1 Microscopía Electrónica de Barrido**

El tamaño promedio de partícula se determinó mediante el programa ImageJ a partir de microscopía electrónica de barrido y los resultados se expresaron como el promedio del tamaño de 100 Np's por imagen  $\pm$  la desviación estándar.

La morfología de las nanopartículas se determinó por microscopía electrónica de barrido (JEOL JXA-8530F) en CINVESTAV campus Querétaro. Se basa en la formación de imágenes mediante la incidencia de un haz de electrones secundarios de alta energía sobre la muestra. De la muestra se tomaron 0.1 mg y se resuspendieron en agua destilada, posteriormente se tomó una alícuota y se resuspendió nuevamente. Se colocó una gota de la suspensión en una lámina de sílice y se dejó secar a temperatura ambiente; cuando la muestra estuvo seca, esta se recubrió con una capa de oro y se observaron al microscopio.



**Figura 11** Microscopio Electrónico de Barrido (CINVESTAV, Qro, 2015).

#### **2.4.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier mediante reflectancia total atenuada (ART-FTIR)**

Los espectros de absorción infrarroja del alginato de sodio, quitosano, ácido fólico, ácido ascórbico, nanopartículas sin cargar, nanopartículas cargadas de ácido fólico y nanopartículas de ácido ascórbico fueron determinados mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con reflectancia total atenuada (ATR), utilizando un espectrofotómetro infrarrojo Spectrum GX de Perkin Elmer acoplado a un accesorio de reflexión total atenuada. El espectrofotómetro fue utilizado en un rango de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ . Los análisis se llevaron a cabo en CINVESTAV, unidad Querétaro.

#### **2.4.3 Difracción de Rayos X**

Los patrones de difracción de Rayos X de las nanopartículas de quitosano-alginato y los polímeros quitosano y alginato fueron determinados en el CINVESTAV campus Querétaro. Dichos estudios se realizaron para investigar la estructura cristalina de las nanopartículas.

#### **2.4.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

Para el estudio del comportamiento térmico o la cantidad de calor que absorbieron o liberaron nanopartículas de alginato-quitosano cargadas con ácido fólico y ácido ascórbico se utilizó Calorimetría Diferencial de Barrido (Mettler Toledo, mod. DSC822e) esta técnica se desarrolló en CINVESTAV unidad Querétaro.

Se tomaron 3 mg de muestra aproximadamente y se colocó en un crisol de aluminio, sellado perfectamente antes de ponerlo en el calentador. Se aplicó una velocidad de barrido de 10 °C en un rango de temperatura de 25 a 300 °C (Archana *et al.*, 2013; Sarmiento, 2006; Mladenovska *et al.*, 2007) en atmósfera de aire con una velocidad de flujo de 100 mL / min.

#### **2.4.5 Potencial Z**

La distribución del tamaño de partícula de las nanopartículas, fue evaluada utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz (NanoZS, Malvern Inst. Ltd, UK). La carga eléctrica ( $\zeta$ ) o potencial Z de las partículas fue medida usando el método de electroforesis de partícula (NanoZS, Malvern Inst. Ltd, UK). Las muestras fueron previamente diluidas a los experimentos ( $\approx$  1:1000) usando una solución PBS (5 mM, pH 7.0), para evitar efectos de dispersión múltiple.

#### **2.4.6 Microscopia de fluorescencia**

Aprovechando la capacidad del ácido fólico de emitir fluorescencia natural, la encapsulación de ácido fólico se siguió mediante microscopia de fluorescencia colocando la muestra en un portaobjetos, posteriormente se colocó en el microscopio y se midió la fluorescencia (Zeiss filtro alexa fluor AF488) con longitud de onda de emisión de 495 y excitación de 519 nm.



**Figura 12** Microscopio de Fluorescencia Zeiss (UAQ, Qro, 2015).

#### **2.4.7 Eficiencia de encapsulación**

Para calcular la eficiencia de encapsulación se liberó el ácido fólico encapsulado: se tomaron 4 mg de nanopartículas y se adicionaron 5 ml de solución PBS (buffer de fosfatos) 75 mM y pH 7; mediante centrifugación a 9000 rpm por 15 min y posteriormente se cuantificó el contenido mediante espectrofotometría a 348 nm y con ayuda de una curva de calibración previamente desarrollada y mediante la ecuación: % EE =  $\left(\frac{\text{cantidad total de AF} - \text{residuo de AF}}{\text{cantidad total de AF}}\right) \times 100$  se procedió a calcular el % EE. Los datos se reportaron como la media  $\pm$  la desviación estándar. Para el cálculo del % de EE del ácido ascórbico se siguió la misma metodología descrita para el ácido fólico, mediante la ecuación: % EE =  $\left(\frac{\text{cantidad total de AA} - \text{residuo de AA}}{\text{cantidad total de AA}}\right) \times 100$ .

### 2.4.8 Cinética de liberación

Un perfil de liberación permite conocer la forma en que el activo encapsulado es liberado a través del tiempo y según las condiciones del medio en el que se encuentra. Esto permite genera información sobre en qué tipo de matriz alimentaria podrían ser aplicados estos sistemas nanoparticulados.

En el presente trabajo, el parámetro de importancia para realizar el perfil de liberación, fue el pH. Para la cinética de liberación se hizo uso de una solución de PBS 75 mM a tres diferentes pH's: 1.5, 6.8 y 7.4; se colocaron 4 mg de nanoparticulas cargadas con AF y AA en tubos falcon, según el caso y se les añadieron 5 ml de la solución de PBS, se dejaron bajo agitación magnética a 300 rpm. Se tomaron muestras a las 0, 10, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos. En una cámara de cromatografía por exclusión de tamaño y conectada a una bomba de vacío se colocaron columnas C18 por triplicado, se pipetearon 0.5 ml de la solución de nanopartículas en la columna y posteriormente se eluyeron con 2 ml de solución PBS a los diferentes pH's. De la solución final colectada, se tomaron 250  $\mu$ l, se colocaron en una placa de 94 pozos y se leyeron las absorbancias a 348 nm, la cinética se realizó por duplicado con tres repeticiones cada una. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura 13** Cámara cromatografía acoplada a bomba de vacío.

#### 2.4.9 Capacidad antioxidante

La literatura sugiere que los folatos pueden actuar como antioxidantes. Se demostró que el ácido fólico puede eliminar de manera eficiente los radicales libres como  $\text{CCl}_3\text{O}^\cdot$ ,  $\text{N}^\cdot_3$ ,  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ ,  $\text{Br}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^\cdot$  y  $\text{O}^\cdot$ . Sus formas reducidas fisiológicas son carroñeros de peroxinitrito y los inhibidores de la peroxidación lipídica. También se informó de la actividad de AF contra el daño oxidativo mediado por radicales en sangre entera humana (Gliszczynska, 2007). La actividad antioxidante tiende a ser baja para el ácido fólico, Las actividades antioxidantes de las formas fisiológicas de ácido fólico podrían llegar a ser importante in vivo especialmente en vista de la suplementación nutricional y enriquecimiento de los alimentos con ácido fólico. Por otro lado el ácido ascórbico es un compuesto con una actividad antioxidante elevada, comportándose como un donador de electrones, lo que lo hace susceptible a ser altamente oxidado por el oxígeno y la luz.

La estimación de la Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC) del ácido fólico y ácido ascórbico se determinaron mediante la técnica por atrapamiento de radicales  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  (2,2'-azino-bis (3-etilenbenzotiazolina-6-sulfónico) (Nenadis *et al.*, 2004).

Para medir la capacidad antioxidante del AF y AA mediante la técnica de ABTS, se tomaron 4 mg de nanopartículas cargadas con AF y AA se colocaron en tubos falcon y se adicionaron 5ml de solución PBS y agua destilada, respectivamente; se calibraron los tubos y se centrifugaron a 9000 rpm por 15 min a 4°C. Posteriormente se tomaron alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  del activo liberado y se colocaron en placas de 96 pozos y se adicionaron 230  $\mu\text{L}$  de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  previamente preparado. Se preparó un blanco que constó de 20  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 230  $\mu\text{L}$  de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  y tres controles: 20  $\mu\text{L}$  de PBS + 230  $\mu\text{L}$  de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ; 20  $\mu\text{L}$  de etanol + 230  $\mu\text{L}$  de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  y 20  $\mu\text{L}$  de np's en PBS. Se realizaron las lecturas a una longitud de onda de 734 nm registrándose las absorbancias a los 0, 6, 10, 30, 60 y 90 minutos, en un lector de microplacas SpectraMax. La Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox se determinó mediante una curva de calibración previamente establecida y los cálculos para el % de inhibición del radical se llevó a

cabo mediante la ecuación: % de Inhibición =  $[(\text{Abs control} - \text{Abs de la muestra}) / \text{Abs control}] * 100$ , donde Abs es la absorbancia medida.

#### **2.4.10 Pruebas de protección contra la degradación por radiación UV**

Para determinar la estabilidad del ácido fólico encapsulado frente a la oxidación por radiación UV-Vis, se tomaron 2 mg de nanopartículas cargadas con ácido fólico (82.624  $\mu\text{g}$ ) y 82.624  $\mu\text{g}$  de ácido fólico libre se colocaron en 5 ml de solución PBS pH 7. Posteriormente estas soluciones fueron expuestas a la luz UV-Vis de una lámpara EXO TERRA: Reptile UVB 100 de 13 W a una distancia de la muestra 15 cm. Esta lámpara produce una mezcla de radiaciones similares a las de la luz del sol. Este experimento se realizó a 3 pH's diferentes: 2, 6.8 y 7.4, esto con la finalidad de observar el efecto de este parámetro junto con el efecto protector de la matriz de encapsulación sobre la integridad de la molécula de ácido fólico cuando éste es expuesto a la luz. Una solución a la misma concentración de ácido fólico y de nanopartículas con activo se resguardó de la luz para utilizarlas como control. Después del tiempo de radiación las nanopartículas suspendidas en solución PBS fueron recuperadas y el ácido fólico remanente fue extraído para su análisis, mediante centrifugación a 9000 rpm por 10 min a 4 °C. La degradación fue medida mediante espectrofotometría UV-Vis a 348 nm).

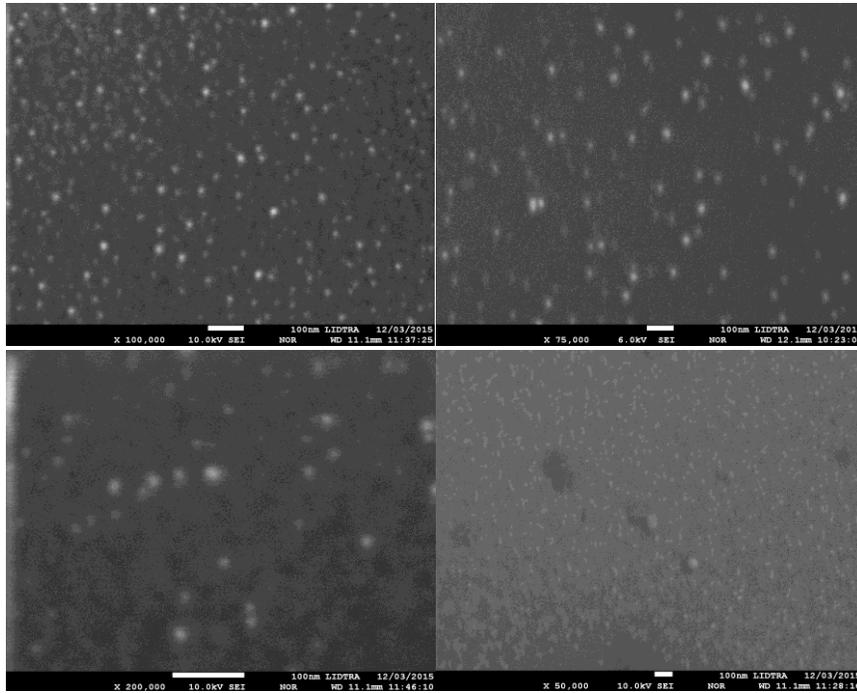
### III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula se determinó mediante el programa ImageJ®. Tres micrografías fueron analizadas en el programa, arrojando como resultado un tamaño de partícula promedio de  $73.8 \pm 3.0048$  (datos reportados como la media  $\pm$  la desviación estándar) nm. Este tamaño es similar lo reportado por diversos autores (Li *et al.*, 2008, Sanjay *et al.*, 2008 y Ratul *et al.*, 2009) que oscila entre los  $50 \pm 20$  nm para nanopartículas formadas con alginato-quitosano cargadas con finedipina y ácido 5-acetil salicílico respectivamente.

#### 3.2 Morfología de las nanopartículas

Para poder estudiar la morfología de las nanopartículas formadas se analizaron las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (Figura 14). Mediante estas se pudo observar la formación de las nanopartículas de alginato-quitosano sin cargar. Se observan pequeños puntos de aproximadamente 74 nm. Sin embargo la morfología no puede apreciarse claramente debido a que al buscar incrementar la resolución de la imagen posiblemente ocurra una degradación a la que se somete la muestra por la alta potencia del microscopio.



**Figura 14** Micrografías Electrónicas de Barrido de las nanopartículas de alginato-quitosano como material de pared a 100 000, 200 000 y 75 000 x respectivamente.

### 3.3 Caracterización de las nanopartículas

#### 3.3.1 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (ART-FT-IR)

Los espectrómetros infrarrojos son una de las herramientas más importantes para observar espectros vibracionales. Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias orgánicas por las cuales es posible lograr identificar los materiales que conforman una muestra. El espectro infrarrojo medio ( $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ ) es donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales; se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre únicamente dos átomos de la molécula. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces aislados. La energía particular a la que aparece cada pico en un espectro guarda relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula. El espectro vibracional se considera una característica única y por tanto característica de una molécula. El espectro infrarrojo puede ser utilizado como una huella dactilar en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con otros espectros de referencia.

Se analizaron las muestras de nanopartículas y mezclas físicas de los compuestos por FT-IR para caracterizar las posibles interacciones en las nanopartículas.

En las figuras 15 y 16 se muestran los espectros FT-IR de las muestras físicas de alginato, quitosano ácido fólico, ácido ascórbico nanopartículas sin cargar de alginato-quitosano y nanopartículas de alginato-quitosano cargadas con ácido fólico y ácido ascórbico respectivamente.

En la figura 15 b se aprecia el espectro del quitosano; se observa una banda a  $3424\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la amina ( $\text{NH}_2$ ) y grupo carboxilo ( $-\text{COO}$ ). La banda a  $2876\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un estiramiento en el enlace OH; la banda de absorción del grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) estira a la amida secundaria (banda amida I) a  $1655\text{ cm}^{-1}$  y las vibraciones de flexión de la N-H (residuos N-acetilados, banda amida II) en

1599  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas a 1423 y 1381  $\text{cm}^{-1}$  pertenecen al estiramiento N-H de los enlaces amida y éter y estiramiento del N-H (banda de la amida III), respectivamente. Las bandas observadas en 1081 y 1033  $\text{cm}^{-1}$  son del grupo hidroxilo secundario (banda característica en  $-\text{CH}_2\text{-OH}$  en alcoholes cíclicos, estiramiento C-O) y el grupo hidroxilo primario (pico característico en  $-\text{CH}_2\text{-OH}$  en alcoholes primarios, estiramiento C-O) (Li; *et al.*, 2008).

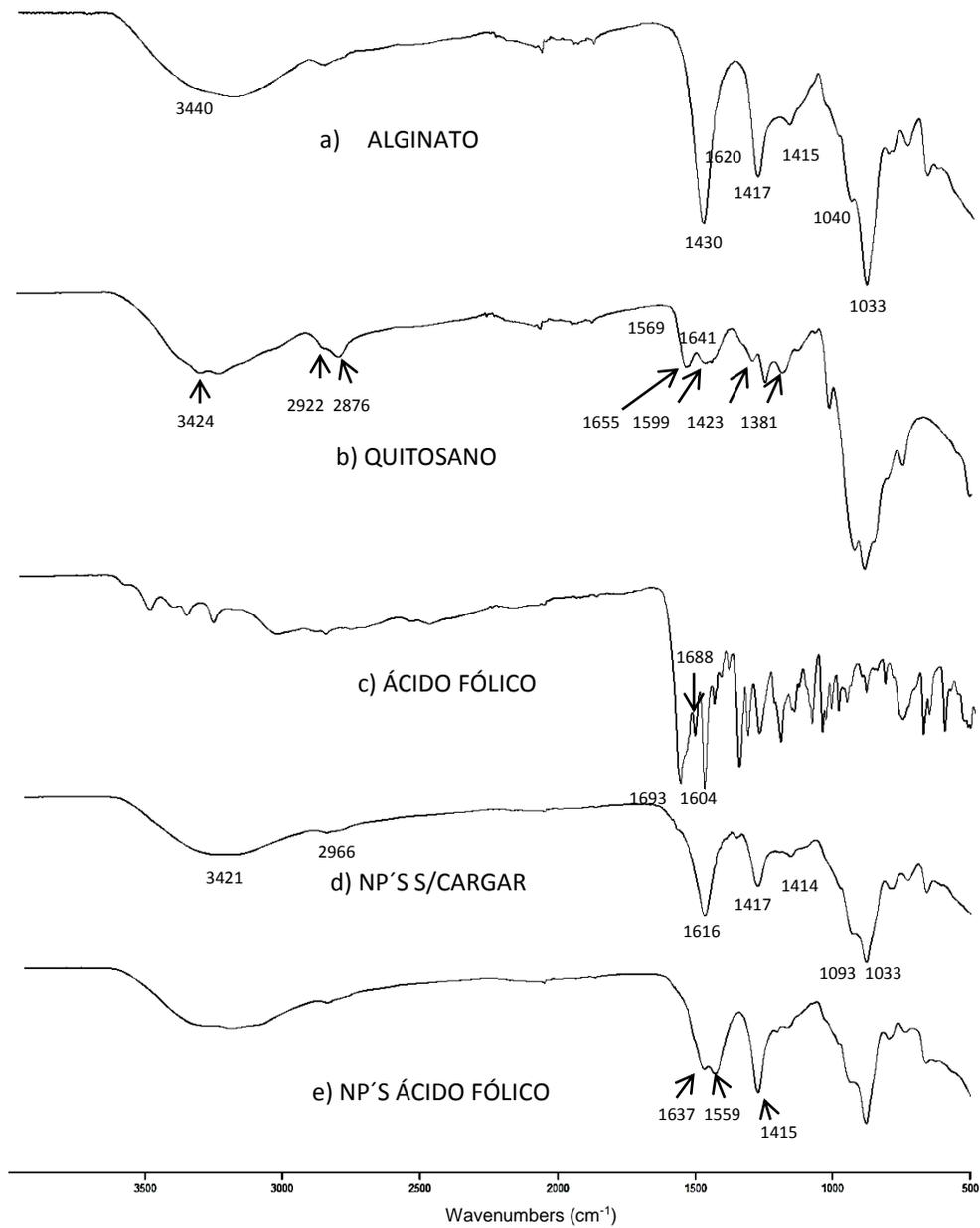
En la figura 15a se muestran las características del espectro del alginato, corresponde ha  $-\text{COO}^-$  (1613-1620  $\text{cm}^{-1}$ ),  $-\text{CH}$  (1430  $\text{cm}^{-1}$ ) y C-O-C (1040  $\text{cm}^{-1}$ ), mientras que la banda a 3440  $\text{cm}^{-1}$  pertenece a la vibración de estiramiento del grupo hidroxilo unidos por puentes de hidrogeno. (Mladenovska, *et al*, 2007).

Está bien establecido que el grupo carboxilo ( $-\text{COO}^-$ ) del polímero aniónico (alginato) interactúa con el grupo amino ( $-\text{NH}_3^+$ ) del quitosano y forman un complejo iónico entre los dos compuestos. Como resultado hay cambios en los espectros FT-IR en las bandas de absorción de los grupos amino y enlaces amida en las nanopartículas sin cargar (Figura 15d). Se pueden observar bandas cerca de 1613  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{COO}^-$  simétricos) y a 1415  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{COO}^-$  asimétricos) ampliados y ligeramente desplazados de 1613 a 1610 y 1415 a 1414 después de la complejación con quitosano. El espectro FT-IR del quitosano también mostró una banda del enlace amida a 1641  $\text{cm}^{-1}$  y una banda amida protonada a 1569  $\text{cm}^{-1}$  porque se obtiene de la N-deacetilación de la quitina. Sin embargo ambos picos fueron desplazados de manera similar por unos pocos  $\text{cm}^{-1}$  después de la complejación con alginato. Los cambios observados en las bandas de absorción de los grupos amino, grupos carboxilo y enlaces amida pueden ser atribuidos a la interacción iónica entre el grupo carbonilo del alginato y el grupo amino del quitosano de acuerdo a lo reportado por Sarmiento en el 2006.

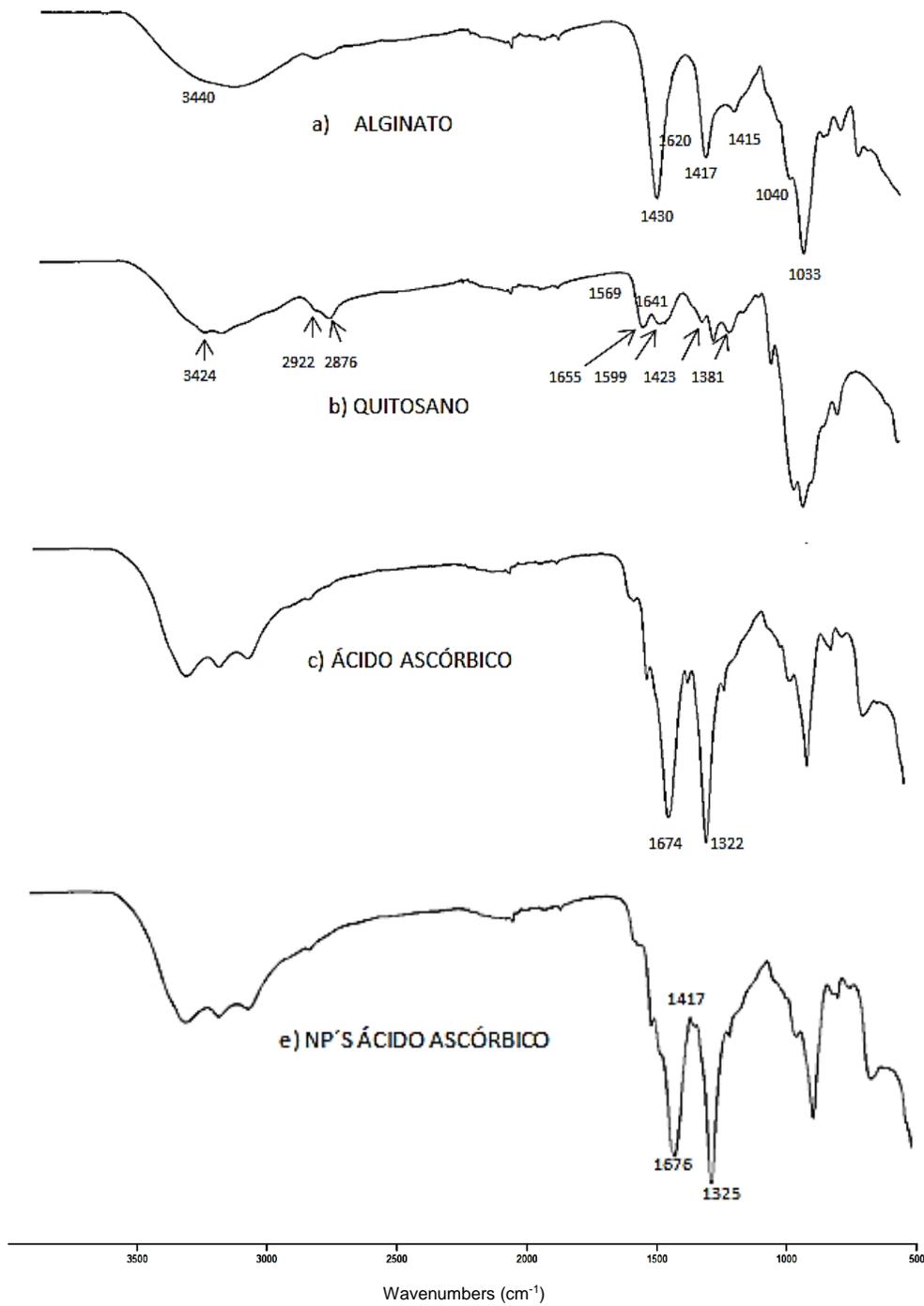
La Figura 15c corresponde al espectro de ácido fólico. Se aprecian las bandas más características, el estiramiento del enlace CH-OH del glutamato se encuentra a 1688  $\text{cm}^{-1}$ . A 1604  $\text{cm}^{-1}$  y a 1693  $\text{cm}^{-1}$  se muestran las bandas de tensión características del enlace C=C aromático del ácido p-aminobenzóico y la amida del ácido glutámico respectivamente. En las nanopartículas cargadas con ácido fólico

se observa (Figura 15e) se observa un estiramiento de banda de  $1637$  a  $1559\text{ cm}^{-1}$ , esto podría sugerir una interacción entre los grupos carboxilo del alginato de las nanopartículas y los grupos hidroxilo del ácido glutámico

En el espectro del ácido ascórbico (figura 16c) la vibración de estiramiento del doble enlace C-C y el pico del hidroxienol fueron observados a  $1674\text{ cm}^{-1}$  y  $1322\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, estos picos también se observan en las nanopartículas cargadas con ácido ascórbico con ligeros estiramientos de banda hacia  $1676\text{ cm}^{-1}$  y  $1325\text{ cm}^{-1}$ . Lo que podría sugerir interacciones entre los grupos hidroxienol del ácido ascórbico y carboxilo (-COO) del alginato, esto se observó en la banda con un ligero estiramiento hacia  $1417\text{ cm}^{-1}$  en las nanopartículas cargadas, que es característica del ácido ascórbico (Asim, *et al*, 2014).



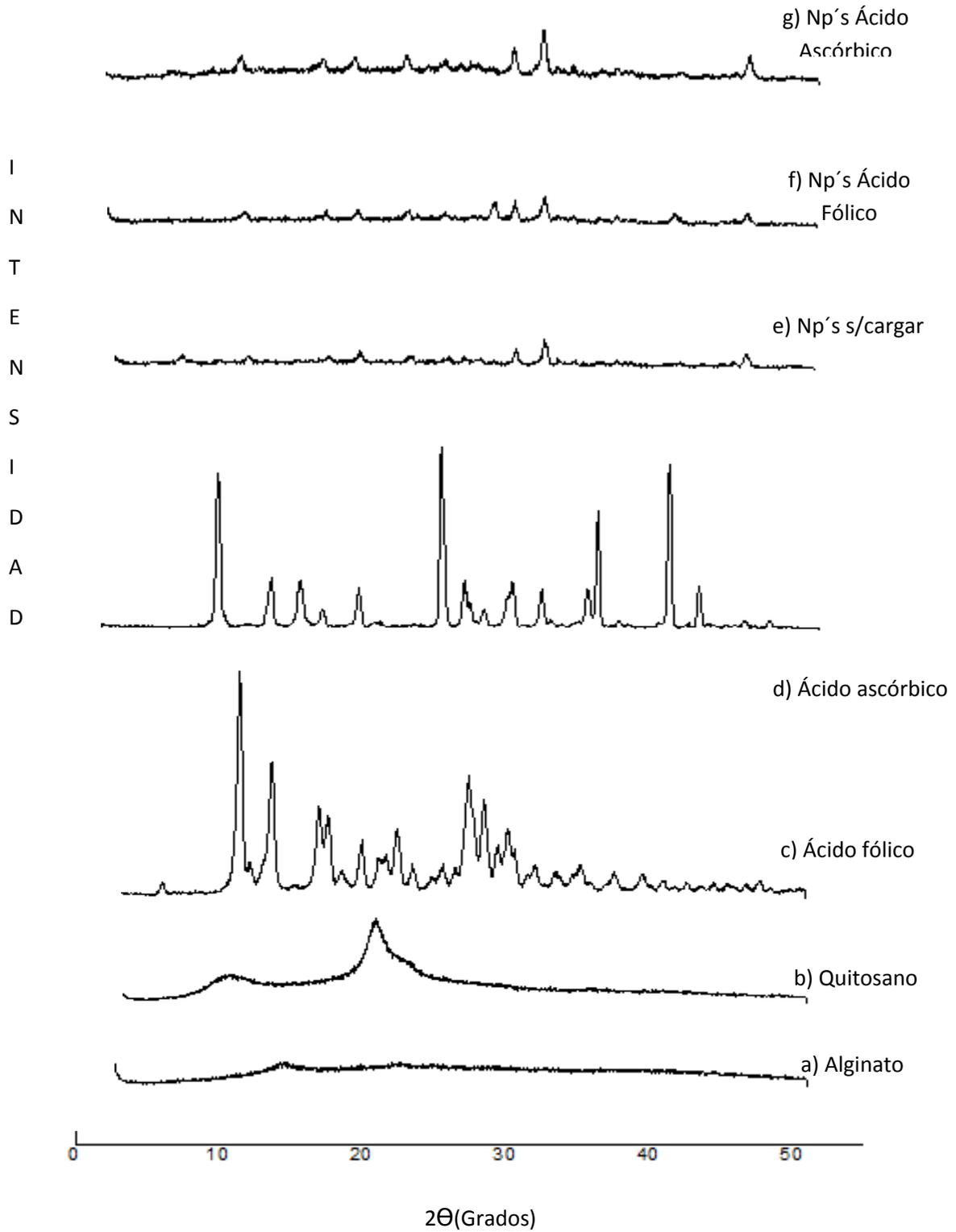
**Figura 15** Espectro FTIR de a) alginato de sodio, b) quitosano, c) ácido fólico, d) nanopartículas de alginato-quitosano sin cargar y e) nanopartículas de alginato- quitosano y cargadas con ácido fólico.



**Figura 16** Espectro FTIR de a) alginato de sodio, b) quitosano, c) ácido fólico, d) nanopartículas de alginato-quitosano sin cargar y e) nanopartículas de alginato- quitosano y cargadas con ácido ascórbico.

### 3.3.2 Difracción de Rayos X

Se realizaron estudios de difracción de rayos X para poder observar la posible estructura cristalina de las nanopartículas (Np's) formadas y cargadas con ácido fólico y ácido ascórbico. En el difractograma de polímero de quitosano (Figura 17a) sólo un pico es claramente visible, cuyo máximo se produce en el ángulo  $2\theta = 20^\circ$ . Otro pico también visible en el ángulo  $2\theta = 11^\circ$ . Lo que se observó es que el quitosano es un polímero con bajo índice de cristalinidad, es decir, su estructura es similar a la de un polímero amórfico. En el caso del alginato (Figura 17b), el difractograma no muestra ningún pico característico, esto se debe a la naturaleza no cristalina o amorfa del polímero. El ácido ascórbico (Figura 17d) exhibió múltiples picos agudos característicos que varían de  $2\theta = 5$  a  $60^\circ$  y que se les atribuye a la naturaleza cristalina de ácido ascórbico (Nirmala, 2013). El ácido fólico es un compuesto con estructura cristalina (Figura 17b); en datos reportados por Eliane *et al.*, (2014) se observaron resultados similares a los obtenidos en el difractograma de ácido fólico obtenido en el presente trabajo en los que se detectan picos en un rango de  $2\theta = 10^\circ$  a  $40^\circ$  los cuales han sido reportados como característicos del anillo de pteridina y el ácido p-aminobenzóico. En las nanopartículas sin cargar y cargadas con ácido fólico y ácido ascórbico respectivamente (Figuras 17e, f y g), se observan picos en los tres difractogramas en  $2\theta = 20^\circ$ ,  $32^\circ$ ,  $35^\circ$  y  $48^\circ$ , esto podría deberse a la baja cristalinidad que se forma en las partículas de alginato-quitosano durante la reticulación o crosslinking con  $\text{CaCl}_2$ . Las nanopartículas formadas no presentaron una morfología cristalina considerable, es decir presentan una baja cristalinidad; los activos, ácido ascórbico y ácido fólico aun siendo moléculas cristalinas definidas, no influyen de manera considerable en la morfología de las nanopartículas.

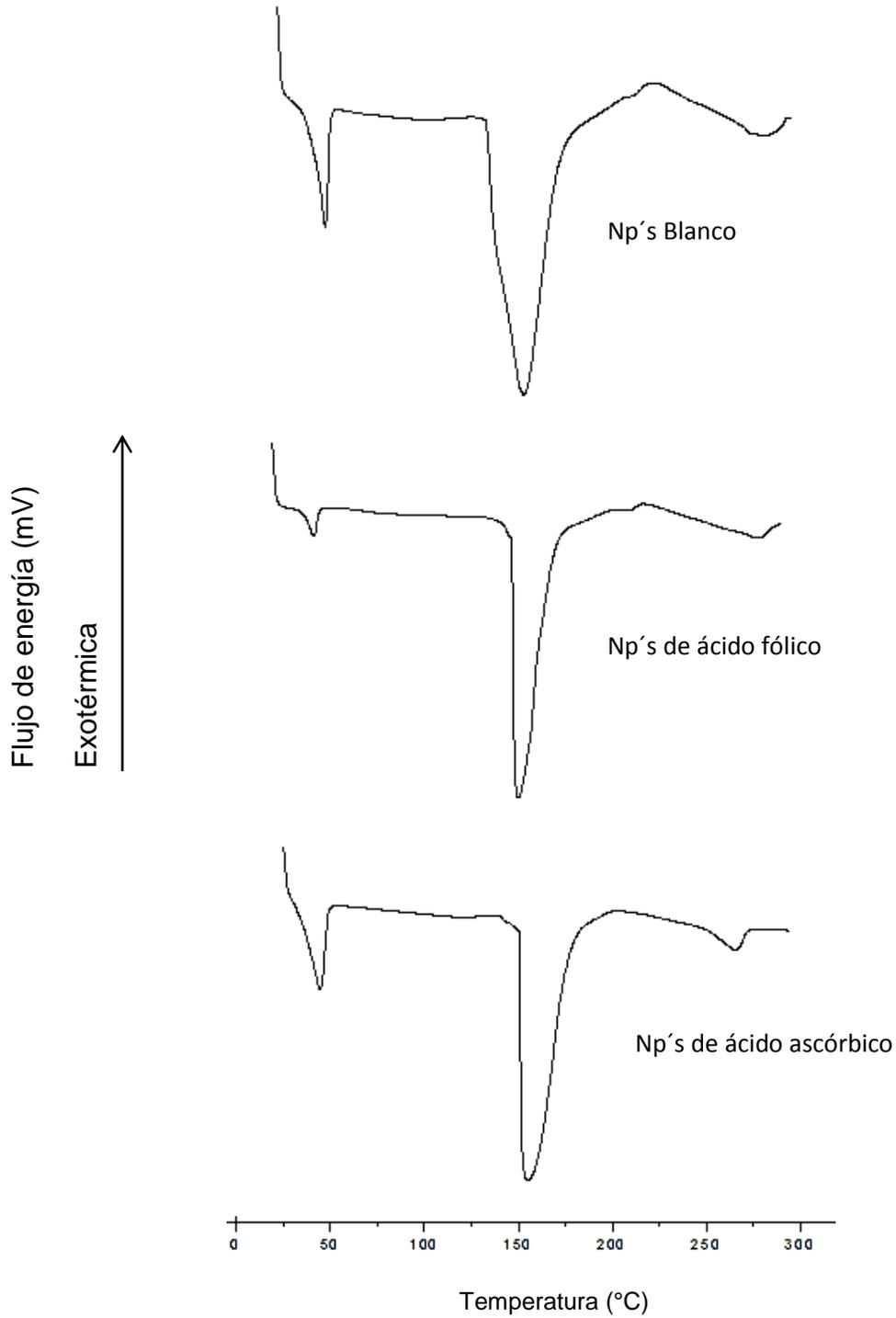


**Figura 17** Difractogramas de Rayos X para los polímeros de encapsulación Alginate, Quitosano, Nanopartículas de ácido fólico, Nanopartículas de ácido ascórbico y Nanopartículas sin cargar.

### 3.3.3 Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) se emplea para medir varias propiedades características de una muestra. Usando esta técnica es posible medir procesos como la fusión y la cristalización así como temperaturas de transiciones vítreas ( $T_g$ ) (cambio de los polímeros de un sólido fuerte y rígido a un sólido gomoso o blando). Esta técnica calorimétrica puede ser también utilizada para estudiar la oxidación, así como otras reacciones químicas que pueden observarse en los polímeros de diferentes naturalezas. Los calorímetros DSC son capaces de medir la cantidad de calor absorbido o eliminado durante tales transiciones. El resultado del corrimiento de algún material por la técnica de DSC es una curva de flujo calorífico *versus* temperatura o *versus* tiempo (Suriñach, 1992).

En la figura 18 se muestra los termogramas de las nanopartículas blanco, nanopartículas cargadas con ácido fólico y nanopartículas cargadas con ácido ascórbico. En las nanopartículas sin cargar se observa un gran pico endotérmico por debajo de 50°C, esto puede sugerir un contenido de humedad en las partículas, es decir, la muestra absorbe una cantidad de energía necesaria para liberar la humedad antes del cambio a la transición cristalina y para que esta pueda ocurrir. Por debajo de los 150°C se aprecia de igual manera un pico endotérmico para las muestras de nanopartículas cargadas con los activos y las nanopartículas sin cargar; un pico exotérmico de degradación a los 215 °C para nanopartículas blanco, 225°C para Np's de ácido fólico y a 280 °C para el ácido ascórbico. Mladenovska *et al.*, (2007) reportan picos similares en nanopartículas de alginato, los investigadores sugieren que el intercambio de los iones del alginato con los iones calcio contribuye a la aparición del pico exotérmico de degradación, lo que podría explicar la denominada estructura "caja de huevo" en la formación de las nanopartículas de alginato-quitosano por reticulación con cloruro de calcio, esto es, estas interacciones aportan a la estructura de la nanopartícula una mayor resistencia a la degradación por calor.



**Figura 18** Termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido para las nanopartículas sin cargar, cargadas con ácido fólico y cargadas con ácido ascórbico.

### 3.3.4 Potencial Z

El potencial Z es una medida de la carga neta de la superficie de las partículas formadas en solución, que está relacionada con su estabilidad. Se ha reportado que valores de potencial Z entre  $\pm 30$  a  $\pm 100$  mV valores indican estabilidad entre las partículas, mientras que valores por debajo de  $\pm 30$  mV sugieren muy baja estabilidad. La falta de repulsión electrostática o  $Z = 0$  elimina la barrera cinética y la condensación espontánea de las partículas, dando como resultado una disminución en la energía de la superficie de partículas y la formación de agregados, lo cual impacta en el tamaño de partícula y afectará por ende la liberación de los compuestos encapsulados. Las mediciones del potencial zeta de las NP, se determinaron utilizando un Zetasizer Zen. Después de haber sido diluidas con H<sub>2</sub>O desionizada, para evitar los efectos de difracción múltiple. Las muestras fueron colocadas en celdas de capilares y las mediciones se realizaron a 25 °C. Los análisis de estas dos evaluaciones, se hicieron por triplicado en cada lote con el programa Colloidal Dinamycs® y los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  la desviación estándar (Pool *et al.*, 2012).

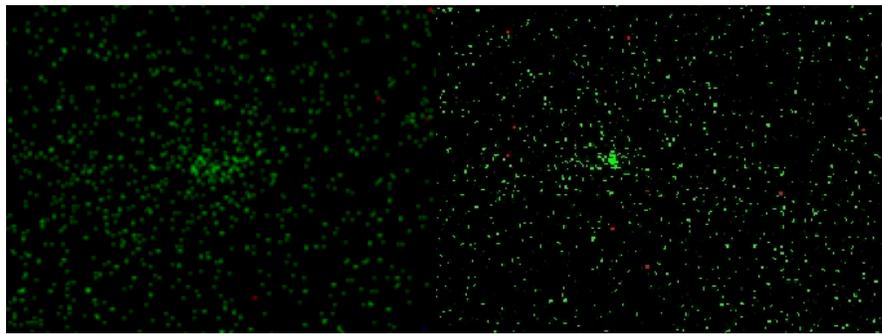
El potencial Z es una medida de la repulsión entre partículas lo que facilitará la adhesión y propiedades de transporte de las nanopartículas. Por otra parte, esto sugiere una alta estabilidad esencial para evitar la agregación de partículas cuando se encuentran en medio líquido. Con los datos obtenidos (Cuadro 3) en el presente estudio, se observó que debido al potencial Z que presentan las nanopartículas cargadas con los activos (ácido fólico y ácido ascórbico) y las nanopartículas sin cargar, estas tienen cierta estabilidad conferida por las cargas de los polímeros de encapsulación, el alginato y quitosano, esto podría explicar el pequeño tamaño que se obtuvo de las nanopartículas de alginato-quitosano, ya que debido a las fuerzas de repulsión entre las nanopartículas que se presentan cuando se lleva a cabo la reticulación, esto podía sugerir que se presente cierta dificultad para que las partículas se aglomeren, lo que podría a su vez dar pie a una buena liberación controlada de los activos, ya que mientras más dispersas se encuentren las nanopartículas, se conservaría su superficie de contacto.

**Cuadro 3** Potencial Z de las nanopartículas de Ácido Fólico.

<b>COMPUESTO</b>	<b>PotZ [m V]</b>	<b>DEVIACIÓN ESTÁNDAR</b>
Ácido fólico (AF)	-8.8144	± 1.3823
Ácido ascórbico (AA)	-4.2389	± 0.7824
Quitosano (QN)	38.4956	± 2.2330
Alginato (ALG)	-36.64	± 1.8381
Nanopartículas ALG-QN (Blanco)	9.39	± 1.5971
Nanopartículas de ALG-QN AF	14.3322	± 3.0098
Nanopartículas de ALG-QN AA	16.8417	± 1.9368

### 3.3.5 Microscopia de fluorescencia

Se aprovechó la capacidad del ácido fólico para emitir fluorescencia; la molécula de pteridina es la responsable de la fluorescencia emitida por el ácido fólico a 455 nm (Aceituno, 2011). La microscopía de fluorescencia se realizó para las nanopartículas cargadas con ácido fólico, con la finalidad de determinar la presencia del ácido fólico dentro de éstas. En las micrografías pueden observarse conglomerados de las nanopartículas, en las que se aprecia la fluorescencia emitida por el ácido fólico retenido en ellas (Figura 19). Debido al tamaño de éstas y a la limitada potencia del microscopio de fluorescencia solo pueden observarse como conglomerados y no como las nanopartículas individuales.



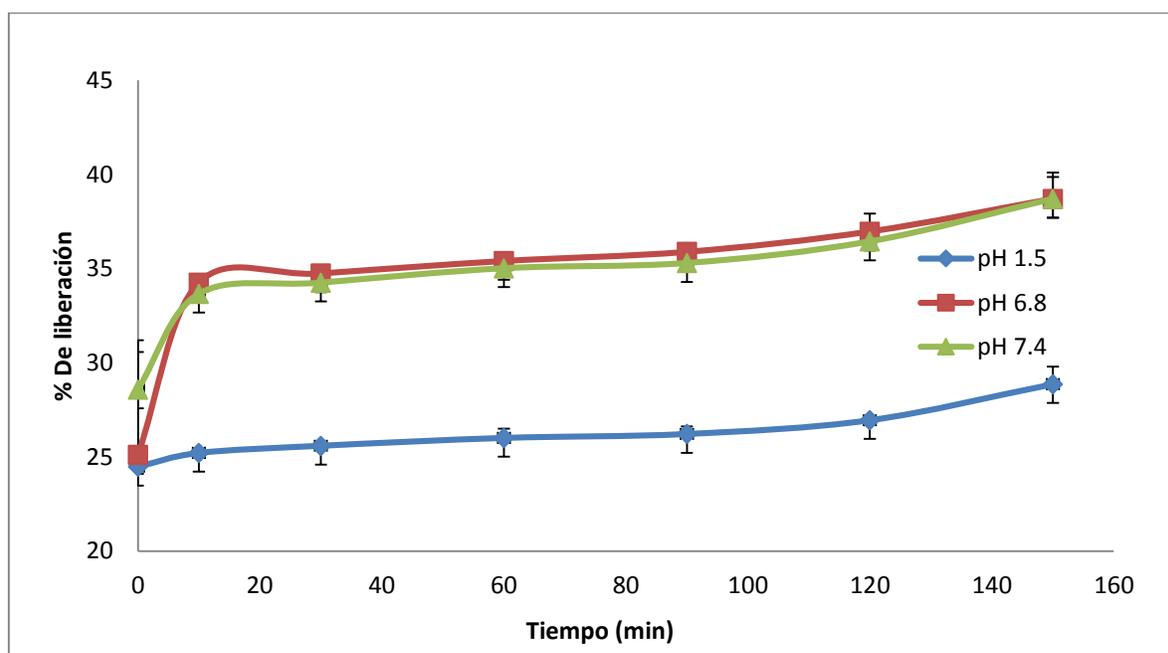
**Figura 19** Micrografías de Fluorescencia para las nanopartículas de alginato-quitosano cargadas con ácido fólico.

### 3.4 Eficiencia de encapsulación (% EE)

Para el ácido fólico la eficiencia de encapsulación obtenida fue del  $94.81\% \pm 0.46$ . La eficiencia de encapsulación del ácido ascórbico fue del  $97.8 \pm 0.105$ , se lograron altas eficiencias de encapsulación, esto podría deberse a la afinidad de los activos, con los polímeros de encapsulación. Archana *et al*, 2013, lograron una eficiencia de encapsulación del 70 % utilizando una matriz combinada de alginato-quitosano encapsulando. Mientras que Simonoska *et al*, 2007 reportaron eficiencias de encapsulación de 99.8 % empleando alginato-quitosano como material de pared para la encapsulación de Budesodina; Ramesh en el 2012 reportó un porcentaje de eficiencia de encapsulación no mayores a 26 % empleando alginato y quitosano como material de pared, es importante mencionar que Ramesh empleó una técnica en la que las nanopartículas se formaron mediante reticulación de quitosano y TPP (tripolifosfato de sodio) y fueron recubiertas con alginato, es decir una variante inversa a la empleada en la formación de las nanopartículas del presente trabajo. Sanjay en el 2008 reportó EE del 82%.

### 3.5 Cinética de liberación

La cinética de liberación se realizó a tres pH's diferentes, 1.5, 6.8 y 7.4, tratando de simular los del tracto digestivo: desde el estómago, yeyuno e intestino grueso respectivamente; En la figura 20 se presentan los perfiles de liberación para el ácido fólico, se puede observar que a pH 1.5 la liberación del activo fue lenta con el mayor porcentaje de liberación del  $28.86 \pm 0.934$ . A pH de 6.8 y 7.4 se puede observar un comportamiento bifásico, donde se tiene una liberación rápida en los primeros 10 minutos. Los mayores porcentajes de liberación del ácido fólico se observaron a los pH's 6.8 y 7.4 a los 150 minutos, con una tendencia de liberación similar. La información proporcionada no solo permite conocer el perfil de liberación considerando los pH's del tracto gastrointestinal, sino que también nos da información sobre los posibles alimentos en los que podrían ser incluidas las nanopartículas de ácido fólico.



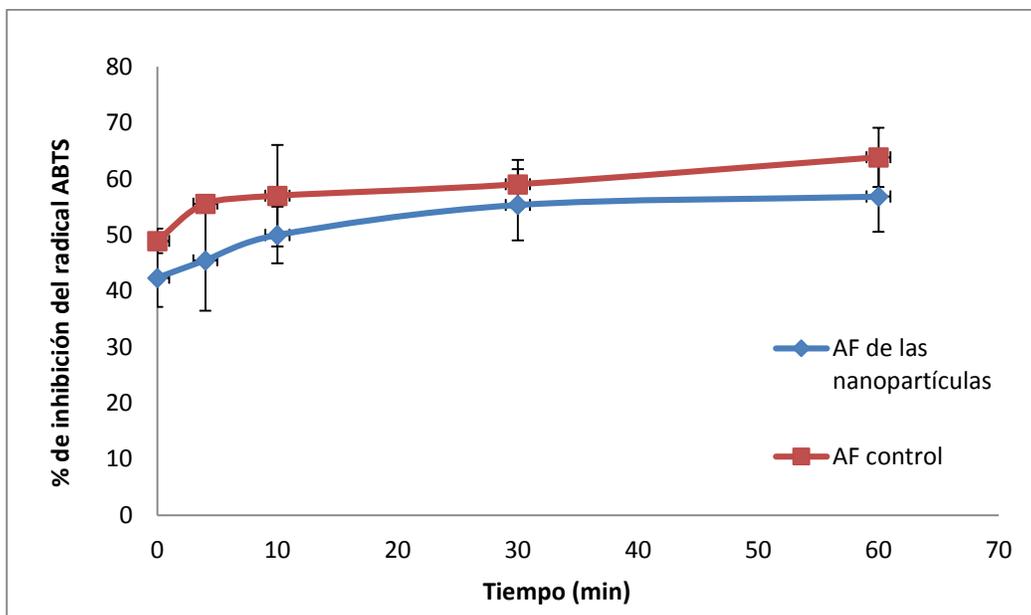
**Figura 20** Cinética de liberación del ácido fólico en buffer de fosfatos 75 mM a tres pH's de 1.5, 6.8 y 7.4 (datos reportados como la media  $\pm$  la desviación estándar).

### 3.6 Capacidad antioxidante

#### 3.6.1 Método de ABTS para ácido fólico

El ácido fólico además de tener importancia como una molécula transportadora y su participación como cofactor en diversos procesos celulares, también se le conoce por presentar un cierto potencial como molécula antioxidante. Este parámetro, para términos de nanoencapsulación como para potencial uso de esta propiedad en los alimentos y otros campos como la farmacología, es importante. En el caso de los alimentos en algunos estudios realizados se ha observado el efecto del ácido fólico sobre la peroxidación lipídica donde la concentración de ácido fólico necesaria para inhibir el 50 % de los peroxinitritos (PON) y peroxidación lipídica (POL) es de 500  $\mu\text{M}$  (Gliszczynska, 2007; Bashir, *et al.*, 2003; Ravi, 2001).

En la figura 21 el porcentaje de inhibición que tiene la estructura de la molécula de ácido fólico sobre el radical ABTS. Se observa un % de inhibición de aproximadamente un 57 % del ácido fólico extraído de las nanopartículas, en comparación con el AF control, esto indicó una pérdida en la capacidad de atrapamiento del ácido fólico, ya sea por la disminución en la concentración de AF en las nanopartículas, o por otro lado a las ligeras pérdidas del activo durante el periodo de tiempo en el que se desarrolló la técnica. Esta actividad se le puede atribuir a los grupos hidroxilo de los anillo de pteridina y a la molécula de ácido glutámico. Es importante mencionar que las formas biológicamente activas de esta vitamina tienen una actividad antioxidante mayor, esto debido a que su estructura permite una mayor biodisponibilidad en el organismo y un mayor atrapamiento de los radicales libres (Gliszczynska-Swigło, 2007).



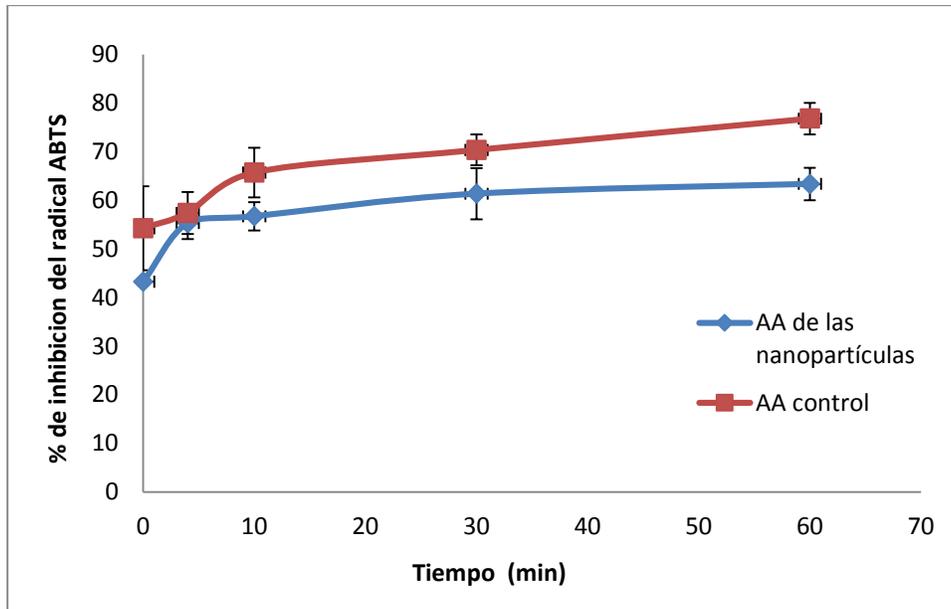
**Figura 21** Método de ABTS: porcentaje de inhibición del radical ABTS por el ácido fólico.

### 3.6.2 Método del ABTS para el ácido ascórbico

Al ácido ascórbico además de su importancia biológica, se le conoce principalmente por su uso en diversos ámbitos de los alimentos, como suplemento alimenticio así como antioxidante. Sin embargo esta molécula es extremadamente sensible a cambiar su forma molecular por que presenta una alta oxidación frente al oxígeno del aire, así como también es termolábil.

Para poder determinar la capacidad antioxidante del ácido ascórbico fue necesario una manipulación rápida de las muestras al momento de hacer las pruebas. Al realizar las pruebas de inhibición del radical ABTS por ácido ascórbico, se pudo observar un porcentaje de inhibición de hasta un 62 %, se puede observar como este es mayor que el del ácido fólico, reconociendo que este porcentaje podría ser mayor con una manipulación más cuidadosa que la realizada por este trabajo y la cual no era un objetivo (Figura 22). Ewa Jablonska *et al.*, en el 2009 reportó un porcentaje de inhibición de 92.5 %. Un menor porcentaje de inhibición, pudo deberse a la degradación del activo, debido a la

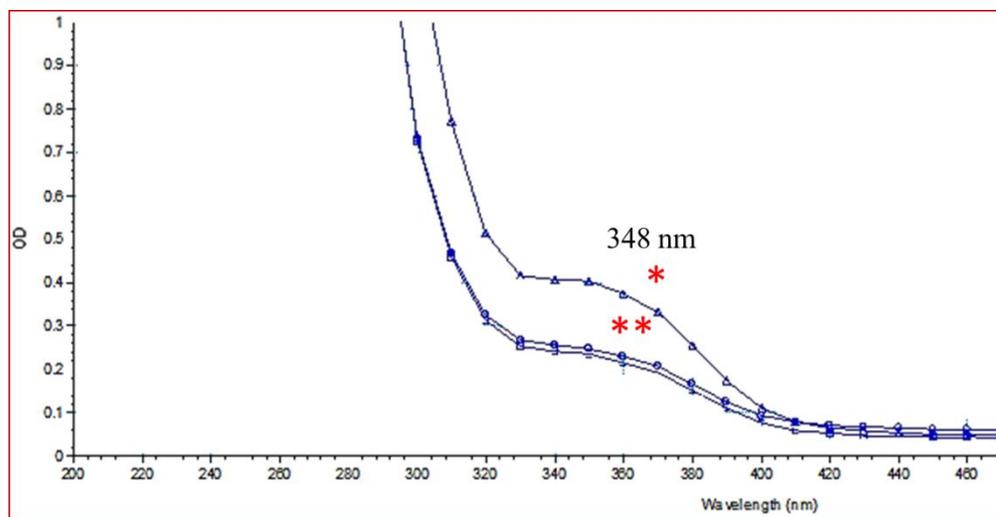
sensibilidad de este al ser expuesto al oxígeno, y dado que esta técnica se requiere periodos de exposición al oxígeno del aire, mientras se ejecuta.



**Figura 22** Método de ABTS: porcentaje de inhibición del radical ABTS por el ácido ascórbico.

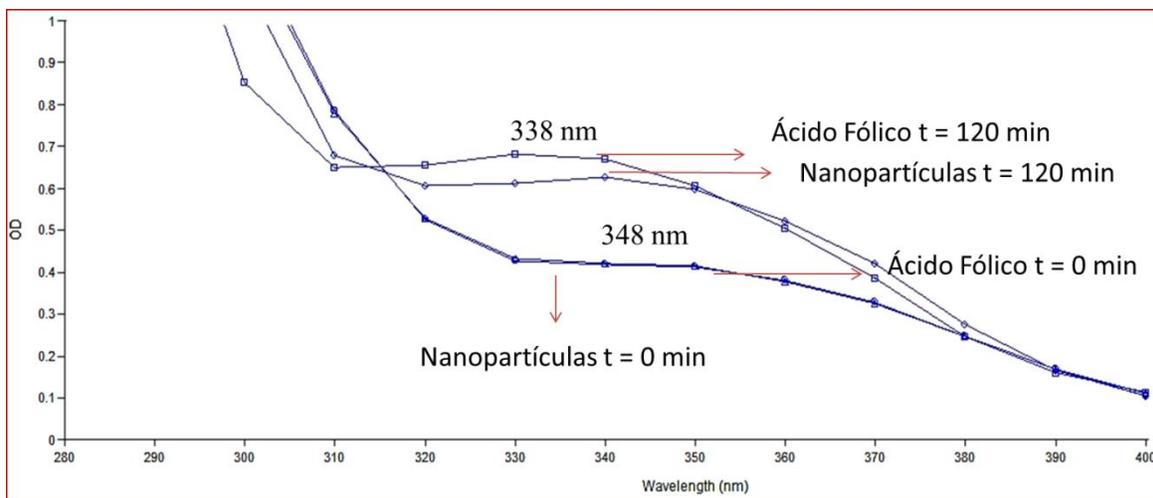
### 3.7 Pruebas de protección contra la degradación por radiación UV

En la figura 23 se muestra el espectro de UV-Vis de la molécula de ácido fólico, en el que se observa como el ácido fólico no se degrada durante el proceso de formación de las nanopartículas.



**Figura 23** Espectro UV del ácido fólico. \* Espectro de solución conocida de ácido fólico. \*\* Espectro de ácido fólico liberado de las nanopartículas.

En el espectro UV-Vis del ácido fólico se muestra un máximo de absorción a 348 nm característico del enlace entre el anillo de pteridina y el ácido p-aminobenzóico. El extracto de ácido fólico obtenido de las nanopartículas presenta un espectro UV-Vis similar a la muestra control de ácido fólico. Cuando el ácido fólico es fotodegradado, se ha reportado un cambio en el pico máximo de absorción con un desplazamiento a longitudes de onda menores. En el presente trabajo se pudo observar como la matriz de aginato-quitosono, permitió mantener la integridad de la molécula del ácido fólico ya que no se observa dicho desplazamiento del pico máximo de absorción (Aceituno, 2011).



**Figura 24** Espectro UV. Pruebas de fotodegradación del ácido fólico encapsulado. No se observa un incremento en el pico máximo de absorción a 348 nm para el ácido fólico liberado de las nanopartículas que fueron expuestas a la luz UV-vis.

Una vez que las nanopartículas fueron expuestas a la luz durante 120 minutos, se extrajo el ácido fólico de las mismas y midió por espectrofotometría UV-Vis a 348 nm. En los espectros que se obtuvieron no se detectaron cambios por desplazamientos en las bandas máximas de absorción, esto puede verse en la figura 24, donde se observó la banda máxima de absorción de la muestra control de ácido fólico expuesta 120 min a la radiación UV, y claramente puede apreciarse un desplazamiento de la banda hacia longitudes de onda menores, dado que en el ácido fólico liberado no muestra desplazamiento en su banda máxima de absorción esto indica que el ácido fólico dentro de las nanopartículas mantuvo su integridad molecular y concuerda según con lo reportado por Aceituno en el 2011 para los espectros de degradación UV de ácido fólico liberado de nanofibras de amaranto.

#### IV.- CONCLUSIONES

La matriz de alginato-quitosano, mostró ser una buena opción para la encapsulación de ácido fólico y ácido ascórbico, ya que se obtuvieron eficiencias de encapsulación del 94 y 97 % respectivamente, así como también un tamaño de partícula que deja un amplio campo de aplicación de las mismas partículas.

Los espectros FTIR nos permitieron confirmar mediante las interacciones moleculares varios puntos: la interacción de los polímeros de alginato y quitosano en la reticulación con  $\text{CaCl}_2$  para la formación de las nanopartículas, así como también las interacciones moleculares entre los polímeros y las vitaminas, permitieron la retención de las vitaminas dentro de la matriz de encapsulación.

Se observó una liberación controlada del ácido fólico, y principalmente se pudo tener un patrón del comportamiento de liberación dependiente del tipo de pH, sugiriendo un posible sistema en donde se podrían adicionar las nanopartículas, y medir su liberación.

Es importante mencionar que de las pruebas de degradación por radiación UV-vis se logró proteger al ácido fólico sobre este factor que es de vital cuidado al momento de manipular y de pensar en donde adicionar esta vitamina; esta protección junto con la capacidad de liberar de manera controlada el activo, podría sugerirse su evaluación en alimentos con pH's bajos, como una suplementación en los mismos.

Si bien es ya es conocida y ampliamente estudiada la capacidad antioxidante del ácido ascórbico, también se conoce la alta susceptibilidad de la vitamina a degradarse en presencia de oxígeno, lo que limita su actividad antioxidante en alimentos y a nivel biológico. En el caso del ácido ascórbico la capacidad antioxidante se conservó en un porcentaje considerable, lo que podría sugerir una menor degradación de este activo y aumentar su rendimiento y beneficios en la prevención de per oxidación lipídica u otros tipos de oxidación en alimentos, así

como también aumentar el consumo de vitamina C de gran importancia en procesos inmunológicos.

Queda un amplio campo de estudio con resultados obtenidos en el presente trabajo, donde podrían evaluarse un mayor número de parámetros de estas nanopartículas de alginato quitosano y cargadas con ácido fólico y ascórbico, así como estudiar una matriz alimentaria donde evaluar su aplicación, tal es el caso de su liberación en el alimento, como la integridad con la que llegan estas vitaminas al organismo.

## BIBLIOGRAFÍA

Aceituno Medina, M. (2011). Desarrollo y caracterización de nanofibras electroestiradas basadas en proteína aislada de amaranto como vehículos para la encapsulación de compuestos antioxidantes”. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Querétaro. Pp: 84-94

Alborzi S. (2012). “Encapsulation of Folic Acid in Sodium Alginate-Pectin Poly (Ethylene Oxide) Electrospun Fibers to Increase Its Stability”. Thesis The University of Guelph.

Almengor, L. (2009). “Nanotecnología en la industria alimentaria”. Universidad Rafael Landívar. Revista electrónica No. 13. Pp:35-52

Archana Pataskar Bagre, Keerti Jain, Narendra K. Jain . (2013). Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: In vitro and in vivo assessment. *International Journal of Pharmaceutics* 456. 31– 40

Bashir M. Rezk, Guido R.M.M. Haenen Wim J.F. van der Vijgh, Aalt Bast. (2003). “Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity. Identification of the antioxidant pharmacophore”. *FEBS Letters* 555 (2003) 601-605

Bergström, L. (1994). “*Nutrient losses and gains in the preparation of foods*”: National Food Administration. *Food Chemistry*. 57(1):77-78

Blakley, R.L. (1988). “IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds”. *The Journal of Biological Chemistry* 263(1), 605-607.

Erdic, B. Neufeld, R. J. (2011). "Protein micro and nanoencapsulation within glycol-chitosan/Ca<sup>+</sup>/alginate matrix by spray drying". Drug Dev Ind Pharm. ISSN 0363-9045. Vol. 37. Pp: 619-627

Esparza Catalán I. Irache Garreta J. M. (2011). "Los retos actuales de la industria alimentaria". Universidad de Burgos. España. La encapsulación como herramienta para la utilización de aditivos. ISBN: 978-84-92681-44-0

Ewa Jabłońska-Ryś, Marta Zalewska-Korona and Janusz Kalbarczyk. (2009). "Antioxidant Capacity, Ascorbic Acid And Phenolics Content In Wild Edible Fruits". Journal of Fruit and Ornamental Plant Research Vol. 17/(2): 115-120

F. A. O. (2015). "Nutrición humana en el mundo en desarrollo". Pp: 201-204

Fennema, Owen R. Química de los Alimentos. 2ª. Edición.

Ferreiro, E. Arilla. (2000). "química de alimentos", "capitulo 10: vitaminas hidrosolubles". 2ª. Edición. Pp: 154-157

"Food & Agriculture organization / World health organization. (1998). Vitamin and mineral requirements in human nutrition". Role of folate and folic acid in human metabolic process. 2<sup>th</sup> edition. ISBN 92 4 154612 3. Pp: 289-293.

Gennaro A. R. 2000. Remington: "The science and practice of pharmacy". Vitaminas y otros nutrientes. 20<sup>th</sup> edición. P: 2166

Gliszczynskawigo, Anna. (2007). "Folates as antioxidants". Food Chemistry. Vol. 101. 1480–1483

Hamman, J. H. (2010). "Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems". ISSN 1660-3397. Journal List Mar Drugs. Vol. 8. Pp: 1305-1322

Khalid Labal, Alam Khan, and Muzaffar Ali Khan Khattak. (2004). "Biological significance of ascorbic acid (vitamin C in human health- A Review". Pakistan Journal of Nutrition 3(1): 5-13

Kashappa G. Desai H. Hyun J. P. (2005). "Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients". DryingTechnology, 23: 1361–1394

Li, Ping, Ya-Ni Dai, Jun-Ping Zhang, Ai-Qin Wang, Qin Wei. (2008). Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. Int J Biomed Sci vol. 4 no. 3. Pp: 221-226

Litwack G. (2008). "Vitamins and Hormones". Foliates and folic acid. ISBN: 978-0-12-374232-2 Vol. 79, Pages 1-443

Li, Yao Olive. (2009). "Development of Microencapsulation-based Technologies for Micronutrient Fortification in Staple Foods for Developing Countries". Ph.D. Graduate Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry University of Toronto. Pp: 100-105

Magearu. (2008). "Kinetic Study Of Vitamin C Degradation From Pharmaceutical Products". Rom. Journ. Phys., Vol. 53, Nos. 1–2. 343–351

Madene A. Jacquot M. Scher J. & Desobry S. (2006). "Flavour encapsulation and controlled release". International Journal of Food Science and Technology 2006, 41, 1–21

Maja Simonoska Crcarevska, Marija Glavas Dodov, Katerina Goracinova. (2008). "Chitosan coated Ca–alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68 (2008) 565–578

Martínez Villarreal, R. T. Rojas Martínez, A. Sánchez Hernández, J. G. Hernández Torres, U. Delgado Enciso, I y Ortíz López, R. (2001). "Evaluación clínica, bioquímica y molecular de una familia con recurrencia de defectos del tubo neural". *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*. Vol. 2 No. 4

Matei, N. Birghila, Popescu, S. Dobrinas, S. Soceanu, A. Oprea, C. (2006). *Kinetic Study Of Vitamin C Degradation From Pharmaceutical Products*. *Rom. Journ. Phys.*, Vol. 53, Nos. 1–2, P. 343–351

Meyers, H. K. S. P. Prinyawiwatkul, W. And Xu, Z. (2007). "Applications Of Chitosan For Improvement Of Quality And Shelf Life Of Foods: A Review". *Institute of Food Technologists* Vol. 72. Pp: R-87-R100

Mladenovska. K., O. Cruaud, P. Richomme, E. Belamie, R.S. Raicki, M.-C. Venier-Julienne, E. Popovski, J.P. Benoit, K. Goracinov. (2007). 5-ASA loaded chitosan–Ca–alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 345. 59–69

Nenadis N., Wang L. F., Tsimidou M., Zhang H. Y. 2004. Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS<sup>+</sup> Assay. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 52, 4669-4674.

Öhrvik V. (2009). "Folate Bioavailability. In vitro Experiments and Human Trials". *Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Food*. Doctoral Thesis. Suecia.

Rodriguez, G. (1998). "Ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub> en la alimentación humana. Revista cubana de alimentos y nutrición". 12(2);107-19

Li, Ping Ya-Ni Dai, Jun-Ping Zhang, Ai-Qin Wang, Qin Wei. (2008). "Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine". International journal of Biomedical science. BiomedSci vol. 4 no. 3

Prasertmanakit S., Praphairaksit N., Chiangthong W., Muansing, N. (2009). "Ethyl cellulose microcapsules for protecting and controlled release of folic acid". American association of pharmaceutical Scientists. Vol 10, No. 4. P: 1104.

Pool Reyes H. Mendoza Díaz S.O. Loarca Piña M. G. F. (2012). "Desarrollo De Nanopartículas Poliméricas Para La Encapsulación, Protección Y Liberación Dirigida De Quercetina, Un Potente Antioxidante". Ciencia@UAQ. P: 3

Ramesh C. Nagarwal, Rakesh Kumar, J.K. Pandit. (2012) "Chitosan coated sodium alginate–chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: In vitro characterization and in vivo study in rabbit eye". European Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol 47. 678–685

Ratul K. D, Naresh K, Utpal B. (2009). "Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells". Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine No. 6 153–160

Ravi Joshi, S. Adhikari, B. S. Patro, S. Chattopadhyay, and T. Mukherjee. (2001). "Free Radical Scavenging Behavior Of Folic Acid: Evidence For Possible Antioxidant Activity Free Radical Scavenging Behavior Of Folic Acid: Evidence For Possible Antioxidant Activity". Free Radical Biology & Medicine, Vol. 30, No. 12, pp. 1390–1399

Reed, M.C., Nijhout, H.F., Neuhouser, M.L., Gregory, J.E., Shane, B., James, S.J., Boynton, A. & Ulrich, C.M. (2006). "A mathematical model gives insights into nutritional and genetic aspects of folate-mediated one-carbon metabolism". *Journal of Nutrition* 136(10), 2653-2661.

Rincón Juan García. (2008). "Efecto del quitosano sobre la membrana celular de *Rhizopsstolonifer*". Tesis de Maestría. Departamento de fitopatología del centro de desarrollo de productos bióticos y el departamento de bioquímica microbiana. Instituto Politécnico Nacional. Pp: 10-15.

Riveros Angarita, A. E. (2010). "inducción de resistencia en plantas: interacción planta-patógeno» inductores bióticos de la resistencia de las plantas a enfermedades". Universidad de Tolima. Colombia,. Pp: 130-133

Rodríguez Pedroso A. T. Ramírez Arrebato, M. A. Rivero González, D. Bosquez- Molina, E. Barrera Necha, L. L. Bautista Baños, S. (2009). "*Propiedades Químico-Estructurales y Actividad Biológica de la Quitosana en Microorganismos Fitopatógenos*". Revista Chapingo. Serie horticultura, Vol. 15, Núm. 3, septiembre-diciembre, Universidad Autónoma Chapingo. México. pp. 307-317

Rosemberg I. H. (1990). "Folate absorption: clinical questions and metabolic answers". *Am J Clin Nutr.* Vol. 5. P: 51

Sanjay K. Motwani, Shruti Chopra, Sushma Talegaonkar, Kanchan Kohli, Farhan J. Ahmad, Roop K. Khar. (2008). "Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* Vol 68. 513–525

Santacruz-Vázquez V., Santacruz-Vázquez C., Laguna-Cortes J. O. (2013). "Diseño de un jugo mínimamente procesado adicionado con micro y nano cápsulas de ácido fólico y su uso como vehículo para la ingesta en ratas wistar". Revista mexicana de ingeniería química. Vol 12, No.2

Sarmiento B., Domingos Ferreira, Francisco Veiga, Antonio Ribeiro. (2006). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. Carbohydrate Polymers Vol. 66 (2006) 1–7

Soni, M. L. Kumar, M. Namdeo, K. P. "Sodium alginate microspheres for extending drug release: formulation and *in vitro* evaluation". (2010). International Journal of DrugDelivery 2. 64-68

Song, H. Su, C. Cui, W. Zhu, B. Liu, L. Chen, Z. and Zhao, L. (2013). "Folic Acid-Chitosan Conjugated Nanoparticles for Improving Tumor-Targeted Drug Delivery". Bio Med Research International. ID 723158. Pp: 1-6

Stevanovic M., Radulovic A., Jordovic B., Uskokovic D. (2008). "Poly(DL-lactide-co-glycolide) Nanospheres for the Sustained Release of Folic Acid". J. Biomed. Nanotechnol. Vol. 4, No. 3

Suárez de Ronderos M. del P. 2003. "Ácido Fólico: Nutriente redescubierto". Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Pp: 5-8

Suriñach S. Baro, M. D. Bordas, S. Clavaguera, N. Clavaguera-Mora. (1992). "La calorimetría diferencial de Barrido y su aplicación a la ciencia de materiales". BOL. SOC. ESP.CERAM. VIDR. Vol. 31, 11-17

Varela Moreiras G., Alonso Aperte E. “El ácido fólico y la salud”. Fundación Española de la Nutrición. Madrid, 1999. Pp: 9-40

Wilson, N. and Shah, N.P. (2007). “Microencapsulation of Vitamins”. Australia. *ASEAN Food Journal* 14 (1): 1-14

Wolfgang H. Rima O. (2011). “The Mandatory Fortification of Staple Foods with Folic Acid”. *Deutsches Ärzteblatt International* 108(15): 249–54