



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**“ SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
DE FOSFATO DE CALCIO PARA SU USO EN POLLOS”**

LÓPEZ MORA YANETH

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

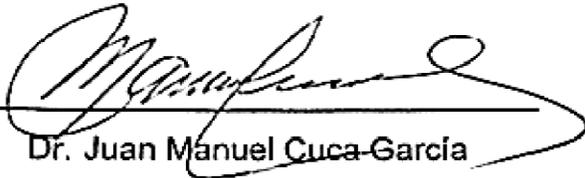
2014

La presente tesis titulada "Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Fosfato de Calcio Para su Uso en Pollos", realizada por la alumna: Yaneth López Mora, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

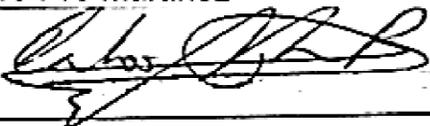
Consejero


Dr. Juan Manuel Cuca-García

Asesor

Dr. Arturo Pro Martínez

Asesor


Dr. Carlos Miguel Becerril Pérez

Asesor


Dr. Ernesto Ávila González

ASESOR


Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre 2014

DEDICATORIA

A Dios por llenarme de bendiciones.

A mi hermoso Ángel que llego a llenar mi vida de una inmensa y desconocida felicidad,
al amor más desinteresado que pueda existir a ti *MAJLL*.

A mi madre por su apoyo, por estar conmigo en los omentos más difíciles de esta
trayectoria, así como en los más felices, te amo mamá.

A mis hermanos Erika y Arturo por el cariño y apoyo que siempre nos han acompañado.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados por permitirme continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado.

A mi profesor consejero el Dr. Juan Manuel Cuca García por sus consejos, sus enseñanzas, su apoyo y su contribución para la realización de esta investigación.

A mis asesores el Dr, Efrén Ramírez Bribiesca, al Dr. Arturo Pro Martínez, Dr. Carlos Becerril Pérez y Ernesto Ávila Gonzales, por sus consejos y aportes a la investigación.

A la línea prioritaria de investigación 16 por el apoyo económico brindado, por la orientación y la ayuda, sin la cual el proceso de realización de esta investigación hubiera sido más complicado.

A la unidad de microscopia en particular a la Bióloga Greta Hanako Rosas Saíto por su tiempo y su paciencia, así como su valiosa contribución en los análisis e imágenes obtenidas para esta investigación.

Al Mc. Antonio García Esteva por sus valiosos consejos, comprensión, su optimismo y apoyo.

A mi compañera y amiga Mc. Diana Gutiérrez Arenas por guiarme en este camino de la investigación, por su apoyo y consejos y diversos aspectos de la vida.

A todas aquellas personas que no nombre, pero que su contribución fue muy valiosa y especial.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Tamaño y comparación de estructuras biológicas	12
Figura 2.- Clasificación de la nanotecnología	13
Figura 3. Infrarrojo de CaHPO ₄ grado analítico	31
Figura 4. Infrarrojo de muestra pH 4.5 - 5.0	32
Figura 5. Infrarrojo de muestra pH 5.0 - 5.5	32
Figura 6. Infrarrojo de muestra pH 5.5 - 6.0	33
Figura 7. Resultados de infrarrojo de CaHPO ₄ analítico, M1, M2 y M3	33
Figura 8. Micrografía electrónica de barrido observada a 18, 000 x de micropartículas amorfas que corresponden a la técnica de pH 4.5 – 5.0.	34
Figura 9. Micrografía electrónica de barrido de micropartículas amorfas observadas a a) 1,600 y b) 18, 000 X, sintetizadas a pH 5.0 – 5.5.	35
Figura 10. Micrografía electrónica de barrido de micropartículas amorfas que corresponden a la técnica de pH 5.5 – 6.0, observadas a a) 500 X, b) 1,000 X y c) 18, 000X.	35
Figura 11. Imágenes obtenidas con microscopio de transmisión electrónica a 39200 x, de muestras sintetizadas a pH 5.5-6.0.	36

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Formas comunes de fosfato de calcio	9
Cuadro 2. Niveles de fosforo disponible (%) en materias de origen vegetal, animal y mineral.....	11
Cuadro 3. Resultados de análisis EDAX de Técnica 1 a pH 6.5 - 9.....	30
Cuadro 4. Resultados de análisis EDAX de Técnica a diferentes rangos de pH.....	30
Cuadro 5. Rangos de tamaño de nanopartículas a diferentes Ph.....	36
Cuadro 6. Pdi de nanopartículas sintetizadas a diferentes pH.....	37

INDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE CUADROS	v
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos particulares.....	3
3. HIPOTESIS	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Importancia del fosforo en las aves	4
4.1.2 Metabolismo del fosforo	5
4.1.3 Excesos y deficiencias de fosforo	6
4.1.4 Fuentes de fosforo	7
4.1.5 Tipos de fosfato de calcio	8
4.1.6 Disponibilidad del fosforo	9
4.2 Nanotecnología	11
4.2.1 Antecedentes de la nanotecnología	12
4.2.2 Clasificación de los nanomateriales	13
4.2.3 Forma de acción de las nanopartículas.....	14
4.2.4 Proceso de absorción de las nanopartículas	15
4.2.5 Aplicaciones en la producción agropecuaria	16
4.2.6 Preparación de nanopartículas	18
4.2.6.1.1 Producción de nanopartículas de Fosforo	19
4.2.7 Caracterización de nanopartículas	21
4.2.7.1 Tamaño de partícula	21
4.2.7.2 Morfología y composición de nanopartículas	22
4.2.7.3 Análisis de difracción de rayos X e infrarrojo.....	22
4.2.7.4 Potencial Zeta	23
4.2.7.5 Índice de polidispersidad.....	24

5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.2 Síntesis de nanopartículas.....	25
5.2.1 Metodología de síntesis de nanopartículas por el método de coprecipitación	25
5.2.2 Análisis en microscopio electrónico de barrido (morfología y composición)	28
5.2.3 Análisis en microscopio electrónico de barrido de alta resolución (morfología y tamaño)	28
5.2.5 Potencial Z.....	29
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
6.1 Resultados de pruebas previas a la técnica final y muestras finales.....	29
6.1.1 Composición de nanopartículas mediante análisis EDAX	29
6.1.2 Composición de nanopartículas con difractograma de rayos X	31
6.1.3 Morfología de nanopartículas mediante análisis SEM	34
6.1.4 Tamaño de nanopartículas	35
6.1.5 Potencial Zeta e índice de polidispersidad (Pdi).....	36
7. CONCLUSIONES	37
8. LITERATURA CONSULTADA	38

SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FOSFATO DE CALCIO PARA SU USO EN POLLOS

López Mora Yaneth, MC.

Colegio de Postgraduados, 2014.

RESUMEN

El fósforo es uno de los minerales más necesarios en la nutrición del pollo de engorda, una deficiencia en la dieta genera pérdidas en la producción al ser un mineral costoso y por sus niveles de disponibilidad es uno de los más estudiados en la industria avícola. El objetivo de esta investigación fue sintetizar y caracterizar nanopartículas de fosfato de calcio, modificando el pH de síntesis como un parámetro determinante en los resultados. Se sintetizaron nanopartículas a diferentes rangos de pH 4.5 - 5.0, 5.0 - 5.5, 5.5 - 6.0 y mayor a 6.0, analizando las características fisicoquímicas (composición, potencial z y índice de polidispersidad) y la morfología (tamaño de partícula y forma) de las nanopartículas. El fosfato de calcio en su fase monetita se obtuvo a pH de 5.5 - 6.0, dicho fosfato por su composición química y disponibilidad es el empleado en la nutrición animal. La síntesis y el tamaño de nanopartículas presentó valores de 28 – 623 nm siendo las más pequeñas en comparación a los otros pH, de igual manera el mejor índice de polidispersidad 0.27 – 0.978 se presentó en dicho pH de síntesis. Las nanopartículas preparadas presentaron una estructura laminar, característica de las estructuras cristalinas, el valor resultante del potencial Z fue -1.13 mV, siendo un valor no esperado en un sistema estable. Estas condiciones encontradas quizás pueden representar una mejor disponibilidad y absorción del fósforo a nivel intestinal.

Palabras claves: fósforo, nanopartículas, síntesis, caracterización, pH.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CALCIUM PHOSPHATE NANOPARTICLES FOR USE IN CHICKENS

López Mora Yaneth, MSc.

Colegio de Postgraduados, 2014.

ABSTRACT

Phosphorus is one of the most needed in the nutrition of broiler mineral deficiency in the diet causes losses in production to be an expensive mineral levels and availability is one of the most studied in the poultry industry. The objective of this research was to synthesize and characterize nanoparticles of calcium phosphate, modifying the pH of synthesis as a key parameter in the results. Nanoparticles were synthesized at different pH ranges of 4.5 - 5.0, 5.0 - 5.5, 5.5 - 6.0 and greater than 6.0, analyzing the physicochemical characteristics (composition, polydispersity potential Z) and morphology (particle size and shape) of nanoparticles. The calcium phosphate in your phase Monetite was obtained at pH 5.5 - 6.0, said phosphate by chemical composition and availability is used in animal nutrition. The synthesis and size of nanoparticles showed values of 28-623 nm being smaller compared to the other pH, just as the best index of polydispersity 0.27 to 0.978 pH presented in this summary. The nanoparticles prepared showed a lamellar structure characteristic of the crystal structures, the resulting value of the zeta potential was -1.13 mV, being an unexpected value in a stable system. These conditions may be found to represent a better availability and phosphorus absorption in the intestine.

Keywords: phosphorus, nanoparticle synthesis, characterization, pH.

I. INTRODUCCION

La industria avícola es de gran importancia en el sector de alimentos en México, derivado de que la carne de pollo y el huevo son las dos proteínas animales de mayor consumo en nuestro país. De acuerdo a la Unión Nacional de Avicultores (UNA 2012) la avicultura representa el 0.78 % del PIB total, el 19.70 % del PIB agropecuario y el 40.94% del PIB producción de pollo del 90 % lo que representa el 34.6 % del total de la producción pecuaria en México, ubicándose en el sexto lugar a nivel mundial.

Dentro de la avicultura la carne de pollo tiene la mayor concentración de las unidades de producción, en comparación con la de huevo (Villamar *et al.*, 2009, UNA 2013), debido a sus sistemas productivos (ciclos cortos de engorda), con altas tasas de crecimiento y productividad, la infraestructura, la conformación de grandes grupos avícolas y a la oferta que demanda el consumidor por esta carne (Villamar *et al.*, 2009). Por lo mencionado, la avicultura en particular la producción de pollo es una actividad del sector pecuario en el cual la ciencia, la tecnología, la investigación, el capital y el mercado, se combinan para maximizar la producción y poder obtener mayores ganancias (Torres, 2011).

Gran parte del desarrollo que tiene la producción de pollo se debe a la alimentación de calidad que se les proporciona en las diferentes etapas de su vida productiva, dentro de la alimentación de las aves un rubro muy importante son los minerales, para entender la importancia de estos hay que tomar en cuenta que aproximadamente 5 % del peso corporal de los animales corresponde a minerales (Mc Dowell, 1992), en pollos la nutrición mineral es sin duda uno de los factores alimentarios más relevantes en la obtención de los extraordinarios rendimientos productivos de los pollos de carne actuales. Basta recordar que el contenido de cenizas en la tibia de pollos de engorda aumenta 125 veces desde el nacimiento hasta los 49 días de vida (Huyghebaert 1996). Problemas como la condrodisplasia tibial y deformaciones en las extremidades (patas torcidas), son anomalías de patas en pollos de crecimiento que pueden ser afectadas por el contenido mineral de la dieta (Nelson *et al.*, 1990). Por lo que los minerales se han ubicado como el tercer factor nutricional más importante en la producción animal (Domínguez, 1993).

Dentro de los minerales uno de gran importancia es el fósforo (P), el cual es un macromineral que en un alimento balanceado, procede de fuentes de proteína animal como la harina de pescado y otra parte proviene de los cereales e ingredientes vegetales, pero bajo la forma de ácido fítico, del cual su disponibilidad es baja (Cuca *et al*, 2009).

La baja disponibilidad del P en los ingredientes de origen vegetal presenta dos problemas: económicamente el P es el tercer componente más caro en una ración de no rumiantes, después de la energía y la proteína; además en el caso del ambiente, dada su baja disponibilidad en aves, una gran concentración del P consumido es excretado en las heces y orina (Maenz y Classen, 1998), lo que ocasiona que estos residuos se depositen en el suelo, que al ser lavados y drenados por acción del agua, contamina los mantos freáticos, arroyos, lagos, ríos y océanos (Nelson, 1967), este exceso de P estimula el crecimiento de algas, las cuales utilizan el oxígeno, reducen la vida acuática y ocasionan la mortalidad de los peces de su hábitat (Keshavarz, 2000).

Debido a los aspectos mencionados (costo que representa el P en la formulación de dietas para aves y contaminación), a través de la tecnología se han realizado estudios que contribuyen a mejorar la disponibilidad del P de fuentes minerales, tanto de origen animal como vegetal en aves, que por un lado permiten reducir el P excretado y por otro lado, permiten determinar los aportes y contribuir a la economía de la alimentación (Cabrera *et al.*, 2002).

La nanotecnología definida como el estudio y control de las dimensiones entre 1-100 nanómetros de la materia, posee campos de aplicación e investigación crecientes, ya que los materiales a pequeña escala adquieren propiedades y características distintas a aquellos de mayor tamaño, debido a esto desde hace algunos años se ha incrementado la investigación de los usos de la nanotecnología en el área de producción animal, con el objetivo de optimizar los procesos de producción de alimentos de origen animal (Ramírez, 2012).

Las nanopartículas son sistemas coloidales de tamaño nanométrico cuyas propiedades de liberación controlada y de protección, hacen a los nanosistemas una herramienta útil para la liberación de sustancias, particularmente en el tubo gastrointestinal, donde las condiciones son adversas. Generalmente las nanopartículas son protegidas por un polímero lo cual impide que reaccionen con otro compuesto presente en el alimento y que se liberen gradualmente para obtener productos con mejores características sensoriales y nutricionales (Yañez *et al.*, 2002).

El objetivo de la presente investigación fue desarrollar una metodología que permita sintetizar nanopartículas de fosfato de calcio como fuente de P para que en un futuro se evalúen su disponibilidad y absorción en pollos de engorda.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Sintetizar nanopartículas de fosfato de calcio para su empleo en dietas para pollos de engorda.

2.2 Objetivos particulares

- Implementar una metodología de proceso para la síntesis de nanopartículas de fosfato de calcio.
- Diseñar y caracterizar las nanopartículas de fosfato de calcio.

3. HIPOTESIS

Se estandarizará la metodología adecuada para la obtención de nanopartículas de fosfato de calcio y se caracterizaran las nanopartículas de fosfato de calcio.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Importancia del fosforo en las aves

4.1.1 Funciones del fosforo

El P cumple una serie de funciones en los animales, es esencial para el metabolismo de las aves, interviene en el desarrollo y mantenimiento de las estructuras óseas, es fundamental para la formación del cascarón del huevo, participa en reacciones energéticas y enzimáticas y es constituyente de la pared celular (Barkley *et al.*, 2004). Este mineral es el segundo más abundante en la composición de los tejidos animales, del cual el 80% del P se encuentra en los huesos y dientes, el resto se distribuye entre los fluidos y otros tejidos donde está íntimamente ligado con una gran variedad de reacciones (Underwood y Suttle, 1999). Parte del P del esqueleto se puede emplear en las funciones que cumple en los procesos metabólicos (Adeola *et al.*, 2005), ya que el esqueleto sirve como área dinámica de depósito para los minerales, especialmente Ca y P, siendo depositados y retirados conforme se les necesita (Frandsen, 1995).

El P da rigidez al hueso, lo que asegura la función del sistema músculo-esquelético, siendo importante también para la formación y la conservación de los huesos. Los cambios en la estructura y composición de los huesos que resultan de la deficiencia de P son semejantes a los causados por el Ca. Sin embargo el P se requiere para la formación y mineralización de la matriz orgánica del hueso. (Ternouth, 1990). También es componente del Adenosín trifosfato (ATP) y de los ácidos nucleicos, el 25% del P corporal que no se encuentra en el esqueleto está en moléculas de alto valor biológico (ADN, ARN, ATP, fosfolípidos como la esfingomielina), compuestos ricos en energía (fosfoenolpiruvato, 1,3-bifosfoglicerato y creatina fosfato) y proteínas fosforiladas (Mc Dowell, 1992). En las células también pueden encontrarse pequeñas cantidades de P que participan en el mantenimiento del equilibrio ácido-base (Adeola *et al.*, 2005).

El P también se necesita para la formación de los fosfolípidos, forma ácidos grasos que son incorporados a través de la sangre a las membranas de la célula y los organelos, dándoles flexibilidad a las membranas celulares. Además participa en el metabolismo de

los hidratos de carbono y grasas, también es importante en la coordinación muscular (Cuca *et al.*, 2009).

El P presente en el esqueleto se encuentra como fosfato de cálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y el resto se encuentra en el tejido muscular y nervioso. La sangre contiene entre 35 y 45 mg de P por 100 mL, localizado en su mayor parte en el interior de las células (Mc Dowell, 1992).

4.1.2 Metabolismo del fosforo

En el buche de las aves, las fitasas presentes actúan de forma inmediata sobre los sustratos presentes en el alimento sin esperar llegar al estómago (Kemme, 1998). Liebert *et al.*, (1993) demostraron que en pollos de engorda, la hidrólisis del ácido fítico tiene lugar fundamentalmente en el buche (69 a 86%) y en menor medida en el proventrículo (14-31 %), no detectándose actividad en el intestino delgado.

La absorción del P se realiza por transporte paracelular y transcelular, el primero ocurre a lo largo del intestino delgado, siendo mayor la capacidad de absorción en yeyuno y duodeno, atravesando el epitelio intestinal mediante un sistema regulado por la vitamina D, debe haber presencia de Ca y sodio (Na) (Church *et al.*, 2002). Mientras el transporte transcelular (a través de las células) tiene lugar principalmente en presencia de Na (Danisi y Murer, 1989). Según Church *et al.* (2002), la absorción está relacionada de manera directa con la concentración del P en la dieta y un exceso con respecto al Ca disminuye la absorción de éste último. Según Guevara (1980), la absorción y retención de Ca y P son mejores con una relación de 2:1 en la dieta.

El proceso del metabolismo del P está regulado por: 1) la hormona paratiroidea la cual mantiene la concentración de Ca y P en el plasma dentro de los límites nutricionales requeridos en la etapa fisiológica en la que se encuentre el ave, también activa los mecanismos de excreción o depósito de Ca y P en los huesos, y controla su excreción renal, 2) el 1,25-dihidroxicolecalciferol (la forma activa de la vitamina D) y 3) la calcitonina (Berner y Bronner, 1997).

Un aspecto que influye en la disponibilidad del P es la forma química de la molécula del fosfato, investigaciones realizadas afirman que el fosfato debe estar en forma de ortofosfato (PO_4) para que exista una buena absorción por el ave. Cuando las moléculas están entrelazadas siendo el caso de los pirofosfatos (dos moléculas enlazadas) y metafosfatos (moléculas que forman argollas o estructuras cíclicas) la absorción a través de la pared intestinal del ave es bastante lenta, lo que ocasiona que poco o nada del P sea retenido (Gillis *et al.*, 1954).

4.1.3 Excesos y deficiencias de fosforo

Los alimentos para aves deben contener el P requerido por estas durante todas las fases de producción. Una deficiencia causa pérdidas en la productividad animal mientras que los excesos conducen a una menor eficiencia en la absorción de P, lo que resulta en concentraciones más elevadas de P en las heces (Van Der Klis y Versteegh, 1996). Este P excretado es liberado y pasa a ríos y lagos (Lon-Wo, 2005).

El signo más común de deficiencia de P en pollos es el raquitismo, donde la densidad de los huesos disminuye, hay reducción del crecimiento y consumo de alimento. En cambio cuando existe un exceso de P en la dieta respecto al Ca, se pueden formar sales fosfatadas insolubles de Ca y de esta forma disminuir la absorción de este último. En cuanto al nivel de cenizas en los huesos, se reduce en cualquiera de las formas de desequilibrio Ca-P (Church *et al.*, 2002). Según Guevara (1980), cuando en una dieta se reduce la relación Ca: P disponible de 2:1 a 1:1, aumenta la toxicidad por P y se incrementa la mortalidad de los pollos durante la primera semana. El NRC (1994) señala que una dieta óptima para un animal en crecimiento debe de contener una proporción Ca:P aproximadamente de 2.2:1. Según Sisson y Grossman (1982), un exceso de P y posterior descalcificación, no afecta a la forma ni a las dimensiones del hueso pero lo hacen blando y moldeable.

El P también está relacionado con la vitamina D, manganeso y colina, si se cumplen óptimamente las relaciones de los niveles, se pueden evitar enfermedades metabólicas como raquitismo y perósis (Castelló, 1977). Este mismo autor menciona que las deficiencias severas de P producen graves trastornos, sin embargo con las condiciones

actuales de producción avícola es difícil que se presenten este tipo de deficiencias; sin embargo, deficiencias marginales, las cuales pueden ser más frecuentes, producen trastornos en los rendimientos productivos, mortalidad y reducción en la calidad de la carne.

En el caso de las aves de postura una deficiencia de P provoca disminución en la producción, grosor del cascarón, resistencia a enfermedades y osteomalacia. En cambio un exceso de P llega a causar un tipo de osteoporosis caracterizado por la remoción de fosfato de Ca, del hueso medular y cortical, particularmente de los huesos largos de las patas, problema que se presenta generalmente en gallinas de jaula, por lo que es llamada fatiga de jaula, acentuándose con excesos de P y niveles bajos de Ca (Cuca *et al.*, 2009).

4.1.4 Fuentes de fósforo

La importancia de la fuente de P se debe a que su intervención en el proceso de metabolismo y absorción, lo que afecta la rigidez ósea y demás funciones en las que participa el P (Hemme *et al.*, 2005). Como ya se mencionó el P contenido en las dietas para aves se origina principalmente de: materias primas vegetales, fuentes de origen animal y de fosfatos inorgánicos.

El contenido de P en los ingredientes utilizados en la alimentación animal presenta un amplio rango de variación. Los subproductos del procesado de granos (salvados de trigo, gluten de maíz o harinas de oleaginosas) son especialmente ricos en P, mientras que tubérculos, raíces y bulbos son los más pobres. Los productos lácteos y las materias primas de origen animal que incluyen parte del esqueleto son los alimentos con mayores niveles de P (Mc Dowell, 1992). No solo el tipo de ingrediente repercute en el aprovechamiento del P, las condiciones de procesamiento como la temperatura de granulación que si no es la adecuada inactiva las fitasas intrínsecas de las materias primas, y el grado de hidratación del alimento, también lo hacen (Mateos y García, 1998).

Además el nivel de P varía no sólo entre fuentes sino también dentro de cada fuente. En materias primas de origen vegetal el contenido en P depende del tipo de suelo, variedad cultivada, estado de maduración, condiciones de cultivo, climatología, etc, (Ravindran *et*

al., 1995). En los productos de origen animal, el nivel varía en función del contenido de P presente en los huesos de la materia prima, por lo que puede ser inferior en sus subproductos derivados (Mc Dowell, 1992).

El P contenido en las materias primas de origen animal se encuentra como ortofosfato (PO_4) y en las moléculas de ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfoproteínas y fosfoglúcidos. La hidrólisis del P en el tracto gastrointestinal libera PO_4 , que es la única forma en que el animal puede absorber y utilizar el P (De Groote, 1990). En los ingredientes vegetales el ácido fítico es el más abundante. Alrededor de un 60-80% del P total contenido en los granos y subproductos se encuentra como parte del ácido fítico y sus sales, generalmente como fitatos de Ca, K y Mg (Ravindran *et al.*, 1995). Por el contrario, en los alimentos de origen animal el P que predomina se encuentra en forma de ortofosfatos y mayoritariamente como fosfatos de Ca en los tejidos óseos y en leche (Mc Dowell, 1992).

En aves debido a la baja disponibilidad del fósforo de fuentes vegetales, se recurre a otras materias primas, como la harina de hueso, fosfatos y carbonatos. Las fuentes minerales de P más utilizadas son los ortofosfatos de Na, Ca, K, NH_4 y sus combinaciones. Otros fosfatos minerales de menor importancia práctica por su baja disponibilidad en monogástricos, son los fosfatos de roca, los metafosfatos de Na, K y Ca, los pirofosfatos de Na y Ca y los polifosfatos de Na y NH_4 (Axe, 1993).

4.1.5 Tipos de fosfato de calcio

El grupo de los fosfatos de calcio son una familia de minerales que contienen iones de calcio y fósforo (P), la estructura y la composición química de las apatitas pueden presentar numerosas variaciones en estructura, tamaño y composición debido a los cationes que se encuentren presentes en su estructura y el método utilizado en su elaboración, en general hay tres tipos de fosfato de calcio: ortofosfatos (PO_4^{3-}), pirofosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) y los polifosfatos ($(\text{PO}_3)_n^{n-}$).

El tipo de fosfato de calcio de nuestro interés son los pertenecientes a los ortofosfatos en donde se encuentran el fosfato de calcio deshidratado (brushita), el fosfato de calcio anhidro (monetita), entre otros. En el cuadro 1 se muestran algunas de las formas más comunes de los fosfatos de calcio, su fórmula química y su proporción Calcio:Fosforo (Sergey, et al. 2010).

Cuadro 1. Formas comunes de fosfato de calcio

Relación Ca:P	Compuesto	Formula
0.5	Fosfato monocalcico monohidratado	Ca(H ₂ PO ₄)H ₂ O
0.5	Fosfato monocalcico anhidro	Ca(H ₂ PO ₄) ₂
1.0	Fosfato dicalcico deshidratado (brushita)	CaHPO ₄ 2H ₂ O
1.0	Fosfato dicalcico anhidro (monetita)	CaHPO ₄
1.33	Fosfato octacalcico	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ 5H ₂ O
1.2-2.2	Fosfato de calcio amorfo	Ca _x (PO ₄) _y nH ₂ O
1.67	Hidroxiapatita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂
2.0	Fosfato tetracalcico	Ca ₄ (PO ₄) ₃ O

De los fosfatos de calcio mencionados anteriormente el fosfato dicalcico anhidro (monetita) se utiliza en los alimentos como fuente de calcio y fósforo en los suplementos nutricionales debido a su mayor disponibilidad en comparación con los otros tipos de fosfato, por lo que en el presente trabajo se buscó obtener dicho compuesto, cuya relación Ca:P es 1.0, la cual es un aspecto importante al realizar la caracterización del compuesto sintetizado y analizado.

4.1.6 Disponibilidad del fosforo

El concepto de disponibilidad se relaciona con la parte realmente utilizada para fines metabólicos (Ammerman, 1995) lo que permite distinguir entre compuestos que teniendo igual contenido químico del elemento, no son utilizados y absorbidos en igual forma. Factores inherentes a la fuente, como el origen del mineral, la estructura físico-química para los elementos inorgánicos, así como la superficie expuesta de la partícula y los tratamientos tecnológicos pueden aumentar ó disminuir la disponibilidad biológica de un mineral indirectamente haciendo variar la cantidad excretada en las heces (Pansu *et al.*, 1993). Estudios realizados sobre la disponibilidad del P en los subproductos de origen

animal, reportan altos valores de digestibilidad aunque variables según la fuente (Lima *et al.*, 1995b). Los fosfatos procesados tienen menor digestibilidad (40 a 80%) y mayor variabilidad según el origen (Lima *et al.*, 1995a). Se han estudiado también las características químicas, físicas (Lima *et al.*, 1995b) y biológicas (Potter *et al.*, 1995) de las fuentes inorgánicas pero hay pocos reportes acerca de la relación entre la solubilidad y la calidad biológica de los mismos (Sullivan *et al.*, 1992).

La mayor parte del P en los vegetales está unido como sales de ácido fítico, en forma de fitato; los fitatos son moléculas de inositol-1-fosfato a inositol-6-fosfato. El aprovechamiento que hacen las aves de este tipo de fósforo es bajo o nulo, por carecer de la enzima fitasa que hidroliza los fitatos, lo que ocasiona que el P se libere como ortofosfato. El P restante (P no fítico) está presente en otras formas químicas y es metabolizado por el animal (Nelson, 1967).

Desde el punto de vista práctico se dice que la disponibilidad del P no fítico es similar y cercana al 100% (rango 80-100%). Por el contrario, se considera que el P fítico no puede ser utilizado por las aves y cerdos asignándole un valor de 0, y se asume que el contenido en P fítico de todas las materias primas de origen vegetal es del 70% del P total. Otros autores mencionan que sólo entre el 30 y 40% del P total que consumen las aves a través de ingredientes de origen vegetal es P disponible (Pd) resultando insuficiente para cubrir los requerimientos del P de las aves y el resto no se aprovecha, lo que resulta en excreción de P originando problemas de contaminación (Potter *et al.*, 1995) y además, surge la necesidad de complementar las dietas con ingredientes de origen mineral (Broz *et al.*, 1994; Cuca *et al.*, 2009).

El Cuadro 2 muestra una comparación de los niveles de P disponible en materias de origen vegetal, animal y mineral (NRC, 1994).

Cuadro 2. Niveles de fosforo disponible (%) en materias de origen vegetal, animal y mineral.

Origen	Fosforo disponible (%)
Avena	22
Maíz	14
Sorgo	20
Harina de carne	90
Harina de pescado	94
Harina de plumas	31
Fosfato monocalcico	100
Fosfato bicalcico	95 -100
Fosfato de roca	40 - 60

(NRC. 1994)

4.2 Nanotecnología

La nanotecnología es un campo de las ciencias aplicadas dedicado al control y manipulación de la materia (nanomateriales) a una escala menor que un micrómetro (entre 1 y 100 nanómetros), es decir, a nivel de átomos y moléculas para proporcionar una comprensión fundamental de los fenómenos y materiales a nanoescala y crear y utilizar estructuras, dispositivos y sistemas que tienen propiedades y funciones debido a su tamaño (Waldner, 2008), con aplicación en diversas áreas como física, química, biología (Buzea *et al.*, 2007). Cintas (2006) la define como el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación controlada y aplicación de sustancias, materiales, aparatos, dispositivos y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nanométrica, esto es átomo por átomo o molécula por molécula, lo que permite mejor manipulación para fabricación de artefactos con una precisión de unos pocos átomos.

El prefijo “nano” proviene del griego y significa “enano” e indica no un objeto sino una medida (la mil millonésima parte de algo). Un nanómetro (nm) se define como una

milmillonésima del metro (10^{-9}) (Bankinter, 2005), por ello la nanotecnología se caracteriza por ser un campo esencialmente multidisciplinario relacionado exclusivamente por la escala de la materia con la que trabaja (Waldner, 2008). Como referencia, el espesor de una hoja de papel mide 100, 000 nm aproximadamente (NNI, 2009), y la longitud de la onda de la luz visible se encuentra entre 400 y 700 nm; además varias estructuras biológicas tienen dimensiones de nanómetros por ejemplo el diámetro de un eritrocito es de 10, 000 nm, el tamaño de una bacteria 1,000 nm, un virus 100 nm, una proteína 5–50 nm, el ADN 2 nm y 0,1 nm un átomo (Cintas, 2006 y Feneque, 2003) (Figura 1).

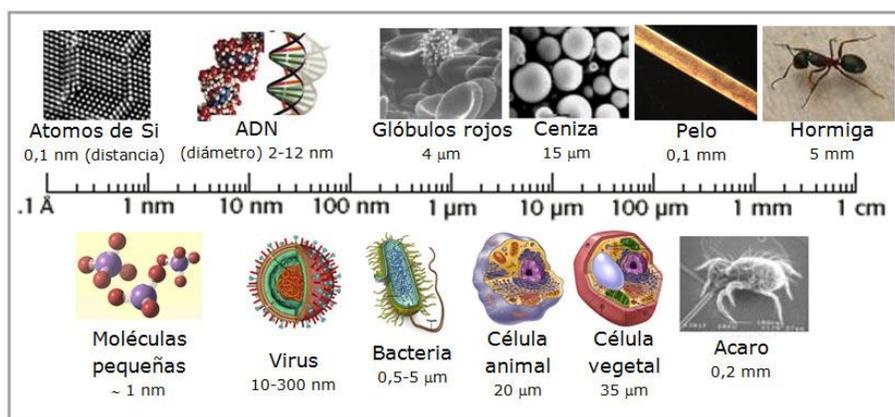


Figura 1.- Tamaño y comparación de estructuras biológicas.

4.2.1 Antecedentes de la nanotecnología

En 1959, en una ponencia titulada “There is Plenty of Room at the Bottom” (Hay mucho espacio por debajo), el físico Richard Feynman propuso un nuevo campo de estudio para la ciencia: la tecnología a escala atómica y molecular, lo que suscitó el interés por el desarrollo de la tecnología a una escala diminuta, que continúa en la actualidad y que probablemente desemboque en una revolución silenciosa de impacto en múltiples ámbitos de la vida cotidiana (Bankinter, 2005).

Sin embargo, históricamente las nanopartículas han existido en el planeta desde tiempos remotos y se han creado por diversos fenómenos naturales, incluyendo reacciones fotoquímicas, erupciones volcánicas o incendios forestales (Buzea *et al.*, 2007). Las aplicaciones de la nanotecnología han estado presentes desde épocas antiguas no se hacía referencia a esta como tal; por ejemplo se sabe que el pigmento de la porcelana de las dinastías chinas desde el siglo XVI a.C., contenía nanopartículas de oro (Hollister *et*

al., 2003). Otro caso es el de la copa Lycurgus creada en el imperio Romano (s. IV a.C.), que contenía nanopartículas de oro y plata (Freestone *et al.*, 2007). En el oriente también se utilizaron coloides con nanopartículas de oro que se empleaban para tratar padecimientos óseos como la artritis (Cao, 2004). Pero no es hasta 1974 cuando el término nanotecnología es acuñado por Norio Taniguchi, de la universidad de Tokio, con el objetivo de distinguir entre la ingeniería llevada a cabo a escala micro (10^{-6}) y la llevada a escala nano (10^{-9}) (Bankinter, 2005).

4.2.2 Clasificación de los nanomateriales

Una forma de clasificar a la nanotecnología es distinguiendo el proceso de fabricación (Figura 2), resultando la nanotecnología “top-down” que se refiere a la fabricación de estructuras a nanoescala, en la que entran en juego leyes de la física para diseñar y miniaturizar estructuras, para obtener a nanoescalas sistemas funcionales, cambiando las propiedades de los materiales. La tecnología “bottom-up” o de la nanotecnología molecular, se enfoca a la construcción de estructuras orgánicas e inorgánicas más grandes, a partir de sus componentes átomo por átomo o molécula por molécula y es el área de la nanotecnología que ha causado más expectativa (Huw, 2003).

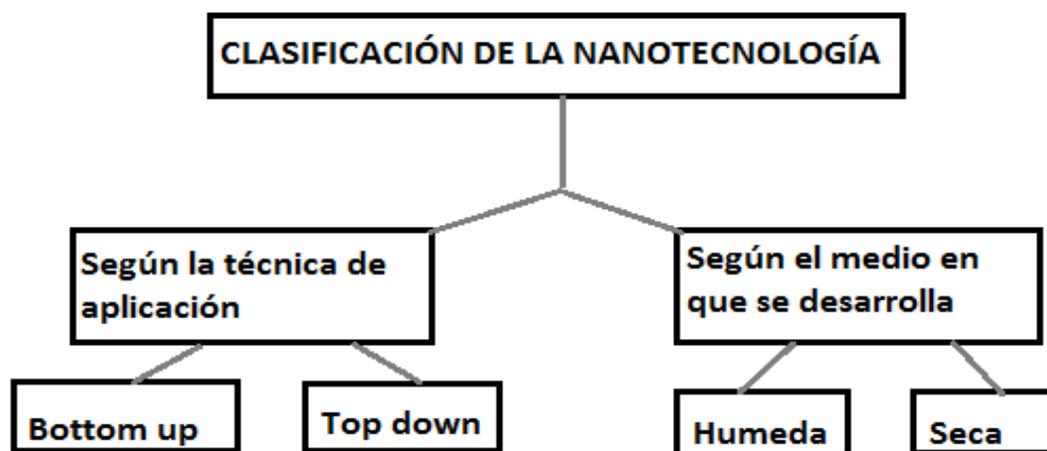


Figura 2.- Clasificación de la nanotecnología

Otra forma de clasificar la nanotecnología, es según el ámbito de aplicación (Figura 2), se determina según el medio en el que y para el cual se genera tal aplicación, el medio puede

ser acuoso; nanotecnología húmeda va dirigida al desarrollo de sistemas nano-biológicos, incluyendo la manipulación de material genético, membranas, enzimas y otros componentes celulares, que indiscutiblemente están inmersos en un medio acuoso. La nanotecnología seca tiene como característica su predominante aplicación en el campo de la electrónica y todos aquellos elementos a nanoescala cuya funcionalidad es alterada por la exposición a un medio húmedo, se puede mencionar como ejemplo el magnetismo, dispositivos ópticos y desarrollo de materiales inorgánicos (Huw, 2003).

Las nanopartículas coloidales se dividen en nanocapsulas que son sistemas vesiculares con una cubierta polimérica y un núcleo interno y las nanoesferas que consisten en una matriz polimérica. Sus propiedades de liberación controlada y la protección que ofrecen a las nanopartículas de interés, hacen a estos nanosistemas una herramienta muy ventajosa en el campo de la liberación de fármacos en el tubo gastrointestinal (Rieux *et al.*, 2006).

Las materias primas de la nanotecnología son los elementos de la tabla periódica a partir de los cuales se constituye todo (ETC Group, 2004). Las nanopartículas se pueden dividir también en naturales o artificiales, este último grupo se divide a su vez en manufacturadas, aquellas que son objeto de producción y derivadas aquellas que son producto de procesos industriales (Bankinter, 2005).

4.2.3 Forma de acción de las nanopartículas

A escala nanométrica las partículas de la materia adoptan propiedades muy diferentes de las que exhiben a gran escala: los nanomateriales serán más fuertes, más ligeros, más porosos, menos corrosivos y sus propiedades físicas y químicas cambian a escala nanométrica: la conductividad eléctrica, el color, la resistencia, la elasticidad y la reactividad, entre otras propiedades se comportan de manera diferente a como lo hacen en los mismos elementos a mayor escala (Bankinter, 2005). Aun siendo de naturaleza inorgánica, los nanomateriales acumulan un potencial extraordinario para resolver desafíos como detectar cambios eléctricos en moléculas biológicas, los cuales se canalizan hacia el descubrimiento y/o tratamiento de una enfermedad.

Las nanopartículas se comportan de forma diferente a las macro partículas del mismo material y a las micropartículas (actualmente en uso) por ofrecer mayor superficie para el mismo volumen, atravesar poros más pequeños y ser más solubles (biodifusibles). Solo

reduciendo el tamaño, sin cambiar la sustancia, los materiales pueden ser más fuertes, más ligeros, más solubles al agua, más resistentes al calor o conducir mejor la electricidad (ETC Group, 2004). Además, ciertas nanoestructuras pueden ser dirigidas para que atraigan células o microorganismos, o bien se unan específicamente con determinados compuestos o moléculas (Bankinter, 2005).

En esa condición, en una partícula que tiene su tamaño reducido a dimensiones inferiores a 1000 nm, los fenómenos físicos fácilmente visualizados en la escala métrica, como la gravedad, la fricción, la inercia y otros disminuyen su importancia de acción sobre las partículas y comienzan a dominar otras fuerzas físicas, hasta entonces diminutas, como es el caso de la fuerza electrostática de van der Waals, de las repulsiones estéricas, del movimiento browniano y otras (Sozer y Konini, 2009). Es así como una partícula puede presentar sus características aumentadas, o incluso ofrecer nuevas características, cuando se comparan con su forma convencional. Como ejemplo se puede citar el caso de las nanopartículas de oro, que cuando poseen un diámetro medio inferior a 10 nm presentan coloración bermellón y que cuando su diámetro oscila entre 10 y 99 nm adquiere una coloración violácea en medio acuoso (Sozer y Konini, 2009).

4.2.4 Proceso de absorción de las nanopartículas

La administración oral de nanopartículas, es considerada la ruta más conveniente y económica de liberación de sus compuestos, sin embargo su absorción presenta dificultades pues existen barreras a la absorción. Para que sean absorbidas, deben pasar a través de dos barreras, el moco intestinal y la mucosa, lo cual hace que la absorción sea baja y variable (Norris *et al.*, 1998).

Las nanopartículas, teóricamente pueden atravesar el epitelio intestinal por la ruta paracelular (entre las células) y por la transcelular (a través de las células). En condiciones fisiológicas la ruta paracelular está limitada por el reducido tamaño de los espacios intercelulares y por las uniones estrechas entre las células epiteliales. El transporte transcelular de nanopartículas ocurre por un proceso llamado transcitosis, que es el conjunto de procesos que permiten el paso de macromoléculas de un espacio extracelular a otro (Rieux *et al.*, 2006).

Algunas de las propiedades que influyen en la absorción de nanopartículas son la carga, la hidrofobicidad de su superficie y el tamaño (Norris *et al.*, 1998). Las nanopartículas hidrofóbicas (moléculas no polares, son más afines a las grasas) tienen mayor absorción que las hidrofílicas (compuestos miscibles en agua y no en grasas), debido a que la membrana de las células epiteliales y el tubo gastrointestinal son lipoproteínicas (formada por lípidos y proteínas). La eficiencia de absorción de partícula de hasta 100 nm en el tubo gastrointestinal, es 15 a 250 veces mayor que las de nanopartículas mas grandes, por lo que la preparación de nanopartículas menores de 100 nm incrementa la absorción (Wang *et al.*, 2004). La absorción de las nanopartículas es baja y variable debido a las diversas barreras físicas y fisiológicas presentes en el tracto gastrointestinal, asociadas a otras consideraciones especiales, estas disminuyen su absorción. Las nanopartículas de tamaño $\leq 5 \mu\text{m}$ se absorben y pueden entrar al sistema circulatorio (Norris *et al.* 1998)

4.2.5 Aplicaciones en la producción agropecuaria.

La nanotecnología posee un potencial capaz de revolucionar la producción agropecuaria. Los ejemplos de aplicaciones en producción animal incluyen el uso de nuevas herramientas moleculares y celulares para la reproducción animal, rastreabilidad del animal desde el nacimiento hasta la mesa del consumidor (“trazabilidad”), bioseguridad de los alimentos de origen animal, mejor comprensión de los fenómenos que rigen la nutrición animal desde la ingestión de la dieta hasta la captación y utilización del nutriente y otras (Scott, 2007), obtención de información de un nutriente o componente bioactivo y su liberación en sitios específicos de acción, mayor disponibilidad de nutrientes, mantenimiento de niveles adecuados por periodos más largos de tiempo y evitar su degradación en el tracto gastrointestinal y por lo tanto reducción del estrés que implica el manejo de los animales (Ross *et al.*, 2004).

La agricultura podría utilizar insumos a nanoescala para optimizar la mejora de la producción, la agricultura de precisión, los plaguicidas y herbicidas, reducción del empleo de agua, el uso del suelo, de fertilizantes y disminuir problemas fitosanitarios, la detección de niveles de agua, nitrógeno, plagas, polen y agroquímicos, en la ganadería el uso de nanochips para la identificación animal, nanopartículas para la administración de fármacos o vacunas, la detección y tratamiento de enfermedades mediante nanosistemas (Cintas,

2006), o el uso de forrajes adicionados con nanopartículas que aumentan el apetito del ganado (López, 2007).

Otra aplicación incluye los ingredientes y aditivos nanoestructurados o nanoencapsulados que dependiendo de su función, pueden ser adicionados directamente al alimento o a su empaque con la intención de prevenir la oxidación, el crecimiento bacteriano, enmascarar el sabor o la textura del alimento, promover la liberación sostenida o direccionada de sustancias bioactivas (vitaminas, minerales, enzimas, etc.) y estabilizar o inhibir el crecimiento de microorganismos (FAO y OMS, 2009). Un ejemplo es el llevado a cabo por Giroux *et al.*, (2010), en donde se empleó el suero de leche como matriz polimérica para confección de nanopartículas con un diámetro que varía entre 100 y 300nm y su posterior uso en sistemas de liberación sostenida.

En el área de nutrición también es posible aplicar la nanotecnología con diversos objetivos como obtención de información de un nutriente o componente bioactivo y su liberación en sitios específicos de acción, mayor disponibilidad, mantenimiento de niveles adecuados por periodos más largos de tiempo, evitar su degradación y menor invasión parenteral (Ross *et al.*, 2004), por lo que también se reduce el estrés que implica el manejo de los animales. La nanotecnología se puede aplicar en la producción de nanopartículas de minerales, los cuales son ampliamente utilizados en nutrición animal; sin embargo, la forma en la cual se encuentran influye en la biodisponibilidad de los mismos, por lo que si son de baja biodisponibilidad, el animal no los aprovechará correctamente y se eliminarán. Un ejemplo es el hierro, cuya deficiencia continúa siendo un problema en nutrición humana y animal, especialmente en etapas tempranas de la vida, la gestación e infestaciones parasitarias (Church *et al.*, 2002). Una de las fuentes más biodisponibles de este elemento es como sulfato ferroso (Mc Dowell, 1992); sin embargo, tiene el inconveniente de causar sabor metálico a los alimentos y acelerar el proceso de oxidación de las grasas de los cereales, provocando rancidez (Hurrell, 2002). La alternativa es usar una fuente menos disponible pero más estable como el fosfato férrico (FePO_4). Al respecto, Rohner *et al.* (2007) desarrollaron nanopartículas de fosfato férrico altamente biodisponibles, demostrando que en nanoescala, esta fuente puede incrementar su valor nutricional. Recientemente Romero (2008) diseñó y evaluó *in vitro* nanopartículas de selenito de sodio para uso vía oral en rumiantes empleando copolímeros de metacrilato sensibles a pH, de

tal modo que no pudieran degradarse en el rumen (pH cercano al neutro), pero si en abomaso, cuyo pH es ácido debido a la secreción de ácido clorhídrico, similar al pH que se encuentra en especies no rumiantes; sin embargo, no se realizaron pruebas *in vivo*. Por otro lado se probaron sin éxito nanopartículas de plata (con fines antibacteriales) en embriones de pollo, las cuales, a pesar de no afectar el desarrollo embrionario, si se redujó el número y tamaño de folículos linfoides de la bolsa de Fabricio (Grodzik y Sawosz, 2006).

Otro ejemplo es el caso del P, mineral que cuando esta deficiente en la dieta puede causar serios problemas para el desarrollo de los pollos, de igual manera el exceso de este mineral provoca que sea excretado al medio ambiente donde se combina con otros elementos y causa problemas de contaminación, por lo cual es importante que se mejore su biodisponibilidad, siendo la producción de nanopartículas de fósforo una alternativa (Feneque, 2003; Scott, 2005; Cintas, 2006).

4.2.6 Preparación de nanopartículas

4.2.6.1 Métodos de preparación de nanopartículas

Tecnológicamente existen diferentes métodos de preparación de nanopartículas, lo que permite una gran variación en su estructura, composición y propiedades fisicoquímicas, la selección de cualquiera de ellos depende del polímero, de las características de solubilidad del compuesto que se va a emplear en la preparación, así como de los objetivos y condiciones particulares de dónde y cómo se requieran aplicar las nanopartículas obtenidas, por lo que es necesario tomar en cuenta la estabilidad física y química del agente activo, su toxicidad, su perfil de liberación, entre otras consideraciones (Agnihotri *et al.*, 2004).

Las nanopartículas pueden ser producidas por polimerización de monómeros sintéticos o por la dispersión de polímeros sintéticos o macromoléculas naturales (Delie y Blanco, 2005). Pueden ser utilizadas múltiples técnicas, las cuales se escogen principalmente en función de la hidrofobicidad del producto que se elaborara (Rieux *et al.*, 2006)

Algunos de los métodos empleados son el método de precipitación-conservación: en este caso, las partículas son producidas al “soplar” el agente de interés en una solución

alcalina; la separación y purificación de las partículas se realiza por infiltración y centrifugación seguida de lavados con agua caliente y fría.

Otro método es el de emulsión – evaporación, el cual está basado en la patente de Vanderhoff *et al.*, (1979), en la que un polímero disuelto en un solvente orgánico inmiscible en agua, dicha solución se dispersa en una fase acuosa que contiene un emulsificador y se forma fácilmente una emulsión, sin embargo se deben agregar estabilizadores frecuentemente para evitar la formación de hojuelas del polímero, este método es interesante debido a l empleo de solventes orgánicos que son farmacéuticamente aceptables, (Gurny *et al.*, 1981). Una variante de este método es la emulsión de enlaces cruzados: en este método se prepara una solución de agua y aceite por emulsificación, que al agitarse vigorosamente, separa y endurece las partículas; requiere de agentes que faciliten la unión de los agentes involucrados.

Otro método es la nanoprecipitación, principalmente se empleó para encapsular compuestos lipofílicos, formando nanoesferas, recientemente se ha adaptado esta técnica para encapsular compuestos hidrofílicos (Bilati *et al.*, 2005). Esta técnica es sencilla, rápida y fácil de realizar, la formación de nanopartículas es instantánea, se requieren dos solventes que sean miscibles, tanto el polímero como el producto se deben disolver primero en un sistema solvente (que permita la dispersión) y posteriormente en un sistema no solvente, la nanoprecipitación ocurre cuando la solución del polímero con el producto se agrega al sistema no solvente. Este método permite producir nanopartículas pequeñas (100 – 300 nm), con una estrecha distribución (Bilati *et al.*, 2005).

4.2.6.1.1 Producción de nanopartículas de Fosforo

El proceso para la producción de nanopartículas de fosfato de calcio se hace en un mezclador de red o en un reactor mezclador estático, el cual debe contener soluciones de Ca, de P, una solución alcalina y, opcionalmente, un agente dispersante. El proceso propuesto permite el control del micromezclado, que es esencial para formar estructuras nanométricas, pero también es un factor determinante en la pureza, la cristalinidad y morfología de cristales. El esquema de distribución de reactivos en la entrada y a lo largo del reactor, se realiza continuamente o puede variar en el tiempo, el pH es factor crucial

para los reactivos, la suspensión de las nanopartículas de fosfato de calcio que se obtiene se concentra por medio de ultra-sonidos, separación, secado, síntesis y procesos de fresado.

Otro factor a considerar es la forma que las nanopartículas adquieren, ya que ésta influye fuertemente en su comportamiento biológico. Es importante señalar que no siempre dichas partículas son de forma esférica, como pudiera imaginarse. Existen reportes de innumerables formas, algunas muy peculiares, de nanopartículas: discos rectangulares, conos, bastones, “gusanos”, discos elípticos o circulares, “tacos”, entre muchas más, las cuales pueden presentarse en 1^a, 2^a ó 3^a dimensión, dependiendo del método de preparación y los materiales utilizados. Al respecto, la viscosidad y grosor del material utilizado determina si la partícula presentará terminaciones puntiagudas o aplanadas. Incluso, es posible que las nanopartículas presenten regiones con diferente curvatura, textura y/o concavidad (Champion *et al.*, 2007).

4.2.6.2 Polímeros empleados en la preparación de nanopartículas

Los agentes activos de la superficie (surfactantes), son generalmente polímeros que a bajas concentraciones, se adsorben en las superficies o interfaces de un sistema y alteran la energía libre y la tensión superficial o interfacial, estos productos tienen una estructura característica, con regiones polares (hidrofílicas) como no polares (hidrofóbicas) en la misma molécula, por lo que tienen naturaleza anfipática (Corrigan, 2007).

Según Rieux *et al.*, (2006) los criterios para la elección de un polímero, para la liberación controlada de un fármaco, son la biodisponibilidad, biocompatibilidad, facilidad de producción y tasa de degradación, para permitir la liberación del compuesto. El polímero empleado en la preparación de las nanopartículas influye en el tamaño de partícula y el patrón de liberación. Al emplear un polímero, las nanopartículas son más estables en el tubo gastrointestinal que otros vehículos que se pudieran emplear, se mejora la regulación de las características fisicoquímicas, las propiedades de liberación y comportamiento biológico de las nanopartículas.

Las nanopartículas de polímeros son más estables en el tubo gastrointestinal que otros vehículos coloidales y pueden proteger sustancias encapsuladas del ambiente

gastrointestinal, en segundo lugar, el uso de polímeros mejora la regulación de las características fisicoquímicas (hidrofobicidad, potencial zeta), las propiedades de liberación (retrasar, prolongar, activar) y comportamiento biológico (especificidad, bioadhesión) estas (Rieux *et al.*,2006).

Los polímeros empleados en la formulación de nanopartículas pueden ser sintéticos ácido poliláctico, (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), polimetil-metalacrilato, polivinilpirrolidone (PVP) entre otros, o naturales (albumina, gelatina, alginato o quitosa). El PVP es un polímero muy biocompatible y biodegradable lo cual no repercute en la contaminación del medio ambiente, funciona como disgregante de las nanopartículas para así evitar su aglutinamiento (Rieux *et al.*, 2006) y en algunos productos de uso farmacéutico se utiliza como aglutinante.

Dentro de los ingredientes encapsulados utilizados en alimentos se encuentran: saborizantes (especies, aceites, sazónadores y edulcorantes), acidulantes, álcalis, buffers (ac. Ascórbico, cítrico, fumarico, bicarbonato), lípidos (ac. Linoleico, agentes redox (blanqueadores, maduradores), enzimas, microorganismos, antioxidantes, colorantes, entre otros (Yañez *et al.*, 2002).

4.2.7 Caracterización de nanopartículas

La caracterización de nanopartículas es el proceso de descripción de características como lo son tamaño, morfología, composición y potencial Z, entre otras.

En la caracterización de nanopartículas el microscopio electrónico juega un papel importante, en este equipo se evalúa la morfología y el tamaño de partícula (Williams y Vaugh, 2007) así como la composición química de las partículas y el porcentaje de los compuestos presentes.

4.2.7.1 Tamaño de partícula

El movimiento de las partículas coloidales en un medio dispersante es una forma de movimiento Browniano. La interacción de las partículas dispersas con el medio (líquido o gas), provocan un movimiento irregular y aleatorio de las partículas a partir de su posición

original en el espacio. De acuerdo con la teoría Stokes-Einstein, el tipo de movimiento y la velocidad depende de la viscosidad, temperatura y tamaño molecular del medio en el que se encuentran suspendidas. Esta teoría es la base para medir el tamaño de partícula utilizando la espectrofotometría de correlación de fotones (Williams y Vaugh, 2007).

4.2.7.2 Morfología y composición de nanopartículas

La microscopia electrónica de barrido SEM permite obtener fotografías donde se puede apreciar las características morfológicas y topográficas de las muestras con una resolución que nos da idea de la forma de las nanopartículas obtenidas. El microscopio electrónico utiliza electrones para formar imágenes de objetos diminutos, permiten alcanzar una capacidad de aumento superior a los microscopios convencionales debido a que la longitud de onda de los electrones es menor que la de los fotones (empleados en los microscopios convencionales). El microscopio electrónico funciona con un haz de luz generado por un impulso, acelerado por un alto voltaje y focalizado por lentes magnéticas (Bozzola y Russell, 1992).

La forma que las nanopartículas adquieren influye fuertemente en su comportamiento biológico. Es importante señalar que no siempre dichas partículas son de forma esférica, como se pudiera esperar. Existen reportes de innumerables formas: discos rectangulares, conos, bastones, discos elípticos o circulares entre otras más, las cuales pueden presentarse en 1^a, 2^o o 3^a dimensión, dependiendo del método de preparación y los materiales utilizados.

4.2.7.3 Análisis de difracción de rayos X e infrarrojo

La difracción de rayos X (drxp por sus siglas en inglés) es el resultado de la interacción de una radiación (rayos X) con los átomos ordenados de las muestras a analizar, se utiliza la drxp para obtener información sobre los sólidos cristalinos, sobre los átomos que los forman (composición) y su disposición. Los equipos utilizados para realizar estas medidas se llaman difractómetro, dan como resultado un difractograma el cual contiene información sobre la fase cristalina que lo produce el compuesto analizado.

Esta relación entre fase cristalina y difractograma hace posible la identificación de fases cristalinas. Se puede realizar un análisis cualitativo de una muestra cristalina comparando las posiciones e intensidades de los picos de su difractograma con las reflexiones características de fases puras, medidas previamente y almacenadas normalmente en bases de datos (Manual de difractómetro, 2010).

Por su parte la espectrometría de infrarrojos (espectroscopia IV) es un tipo de espectrometría de absorción que se emplea como técnica espectroscópica, para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra. Se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Con el fin de hacer medidas en una muestra, se transmite un rayo monocromo de luz infrarroja a través de la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida. Repitiendo esta operación en un rango de longitudes de onda de interés (por lo general, $4000-400\text{ cm}^{-1}$) se puede construir un gráfico. Al examinar el gráfico de una sustancia, un usuario experimentado puede obtener información sobre la misma.

Se pueden generar gráficos bien resueltos con muestras de una sola sustancia de gran pureza. Sin embargo, la técnica se utiliza habitualmente para la identificación de mezclas complejas. La espectrometría infrarroja se utiliza ampliamente en la investigación científica, porque es una técnica rápida y fiable para medidas, control de calidad y análisis dinámicos. Algunas máquinas automáticamente señalan qué sustancia está siendo analizada a través de miles de espectros de referencia almacenados en la memoria.

4.2.7.4 Potencial Zeta

Las nanopartículas coloidales generalmente son negativas aunque también pueden ser positivas y su atmosfera cargada produce un potencial eléctrico relativo a la solución.

Un punto de particular interés es el punto donde se unen la capa difusa y la de Stern de una nanopartícula, este es el llamado potencial zeta e indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre ellas (Zeta-Meter, 1997), el cual da una idea de que tan estable es el sistema coloidal, si las nanopartículas tienen valores marcadamente positivas ($>30\text{ mV}$) o negativas ($< -30\text{ mV}$) tenderán a repelerse unas a

otras, por el contrario si tienen valores bajos (-30 mV - +30Mv) las nanopartículas se juntarán y precipitarán, el método más común para determinar el potencial z es la microelectroforesis realizado por medio de una técnica microscópica (Malvern Instruments, 2007).

4.2.7.5 Índice de polidispersidad

El índice de polidispersidad es una medida de homogeneidad de las partículas y oscila entre 0 y 1. Cuanto más se acerque a cero la polidispersidad, más homogéneas serán las partículas de la suspensión.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

La elaboración de fosfato se realizó en las instalaciones del laboratorio de nutrición animal del Colegio de Postgraduados. Se prepararon nanopartículas de fosfato de calcio por el método de coprecipitación, para lo cual la metodología inicial fue la siguiente:

Basándonos en la técnica descrita por Kozlova *et al.* (2012) se procedió a preparar las soluciones a emplear.

Partiendo de la reacción general:



5.2 Síntesis de nanopartículas

5.2.1 Metodología de síntesis de nanopartículas por el método de coprecipitación

La metodología empleada como base para la preparación de las nanopartículas de fosfato de calcio fue acuerdo al método de Koslova *et al.* (2012) realizando algunas modificaciones por las diferencias del producto final que se obtuvo.

Preparación de soluciones

La preparación de las soluciones de cloruro de calcio y fosfato de sodio, se prepararon según las molaridades y la metodología que describen Urch *et al.* (2009).

- Se prepararon 50 mL de solución de Cloruro de calcio (CaCl_2) 18 milimolar (mM), se pesaron 0.0998 g de CaCl_2 , los cuales se diluyeron en 50 mL de agua destilada.
- En la preparación de fosfato de sodio (Na_2HPO_4), 10.8 mM, se pesaron 0.0766 g, los cuales se diluyeron en 50 mL de agua destilada.
- Se pesaron 0.4 g de NaOH y se diluyeron en 100 mL de agua destilada, este se emplea para realizar el ajuste al pH correspondiente.
- El polivinilpirrolidone (PVP) se empleó en una dilución al 1%, 1 g de PVP se diluyó en 100 mL de agua destilada.

Preparación de nanopartículas

Técnica 1: A temperatura ambiente en un matraz previamente esterilizado se agregaron 20 mL de agua destilada ajustando a un pH de 6.5 – 9, en constante agitación se adicionaron 5 mL de CaCl_2 a una concentración de 18 mMol, posterior a esto se dejaron caer lentamente 8.3 mL de Na_2HPO_4 , se agitó por 10 minutos, para después agregar 3 gotas de una solución de PVP, mientras se mantenía en agitación se pasó un rayo láser a través de la solución, con el objetivo de observar el efecto Tyndall (lo cual indica la formación del compuesto).

La solución obtenida se lavó para eliminar las sales (NaCl) mediante centrifugación de la solución a 6000 rpm por 5 minutos para eliminar el sobrenadante, se realizaron dos lavados (2 veces se centrifugo y se eliminó sobrenadante, volviendo a colocar agua en el segundo lavado para volver a centrifugar). El material restante se sometió a calor para

eliminar el remanente de agua, el polvo obtenido se despegó del matraz con una espátula y se guardó para su posterior análisis.

Como segunda etapa se tuvo la observación del material obtenido, en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

En esta primera metodología se realizaron análisis EDAX y de tamaño en microscopio SEM, con el objetivo de obtener datos en composición, tamaño y forma de las nanopartículas.

Técnica 2: Debido a los resultados obtenidos (que se mencionan más adelante), se realizaron modificaciones a la Técnica 1, para hacer más eficiente el proceso de extracción de humedad, se sustituyó el calor como método de extracción, por un proceso de liofilización (proceso en el cual se congela la solución y se crea un vacío para realizar la separación de agua por sublimación), de esta manera se elimina agua desde el estado sólido sin pasar por el líquido, ya que el calor (altas temperaturas) es un factor que modifica la estructura de las nanopartículas, y con la liofilización no hay alteración de las nanopartículas formadas. Otro factor muy importante que se modificó en la técnica fue el pH inicial de la solución, el cual se llevó inicialmente a un rango de 5.5 – 6.0 con ácido clorhídrico (HCL) y posteriormente se agregaba el CaCl_2 y Na_2HPO_4 lentamente para dar tiempo a la formación del compuesto y en agitación constante, después se agregó el PVP, sin modificar concentraciones, ni molaridades, solo volúmenes.

Técnica 3: Debido a que a pH mayores A 6.0 se da la formación de otro tipo de fosfato como la hidroxiapatita, el cual es menos digestible que el fosfato de calcio, se llevó a cabo un monitoreo del pH durante toda la reacción manteniéndolo en un rango de pH 4.5 -5.0, desde el inicio, durante la agregación del CaCl_2 y del Na_2HPO_4 y al final al agregar el PVP.

Cabe mencionar que con esta modificación en el pH no se presentó el efecto Tyndall tan marcado, también hubo problemas en el proceso de separación de sales (NaCl) (producto del proceso de formación del fosfato) ya que al centrifugar no hubo separación de sólidos y líquido (en el cual van las sales por tener un peso menor al del fosfato), por lo que se procedió a aumentar las revoluciones de centrifugado a 10 000 rpm, 15 000 rpm y 20 000 rpm, sin haber separación, por lo que se procedió a liofilizar primero, posteriormente a

centrifugar y volver a liofilizar, sin embargo al llevar las pruebas al microscopio tampoco se obtuvieron los resultados deseados.

Técnica 4: Ya que a pH 4.5 – 5.0 hubo problemas en el proceso de separación de sales, se realizaron cambios llevando a cabo reacciones monitoreando el pH en un rango de 5.0-5.5 durante toda la reacción.

Para obtener mayores cantidades de nanopartículas se incrementaron los volúmenes, conservando la proporción de las molaridades, la técnica resultante es la siguiente:

A temperatura ambiente en un matraz previamente esterilizado, se colocaron en 602 mL de CaCl_2 18 mMol en agitación, ajustando el pH con ácido clorhídrico a un rango entre 4.5 – 5.0, posterior a esto se agregaron gota a gota 1000 mL de Na_2HPO_4 10.8 mMol, se mantuvo durante 10 minutos en agitación y se agregaron 9 mL de la solución de PVP al 1%, manteniendo la solución en agitación se paso un rayo láser a través de ella para observar el efecto Tyndall.

La solución obtenida se repartió en matraces, se colocaron en la liofilizadora y se esperó a obtener los sólidos (nanopartículas). Este proceso por medio de liofilización se llevo de 24 a 78 h.

Los sólidos (nanopartículas) obtenidos, se colocaron en tubos para centrifuga, este proceso se realizó con el objetivo de lavar sales (NaCl), se colocaron en los tubos con 20 mL de agua, se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos, al terminar la centrifugación se extrajo el sobrenadante con ayuda de una jeringa, se volvió a agregar muy poca agua, se centrifugó por segunda vez y se eliminó el sobrenadante, el producto restante se colocó en un matraz de 250 mL, aforándolo a 50 mL para colocarlo en la liofilizadora. Las muestras obtenidas se extrajeron del matraz y se guardaron en un tubo Eppendorf, para su posterior análisis en microscopio.

Esta técnica se repitió modificando el pH a rangos entre 4.5- 5.0, 5.0-5.5 y 5.5-6.0.

Como segunda etapa se tuvo la observación del material obtenido, en el microscopio electrónico de barrido (SEM).

5.2.2 Análisis en microscopio electrónico de barrido (morfología y composición)

Las muestras obtenidas se observaron en el microscopio electrónico de barrido (SEM), en el área de microscopia del Colegio de Posgraduados.

1.- Para poder ver las nanopartículas al microscopio, se colocó una pequeña parte de la muestra en los porta muestras de latón, se recubrieron con una delgada capa metálica conductora de 5 nm, de una aleación de 80% oro y 20% paladio, en una ionizadora de metales (Ion Sputter JFC-III00), y se observaron al microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6390).

2.- Se introdujeron las muestras en el SEM, para su análisis.

3.- El análisis de las muestras consistió en la observación de la forma y tamaño de las partículas, este microscopio solo da una idea del tamaño debido a que su resolución no es la suficiente para realizar una medición de las partículas. Se tomaron imágenes y se realizó un análisis EDAX el cual indica la composición de las muestras, por medio del porcentaje de los elementos presentes en estas obtuvimos la relación Ca:P.

5.2.3 Análisis en microscopio electrónico de barrido de alta resolución (morfología y tamaño)

Las muestras obtenidas se observaron en el microscopio electrónico de barrido de alta transmisión (SEM), en la central de microscopia del Instituto Politecnico Nacional, en este microscopio se observó morfología y por la resolución de este tipo de microscopio también se pudo observar tamaño.

1.- En tubos Eppendorf se agregaron 1mg de muestra y 1 mL de agua, se sónico durante 10 min.

2.- De la solución obtenida se tomaron 0.5 mL y se agregaron 0.5 mL de agua, se sónico nuevamente por 10 min.

3.- De la última solución obtenida se toma una gota y se coloca en el centro de las rejillas de 2 μm .

4.- Se colocan en una caja Petri para su almacenamiento y posterior observación.

5.2.4 Análisis en difractometro e infrarrojo

Parte de las muestras obtenidas se enviaron a la Universidad de las Américas Campus Puebla, donde fueron analizadas en un difractometro de rayos X.

5.2.5 Potencial Z

El potencial Z y la dispersión de tamaño de partícula se determinaron utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Se preparó una solución de 0.0001 g de nanoparticulas de fosfato de calcio en 10 mL de agua destilada y se sónico durante 10 minutos, de esta solución se tomó una parte y se colocó en la celda para su análisis.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Resultados de pruebas previas a la técnica final y muestras finales

6.1.1 Composición de nanopartículas mediante análisis EDAX

A las muestras obtenidas en las técnicas 1, 2 y 3 se realizaron análisis solo en microscopio SEM para obtener datos de morfología y composición y los resultados obtenidos son los que se presentan a continuación.

En las muestras de la Técnica 1 donde el pH es mayor a 6.5 la relación calcio fosforo resulto mayor a la deseada (1.0), en el Cuadro 3 se observa que la relación fue 3.54, indicando formación de hidroxiapatita, por lo que este pH se descartó para seguir manipulándose y realizando las pruebas de síntesis de nanopartículas de fosfato de calcio además aún se observa un porcentaje de Na y Cl lo que indica la presencia de sales sin embargo el contenido fue bajo.

Cuadro 3. Resultados de análisis EDAX de Técnica 1 a pH 6.5 - 9.

Elementos %					
pH Síntesis	P	Ca	Na	Cl	Ca:P
6.5 – 9.0	2.93	10.39	0.87	-----	3.54

La relación Ca:P es muy importante ya que cuanto más cercana sea a 1.0 nos indica que es un fosfato de calcio el que se está obteniendo, en cambio al estar por arriba de este valor se habla de la producción de hidroxiapatita, esto según Vanegas *et al*, (2014) puede ser debido a que a pH 6,5 o mayores hay tendencia a aglomeración con posterior precipitación, lo que no permite que exista una buena interacción entre los elementos.

Debido a los resultados obtenidos en la primera síntesis de muestras, se decidió realizar otras pruebas estableciendo tres rangos de pH, los resultados se observan en el Cuadro 4, y se observa que conforme los rangos de pH se acercan a 6 la relación Ca:P disminuye, de igual manera el contenido de Na y Cl disminuye hasta no hacerse presente en las muestras de pH 5.5-6.0, sin embargo estos resultados solo dan una idea del comportamiento de las muestras al pH, debido a que los resultados son muy variables, por el tipo de análisis que es, en el cual solo se analiza una parte de la muestra y no toda.

Cuadro 4. Resultados de análisis EDAX de Técnica a diferentes rangos de pH.

Elementos					
pH Síntesis	Ca	P	Na	Cl	Ca:P
4.5 - 5.0	55.31	34.00	0.51	8.75	1.63
5.0 - 5.5	26.94	16.85	1.11	2.39	1.59
5.5 - 6.0	20.41	18.70	1.28	---	1.09

En los resultados del análisis EDAX observamos que la proporción Ca:P más próxima a 1.0 es la de la muestra con pH controlado entre 5.5-6.0, en las otras muestras la proporción es mayor por lo que podemos deducir que al trabajar en este pH obtendremos con mayor probabilidad el fosfato de calcio deseado, a diferencia de las demás muestras, tal es el caso de la muestra de pH 4.5-5.0 donde la relación Ca:P es más cercana a 2 lo que es un indicio de que se está produciendo hidroxiapatita.

6.1.2 Composición de nanopartículas con difractograma de rayos X

Se realizaron análisis de infrarrojo al CaHPO_4 grado analítico (Figura 3) utilizadas como testigo, para comparar su composición con la de las muestras sintetizadas.

En la Figura 3 los resultados del análisis de infrarrojo dio valores de referencia (picos) que se compararon con las muestras elaboradas. Estos valores son por orden de aparición 1338.553, 1058.176, 987.750, 846.240, 720.877, 589.294 y 578.531.

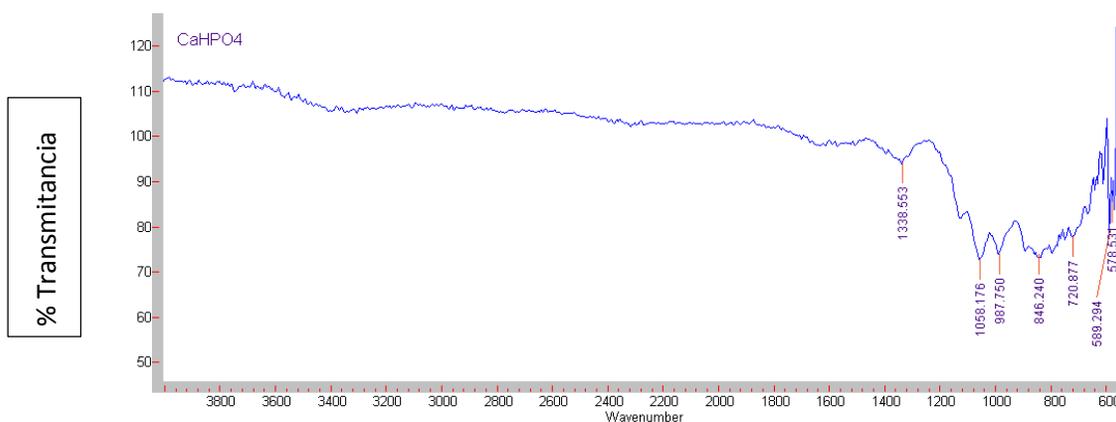


Figura 3. Infrarrojo de CaHPO_4 grado analítico

Las figuras 4, 5 y 6 muestran los resultados del análisis de infrarrojo. Los valores (picos) pueden compararse con los obtenidos en la figura 3 correspondiente al CaHPO_4 grado analítico. Los valores obtenidos del análisis infrarrojo para la muestra del pH 4.5 – 5.0 por orden de aparición fueron 1343.89, 1131.52, 1066.27, 996.59, 885.31 y 558.58.

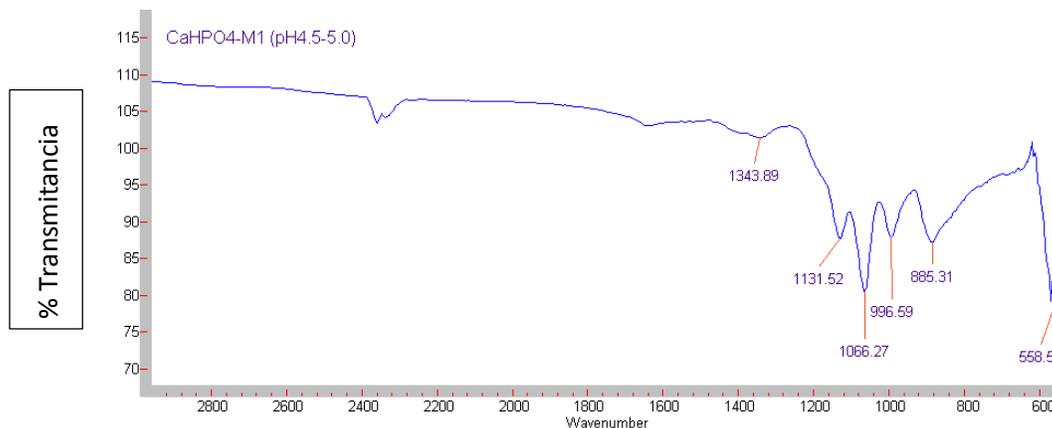


Figura 4. Infrarrojo de muestra pH 4.5-5.0

Valores obtenidos por análisis de infrarrojo a muestra de pH 5.0 – 5.5: 1339.86, 1132.09, 1065.38, 995.63, 882.70, 685.72 y 563.81.

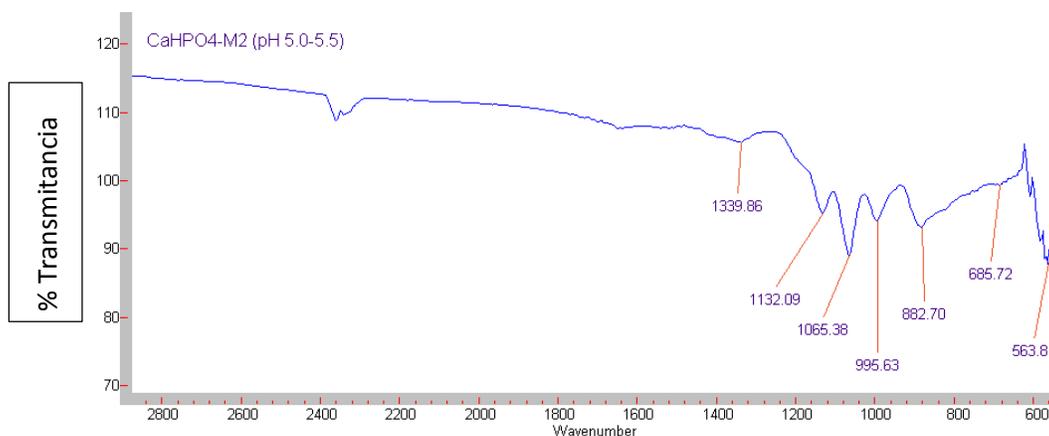


Figura 5. Infrarrojo de muestra pH 5.0 – 5.5

Los valores obtenidos del análisis para la muestra de pH 5.5-6.0 fueron: 1636.46, 1338.91, 1123.4, 1059.31, 989.89 y 877.91.

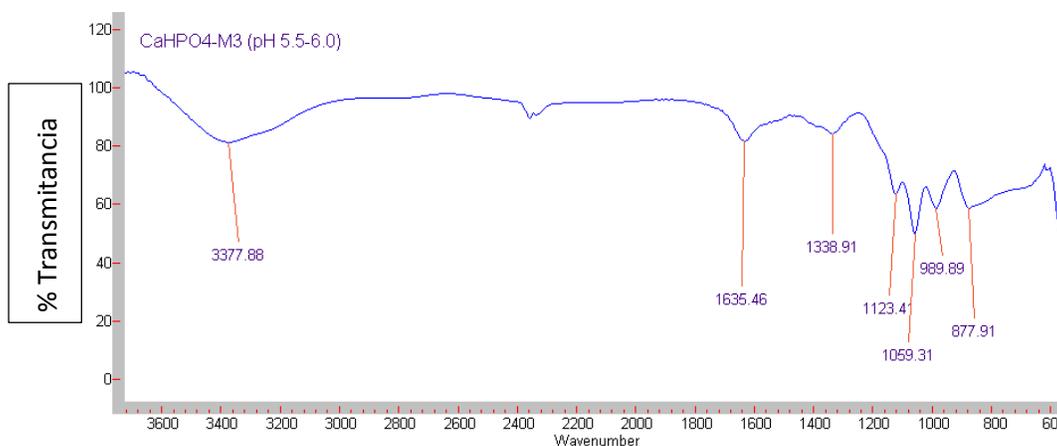


Figura 6. Infrarrojo de muestra pH 5.5-6.0

En la figura 7 se realizó una comparación de las muestras elaboradas a diferentes pH con la muestra de Ca_2HPO_4 grado analítico, sin los valores de los picos, solamente de las curvas, para darnos una idea más clara de que muestra se acercó más a la del fosfato grado analítico.

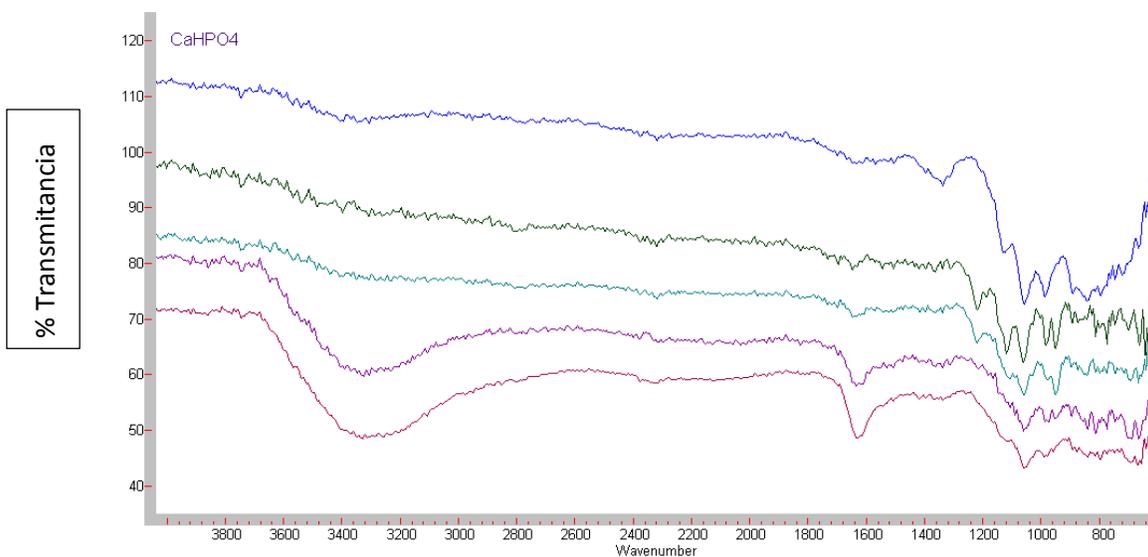


Figura 7. Resultados de infrarrojo de CaHPO₄ analítico, M1, M2, M3, M4 (de arriba a abajo)

Al realizar la comparación de las gráficas y los valores de los picos observamos que la muestra más parecida al Ca₂HPO₄ analítico es la muestra sintetizada a un pH de 5.5-6.0.

Cada uno de los espectros de los precipitados analizados muestra las bandas fundamentales correspondientes a los grupos principales del fosfato de calcio que se analiza. En los 1040 y 1091 cm⁻¹ se encuentra la señal de formación de hidroxiapatita, la señal de formación de PO₄³⁻ tiene dos puntos; la vibración antisimétrica que aparece en los los 561 y 606 cm⁻¹ y la vibración simétrica aparece a partir de los 952 cm⁻¹. La vibración principal del grupo OH⁻ se aprecia como una ligera inflexión sobre los 3572 cm⁻¹, señal de la absorción de humedad por parte de la muestras durante el proceso de síntesis (Fowler, 1974).

Con la obtención de estos resultados se determinó que el pH para trabajar en la elaboración de las nanopartículas sería 5.5 – 6.0, con lo que se procedió a realizar las nanopartículas monitoreando el pH en dicho rango.

6.1.3 Morfología de nanopartículas mediante análisis SEM

Los resultados obtenidos de morfología con esta técnica no fueron muy favorables ya que no se observaron estructuras muy definidas. En las Figuras 8, 9 y 10 obtenidas por SEM se apreció que en las partículas generadas por todas las variantes (pH) prevalecen las dimensiones menores a 5 micras, sin embargo existe una propensión a presentar una configuración globular en las partículas obtenidas a pH 4.5 – 5.0, a diferencia de las obtenidas a pH mayores a 5.0 en las que se observó la tendencia a formación de estructuras laminares figura 9 y 10, lo cual pudiera encontrarse relacionado según Paz *et al.* (2010) a la formación de cristales, además, en todos los casos se observó una tendencia a la formación de aglomerados de las partículas.

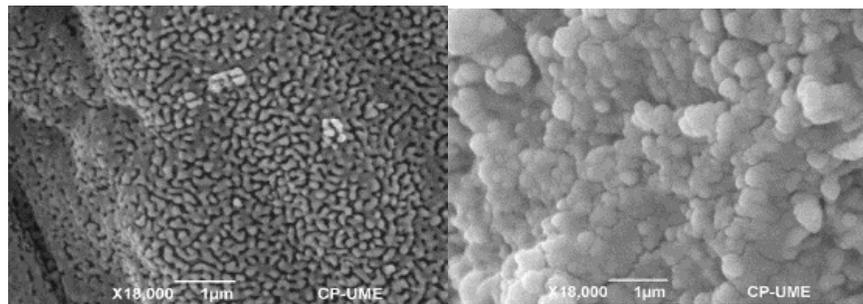


Figura 8. Micrografía electrónica de barrido observada a 18, 000 x de micropartículas amorfas que corresponden a la técnica de pH 4.5 – 5.0.

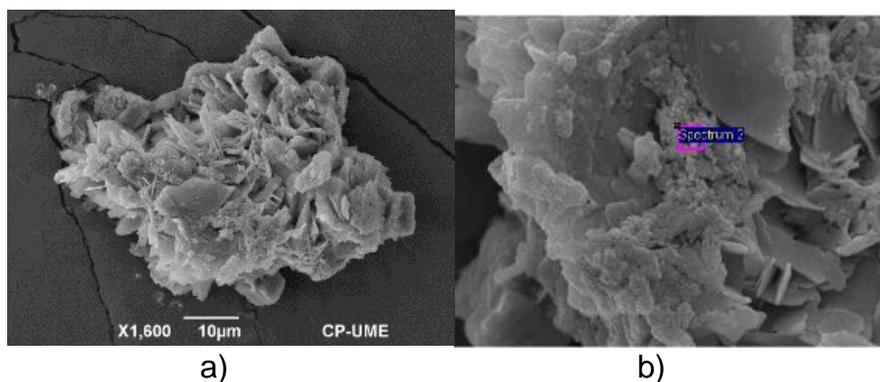


Figura 9. Micrografía electrónica de barrido de micropartículas amorfas observadas a a) 1,600 y b) 18, 000 X, sintetizadas a pH 5.0 – 5.5.

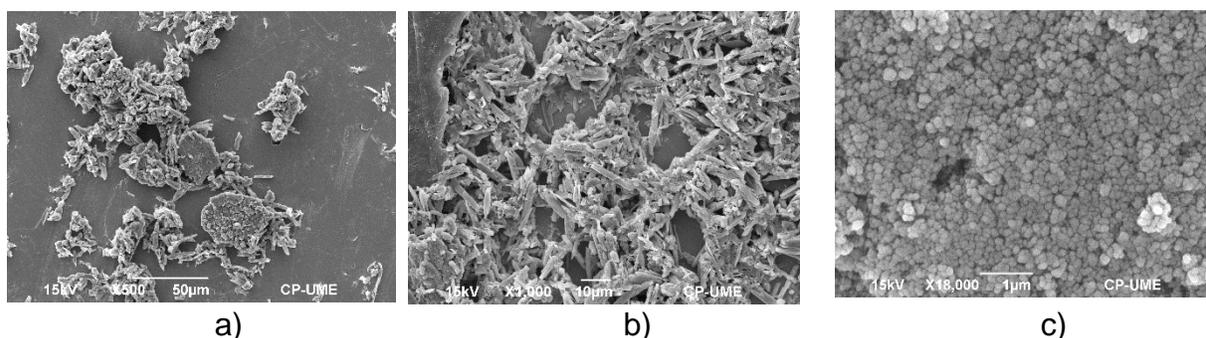


Figura 10. Micrografía electrónica de barrido de micropartículas amorfas que corresponden a la técnica de pH 5.5 – 6.0, observadas a a) 500 X, b) 1,000 X y c) 18,000X.

6.1.4 Tamaño de nanopartículas

Los resultados obtenidos en el Z-Sizer para tamaño de partícula se agrupan en el Cuadro 5, posteriormente se muestran las gráficas generadas, donde se observa que para las muestras sintetizadas a pH4.5-5.0 los rangos van de 141.8 nm a 684.1 nm, en la siguiente muestra pH 5.0-5.5 los tamaños son de 396.6 nm a 658.0 nm y en la muestra final el rango va de 28.21 a 623.5 nm, los rangos obtenidos son amplios esta variación probablemente se debe a que a cada muestra se realizaron 3 medidas, al realizar la medida final día tiempo a que hubiera aglomeración de las nanopartículas y de esta manera se obtuvieron valores mayores.

Cuadro 5. Rangos de tamaño de nanopartículas a diferentes pH

pH de síntesis	Rango de tamaño (nm)
4.5-5.0	141.8 - 684.1
5.0-5.5	396.6 - 658.0
5.5-6.0	28.21 - 623.5

De los resultados anteriores observamos que el pH con el que se obtienen menores tamaños de partícula es de 5.5-6.0, los tamaños de partícula sintetizados a dicho pH (5.5-6.0) se corroboraron al realizar medición de tamaños en microscopio de transmisión electrónica TEM, se observó tamaños de partícula de 20 nm a 100 nm aproximadamente, como lo podemos observar en la Figura 11.

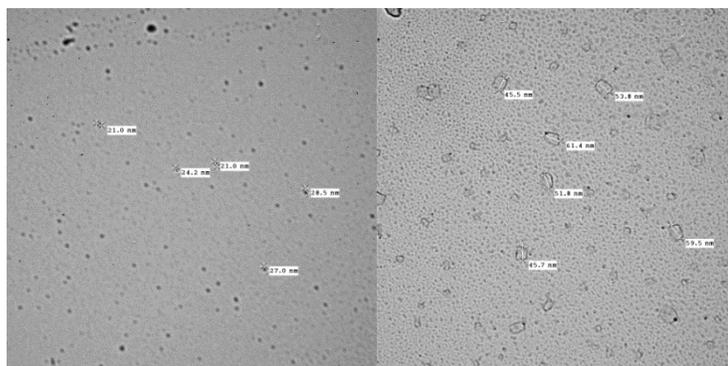


Figura 11. Imágenes obtenidas con microscopio de transmisión electrónica a 39200 x, de muestras sintetizadas a pH 5.5-6.0.

6.1.5 Potencial Zeta e índice de polidispersidad (Pdi)

El índice de polidispersidad de las nanopartículas obtenido presenta un comportamiento interesante Cuadro 6, ya que conforme aumenta el pH de síntesis de las nanopartículas se observa una disminución en el Pdi, siendo el valor más bajo para el pH de 5.5-6.0, teniendo en cuenta que el rango de un Pdi aceptable va de 0 a 1 y cuanto más cercano este de cero más homogéneas serán las partículas, estos valores indican que a pH de síntesis 5.5-6.0 las nanopartículas son más homogéneas a comparación de los otros dos rangos de pH (4.5-5.0, 5.0-5.5).

Cuadro 6. Pdi de nanopartículas sintetizadas a diferentes pH

pH de síntesis	PDi	
	Mínimo	Máximo
4.5-5.0	0.605	1
5.0-5.5	0.481	0.983
5.5-6.0	0.27	0.978

Debido a que los menores tamaños de partícula, al tipo de morfología e índice de polidispersidad muestran que el pH de síntesis con el que se obtienen las mejores nanopartículas de fosfato de calcio es 5.5 – 6.0, el análisis de potencial Z se obtuvo solo para las nanopartículas sintetizadas a dicho pH, el valor resultante fue -1.13 mV, siendo un valor alejado del esperado para que se le considere un sistema estable (< -30mV ó > 30mV), lo que indica que con el tiempo en un sistema coloidal las nanopartículas tenderán a juntarse y precipitarse.

Puede verse que los resultados en la caracterización de las nanopartículas varían de acuerdo al pH de síntesis esto concuerda con lo reportado por García *et al.* (2005) que refiere que la región de estabilidad de la fase hidroxiapatita (HAp) o de la fase monetita (Mt) de un fosfato es altamente dependiente del pH del sistema. Dependencia que también ha sido reportada en otros trabajos.

7. CONCLUSIONES

- Se prepararon y caracterizaron satisfactoriamente las nanopartículas de fosfato de calcio.
- Las nanopartículas sintetizadas a diferentes pH, fueron diferentes en su, composición y morfología.
- Se concluye que la técnica en la cual se controla el pH en un rango de 5.5 – 6.0, se obtienen las mejores nanopartículas de fosfato de calcio en tamaño y composición. La técnica adecuada para la elaboración de nanopartículas de fosfato de calcio fue a dicho pH.

8. LITERATURA CONSULTADA

- Adeola, O., Dilger, R.N., Onyango, E.M., y Jendza, J.A. 2005. Utilización del fosforo en aves y ganado porcino. Department of Animal Sciences. Purdue University, USA. XXI Curso de especialización FEDNA, pp. 343-365.
- Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., and Aminabhavi, T.M. 2004. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 100:5-28.
- Ammerman, C.B. 1995. Methods for estimation of mineral bioavailability. In *Bioavailability of nutrients for animals*. Academic Press, San Diego, CA. 4: 83-94
- Axe, D.E. 1993 *Macrominerals*. IMC-Agrico. Feed Ingredients Division, Mundelein. Illinois.
- Bankinter. 2005. Nanotecnología: la revolución industrial del siglo XXI. Fundación de la Innovación Bankinter. www.ftforum.org (consulta Agosto 2012)
- Barkley, G. R.; Miller, H. M. and Forbes, J. M. 2004. The ability of laying hens to regulate phosphorus intake when offered two feed containing different levels of phosphorus. *Br. J. Nutr.* 92: 233-240.
- Berner, N. and Bronner, F. 1997. *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements*. Edición: Boyd L. O'Dell y Roger Allan Sunde. Marcel Dekker Inc. Volumen 2. Edición 1. Nueva York.
- Bilati, U., Alléman, E. and Doelker, E. 2005. Development of nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Euro. J. Pharm. Sci.* 24:67-75.
- Bozzola, JJ, y Russell, LD. 1992. Tinción de muestras y métodos de contraste para microscopía electrónica de transmisión. *Microscopía Electrónica.Principios y Técnicas para biólogos*. Pp. 117-118
- Broz, J., Oldale, P., Poerrin-Voltz, R. H., Rychen, G., Shulze, J., and Si- Moes Nunes, C. 1994. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilization in broiler chickens fed a low phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. *Br. Poultry Sci.* 35:273.
- Buzea, C., Pacheco, B.I., and Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2(4):1-103.

- Cabrera, M.C., Del Puerto, M., Ramos, A., Saadoun, A., y Marchesoni, A. 2002. Evaluación de la biodisponibilidad del fosforo Orgánico e inorgánico a través de la Solubilidad in vitro y utilización in vivo. *Agrociencia* Vol.VI N° 1 pp. 69-78 69
- Castelló, J. A. 1977. *Nutrición de las aves*. Barcelona. Ediciones Sertebi. 237 pp.
- Cao, G. 2004. *Nanostructures y nanomaterials: Synthesis, properties and applications*. Imperial College Press. England. 305 pp.
- Champion, J.A., Katare, Y.K., and Mitragotri, S. 2007. Making polymeric micro- and nanoparticles of complex shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104:11901-11904
- Church, D.C., Pond, W.G., and Pond, K.R. 2002. *Fundamentos de nutrición y alimentación de animales*. 2da edición UTEHA Wiley, Mexico, D. F. 635 pp.
- Cintas, L.M. 2006. *Nanotecnología: la revolución industrial del siglo XXI*. Online: <http://weblogs.madrimasd.org/alimentacion/archive/2009/03/29/37553.aspx>.
- Corrigan, O. 2007. Surfactants in pharmaceutical Products and Systems. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Informa Healthcare. U.S.A. 4128 p.
- Cuca, J.M., Ávila, E., y Pro, A., 2009. *Alimentación de las aves*. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Zootecnia. México. 276 pp.
- Danisi, G. and Murer, H. 1989. En: *Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System. IV.*, edited by S. Schultz.
- De Groote, G. 1990. *Materias primas alternativas para la alimentación animal*. En: *VI Curso de Especialización FEDNA*. Madrid. 45 pp.
- Delie F. and Blanco J. 2005. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules* 10:65-80.
- Dominguez, V. I. 1993. *Diagnóstico del estado mineral de ovinos bajo condiciones en pastoreo en Tenenago del Valle, México*. Tesis de maestría Departamento de Zootecnia. Universidad Autonoma Chapingo. Chapingo, Mex. 59 pp.
- ETC Group. 2004. *La inmensidad de lo minimo: Breve introducción a las tecnologías de nano escala*. Canada. 9p
- FAO y OMS. 2009. *Expert Meeting on the Application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potential Food Safety Implications. Meeting Report*. 104p.

- Feneque, J. 2003. Brief introduction to the veterinary applications of nanotechnology. Nanotechnology Now. On line: <http://www.nanotech-now.com/Jose-Feneque/Veterinary-Applications-Nanotechnology.htm>.
- Frandson, R.D. y Spurgeon, T.L. 1995. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. 5° edición. Ed. Interamericana-Mc Graw- Hill. México. 560 pp.
- Fowler BO. 1974. Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium strontium and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitutions, *Inorganic Chemistry*. 13: 194-207.
- Freestone, I., Meeks, N., Sax, M., and Higgitt, C. 2007. The Lycurgus Cup-a roman nanotechnology. *Gold Bulletin*. 40:270-277.
- García C., Paucar, C., Gaviria, J., Duran, A. 2005. Effect of some physical-chemical variables in the synthesis of hydroxyapatite by the precipitation route. *Key Engineering. Materials*, 284, 47-50.
- Guevara, V. 1980. Effect of excessive dietary calcium and phosphorus in broiler diets. Ph. D. Dissertation. Mississippi State University
- Gurny, R., Peppas, N., Harrington, D and Banker, G. 1981. Development of biodegradable and injectable lattices for controlled release of potent drugs. *Drug Dev Ind Pharm*. 71:1-25.
- Gillis, M.B., Norris, L.C. and Heuser, G.F. 1954. Studies on the biological value of inorganic phosphates. *J. Nutritión*. 52:115
- Giroux, H.J., Houde, J. and Britten, M. 2010. Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by pHcycling treatment. *Food Hydrocolloids*, v. 24, p. 341-346.
- Grodzik, M. and Sawosz, E. 2006. The influence of silver nanoparticles on chicken embryo development and bursa of Fabricius morphology. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 15:111-114.
- Hemme, A., Spark, M., Wolf, P., Paschertz, H. and Kamphues, J. 2005. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition (Berl)*89:129-133.
- Hollister, P., Weener, J.W., Roman, C.V. and Harper, T. 2003. Nanoparticles. *Cientifica Technology white papers*.
- Hurrell, R. 2002. Fortification: Overcoming Technical and practical barriers. *Journal of Nutrition*. 132:806S-812S.

- Huw, A. 2003. Future technologies, today's choice. Greenpeace environmental trust. Canonbury Villas, London. 69 p
- Huyghebaert, G. 1996. The response of broiler chicks to phase feeding for P, Ca and phytase. *Archiv für Geflügelkunde*, 60(3), 132-141
- Keshavarz, K. 2000. Nonphytate phosphorus requirements of laying hens with and without phytase on a phase feeding program. *Poultry Sci.*:79:748-763.
- Kemme, P.A. 1998. *Phytate and phytases in pig nutrition*. PhD Thesis. Agricultural University of Wageningen, Países Bajos.
- Liebert, F., Wecke, C. and Schöner, F.J. 1993. In: *Proc. 1st Symposium on Enzymes in animal Nutrition*. Ed. C. Wenk y M. Boessinger. Karthause Ittingen, Suiza. pp: 202-205.
- Lima, F.R., Mendonza, C.X., Alvarez, J.C., Ratti, G., Lenharo, S.L.R., Kahn, H. and Garzillo, J.M.F. 1995a. Chemical and physical evaluations of commercial dicalcium phosphates as sources of phosphorus in animal nutrition. *Poultry Sci.*74: 1659-1670.
- Lima, I.L., Rostagno, H.S., Texeira, Albino, L.F. and Zanoto, D.L. 1995b. Disponibilida de em algumas fontes de fosforo para pintos de corte de 1 a 21 días de idade. *Anais da XXXII Reunião da SBZ Brasil*.
- Lon-Wo, E. 2005. La Producción Avícola y la Contaminación Ambiental. VIII Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos. UNELLEZ. Programa de Producción agrícola Animal. La Habana- Cuba. pp: 29- 34.
- López, J. 2007. *Nanotecnología y producción animal*. On line: <http://www.diariodigitalagrario.net/versiones/rc2/articulo2.asp?id=37374>.
- Maenz, D.D and Classen L.H. 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poultry Sci.* 77: 557-563.
- Manual de difractorómetro. Difracción de rayos X en la practica 2010. En línea <http://drxp.info/brevisima-introduccion-a-la-drxp/> página consultada Febrero 2014.
- Mateos, G.G. y García, M. 1998. En: *XIV Curso de Especialización FEDNA*. Eds. P. García, C. de Blas y G.G. Mateos. Expoaviga 98. Fira de Barcelona. pp: 173-190.
- Mc Dowell, L. R. 1992. *Minerals in Animal and Human Nutrition*. Academic Press, Inc., San Diego, C.A. 524 pp.

- National Research Council (NRC). 1994. Nutrients Requirements of Poultry. 9^o edición. National Academy of Sciences. (NAC). Editorial National Academy Press. Washington- USA. 176 pp.
- Nelson, T.S. 1967. The utilization of phytate phosphorus by poultry-A review. *Poultry Sci.* 46: 862-871.
- Nelson, T. S., Kirby, L. K. and Johnson, Z. B. 1990. The Relative Biological Value of Feed Phosphates for Chicks. *Poult. Sci.* 69:113.
- NNI. 2009. What is nanotechnology? National Nanotechnology Initiative. www.nano.gov/html/facts/whatisnano.html. Consultada el 15 junio 2013.
- Norris, A.D., Puri, N. and Sinko, P. J. 1998. The effect of physical barriers and properties in the oral absorption of particulates. *Adv. Drug Del. Rev.* 34:135-154.
- Pansu, D., Duffus, C., Bellaton, C. and Bronner, F. 1993. Solubility and intestinal transit time limit calcium absorption in rats. *J. Nutr.*, 123:1396-1404.
- Paz, A., Gonzales, J. E., López, M., Becquer, C. E. y Parodi, Ma. B. 2010. Obtención de nanopartículas de hidroxapatita empleando disoluciones con elevado contenido de iones calcio y fosfato. *Revista CENIC. Ciencias Químicas. Centro Nacional de Investigaciones Científicas Cuba* 41:1-8
- Potter, L. M., Potchanakorn, M., Ravindran, V. and Kornegay, E.T. 1995 Bioavailability of phosphorus in various phosphate sources using body weight and toe ash as response criteria. *Poultry Science* 74:1829 . 1830
- Ramírez, M. M. 2012. Efecto de la vitamina E en la función digestiva y composición de la leche de bovinos alimentados con un suplemento de ácido linoleico conjugado protegido. Tesis de doctorado. Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad – Ganadería. Montecillo, Texcoco, estado de México. 112 pp.
- Ravindran, V., Bryden, W.L. and Kornegay, E.T. (1995) *Poultry Av. Biol. Rev.* 6: 125-143.
- Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M.Y., Schneider, J. and Preat, V. 2006. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J. Control Release* 116: 1-27.

- Rohner, F., Ernst, F., Arnold, M., Hilbe, M., Biebinger, R., Ehrensperger, F., Pratsinis, S., Langhans, W., Hurrell, R. and Zimmermann, M. 2007. Synthesis, characterization, and biodisponibility in rats of ferric phosphate nanoparticles. *Journal of Nutrition*, 137: 614-619.
- Romero, P.A. 2008. Diseño y evaluación de nanopartículas de selenito de sodio para su uso en rumiantes. Tesis de Maestría. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad – Ganadería. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, estado de México. pp:46-48.
- Ross, S.A., Srinivas, P.R., Clifford, A.J., Lee, S.C., Philbert, M.A. and Hettich, R.L. 2004. New technologies for nutrition research. *Journal of Nutrition*. 134 (3): 681-685.
- Scott, N.R. 2005. Nanotechnology and animal health. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*. 24:425-432.
- Scott, NR. 2007. Nanoscience in veterinary medicine. *Vet Res Commun Suppl* 1: 139 -144.
- Sergey V, et al. Amorphous calcium (ortho) phosphate. *Acta biomaterialia*.2010, 6: 4457-4475.
- Sisson, S. y Grossman, J. 1982 Anatomía de los animales domésticos tomo I. 5ta edición. Salvat Editores. Barcelona. 1335 pp.
- Sozer, N. and Kokini, J.L. 2009. Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*. 27 (2):82-90.
- Sullivan, T.W., Douglas, J.H., Gonzales, N.J. and Bond, P.L. 1992. Correlation of biological value of feed phosphates with their solubility in water, dilute hydrogen chloride, dilute citric acid, and neutral ammonium citrate. *Poultry Sci*. 71: 2065-2074.
- Ternouth, J.H. 1990. Phosphorus and beef production in Northern Australia. 3. Phosphorus in cattle – a review. *Tropical Grasslands* 24, 159–169.
- Torres, G. A. 2011. El rol de las pequeñas y medianas empresas de la industria avícola en el proceso de la globalización: el caso de la zona metropolitana de Saltillo (1958- 2010). Centro de investigaciones socioeconomicas, pp 15-62.
- Underwood, E.J. and Suttle, Nf. 1999. The mineral nutrition of livestock. 3ra edición. CABI Publishing, New York, NY 614 pp
- UNA. Unión Nacional de Avicultores. 2012. <http://www.una.org.mx>. Consulta mayo 2012.

- UNA. Unión Nacional de Avicultores. 2013. <http://www.una.org.mx>. Consulta septiembre 2013
- Urch, H., Vallet Regi, M., Ruiz, L., Gonzalez, J. M., and Epple, M. 2009. Calcium phosphate nanoparticles with adjustable dispersability and crystallinity. *Journal of Material Chemistry*.19:1463-1469.
- Van Der Klis, M. and Versteegh, H.A. 1996. Phosphorus nutrition of poultry. En: *Recent Advances in Animal Nutrition*. P.C. Garnsworthy, J. Wiseman and W. Haresign (Eds.), pp 71-83.
- Vanegas, M. E., Vázquez, V., Moscoso, D y Cruzat, Ch. 2014. Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas del tipo Fe₃O₄/TiO₂, efecto del pH en la dispersión y estabilización en soluciones acuosas. *MASKANA*, Vol. 5, No. 1.
- Villamar, A. L., Guzman, H. y Ruiz, N.. 2009. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México 2009. SAGARPA.
- Waldner, J. B. 2008. *Nanocomputers and swarm intelligence*, Wiley & Sons, London, p.172.
- Wang, X., Dai, J., Chen, Z., Zhang, T., Xia, G., Nagai, T. and Zhang, Q. 2004. Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine A-loaded Ph-sensitive nanoparticles for oral administration. *J. Control. Release*. 97: 421-429
- Williams, R. O. and Vaughn, M. V. 2007. Nanoparticle engineering. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Informa Healthcare. U.S.A 4128 p.
- Yañez, F.J., Salazar, M.J., Chaires, M.L., Jiménez, J.H., Marquez, R.M. y Ramírez, R.E. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y perspectiva*. 21:331-319.