

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Posgrado en Nanotecnología

Tesis

Preparación de nanopartículas de quitosano tiolado empleando el método de gelificación ionotrópica, para el transporte de lisozima y albúmina.

“Tesis que como requisito para obtener el grado de:

Maestra en Nanotecnología

Presenta”:

Lic. Lesyanny Hechavarría Pérez

Teniendo como Director a:

Dr. Josué Elías Juárez Onofre

Co-director:

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios por haberme dado esta oportunidad y las fuerzas para no rendirme aun en los momentos más difíciles.

A mi padre ya que él fue el principal responsable de toda esta aventura, gracias porque este proyecto también permitió que nos acercáramos, después de estar más de 10 años separados.

A mi madre por darme tanto apoyo siempre en todo lo que me propongo, aun cuando esto implique que estemos distantes, ella es una de las personas que más ha sufrido con este proyecto, pero aun así nunca dejó de motivarme a seguir echándole ganas.

Muchas gracias a mi esposo Gildardo Martín Montaña Piña, fuiste la cosa más bonita que me pudo pasar en mi estancia en México, gracias por centrarme y tenerme tanta fe, el tiempo contigo siempre es de calidad.

A mi hermano por haber estado conmigo en esta nueva experiencia en México y hacerme sentir en mi país siempre que estábamos juntos.

A mi Director de Tesis el Dr. Josué Elías Juárez Onofre, le doy mil gracias por la paciencia que siempre me tuvo, por su apoyo, por las pláticas, por el conocimiento y por su tiempo sobre todo.

A mi tutor, el Dr. Raúl Riera Aroche por sus buenos consejos, por todo ese conocimiento que tiene y que comparte con sus estudiantes, es una magnífica persona, Dios le dé mucha salud.

A los maestros del posgrado en Nanotecnología, fueron increíbles, en especial el Dr. Roberto Carrillo, le agradezco mucho su ayuda en particular, pero de forma general todos fueron muy profesionales, siempre los voy a recordar.

A mi familia y amigos en general que siempre me han mostrado su cariño y preocupación.

¡¡¡A todos los que de alguna forma han tenido que ver con mi crecimiento en el área de la Nanotecnología y en este proceso de adaptación a esta nueva cultura, **muchísimas gracias!!!**

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

Al Proyecto CONACYT CB-2014-01 #236185 por las facilidades brindadas en el uso de sus reactivos y laboratorios.

ÍNDICE

Capítulo I. ANTECEDENTES.....	7
I.1 Polímeros.....	7
I.1.1 Biopolímeros.....	7
I.2 Quitina.....	7
I.3 Quitosano.....	9
I.3.1 Propiedades fisicoquímicas del quitosano.....	9
I.3.2 Principales reacciones químicas del quitosano.....	11
I.3.3 Quitosano tiolado.....	11
I.3.4 Aplicaciones del quitosano.....	12
I.4 Nanomedicina.....	13
I.5 Nanopartículas como sistemas de administración de fármacos.....	13
I.6 Lisozima.....	14
I.6.1 Aplicaciones.....	16
I.7 Albúmina.....	17
I.7.1 Aplicaciones.....	18
I.8 Métodos para sintetizar nanopartículas de quitosano.....	18
I.8.1 Gelificación Ionotrópica.....	19
Capítulo II. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	22
II.1 Reactivos y solventes.....	22
II.2 Determinación de grupos ionizables del quitosano.....	22
II.3 Modificación química del quitosano al 10%.....	23
II.4 Síntesis de nanopartículas de quitosano.....	23
II.5 Síntesis de nanopartículas de quitosano tiolado-proteínas.....	24
II.6 Caracterización físicoquímica.....	25
II.6.1 Determinación del tamaño de partícula y potencial zeta.....	25
II.6.2 Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier: FT-IR....	25
II.6.3 Microscopía de Fuerza Atómica: AFM.....	25
II.6.4 Eficiencia de Encapsulamiento.....	26
Capítulo III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
III.1 Cálculo del número de grupos ionizables del quitosano.....	27
III.2 Modificación del quitosano con grupos tioles al 10%.....	28
III.3 Nanopartículas de quitosano nativo y quitosano tiolado.....	29
III.4 Nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con lisozima.....	33

III.5 Nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con albúmina	37
Capítulo IV. CONCLUSIONES	42
Capítulo V. RECOMENDACIONES.....	43
Capítulo VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS:

1. Estructura molecular de la quitina.....	8
2. Principales fuentes de obtención de quitina.....	8
3. Estructura molecular del quitosano.....	9
4. Representación esquemática del quitosano mediando la apertura de uniones estrechas.....	11
5. Estructura molecular del quitosano tiolado con ácido mercaptoundecanoico.....	12
6. Estructura tridimensional de la lisozima de huevo.....	15
7. Estructura secundaria de la lisozima de huevo en donde se observan sus sitios catalíticos.....	16
8. Estructura terciaria de la albúmina, mostrando la unión de siete ácidos araquidónicos.....	17
9. Métodos empleados para la síntesis de nanopartículas de quitosano...	19
10. Mecanismo de síntesis de nanopartículas cargadas con proteína, por el método de gelificación ionotrópica.....	24
11. Curva potenciométrica para la determinación del grado de ionización del quitosano.....	27
12. Espectros de FT-IR de quitosano nativo y quitosano tiolado.....	28
13. Distribución de tamaño de las nanopartículas de quitosano nativo (izquierda) y quitosano tiolado (derecha).....	32
14. Microscopía de fuerza atómica de las partículas de quitosano nativo (izquierda) y quitosano tiolado (derecha).....	33
15. Microscopía de fuerza atómica de las partículas de quitosano nativo entrecruzadas con TPF (izquierda) y modificadas con ácido mercaptoundecanoico (derecha).....	33
16. Eficiencia de encapsulamiento en nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con lisozima.....	35
17. Microscopía de fuerza atómica de las nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con lisozima (relación 10:1).....	36
18. Espectros FT-IR de nanopartículas de quitosano tiolado, quitosano tiolado/lisozima y lisozima pura.....	37

19. Eficiencia de encapsulamiento en nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con albúmina.....	39
20. Microscopía de fuerza atómica de las nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con albúmina (relación 6:1).....	40
21. Espectros FT-IR de nanopartículas de quitosano tiolado, quitosano tiolado/albúmina y albúmina pura.....	41

LISTA DE TABLAS

1. Efecto de la relación Q/TPF y QSH/TPF sobre el tamaño, el potencial ζ y el Índice de polidispersidad de las nanopartículas.....30
2. Efecto de la relación Q-SH/LYZ sobre el tamaño el índice de polidispersidad, el potencial ζ y la eficiencia de encapsulamiento de las nanopartículas.....34
3. Efecto de la relación Q-SH/ASB sobre el tamaño, el índice de polidispersidad, el potencial ζ y la eficiencia de encapsulamiento de las nanopartículas.....38

RESUMEN:

En las últimas décadas los sistemas nanoparticulados han sido ampliamente explorados y propuestos como vectores de carga y entrega de fármacos, ya que aumentan la estabilidad de estos, permitiendo su administración por vías no invasivas, tales como la oral. El uso de sistemas de administración formados por partículas poliméricas, en particular las compuestas por quitosano generan interés particular para aplicaciones biomédicas ya que es un biopolímero, con carácter mucoadhesivo, no inmunogénico, biodegradable, biocompatible y no tóxico. Actualmente existe vasta información relacionada con las propiedades y aplicaciones del quitosano en la nanomedicina, sin embargo, hay muy pocos trabajos que aborden el rol de los derivados del quitosano en el potenciamiento de las mismas; para lograr la encapsulación eficiente de proteínas tan útiles y diferentes, en cuanto a carga y peso molecular. De acuerdo a este contexto, el objetivo del presente trabajo es la preparación y caracterización de nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con lisozima y albúmina. La síntesis de las nanopartículas se realizó por el método de gelificación iónotrópica con diferentes relaciones molares de quitosano y entrecruzante aniónico. Las nanoplataformas quitosano tiolado-proteína fueron caracterizadas físicoquímicamente en el equipo Zetasizer nano Zs, en el cual se obtuvieron resultados de distribución de tamaño en un rango de 100 a 300 nm, y valores de potencial zeta en un rango de 15 y 22 mV. Las imágenes realizadas por microscopía de fuerza atómica muestran nanopartículas con una morfología semiesférica u ovoide.

Palabras clave: sistemas nanoparticulados, quitosano tiolado, lisozima, albúmina.

SUMMARY:

In recent years, nanoparticulate systems have been widely explored and proposed as drug loading vectors, since these increase the drug stability, allowing its administration by non-invasive routes, such as oral. The use of administration systems formed by polymeric particles, in particular those composed of chitosan, generate particular interest for biomedical applications, since it is a biopolymer with a mucoadhesive, non-immunogenic, biodegradable, biocompatible and non-toxic character. Currently there is much information related to the properties and applications of chitosan in nanomedicine, however, there are few studies that address the role of chitosan derivatives in its enhancement to achieve the efficient encapsulation of such useful and different proteins, in terms of charge and molecular weight. According to this context, the objective of the present work is the preparation and characterization of thiolated chitosan nanoparticles loaded with lysozyme and albumin. The synthesis of the nanoparticles was performed by the ionotropic gelation method with different molar ratios of chitosan and an anionic crosslinker. The nanoparticles of chitosan thiolated-protein were physicochemically characterized in a Zetasizer equipment, where results of size distribution were obtained in the range of 100 to 300 nm, and zeta potential values in the range of 15 and 22 mV. The images by atomic force microscopy show nanoparticles with a semi-spherical or ovoid morphology.

Key words: nanoparticle systems, thiolated chitosan, lysozyme, albumin.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos métodos para la administración de fármacos ha sido un tema de gran interés para la comunidad científica, en donde el uso de nanopartículas ofrece numerosas ventajas relacionadas con las dimensiones que presentan. Los sistemas nanoparticulados con actividad biológica están formados por al menos dos componentes, uno de los cuales es el principio activo o molécula biológicamente activa que se quiere encapsular y, el segundo, es el propio sistema que tiene como función principal, proteger y transportar al compuesto activo y en ocasiones funcionar como agentes de diagnóstico, tratamiento para tratar una enfermedad (Irache, 2008). Como ejemplo de estas moléculas o principios activos se pueden encontrar péptidos y proteínas, los que se han convertido en fármacos de elección para el tratamiento de numerosas enfermedades por su increíble selectividad y capacidad para proporcionar una acción eficaz y potente (Su et al., 2010).

Entre los diversos métodos de administración, la vía oral es la forma más conveniente y deseada de administración de fármacos, especialmente cuando se trata de un tratamiento repetitivo o de rutina (Mukhopadhyay, 2012). Sin embargo, proteínas y péptidos terapéuticos presentan poca absorción por esta vía debido a su susceptibilidad a la degradación enzimática y su baja permeabilidad a través del epitelio intestinal (Irache, 2008). Por lo que se han propuesto varios sistemas para superar las barreras biológicas y lograr una mejor biodisponibilidad oral, tales como el uso de surfactantes, potenciadores de la permeación, inhibidores de proteasas, recubrimientos entéricos y sistemas de soporte (Su et al., 2010).

Entre estas alternativas, el uso de sistemas de administración de partículas poliméricas mucoadhesivas representan un concepto prometedor (Katas., 2013). En particular, los polímeros catiónicos como el quitosano generan interés particular para aplicaciones biomédicas ya que es un biopolímero, con carácter mucoadhesivo, no inmunogénico, biodegradable, biocompatible y no tóxico (Araújo et al., 2014; Perentena, 2015).

Se ha observado que el desarrollo de nanopartículas basadas en quitosano tiolado potencia la mucoadhesividad del polímero, aumentando el tiempo de residencia del fármaco en el sitio de absorción y el gradiente de concentración del mismo (Sreenivas & Pai, 2008). Esto es atribuido a la formación de enlaces disulfuro entre los grupos tiol de los tímeros y los grupos sulfidril de los subdominios ricos en cisteína de las glicoproteínas, lo que permite que aumente la permeación y la actividad antiproteasa (Mukhopadhyay et al., 2013).

Uno de los métodos más empleados actualmente para la síntesis de nanopartículas de quitosano se encuentra el degelificación ionotrópica ya que presenta numerosas ventajas entre ellas: no requiere la adición de disolventes orgánicos, altas temperaturas y se lleva a cabo en un medio acuoso permitiendo así la encapsulación exitosa de moléculas frágiles, como las proteínas (Rampino, et al., 2013). Esta técnica se basa en las interacciones electrostáticas entre grupos funcionales cargados negativamente, con frecuencia Tripolifosfato (TPF), y los grupos amino cargados positivamente de la molécula de quitosano (Mukhopadhyay et al., 2013).

HIPÓTESIS

Las nanopartículas de quitosano tiolado-TPF, obtenidas por el método de gelificación ionotrópica, permiten el atrapamiento de las proteínas: albúmina y lisozima.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Preparar nanopartículas de quitosano tiolado-proteínas, mediante el método de gelificación ionotrópica y caracterizar las nanopartículas obtenidas empleando diversas técnicas.

Objetivos particulares:

- Modificar la estructura química del quitosano con grupos tioles al 10%.
- Preparar nanopartículas de quitosano nativo y quitosano tiolado.
- Preparar nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con lisozima y albúmina.
- Caracterizar las nanopartículas de quitosano tiolado-proteína mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DDL).
- Caracterizar las nanopartículas de quitosano tiolado-proteína mediante la técnica de Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).
- Caracterizar las nanopartículas de quitosano tiolado-proteína mediante la técnica de Microscopía de fuerza Atómica (AFM).
- Determinar la eficiencia de encapsulamiento de las proteínas en las nanopartículas, mediante espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS).

Capítulo I. ANTECEDENTES

I.1 Polímeros

La palabra "polímero" se deriva de las raíces griegas "*poli*" y "*meros*", que significa "muchas partes"; son macromoléculas de alto peso molecular formadas por la unión de moléculas de menor tamaño que se conocen como monómeros (Cziple y Velez, 2008). Según su origen se clasifican en polímeros naturales (biopolímeros) y polímeros sintéticos.

El aumento en la preocupación medioambiental ha conllevado al desarrollo de materiales poliméricos renovables y biodegradables para reemplazar los polímeros sintéticos utilizados en muchas aplicaciones industriales (Tanase et al., 2014).

I.1.1 Biopolímeros

Los biopolímeros se forman durante los ciclos de crecimiento de todos los organismos; su producción ocurre dentro de las células por complejos procesos metabólicos (Carraher, 2013). Se pueden clasificar en tres subgrupos según su fuente: polímeros basados en recursos renovables, polímeros biodegradables basados en monómeros bioderivados y biopolímeros sintetizados por microorganismos (Valero et al., 2013)

En la actualidad existe una atención creciente en los polímeros de hidrocarburos más complejos producidos por bacterias y hongos, particularmente polisacáridos tales como xantana, quitina y ácido hialurónico (Gopal et al., 2014)

I.2 Quitina

La quitina (del griego "*tunic*", envoltura) se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, después de la celulosa es el polímero natural más abundante (Lárez, 2006). Presenta una tasa de reposición tan alta en la biósfera que se estima duplica a la de la celulosa, por lo que constituye un importante recurso renovable (Cocoletzi et al., 2009).

La unidad primaria en la quitina es 2-desoxi-2-(acetilamino) glucosa, unidas por enlaces β -(1-4)-glicosídicos, forman una cadena larga lineal (Figura 1) (Krishna et al., 2011).

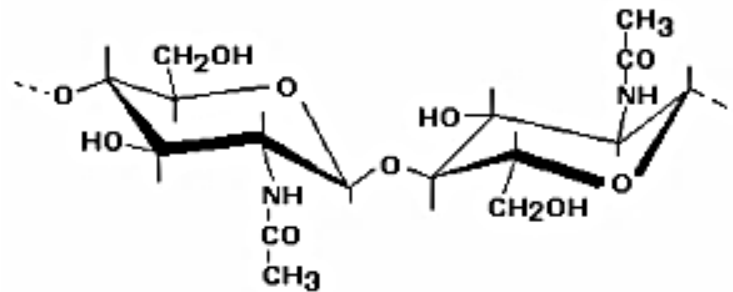


Figura 1. Estructura molecular de la quitina (Lárez, 2006).

La quitina se puede encontrar en alas de insectos, paredes celulares de hongos, algas, pero su principal fuente son los exoesqueletos de crustáceos (Figura 2) (Lárez, 2006). Particularmente, los exoesqueletos de camarón contienen una alta concentración de quitina, de la cual es posible obtener quitosano a través de un proceso químico de N-desacetilación (Jayakumar et al., 2007); este proceso generalmente ocurre por hidrólisis bajo condiciones alcalinas y elevadas temperaturas, específicamente en una fuerte solución de hidróxido de sodio (> 40%) a una temperatura entre (90-120 ° C) (Kushawaha et al., 2010). El grado de desacetilación variará de acuerdo con la duración, la temperatura y la concentración del hidróxido de sodio.



Figura 2. Principales fuentes de obtención de quitina.

I.3 Quitosano

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, es el producto parcialmente desacetilado de la quitina (Figura 3) (Lárez, 2003).

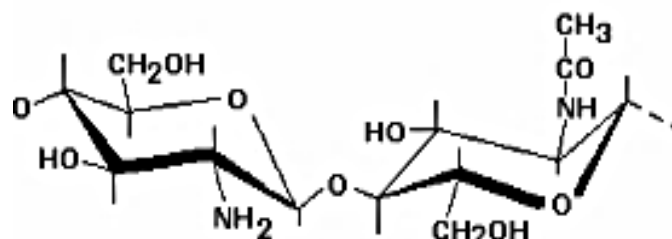


Figura 3. Estructura molecular del quitosano (Lárez, 2006).

El quitosano es un copolímero lineal formado por unidades de glucosamina y en menor medida de N-acetil D-glucosamina unidos por enlaces β -(1-4) (Rhaziet al., 2000). Su denominación química, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), es 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (D-glucosamina GlcN) y 2 acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa N-acetil glucosamina (Rodríguez et al., 2009).

I.3.1 Propiedades fisicoquímicas del quitosano

La solubilidad y la estabilidad en la solución del quitosano es dependiente del pH, siendo insoluble a pH alcalino y neutro (Jayakumar et al., 2007). El punto isoeléctrico del quitosano es de 6.3, por encima de 7, la estabilidad de la solución de quitosano es deficiente debido a que precipita; a un pH inferior a 4 forma una solución estable (Rajalakshmi et al., 2014).

Aunque el quitosano es insoluble en agua, se disuelve en soluciones acuosas de ácidos orgánicos e inorgánicos resultando en soluciones viscosas; en las que el quitosano se comporta como un poli electrolito catiónico, debido a la protonación de los grupos amino presentes en esta macromolécula (Perentena et al., 2015). Es esta propiedad que permite la solubilidad del quitosano en medio ácido, puesto que la protonación de los grupos amino a pH ácido, incrementa la repulsión entre las cadenas del polímero facilitando su solubilización (Riva, 2011).

El quitosano presenta numerosas propiedades entre las que se encuentran: excelente biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad, abundante disponibilidad, actividad antimicrobiana, actividad antifúngica, actividad hipocolesterolémica, actividad antioxidante, mucoadhesión, hemostático y promotor de absorción (Kushwaha et al., 2010) (Tanase et al., 2014). Además, debido al carácter catiónico del quitosano es capaz de interactuar con las superficies celulares y proteínas plasmáticas.

Por ejemplo, se conoce que el mecanismo que le permite al quitosano promover la absorción se basa en las interacciones electrostáticas entre el quitosano y la proteína presente en la membrana apical de los enterocitos llamada integrina (Figura 4). Estas interacciones conducen al agrupamiento de las integrinas, es en este punto en donde se fosforilan quinasas de adhesión local y tirosinas quinasas. Esto, a su vez, conduce a la disrupción de uniones estrechas por la redistribución de la proteína transmembrana CLDN4 (Russel, 2001; Sherestha, 2016).

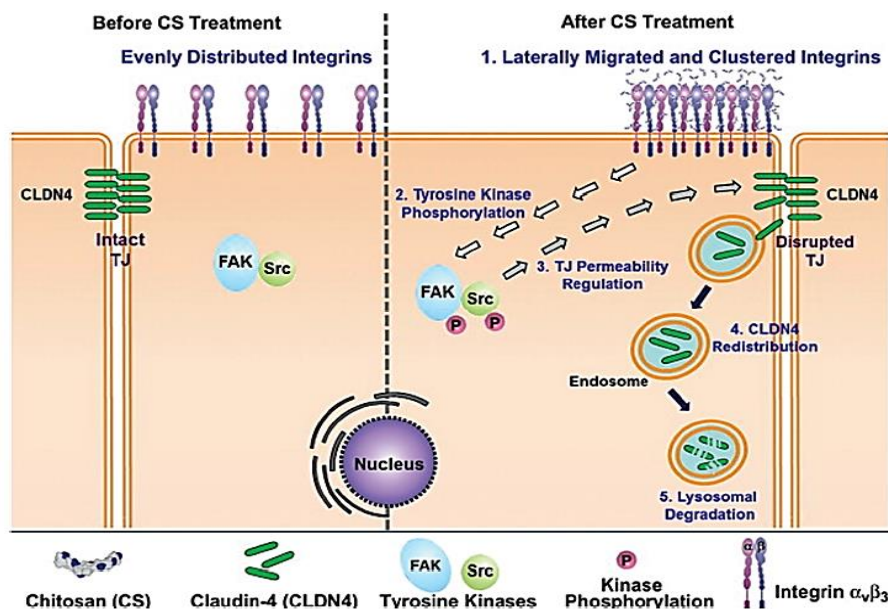


Figura 4. Representación esquemática del quitosano mediando la apertura de uniones estrechas (Sherestha, 2016).

I.3.2 Principales reacciones químicas del quitosano

Las cadenas de quitosano poseen tres atractivos sitios reactivos en los residuos N–glucosamina para su modificación: dos grupos hidroxilo (primario o secundario) en las posiciones C–3 y C–6 y un grupo amina primario en la posición C–2 (Rodríguez et al., 2009).

Las numerosas reacciones del quitosano se pueden diferenciar en reacciones específicas que implican el grupo NH₂ (amidación) y reacciones no específicas de grupos OH (especialmente esterificación y eterificación), además estos grupos pueden ser objeto de reacciones de alquilación y acilación (Perentena et al., 2015).

Producto de estas reacciones se obtienen varias modificaciones en la cadena del quitosano. Dentro de las modificaciones inespecíficas encontramos el sulfoetilquitosano, O–alquilquitosano y reacciones de injerto tales como quitosano entrecruzado, quitosano cuaternizado, quitosanos anfífilos y quitosano basado en hidrogeles (Riva, 2011).

Entre las modificaciones producto de reacciones específicas se encuentra el N–alquilquitosano, el N–carboximetilquitosano y el quitosano tiolado, por mencionar algunas (Perentena et al., 2015).

Estas modificaciones químicas han permitido modificar las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano como la hidrofobicidad, reactividad química, la capacidad bactericida, la mucoadhesividad, y la capacidad de transporte de fármacos macromoleculares a través de membranas, entre otras propiedades (Prabaharan, 2008).

I.3.3 Quitosano tiolado

Esta modificación se logra por la adición de grupos sulfhidrilo o tioles unidos covalentemente al grupo amino del quitosano. La síntesis de tiómeros catiónicos se basa principalmente en la inmovilización del grupo tiol en la posición 2 de las subunidades de glucosaminas de la molécula de quitosano (Bernkop, 2005). Esta unión es de tipo covalente mediante la formación de un enlace amida, específicamente entre el grupo carboxílico del ácido empleado como agente de tiolación y el grupo amino primario del quitosano (Figura 5).

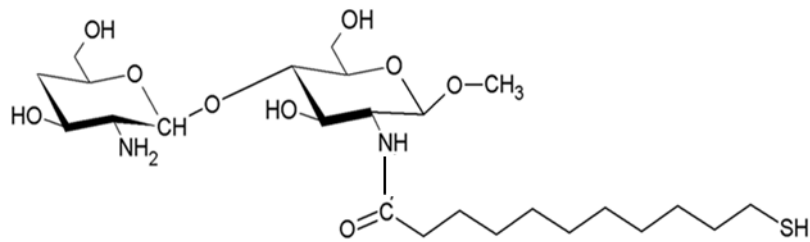


Figura 5. Estructura molecular del quitosano tiolado con ácido mercaptoundecanoico.

Las fuertes propiedades mucoadhesivas de los tiómeros se basan en el enlace covalente adicional entre el grupo tiol del polímero y los residuos ricos en cisteína de las glicoproteínas presentes en las mucosas. Esta teoría es confirmada por los hallazgos de estudios de mucoadhesión, donde se observó que una mayor cantidad de grupos tiol en el polímero aumenta las propiedades mucoadhesivas (Bernkop et al., 2010).

También se ha demostrado que los tiómeros tienen un efecto potenciador de la permeación, basado en la formación del enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de los tiómeros y la presencia de glutatión en su forma reducida en la mucosa apical del intestino. El glutatión reducido inhibe la enzima tirosina fosfatasa, que posteriormente conduce a la fosforilación de las subunidades de tirosina de las uniones estrechas. Esta fosforilación conduce a la apertura de las uniones estrechas (Russel, 2001). Se ha informado que el quitosano tiolado inhibe la actividad ATPasa de las glucoproteínas en el intestino.

I.3.4 Aplicaciones del quitosano

El quitosano presenta un potencial e interesante valor económico debido a su bajo costo de producción. Además, las propiedades fisicoquímicas, actividad biológica y reactividad química que presenta el quitosano pueden ser explotadas en diferentes áreas de la ciencia y tecnología como en la industria de alimentos, la medicina, la agricultura, la cosmética, y la farmacia, entre otras (Cocoletzi et al., 2009).

En la industria alimenticia, el quitosano se emplea para la conservación de alimentos, en la purificación de aguas residuales y la creación de suplementos dietéticos (Tanase et al., 2014). En el área de la agricultura se emplea en la preparación de alimentos para animales, como agente floculante y estabilizante

de emulsiones. Puede ser utilizado como matriz para liberar materiales bioactivos o influenciar directamente el crecimiento celular (Cziple y Velez, 2008). El quitosano también forma parte de una amplia gama de aplicaciones médicas entre ellas; fabricación de vendajes para control de hemorragias, lentes de contacto, piel artificial, suplementos dietéticos, vector no viral en terapia genética (Perentena et al., 2015). También se emplea en la preparación de aditivos bactericidas en jabones, champús, cremas de afeitar, cremas para la piel, pasta dental, y en la creación de biosensores (Lárez, 2006). Otras aplicaciones en el campo biomédico incluyen fibras para bloqueador de grasa, suturas digestibles, estabilización de liposomas, antitumorales, y agente hipocolesterolémico (Kushwaha et al., 2010).

I.4 Nanomedicina

El término Nanomedicina se refiere al conjunto de técnicas empleadas en el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades, utilizando materiales estructurados a nanoescala ($1\text{nm}=1\times 10^{-9}\text{m}$), biotecnología e ingeniería genética, y finalmente máquinas complejas como nanorobots, permitiendo así preservar y mejorar la salud humana (Irache, 2008). Las nanopartículas son sistemas coloidales sólidos, bien definidos, con un tamaño aproximado de 1 a 1,000 nm (usualmente 200-300 nm), que pueden constar de una estructura núcleo-capa (nanocápsulas) o una estructura de matriz continua (nanoesferas) (Yao et al., 2013)

I.5 Nanopartículas como sistemas de administración de fármacos

La búsqueda de nuevos métodos para la administración de fármacos ha sido un tema de gran interés para la comunidad científica, en donde el uso de nanopartículas ofrece numerosas ventajas debido a las dimensiones que presentan y a su relación volumen-superficie. Algunas de estas ventajas son:

- Capacidad de atravesar tejidos y ser absorbidos por células
- Liberación controlada y dirigida de fármacos para diversas áreas del cuerpo
- Aumentar el tiempo de residencia del fármaco en el torrente sanguíneo
- Aumentar la biodisponibilidad a través de proveer una mayor cantidad de fármaco en el lugar de absorción

- Protegerlos fármacos contra la degradación hidrolítica y enzimática en el tracto gastrointestinal (Alcalá y Quintanar, 2014).

Los sistemas nanoparticulados están formados por al menos dos componentes, uno de los cuales es el principio activo o molécula biológicamente activa y, el segundo, es el propio sistema que permite una función especial relacionada con el diagnóstico, tratamiento, o prevención de una enfermedad (Irache, 2008).

Como ejemplo de estos fármacos se pueden encontrar péptidos, proteínas, oligonucleótidos, entre otros. Estas moléculas activas son muy sensibles a la degradación fisicoquímica y enzimática, se muestran incapaces de atravesar barreras biológicas (mucosas) y, menos aún de alcanzar compartimentos celulares muy precisos para poder ejercer su acción. Por ello, su inclusión en nanopartículas permite solventar parte o la totalidad de estos problemas ofreciendo posibilidades interesantes para su administración de forma segura y eficaz (Katas et al., 2013).

I.6 Lisozima

La lisozima es una enzima bacteriolítica comúnmente encontrada en la naturaleza. La lisozima se encuentra en muchos organismos como, insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, produciéndose en múltiples tejidos y fluidos, incluyendo huevos de aves, leche humana, lágrimas y la saliva (Wuet al., 2017). Se clasifica en seis tipos: lisozima de gallina (tipo-C) entre ellas se encuentran lisozima de estómago y lisozima de unión a calcio, lisozima de ganso (tipo-G), lisozima de plantas, lisozima bacteriana, lisozima del fago T4 y lisozima de invertebrados (tipo-I). De todas las lisozimas existentes, la lisozima de huevo de gallina ha sido la más estudiada, por encontrarse en alta concentración (1-3 g/L de clara de huevo), su fácil manejo y la posibilidad de purificación por cristalización en NaCl al 5% a pH 9,5. La lisozima de huevo es una proteína que puede representar cerca del 3,4% de las proteínas de la clara de huevo, su masa molecular es 14.307 kDa, tiene forma elíptica (Figura 6) y está compuesta por una secuencia de 129 residuos de aminoácidos. Es una proteína catiónica, con un elevado punto isoeléctrico (pI= 10,7), con 19

aminoácidos en su secuencia cargados positivamente (Carrillo, 2013). Una molécula de lisozima posee cuatro enlaces disulfuro y seis regiones de hélice que le confieren a la lisozima una elevada estabilidad térmica, además es una proteína estable en soluciones ácidas (Wu et al., 2017)

La característica más llamativa de la molécula de la lisozima es una hendidura prominente, el sitio de fijación del sustrato, que atraviesa una cara de la molécula.

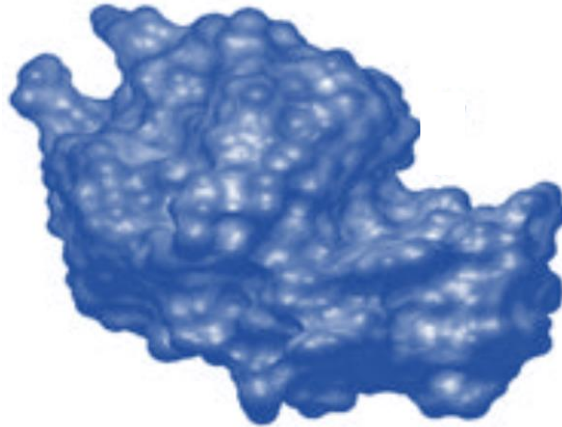


Figura 6. Estructura tridimensional de la lisozima de huevo (Alberts, 2011).

El sitio catalítico de la lisozima se encuentra dividido en seis zonas: A, B, C, D, E y F que a su vez se unen a seis azúcares (Figura 7). En el sitio catalítico se encuentran dos aminoácidos que son necesarios para que ocurra la catálisis que son (Glu 35 y Asp 52), estos residuos son invariables en la familia de la lisozima (Alberts, 2011).

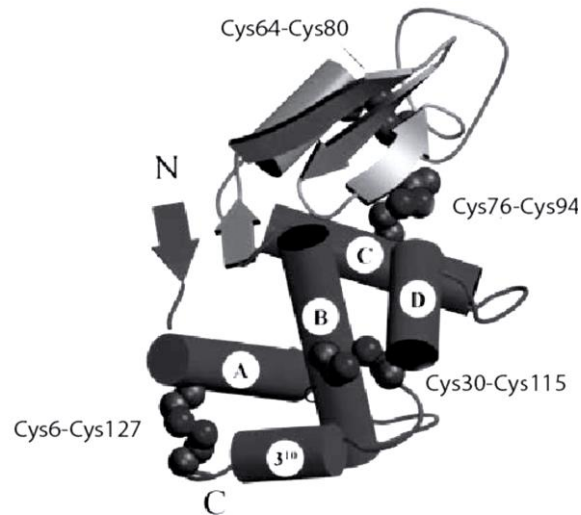


Figura 7. Estructura secundaria de la lisozima de huevo en donde se observan sus sitios catalíticos (Carrillo, 2013).

Esta enzima puede dañar la pared celular de ciertas bacterias Grampositivas catalizando la hidrólisis del enlace β 1,4- -glucosídico entre N-acetilmurámico y N-acetil-d-glucosamina debilitando así la pared celular; sin embargo, es casi inactiva frente a microorganismos Gramnegativos por la dificultad de acceder al peptidoglicano que se encuentra protegido por la membrana externa. Esta propiedad de hidrolizar a los peptidoglicanos se conoce como actividad neuraminidasa o muramidasa (Zhang et al., 2015).

I.6.1 Aplicaciones

La lisozima administrada por vía oral y cutánea previene enfermedades de la piel, como herpes simple y varicela, debido a su actividad antiinflamatoria. Se han descrito otras actividades a la lisozima como actividad antioxidante, actividad antiheparínica, actividad antifúngica y potenciación del efecto de antibióticos. Las propiedades bacteriostáticas y bactericidas de la lisozima se han usado tanto para preservar varios tipos de alimentos, así como en farmacia, medicina humana y veterinaria (Cegielska et al., 2008; Wu et al., 2017). Sin embargo, la aplicación práctica de la lisozima libre es bastante limitada debido a que esta molécula es inestable y se inactiva fácilmente (Zhang et al., 2015).

I.7 Albúmina

La albúmina es la principal proteína plasmática (representa más del 50% del contenido total de proteínas presentes en el plasma). Se sintetiza principalmente en el hígado a una velocidad de ~ 120 mg / kg peso corporal / 24 h. Su principal función es el transporte de numerosas proteínas endógenas y sustancias exógenas, pero además presenta funciones antioxidantes, puede influir en la integridad microvascular y es responsable del mantenimiento de la presión osmótica coloidal de la sangre del y del pH sanguíneo (Quinlan et al., 2004).

Esta proteína presenta algunas variaciones en diferentes organismos, dando lugar a varios tipos de albúminas, como, por ejemplo: albúmina de suero humano (ASH) (Figura 8), albúmina sérica bovina (ASB), albúmina sérica equina (ASE) y albúmina sérica de rata (ASR).

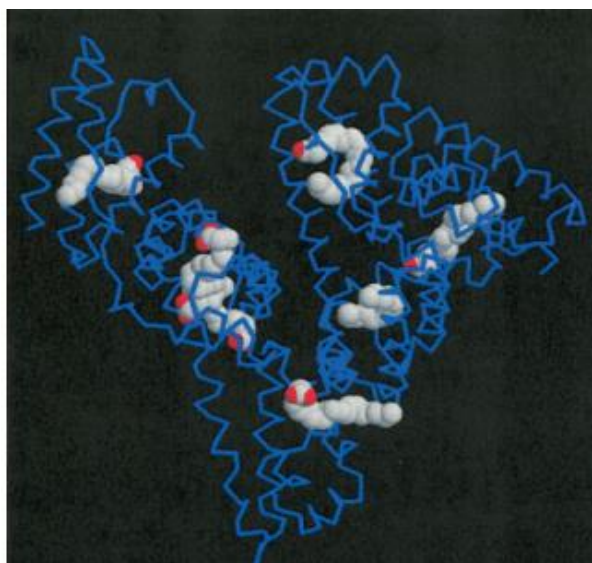


Figura 8. Estructura terciaria de la albúmina, mostrando la unión de siete ácidos araquidónicos (Quinlan et al., 2004).

Estructuralmente, la ASB consta de una sola cadena de 582 aminoácidos, se encuentra no glicosilada, cargada negativamente, reticulada con 17 residuos de cisteína, con un peso molecular de aproximadamente 66kDa y un punto isoeléctrico ($pI=4.6$) (Shih et al., 2016). Se observa como una proteína globular, cordiforme, organizada en tres dominios estructurales similares, cada uno

subdividido en dos subdominios. Los dominios son predominantemente α -helicoidales (70%) e incluyen bucles y un gran número (17) de enlaces disulfuro. La secuencia de la albúmina de suero bovino (ASB) es del 76% a la de la ASH, la principal diferencia es la presencia de un segundo residuo de triptófano en posición 131 en la proteína bovina. Estos residuos de Trp hacen que ASB tenga fluorescencia intrínseca (Kadi et al., 2006). La albúmina contiene 1 derivado de cisteína libre, grupo tiol (-SH) (Cys-34). El resto tiol de Cys-34 es reactivo y capaz de establecer interacciones covalentes (tiolaciones) a través de formación de puentes disulfuro (Shihet al., 2016).

La característica más destacada de las interacciones albúmina-ligando es la presencia de unos pocos sitios de unión de alta afinidad y un gran número de sitios de unión de baja afinidad que interactúan con varios tipos de ligandos cargados negativamente tales como ácidos grasos, metales, etc (Quinlan et al., 2004). Todas estas características estructurales hacen de ASB uno de los mejores modelos para comprender la base fisicoquímica de las interacciones polímero-proteína.

I.7.1 Aplicaciones

La ASB se usa comúnmente como una proteína modelo debido a su importancia medicinal, bajo costo, disponibilidad, estabilidad, solubilidad en agua, propiedades inusuales de unión a ligandos y similitud estructural con albúmina de suero humano.

I.8 Métodos para sintetizar nanopartículas de quitosano

Las nanopartículas a base de quitosano se forman como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento de acuerdo a una aproximación de tipo 'bottom-up', en donde las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente (Goycoolea et al., 2009).

Se han desarrollado diversos procesos de síntesis, que incluyen autoensamblado, coacervación, reticulación química y la reticulación iónica (Figura 9). Esta última es muy atractiva, con respecto al método de reticulación química, puesto que no se necesita ningún disolvente orgánico, ni agente

reticulante tóxico como el glutaraldehído para estabilizar las nanopartículas de quitosano.

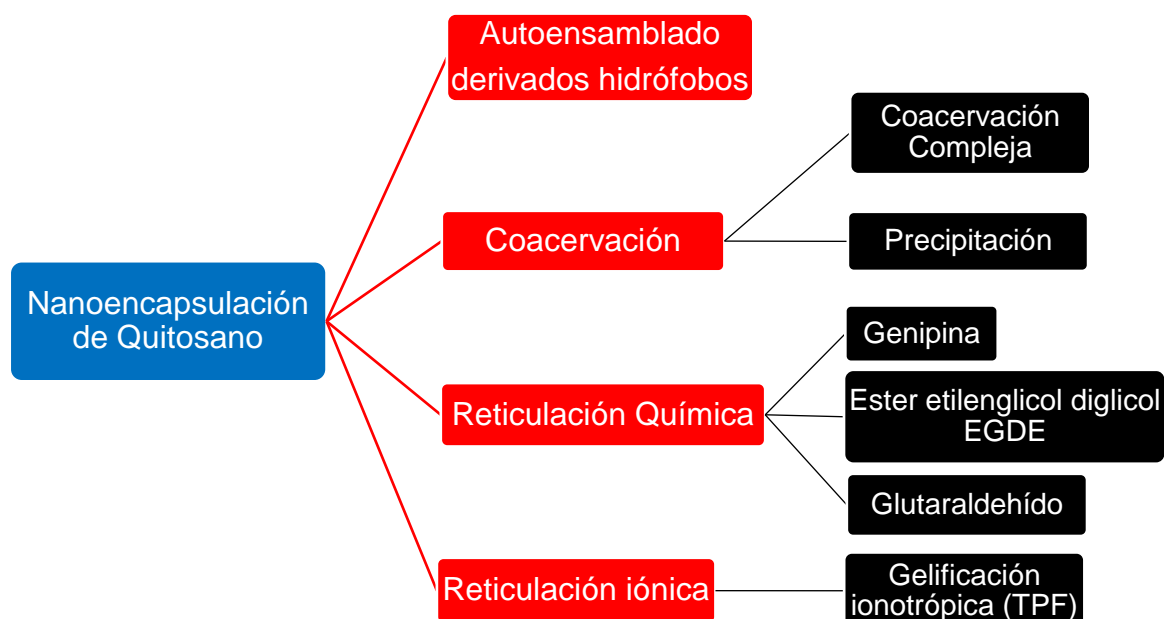


Figura 9. Métodos empleados para la síntesis de nanopartículas de quitosano.

A pesar de la variedad de agentes químicos disponibles y métodos documentados para obtener nanopartículas a base de quitosano, debido al estricto marco regulatorio que deben cumplir los excipientes para la liberación de fármacos sólo unos cuantos de los anteriormente mencionados ofrecen potencial real para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas (Goycoolea et al., 2009).

Dentro de los que mayor atención han recibido, destacan aquellos basados fundamentalmente en el principio de la gelificación ionotrópica del quitosano utilizando tripolifosfato sódico (TPF) (Calvo et al., 1997).

I.8.1 Gelificación Ionotrópica

La gelificación ionotrópica se reportó por primera vez en 1997 por Calvo y colaboradores y es una de las técnicas más utilizadas para la preparación de nanopartículas a partir de derivados de quitosano. Este método presenta numerosas ventajas entre ellas: el proceso es relativamente simple y no requiere la adición de disolventes orgánicos o procesos drásticos como la sonicación, evita el uso de altas temperaturas, además se lleva a cabo en un

medio acuoso permitiendo así la encapsulación exitosa de moléculas frágiles, como las proteínas (Rampino et al., 2013). Esta técnica se basa en interacciones electrostáticas entre grupos funcionales cargados negativamente, con frecuencia TPF (específicamente productos de la disociación del TPF en solución acuosa tales como $P_3O_{10}^{-5}$ y $HP_3O_{10}^{-4}$), y los numerosos grupos amino cargados positivamente (NH_3^+) de la molécula de quitosano (Mukhopadhyay et al., 2013), para esto el biopolímero se disuelve previamente en una solución acuosa de ácido acético para obtener el catión de quitosano.

Existen dos tipos de reticulación (covalente e iónica) en cuanto al tipo de enlace, la reticulación covalente conduce a la formación de hidrogeles con una estructura de red permanente, ya que se forman enlaces químicos irreversibles. Los hidrogeles reticulados de forma iónica se basan en las interacciones iónicas, por lo que la estructura de la red es no permanente, formados por interacciones reversibles, generalmente se consideran biocompatibles y bien tolerados (Rodríguez et al., 2010). Los hidrogeles de quitosano reticulados de forma iónica exhiben una mayor sensibilidad de hinchamiento a los cambios de pH en comparación con los hidrogeles de quitosano reticulados covalentemente. Esto extiende su aplicación potencial, ya que la disolución puede ocurrir en condiciones de pH ácido extremo o básico (Berger et al., 2004).

Este sistema ha mostrado alta capacidad de carga de péptidos y proteínas hidrofílicas tales como insulina y albúmina. En donde la capacidad de carga se ve principalmente afectada por la solubilidad y el punto isoeléctrico de la proteína, la carga teórica de ésta y el pH (Vila et al., 2004; Xu y Du, 2003).

Por otro lado, la eficiencia del método de gelificación ionotrópica es dependiente de la masa molecular y grado de desacetilación del quitosano. Cuanto mayor es el peso molecular del quitosano, existe mayor número de grupos amino protonados en una solución ácida de quitosano. De este modo, hay un mayor número de cargas positivas que pueden interaccionar con las cargas negativas del TPF, lo que se traduce en un mayor grado de entrecruzamiento. Además, cuanto mayor es el grado de desacetilación del quitosano, se presentarán mayor cantidad de grupos amino para protonarse, por lo que será mayor la interacción iónica con el TPF, obteniendo una mejor

eficiencia de gelificación y un mayor grado de entrecruzamiento (Rodríguez et al., 2010).

El tamaño de partícula del sistema quitosano/TPF es muy sensible al pH y a la fuerza iónica, a las características intrínsecas del quitosano relacionadas con su composición, peso molecular y grado de acetilación, entre otras condiciones preparativas (Goycoolea et al., 2009).

Capítulo II. MATERIALES Y MÉTODOS:

II.1 Reactivos y solventes

- Quitosano de bajo peso molecular promedio (120.000 g/mol) con grado de desacetilación (75-85%) de Sigma-Aldrich.
- Ácido 3-mercaptopundecanoico
- Clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil) N'-etilcarbodiimida EDAC ($C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$)
- N-hidroxisuccinimida NHS ($C_4H_5NO_3$)
- Hidróxido de sodio (NaOH) 98% 0.5 M
- Ácido clorhídrico (HCl) 0.5M
- Ácido acético (CH_3CO_2H) 98%
- Ácido acético (CH_3COOH) 99.7%
- Ácido fosfórico 85%
- Etanol 99.5%
- Tripolifosfato de pentasodio TPF ($Na_5P_3O_{10}$)
- Azul de Coomassie G-250 de Laboratorios Bio-Rad
- Albúmina de suero bovino
- Lisozima
- Agua desionizada

II.2 Determinación de grupos ionizables del quitosano

Para el cálculo de los grupos ionizables del quitosano se realizó una titulación potenciométrica de una solución de quitosano nativo según la metodología descrita por Farris et al., (2012). La curva de titulación se construyó graficando los valores de pH observados contra el volumen de la solución titulante empleada (HCl), para medir el porcentaje de desacetilación del reactivo. Con el

valor obtenido de desacetilación, se realizaron los cálculos necesarios para modificar en un 10% el quitosano mediante la adición de grupos tioles derivados del ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA).

II.3 Modificación química del quitosano al 10%

La modificación del quitosano con grupos tioles se realizó según la metodología referida por Lu y col en 2007 empleando como fuente de tiolación el ácido 11-mercaptoundecanoico.

Este proceso se divide en dos etapas: Primeramente, se disolvieron los reactivos hidrocloreuro de N-(e-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida (EDAC), ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) y N-hidroxisuccinimida (NHS) en 5 mL de dimetilformaamida (DMF) cada uno. Luego se hizo reaccionar MUA-DMF con EDAC-DMF y se dejó en agitación constante por 2 horas, posteriormente se agregó NHS-DMF y se dejó reaccionar toda la noche en agitación constante. En la segunda etapa se preparó una solución de quitosano al 1% (p/v). A esta solución se le agregaron los otros reactivos, se ajustó el pH a 5.0 con NaOH 0.2 M y se dejó en agitación constante durante 24 horas. Por último, se sometió a un proceso de diálisis y liofilización por tres días la solución obtenida.

II.4 Síntesis de nanopartículas de quitosano

Se sintetizaron nanopartículas de quitosano nativo y quitosano tiolado por la técnica de gelificación ionotrópica según la metodología descrita por Calvo et al., (1997) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de quitosano de 0,5 mg/ml disolviendo quitosano de bajo peso molecular en una solución de ácido acético 0.05 M y se agitó por 3-4 horas a temperatura ambiente a 400 rpm. Esta concentración fue seleccionada según lo reportado por Fana et al., 2012, en donde a concentraciones mayores e iguales a 1 mg/mL se obtenían micropartículas; ya que la naturaleza altamente viscosa del medio dificulta la gelificación entre el quitosano y el TPF (Su et al., 2010). Se preparó una solución de TPF disuelto en agua desionizada a una concentración de 0,5 mg/ml, y posteriormente se adicionó gota a gota a la solución de quitosano. El pH de la solución de quitosano se ajustó en 5,53 con una solución de hidróxido sódico 0,5 M.

Una vez que se ajustó el pH de la solución de quitosano, se preparó un baño de agua a 60° y se dejó la solución en agitación por 10 minutos, inmediatamente se cambió a un baño de agua a 4°C, en donde se agrega gota a gota la solución de TPF en diferentes relaciones (2, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8 y 3), la reacción se llevó a cabo durante 10 minutos, bajo agitación magnética a 400 rpm. Las nanopartículas obtenidas se precipitaron a 13,000 rpm durante 30 minutos y se resuspendieron con 5 ml de agua desionizada, posteriormente se sometieron a sonicación para una completa resuspensión. Se usó el mismo procedimiento para la síntesis de nanopartículas de quitosano tiolado.

II.5 Síntesis de nanopartículas de quitosano tiolado-proteínas

El proceso para la preparación de nanopartículas cargadas con albúmina de suero bovino (ASB) y lisozima (LYZ) presentó algunas variaciones con respecto al descrito anteriormente para las nanopartículas de quitosano tiolado sin proteínas. En el caso de la LYZ se añadió directamente a la solución de quitosano en las relaciones QSH/LYZ (1:1, 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1) y se agitó a la temperatura de 37°C, mientras que la ASB se añadió a la solución de TPF en las relaciones QSH/ASB(1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 y 6:1) respectivamente y posteriormente se ajustó el pH a 7. La solución se dejó bajo agitación magnética constante durante 10 minutos, a 400 rpm para permitir una gelificación homogénea.

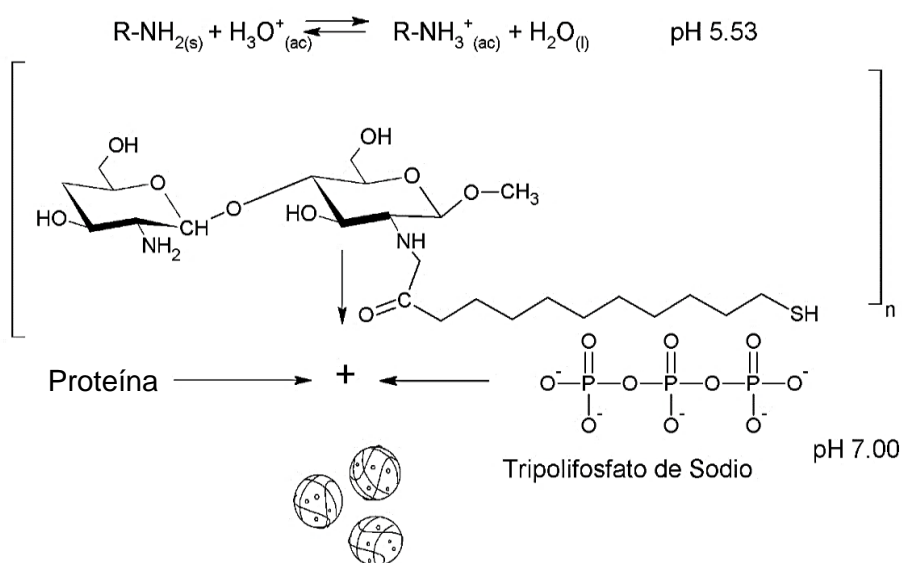


Figura 10. Mecanismo de síntesis de nanopartículas cargadas con proteína, por el método de gelificación ionotrópica.

II.6 Caracterización físicoquímica

La caracterización físico-química de las nanopartículas consistirá en el análisis de varios parámetros tales como:

II.6.1 Determinación del tamaño de partícula y potencial zeta

El tamaño de NP y el potencial ζ se determinaron mediante Dispersión Dinámica de Luz (DDL), usando un Malvern Zetasizer Nano ZS. Las muestras diluidas se colocaron en una celda especial DTS 1070 y se midió la intensidad de dispersión a 25°C, con un láser rojo de $\lambda=633$ nm (He-Ne, 4 Mw). Las mediciones se realizaron por triplicado y con un tiempo de muestreo de 60 s cada uno y posteriormente se calculó un promedio. Los valores obtenidos se muestran como una media \pm desviación estándar de tres mediciones independientes.

II.6.2 Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier: FT-IR

Las muestras se secaron previamente mediante un liofilizador para su posterior análisis. Los espectros FT-IR fueron obtenidos por un espectrómetro Spectrum Two de Perkin-Elmer, con accesorio universal de reflectancia totalmente atenuada (ATR, por sus siglas en inglés), en el intervalo de 4000 – 500 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y un promedio de 32 escaneos. Las muestras se depositaron en la punta de un cristal de diamante y se aseguraron con una pinza de alta presión.

II.6.3 Microscopía de Fuerza Atómica: AFM

El tamaño y morfología de las nanopartículas se observó mediante un microscopio de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) en un equipo modelo JSPM-4210. Se colocaron 20 μL de muestra sobre una mica y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas. Las imágenes se obtuvieron por

modo de no contacto, con un cantiléver NSC15 y se analizaron con el software WSxM 5.0.

II.6.4 Eficiencia de Encapsulamiento

La eficiencia de encapsulamiento (EE por sus siglas en inglés) de las proteínas en las nanopartículas de quitosano tiolado, se determinó mediante el análisis del sobrenadante obtenido después de la centrifugación a 13,000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se analizó para determinar la cantidad de proteína, mediante el espectrofotómetro UV-Vis (Lambda 25, de Perkin Elmer, EU) a 595 nm usando sobrenadante de nanopartículas no cargadas como corrección básica. Las mediciones se realizaron por triplicado para calcular un promedio. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad total de proteína} - \text{Proteína libre en el sobrenadante}}{\text{Cantidad total de proteína}} \times 100$$

La cantidad de proteína encapsulada en las nanopartículas se calculó a partir de la diferencia entre la cantidad de proteína en el sobrenadante y la cantidad inicial de proteína utilizada para la preparación de las nanopartículas QSH-TPF-proteína.

Capítulo III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Cálculo del número de grupos ionizables del quitosano

La titulación conductométrica se mide en cada adición de una solución con concentración conocida (el valorante) a una segunda solución con una concentración desconocida (el analito), mediante el registro de los cambios de conductancia, con el objetivo de determinar la concentración del último (Farris et al., 2012)

A partir de esta gráfica (Figura 11) se pudo obtener el número de moles de HCl necesarios para protonar 0.1g de quitosano, y posteriormente a partir del número de moléculas de HCl obtenidas se comprobó que el quitosano tenía un grado de desacetilación del 79.22%. Este es un procedimiento de rutina, ya que la empresa responsable de distribuir el quitosano certifica el grado de acetilación en un rango aproximado (75-85 %).

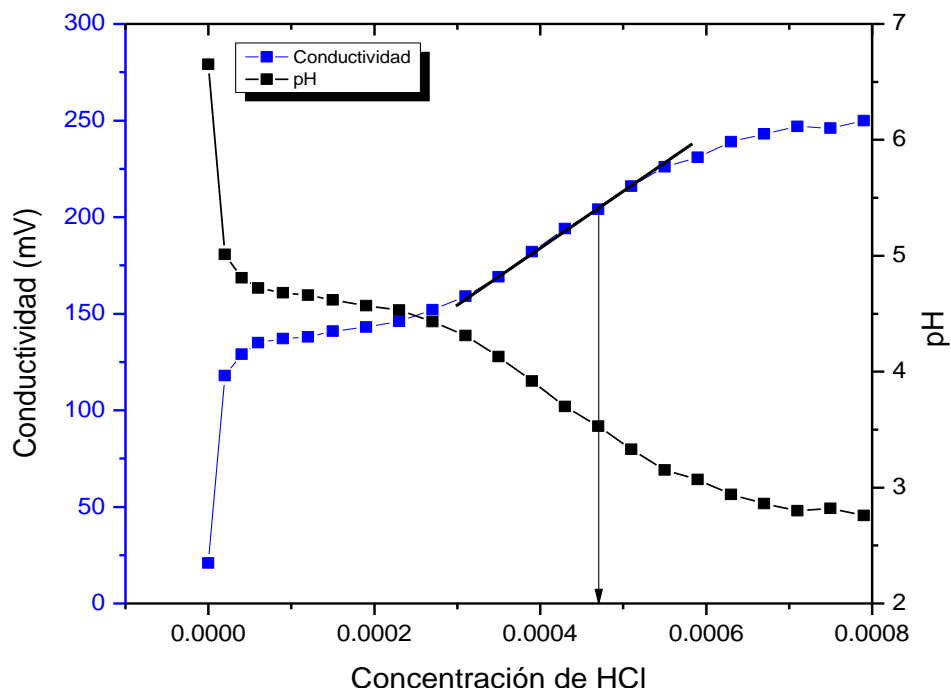


Figura 11. Curva potenciométrica para la determinación del número de grupos ionizables del quitosano.

III.2 Modificación del quitosano con grupos tioles al 10%

Los espectros comparativos de FT-IR de quitosano nativo y quitosano tiolado, ambos de bajo peso molecular se muestran en la Figura 12. Los resultados del análisis indican la modificación con éxito del quitosano nativo selectivamente en los grupos amina, mediante la reacción entre los grupos amina primarios de quitosano y los grupos carboxílicos del ácido mercaptoundecanoico (UMA) dando como resultado un grupo amida. Esto queda demostrado por la presencia de varios picos: el pico a 1530 cm^{-1} correspondiente a la señal de la amida secundaria (N-H), el pico en 1622 cm^{-1} (C=O estiramiento del grupo amida), el pico de 1250 cm^{-1} (enlace SH-C) (Esquivel et al., 2015). Al igual que en los resultados ya publicados por Zhu et al., 2012, se observa un pico pequeño a 2920 cm^{-1} (estiramiento-CH₂), este pico es más conspicuo en el quitosano tiolado confirmando la unión covalente de la cadena hidrocarbonada del ácido mercaptoundecanoico.

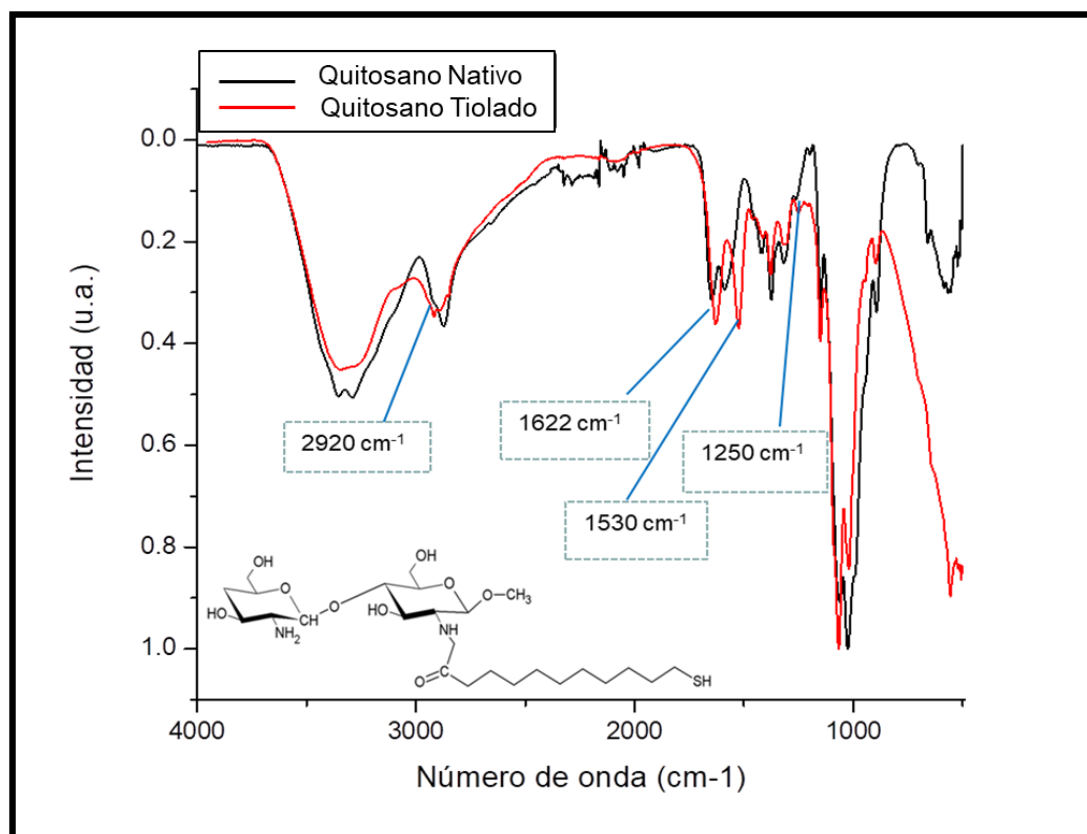


Figura 12. Espectros de FT-IR de quitosano nativo y quitosano tiolado.

III.3 Nanopartículas de quitosano nativo y quitosano tiolado.

Se usó la apariencia de opalescencia como un indicador de formación de nanopartículas, lo que fue confirmado más tarde mediante dispersión dinámica de luz. En la Tabla 1 se resumen los datos correspondientes con el diámetro hidrodinámico y el potencial ζ de las nanopartículas a las diferentes relaciones Q/TPF y QSH/TPF realizadas.

Los resultados indicaron que el tamaño de partícula aumentó a concentraciones extremas de TPF encontrando que la formación de nanopartículas solo fue posible para algunas relaciones.

Como se puede apreciar en ambos casos cuando la relación es máxima quitosano/TPF (relación 3) se obtienen grandes tamaños de nanopartículas puesto que disminuye la concentración del TPF reduciéndose de esta forma la interacción con los grupos aminos protonados de la molécula de quitosano, lo que provoca que las cadenas del polímero estén en una conformación extendida producto de la repulsión que experimentan los grupos aminos libres del quitosano, contribuyendo al aumento de tamaño (Berger et al., 2004).

A medida que aumenta la concentración de TPF (2.8-2.4) se observa una disminución en el tamaño de la partícula ya que está aumentando la densidad de entrecruzamiento por lo que se están potenciando las interacciones iónicas con las cadenas de quitosano. Estas relaciones resultan ser más estables puesto que presentan una menor sensibilidad al pH (Rodríguez et al., 2010). De igual forma a relaciones menores de Q/TPF y QSH/TPF se produce un aumento de tamaño ya que hay un exceso de TPF en la solución provocando la agregación de las partículas formadas previamente (Rampino et al., 2013).

Tabla 1. Efecto de la relación Q/TPF y QSH/TPF sobre el tamaño, el potencial ζ y el índice de polidispersidad de las nanopartículas

	Muestras	Tamaño (d.nm)	Potencial ζ	Pdl
Nanopartículas de Quitosano Nativo	3	239±31.6	28.3 ± 3.7	0.21±0.08
	2.8	227±41.2	29 ± 2.8	0.36±0.64
	2.6	193±9.3	29± 2.9	0.27±0.07
	2.4	173±10.4	27.7± 3.6	0.2±0.05
	2.2	185±18.4	26.1± 3.2	0.18±0.02
	2	230±33	24.6±0.6	0.23±0.01
	Nanopartículas de Quitosano Tiolado	Muestras	Tamaño (d.nm)	Potencial ζ
3		240±0,34	19.6 ± 1.4	0.34±0.06
2.8		226±0.32	19.6 ± 2.1	0.32±0.09
2.6		216±0.25	22.8 ± 2.9	0.25±0.06
2.4		186±0.22	19.7 ± 2.8	0.22±0.05
2.2		353±0.35	17.3 ± 0.8	0.35±0.15
2		377±0.3	13 ± 5.4	0.31±0.1

Con respecto al potencial zeta se puede apreciar en todos los casos una carga superficial positiva. Se observaron los valores más bajos de potencial zeta para la relación Q/TPF de 2, debido al mayor número de moléculas de TPF en la solución provocando la neutralización o apantallamiento de la carga de los grupos aminos protonados del quitosano, siendo los que contribuyen con la carga positiva del sistema (Su et al., 2010). Al igual que en nuestro estudio Janes y Alonso en el 2003, reportaron que a bajas concentraciones de TPF se produce un aumento dramático en el tamaño de partícula y el aumento del potencial zeta, ya que al haber menos TPF, los aniones disponibles son menos capaces de neutralizar la carga positiva del quitosano y condensan las partículas de polímero en el interior de la partícula. Sin embargo, a elevadas concentraciones de TPF se produce la disminución de la carga superficial de la partícula, producto del exceso de aniones en solución.

Para las nanopartículas preparadas con el quitosano tiolado, se observó una disminución de aproximadamente 10 mV en el valor del potencial zeta, con

respecto a las de quitosano nativo, lo cual se debe a que en el proceso de tiolación se están comprometiendo un 10% de los grupos aminos del quitosano. Se conoce que el quitosano tiolado es vulnerable a la oxidación siendo una de sus principales limitaciones en su uso como polímero mucoadhesivo. Es generalmente estable en estado seco, sin embargo, en soluciones experimenta una oxidación rápida, particularmente a $\text{pH} > 5$. En nuestro estudio se prestó especial atención a esta información, sin embargo, pudimos constatar que la solución de quitosano fue estable, ya que la disminución en el valor del potencial zeta no fue significativa.

En todos los casos, las dispersiones de nanopartículas exhiben una distribución de tamaño de partícula unimodal, como también se confirma por los bajos índices de polidispersidad obtenidos ($\text{PDI} < 0.4$), un comportamiento típico de sistemas monodispersos, sugiriendo la formación de dispersiones NP homogéneas (Figura 13). Sin embargo, las nanopartículas preparadas con quitosano tiolado usando una relación QSH/TPF de 2.6 muestran una distribución polidispersa.

Los resultados de estas formulaciones para la obtención de nanopartículas de quitosano indican que en la relación Q/TPF de 2.4 se obtuvo un tamaño adecuado de nanopartícula tanto para el quitosano nativo como para el quitosano tiolado, con un diámetro hidrodinámico de 173 nm y 186 nm, respectivamente; este tamaño de partícula es idóneo para evitar la captación del sistema retículo endotelial y obtener una absorción intracelular efectiva. Además, un tamaño de partícula menor a 200 nm puede conducir a una vía de endocitosis no energética, por este motivo la modulación de nanopartículas de quitosano tiolado es un factor ventajoso para diseñar nanoestructuras con aplicaciones específicas (Rejman et al., 2004).

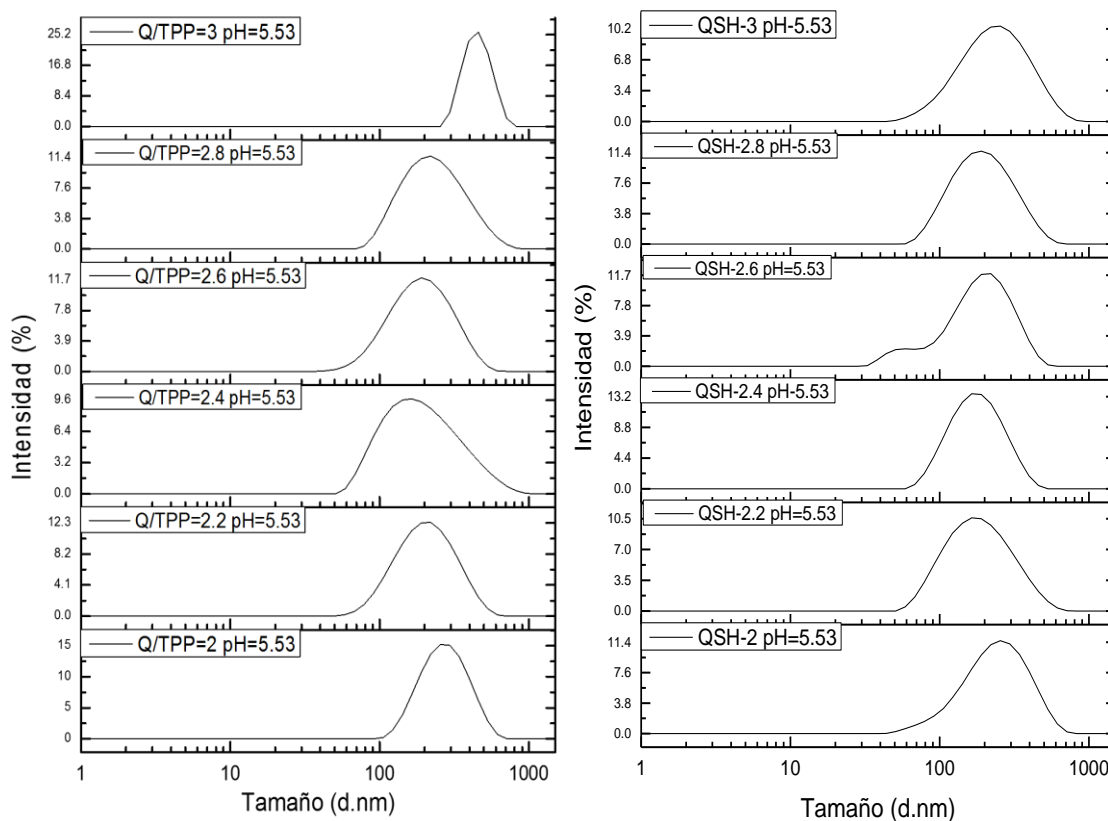


Figura 13. Distribución de tamaño de las nanopartículas de quitosano nativo (izquierda) y quitosano tiolado (derecha).

Con respecto a la morfología en las imágenes obtenidas en AFM se observó una geometría semiesférica en las nanopartículas de quitosano nativo (Figura 14), este comportamiento fue observado por otros autores ya que el quitosano nativo presenta una mayor cantidad de cargas positivas lo que favorece el proceso de reticulación, obteniéndose un tamaño de partícula más pequeño y uniforme. En las nanopartículas de quitosano tiolado se obtuvo una geometría ovoide, provocada por la cadena alquilo del ácido mercaptoundecanoico. Se evidenció la formación de agregados (Figura 15), también reportado por otros autores (Esquivel et al., 2015) que sintetizaron nanopartículas de quitosano a un pH cercano a 5, ya que el punto isoeléctrico del quitosano es cercano a este valor (6.3) por lo que se ven disminuidas las fuerzas de repulsión electrostáticas entre los grupos aminos cargados.

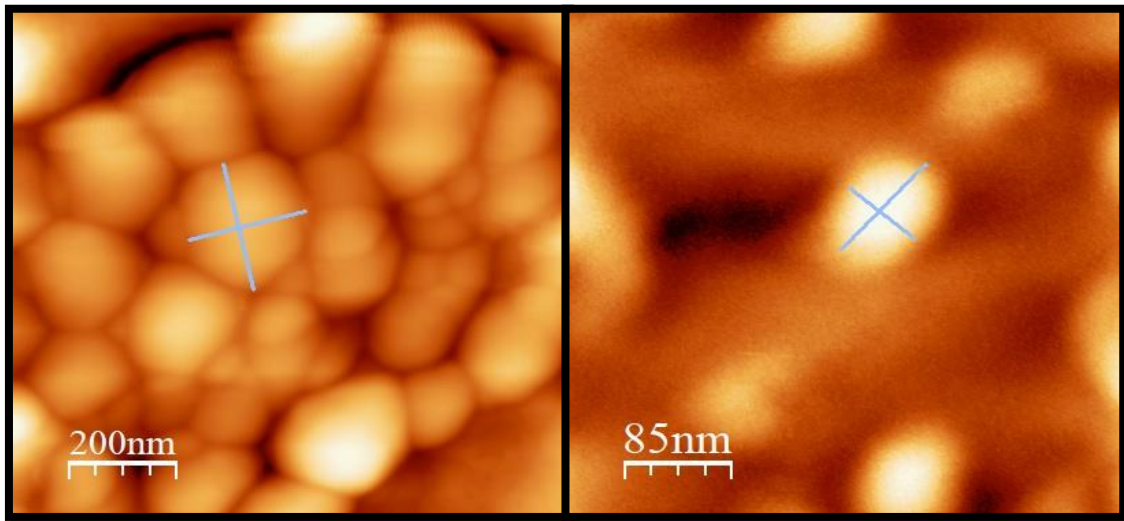


Fig 14. Microscopía de fuerza atómica de las partículas de quitosano nativo (izquierda) y quitosano tiolado (derecha).

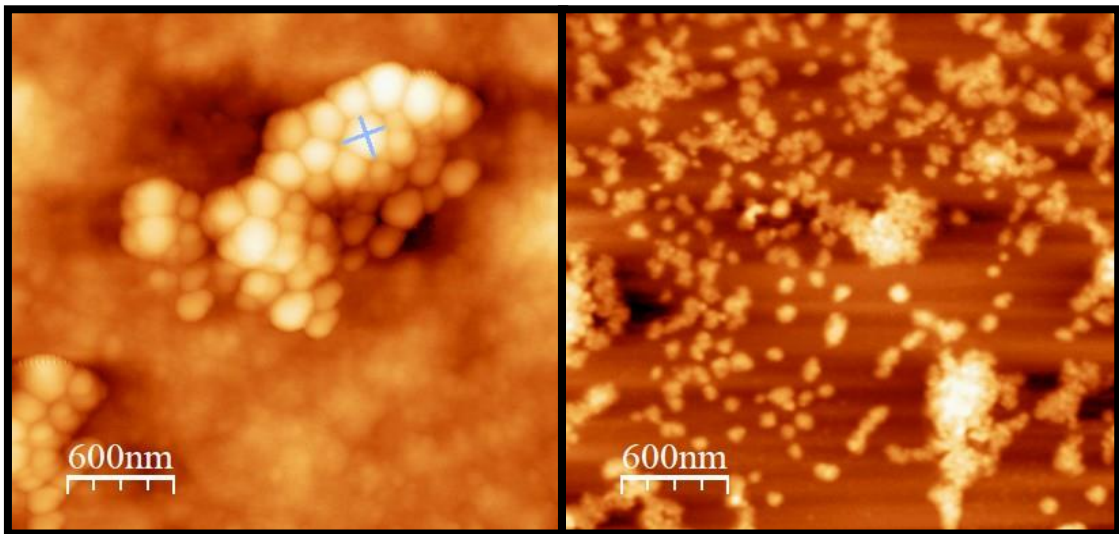


Fig 15. Microscopía de fuerza atómica de las partículas de quitosano nativo entrecruzadas con TPF (izquierda) y modificadas con ácido mercaptoundecanoico (derecha).

III.4 Nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con lisozima

En nuestro estudio la lisozima se disolvió inicialmente con el quitosano antes de la adición del TPF. Sin embargo, contrario a lo reportado en la literatura en donde se plantea que al aumentar la fuerza iónica del medio, se espera un

aumento progresivo del tamaño de las partículas, debido a que cada vez más iones compiten por la interacción con el TPF y el quitosano, en nuestros resultados se obtuvo, el menor tamaño de partícula a altas concentraciones de lisozima (Tabla 2), esto puede deberse a que la lisozima es una proteína pequeña por lo que pudo haberse acomodado en las oquedades de las nanopartículas, unida a los grupos expuestos con carga negativa del TPF, potenciando de esta forma la reticulación. Por otro lado, el efecto de repulsión estérica esperado pudo haber sido menos significativo puesto que la diferencia del tamaño de carga de estas moléculas es notoria. Tampoco se descartan las interacciones hidrofóbicas que pudieron ocurrir entre la cadena hidrocarbonada de once carbonos del agente de tioración y los aminoácidos hidrofóbicos de la proteína.

Tabla 2. Efecto de la relación Q-SH/LYZ sobre el tamaño, el índice de polidispersidad, el potencial ζ y la eficiencia de encapsulamiento de las nanopartículas.

QSH-LYZ (m/m)	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	EE (%)
1:1	186±44	0.32± 0.15	18.75± 2.08	93.2±4.2
2:1	183±28.3	0.26±0.04	20.4±3	89.4±9.2
3:1	233±44	0.25±0.04	16.5±6.7	94.2±9.9
4:1	280±65	0.38±0.14	21.3±5.2	91.5±12.7
5:1	230±48	0.38±0.1	19.8±2.2	89.3±7.7
6:1	244±34	0.37±0.1	20.2±2.75	98.3±27.1

El Potencial Zeta de las nanopartículas obtenidas fue positivo en todos los casos, oscilando entre 16 mV y 21 mV. No se pudo establecer una relación directa entre la concentración de proteína añadida y el potencial Z, ya que como se puede apreciar fue muy variable. La carga superficial se mantuvo en el rango de las nanopartículas de quitosano tiorado, no se observó un aumento de dicho potencial por la presencia de la lisozima, lo que nos indica que gran

parte de esta proteína pudo haber quedado encapsulada en el interior de la nanopartícula.

Podemos afirmar que en nuestro estudio se logró encapsular lisozima ya que, al medir la absorbancia de esta proteína en el sobrenadante, se obtuvieron valores muy pequeños de este parámetro, los que eran proporcionales a la disminución de la concentración de lisozima añadida. En nuestro estudio se obtuvo un máximo de encapsulamiento del 98% para la relación 10:1 (Figura 16), este resultado coincide con los obtenidos por otros autores, los que a menor concentración de proteína han obtenido mayor encapsulación, esto se debe a que en este punto la relación molar del quitosano con respecto a la proteína es superior, favoreciendo el atrapamiento de la misma (Su et al., 2010). El mismo comportamiento también se apreció en las relaciones 4:1 y 6:1, sin embargo, al analizar sus valores de absorbancia en el pellet, eran inferiores al resto de las absorbancias observadas. Entre las relaciones obtenidas, la 1:1 y la 2:1, resultan interesantes, ya que mostraron un menor radio hidrodinámico y una buena eficiencia de encapsulamiento, quizás potenciada por el aumento del área superficial de estas partículas.

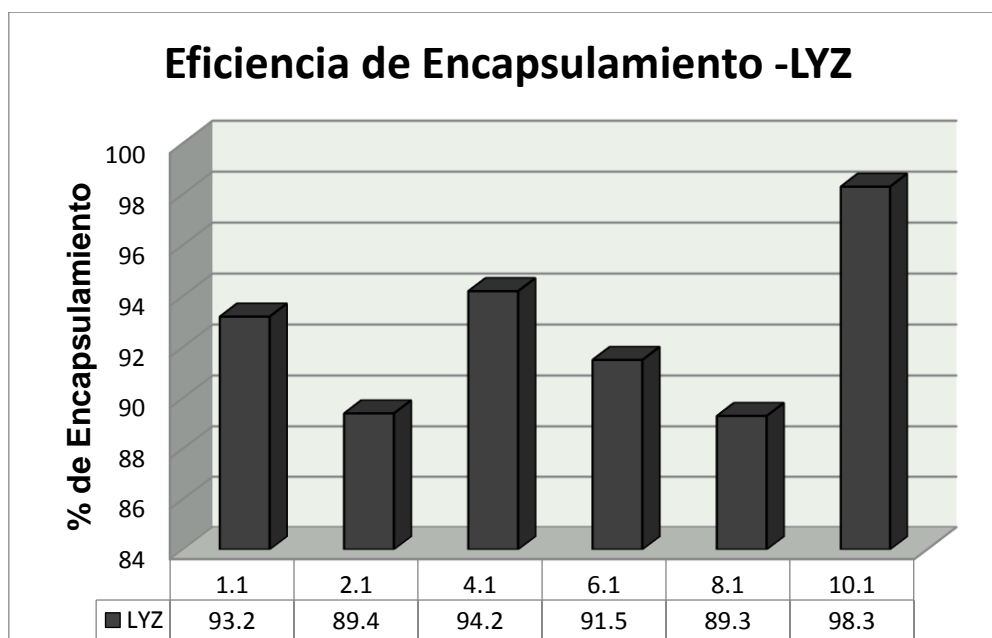


Figura 16. Eficiencia de encapsulamiento en nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con lisozima.

La morfología de estas partículas fue ovoide, similar a la obtenida en las nanopartículas de quitosano tiolado, ya que la lisozima es una proteína elíptica, y su unión a la superficie de las nanopartículas contribuye a mantener este patrón. También se observó la formación de agregados (Figura 17).

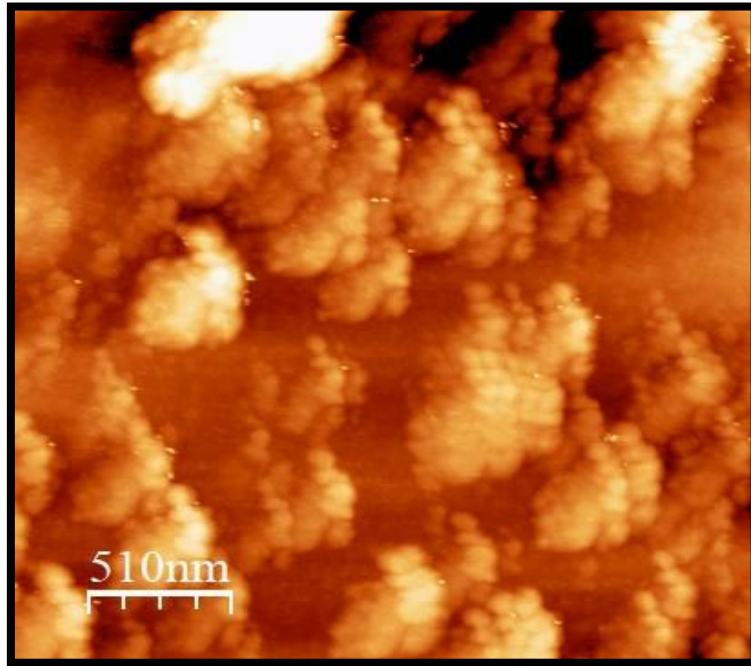


Figura 17. Microscopía de fuerza atómica de las nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con lisozima (relación 10:1).

Los espectros FTIR de las nanopartículas de QSH/lisozima se muestran en la Figura 18. Se ha atribuido previamente una banda a 3435 cm^{-1} a la vibración de estiramiento de los grupos -NH_2 y -OH del quitosano. Esta banda se hizo más ancha a medida que aumentaba la concentración de proteína, indicando que aumentó el número de puentes de hidrógeno en la solución, recorriéndose a un rango de 3400 a 3426 cm^{-1} . Se observaron vibraciones de flexión del enlace N-H en un rango de 1630 y 1655 cm^{-1} , este pico está relacionado con la señal de la amina primaria, y se intensificó en las nanopartículas cargadas con proteína, indicando la presencia de proteína en las nanopartículas. También se apreció

un segundo pico en un rango de 1522 y 1560 cm^{-1} relacionado con la señal de la amida secundaria.

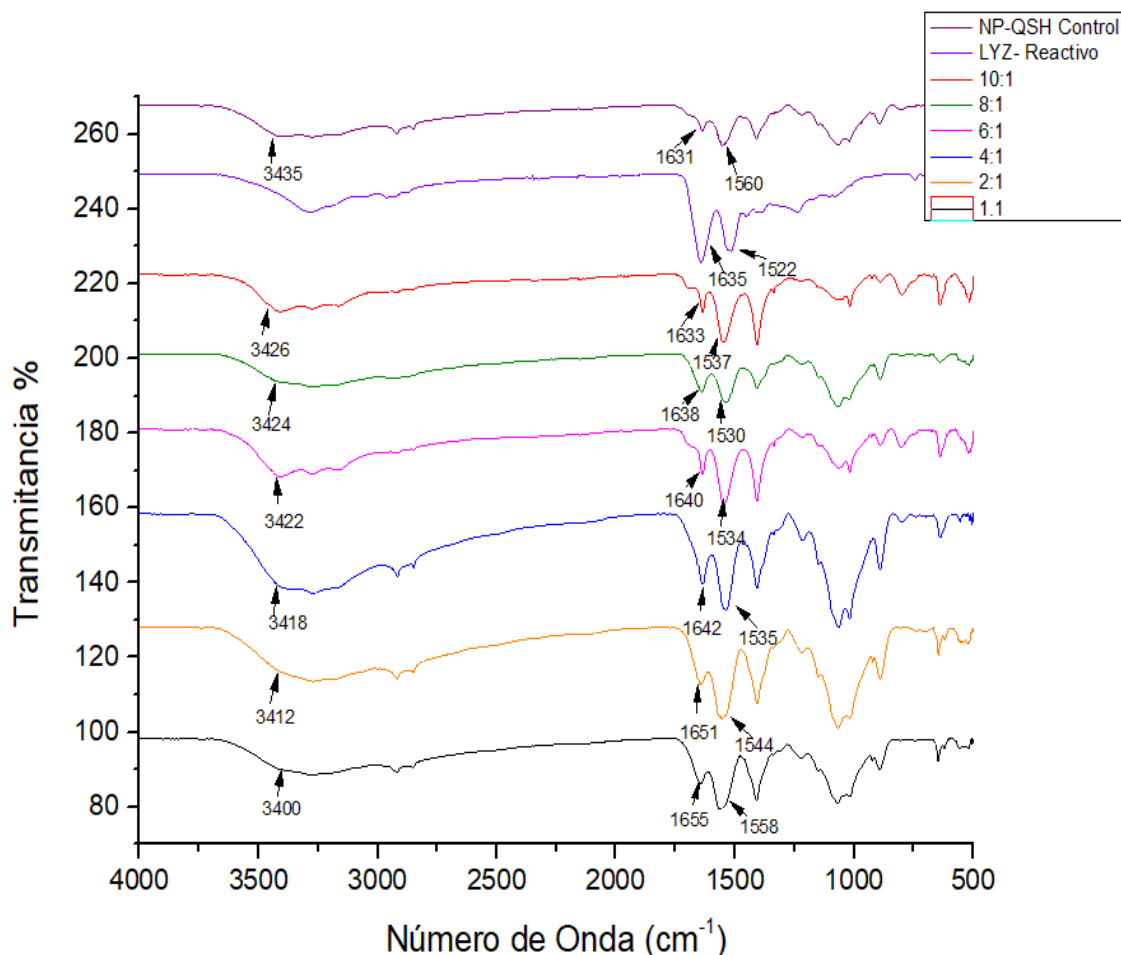


Figura 18. Espectros FT-IR de nanopartículas de quitosano tiolado, quitosano tiolado/lisozima y lisozima pura.

III.5 Nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con albúmina

El procedimiento empleado para la síntesis de nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con albúmina fue similar al empleado en la síntesis de nanopartículas cargadas con lisozima, en este caso se disolvió el TPF y la albúmina inicialmente, puesto que ambos están cargados negativamente. La solución original de TPF presenta un $\text{pH} = 9.7$, con una alta concentración de iones hidróxidos y tripolifosfóricos (Fana et al., 2012), por este motivo, con el fin

de evitar la desprotonación del quitosano y su posterior precipitación, se ajustó el pH de la solución TPF-ASB a un valor de pH ligeramente básico (pH=7). Una vez mezcladas las soluciones de TPF-ASB y quitosano, los iones OH⁻ de la solución serán parcialmente neutralizados por los iones H⁺ de la solución de quitosano, en caso de que en la solución persista algún ion OH⁻, tendrá poco efecto sobre el grado de protonación del quitosano (Sreenivas y Pay, 2008). En cuanto al diámetro hidrodinámico se obtuvieron tamaños de partícula muy similares e inferiores a los 200 nm, lo que demuestra que se produjeron interacciones efectivas, tanto hidrofóbicas como iónicas entre el quitosano tiolado y la albúmina. Los tamaños de partículas más pequeños fueron los correspondientes a las relaciones 5:1 y 6:1, en estas relaciones la competencia de la albúmina y el TPF por los grupos aminos protonados del quitosano fue mínima, favoreciéndose el proceso de reticulación. Con respecto al potencial zeta se observaron valores uniformes en todas las relaciones preparadas, variando en un rango entre 15 y 19 mV, evidenciando la unión con la proteína, cargada negativamente. En la síntesis de nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con albúmina, se tuvo en cuenta la existencia de un grupo tiol libre en la proteína, a pesar de que este grupo es capaz de reaccionar fácilmente en nuestros resultados no se obtuvieron disminuciones significativas del potencial zeta, esta inquietud pudo ser aclarada una vez realizado el análisis de los espectros en FT-IR.

Tabla 3. Efecto de la relación Q-SH/ASB sobre el tamaño, el índice de polidispersidad, el potencial ζ y la eficiencia de encapsulamiento de las nanopartículas.

QSH-ASB (m/m)	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	EE(%)
1:1	198±24.4	0.29±0.05	17±2.1	77.02±1.4
2:1	192.8±31	0.33±0.06	17.3±3.7	65±2.1
4:1	183.5±28	0.28±0.07	17.3±4.2	58.7±4.2
6:1	181±42.2	0.36±0.1	17.4±0.5	49.3±9.9
8:1	174.4±39	0.35±0.1	15.9±5.1	41±17.4
10:1	176.8±46.3	0.32±0.08	19.5±1.9	74±11.3

La eficiencia de encapsulamiento mostró un valor máximo en la relación de proteína más concentrada, esto pudiera deberse a que al aumentar la concentración de proteína en solución se ve favorecido el atrapamiento, sin embargo, a medida que disminuye la concentración de proteína disminuye la eficiencia de encapsulamiento, este comportamiento ha sido observado por otros autores tales como Janes y Alonso, (2003) los que manifiestan que el TPF presenta una mayor movilidad con respecto a la proteína por los grupos aminos cargados, ya que es una molécula mucho más pequeña con una densidad de carga más alta, por lo que se reduce drásticamente la eficiencia de encapsulamiento.

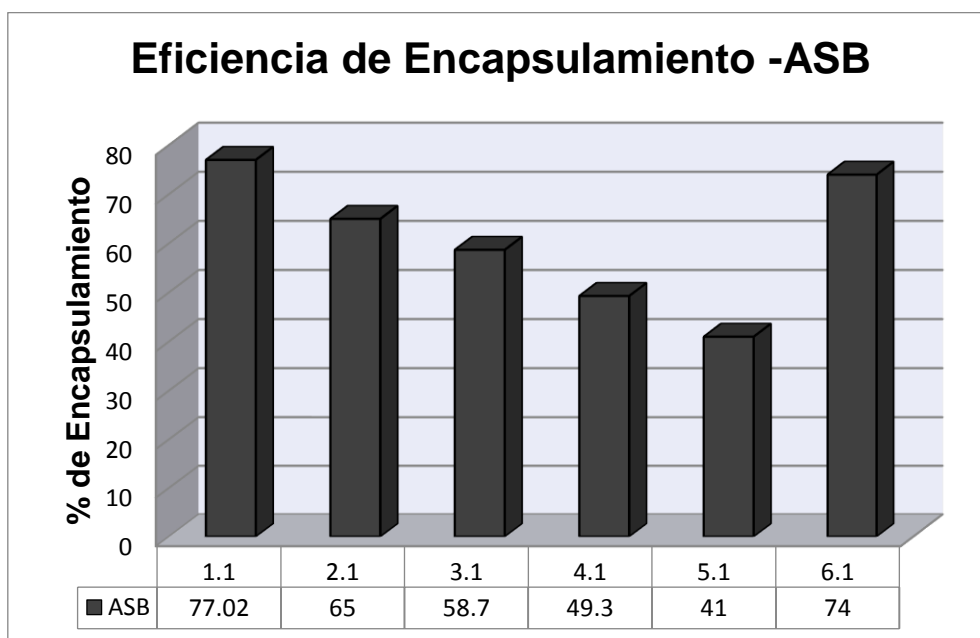


Figura 19. Eficiencia de encapsulamiento en nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con albúmina.

Este fenómeno se ve influenciado además porque previamente en nuestro experimento se había optimizado la relación QSH/TPF que permitiera la mejor gelificación de todo el quitosano, dando como resultado partículas de alto rendimiento. Sin embargo, esta estrecha relación de carga deja pocos grupos positivos libres que puedan ser atrapados por los aminoácidos de la proteína.

Lo anterior se ratifica al obtener un menor tamaño de partícula a medida que disminuye la concentración de proteína. Al igual que en la síntesis de lisozima, en la relación menos concentrada de albúmina se obtuvo un aumento en la eficiencia de encapsulamiento, propiciado por la mayor relación molar del quitosano.

El análisis de la morfología de estas nanopartículas demostró que la proteína se captó también en la superficie ya que presentaban formas semiesféricas (Figura 20), la albúmina es una proteína de gran tamaño y cordiforme, contribuyendo con el redondeamiento de la partícula.

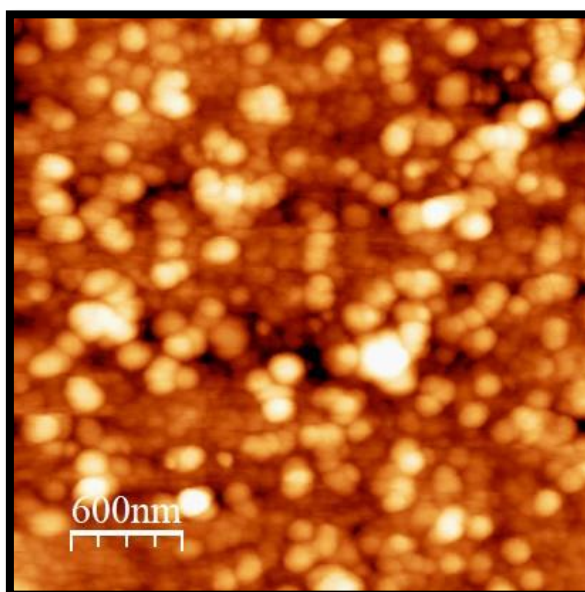


Figura 20. Microscopía de fuerza atómica de las nanopartículas de quitosano tiolado cargadas con albúmina (relación 6:1).

Los espectros FTIR de las nanopartículas de quitosano tiolado/albúmina se muestran en la Figura 21. Se ha atribuido previamente una banda a 3430 cm^{-1} a la vibración de estiramiento de los grupos -NH_2 y -OH del quitosano. Esta banda se hizo más ancha a medida que aumentaba la concentración de proteína, indicando que aumentó el número de puentes de hidrógeno en la solución, recorriéndose a un rango de 3400 a 3421 cm^{-1} . Al igual que en trabajos realizados por otros autores tales como (Su et al., 2010), se

observaron vibraciones de flexión del enlace N-H en un rango de 1630 y 1645 cm^{-1} , este pico está relacionado con la señal de la amina primaria producto de la unión entre el grupo amina y el TPF y amida I para las nanopartículas cargadas con proteína, indicando el aumento de residuos aminoácidos. También se apreció un segundo pico en un rango de 1534 y 1552 cm^{-1} relacionado con la señal de la amida secundaria, asociada a las amidas que resultan de la unión covalente del grupo amino del quitosano con el grupo carboxilo del ácido mercaptoundecanoico. No se obtuvieron señales correspondientes a los grupos tioles, lo que nos permite comprobar que no ocurrió la oxidación del quitosano, por lo que no se formaron enlaces disulfuros con el grupo sulfhidrilo libre de la albúmina.

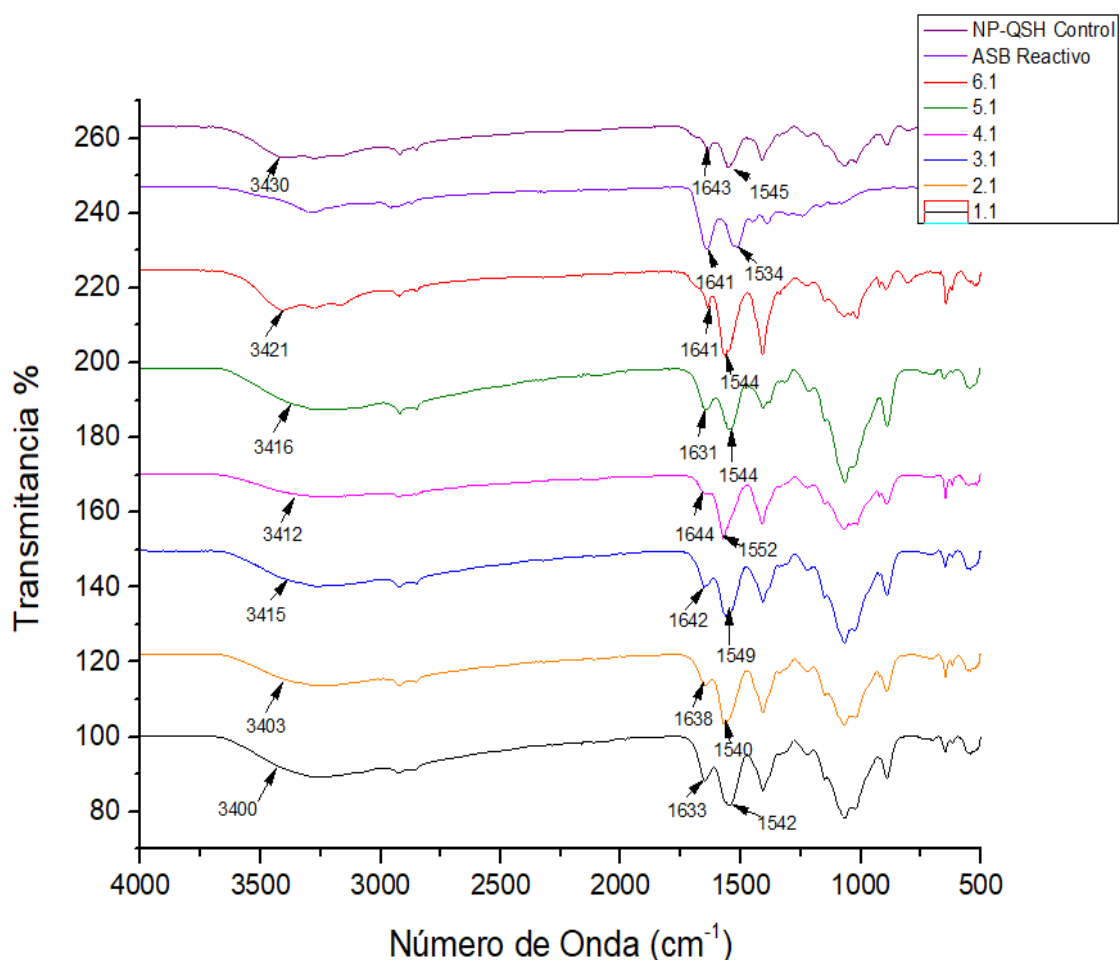


Figura 21. Espectros FT-IR de nanopartículas de quitosano tiolado, quitosano tiolado/albúmina y albúmina pura.

Capítulo IV. CONCLUSIONES

- Las diversas técnicas de caracterización empleadas permitieron conocer la morfología de las nanopartículas, variando de redonda a ovoide; el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta arrojó valores inferiores a los 300 nm y entre 15 y 22 mV respectivamente, la eficiencia de encapsulamiento fue mayor al 40% en todos los casos, por lo que se logró la optimización de los parámetros de carga.
- La evidencia presentada demuestra que las nanopartículas de quitosano tiolado funcionan como buenos transportadores de albúmina y lisozima a pesar de las diferencias que presentan en cuanto a carga y peso molecular, sin embargo es necesaria la realización de otros estudios que refuercen nuestros resultados.

Capítulo V. RECOMENDACIONES

Recomendamos la realización de estudios de liberación para complementar nuestros resultados.

Capítulo VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts, B., Bray., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. Introducción a la Biología Celular. Traducción al español de la 3ra. edición. Editorial Omega, Barcelona. (2011).
2. Alcalá, S. & Quintanar, D. La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos. *Mundo Nano*, 7(12), (2014).
3. Araújo, F., Shrestha, N., Shahbazi, M. A., Fonte, P., Mäkilä, E. M., Salonen, J. J., Sarmiento, B. The impact of nanoparticles on the mucosal translocation and transport of GLP-1 across the intestinal epithelium. *Biomaterials*, 35(33), 9199–9207. (2014).
4. Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 19–34. (2004).
5. Bernkop, A. & Elhassan, M. Controlled Drug Delivery Systems Based on Thiolated Chitosan Microspheres. *Drug Dey Ind Pharm.* 31 (6) 557–565, (2005).
6. Bernkop-Schnu, A., Kraulandb, A. H., Leitnerb, V. M., Palmberger, T. Thiomers: potential excipients for non-invasive peptide delivery systems *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*; 1(3): 209 – 218 (2010).
7. Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63: 125-132, (1997).
8. Carraher, C. E. *Carraher's Polymer Chemistry*, Ninth Edition. A CRC Title. Taylor & Francis. (2013).
9. Carrillo, W. Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad. *Actualización en nutrición*, 14 (4) 314-326 (2013).
10. Cegielska, R., Leśnierowski, G., Kijowski, J. *Pol. J. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations- A review. Food Nutr. Sci.*, 58 (1) 5-10, (2008).
11. Cocolletzi, H. H., Almanza, E. Á., Agustin, O. F., Nava, E. L. V.

- & Cassellis, E. R. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *22*, 57–60 (2009).
12. Cziple, F. A., & Velez, A. J. Biopolymers versus Synthetic Polymers. *UEM*. *15*, 125-132 (2008).
 13. Esquivel, R., Juárez, J., Almada, M., Ibarra, J., & Valdez, M. Synthesis and Characterization of New Thiolated Chitosan Nanoparticles Obtained by Ionic Gelation Method. *International Journal of Polymer Science*, *18* pages (2015).
 14. Fana, W. Yan, W., Xub, Z., Nia, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* *90*, 21–27(2012).
 15. Farris, S. *et al.* Charge Density Quantification of Polyelectrolyte Polysaccharides by Conductometric Titration: An Analytical Chemistry Experiment. *J. Chem. Educ.* *89*, 121–124 (2012).
 16. Gopal, M., Bharathi P. & Akila R.M. A comprehensive review on biopolimers. *Sci. Revs. Chem. Commun.* *4*, 61-68 (2014)
 17. Goycoolea, F.M., Remuñán, C., Alonso M.J. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. En: (Vila Jato, J.L. ed.) *Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. Pag. 103-131, (2009).
 18. Irache, J. M. Nanomedicina: Nanopartículas con aplicaciones médicas. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, *31*(1), 7–10, (2008).
 19. Janes, A., Alonso M. J. Depolymerized Chitosan Nanoparticles for Protein Delivery: Preparation and Characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, *88*, 2769 –2776 (2003).
 20. Jayakumar, R., Reis, R. L. & Mano, J. F. Synthesis and Characterization of pH-Sensitive Thiol-Containing Chitosan Beads for Controlled Drug Delivery Applications. *9–17* (2007).
 21. Kadi, N. Taulier, N. Le Hue´rou, J. Y., Gindre, M. Urbach, W. Nwigwe, I. Kahn, P. C. Waks, M. Unfolding and Refolding of Bovine Serum Albumin at Acid pH: Ultrasound and Structural Studies. *Biophysical Journal*. *91*, 3397–3404, (2006).

22. Katas, H., Raja, M. A. G., & Lam, K. L. Development of chitosan nanoparticles as a stable drug delivery system for protein/siRNA. *International Journal of Biomaterials*, 9 pages (2013).
23. Krishna, A., Amareshwar, p., Chakravarty, P., different techniques used for the preparation of nanoparticles using natural polymers and their application. *Int J Pharm Pharm Sci* 3(2), 45- 50 (2011).
24. Kushwaha K.S., Rai K., Singh. Chitosan: A Platform for Targeted Drug Delivery *International Journal of Pharm Tech Research*. 2, 2271-2282 (2010).
25. Lárez, C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4, 91-109 (2003).
26. Lárez, C. Quitina y quitosano : materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15–21. (2006).
27. Loaiza, M., Chavez, G. & Sabino, M. Artículo Suplemento Artículo Suplemento. 2013, 25–26 (2014).
28. Lu, L., Kong, L., Sheng, B., Wang, G., Gong, Y., & Zhang , X. Degradation of covalently cross-linked carboxymethyl chitosan and its potential application for peripheral nerve regeneration. *European Polymer Journal* 43, 3807–3818 (2007).
29. Mukhopadhyay, P., Mishra, R., Rana, D., & Kundu, P. P. Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progress in Polymer Science*, 37(11), 1457–1475 (2013)
30. Mukhopadhyay, P., Sarkar, K., Chakraborty, M., Bhattacharya, S., Mishra, R., & Kundu, P. P. Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: in vitro and in vivo studies in diabetic animal model. *Materials Science & Engineering. C*, 33(1), 376–382, (2012).
31. Perentena, L., Celis, B., & Valbuena, A. Síntesis de bases de schiff derivadas del quitosano por metoxibenzaldehido. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 16(1), 1–27 (2015).
32. Prabakaran, M. Review Paper: Chitosan Derivatives as Promising Materials. *J. Biomater. Appl.* 23, 5–36 (2008).
33. Quinlan, G.J., Mumby, S., Martin, G.S., Bernard, G.R., Gutter-idge, J.M. and Evans, T.W. Albumin influences total plasma antioxidant capacity

- favorably in patients with acute lung injury. *Crit. Care Med.* 32, 755–759, (2004).
34. Rajalakshmi, R. *et al.* Chitosan Nanoparticles — an Emerging Trend in Nanotechnology Chitosan Nanoparticles - An Emerging Trend In Nanotechnology. *Int. J. Drug Deliv.* 6, 204–229 (2014).
 35. Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., & Cesàro, A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1–2), 219–228 (2013).
 36. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* 377 (1):159-69, (2004).
 37. Riva, R., Ragelle, H., Rieux, A., Duhem, N., Jerome, C & Pr eat, V. Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Adv Polym Sci*, 244, 19–44 (2011).
 38. Rodríguez, N., Valderrama, A., Alarc n, H., & López, A. Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Rev Soc Qu m Per *, 76(4), 336–354. (2010).
 39. Rodríguez-Pedroso, A. T.; Ramírez-Arrebato, M. A.; Rivero-González, D.; Bosquez-Molina, E.; Barrera-Necha, L. L.; Bautista-Ba os, S. Propiedades químico estructurales. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 15, 307–317 (2009).
 40. Russel, G. J. The potential use of receptor-mediated endocytosis for oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 46:59–73, (2001).
 41. Sherestha, N. (2016). Mesoporous Silicon Systems for Oral Protein/Peptide-Based Diabetes Mellitus Therapy. (tesis de doctorado). Universidad de Helsinki, Finlandia.
 42. Shih, P. Madhusudhana, R. 2, Chi, C., Kumar, A. , Wan, W, Hui, L. Exploring the Behavior of Bovine Serum Albumin in Response to Changes in the Chemical Composition of Responsive Polymers: Experimental and Simulation. *Polymers*, 8, 238, (2016).
 43. Sreenivas, S. A. & Pai, K. V. Thiolated Chitosans : Novel Polymers for Mucoadhesive Drug Delivery – A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 7, 1077–1088 (2008).

44. Su, Z. Q., Zhang, H. L., Wu, S. H., Tao, Y., & Zang, L. Q. Preparation and characterization of water-soluble chitosan nanoparticles as protein delivery system. *Journal of Nanomaterials* (2010).
45. Rhazi, M., Desbrieres, J., Alagui, A & Vottero, P. Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan. *Polym Int.*49, 337–344 (2000).
46. Tanase, E. E., Rapa, M., & Popa, O. Biopolymers based on renewable resources- A review. *Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies.* 18, 11-14 (2014).
47. Valero-Valdivieso, M. F., Ortegón, Y., & Uscategui, Y. Biopolímeros: avances y perspectivas. *Dyna.*80, 171-180 (2013).
48. Vila, A., Sánchez, A., Janes, K.A., Behrens, I., Kissel, T., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57: 123-131. (2004).
49. Wu, T., Wu, C., Fu, S., Wang, L., Yuan, C., Chen, S., Hu, Y. Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* 155, 192–200 (2017).
50. Xu, Y. & Du, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 250: 215-226. 125, (2003).
51. Yao, X., Bunt, C., Cornish, J., Quek, S. Y., & Wen, J. Oral delivery of lactoferrin: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 19(2), 125–134(2013).
52. Zhang, T., Zhou, P., Zhan, Y., Shi, X., Lin, J., Du, Y., Deng, H. Pectin/lysozyme bilayers layer-by-layer deposited cellulose nanofibrous mats for antibacterial application. *Carbohydrate Polymers*, 117, 687–693, (2015).
53. Zhu, X., Su, M., Tang, S., Wang, L., Liang, X., Meng, F., Hong, Y., & Xu, Z. Synthesis of thiolated chitosan and preparation nanoparticles with sodium alginate for ocular drug delivery. *Mol Vis.* 18, 1973-1982 (2012).