

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN

POLÍMEROS Y MATERIALES

**“PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANO Y  
MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO POR GELIFICACIÓN  
IÓNICA Y MICROFLUÍDICA”**



Que para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIA  
DE MATERIALES**

Presenta

**I.Q. ANDREA LORENA CHOZA FARÍAS**

Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2018

# 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

## APROBACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de ANDREA LORENA CHOZA FARIAS han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.



Amir Darío Maldonado Arce  
(Presidente)



María Elisa Martínez Barbosa  
(Secretario)



Judith Celina Tánori Córdova  
(Sinodal)



Ramón Alfonso Moreno Corral  
(Sinodal)



Gabriel Espinosa Pérez  
(Sinodal Externo)

## DEDICATORIA

*A Dios, porque si no me hubiera concedido el milagro de la vida, nada de esto sería posible.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (CVU 727782).

A la Universidad de Sonora (UNISON), en especial al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) por haberme brindado la oportunidad de formarme en esta institución, tanto profesional como personalmente. Así como al proyecto UNISON USO0005772.

A los proyectos CONACyT 271189 (Infraestructura) y 256753 (Ciencia Básica), con cuyos recursos se realizó parcialmente este trabajo.

A las Dras. Carmen Mijangos y Rebeca Hernández, del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) de Madrid, España, por haberme recibido en una estancia de investigación durante cuatro meses.

A Sébastien Cargou, del BlackHole Lab de París, Francia; primero por haberme capacitado en la UNISON para el manejo del equipo de microfluídica y después por haberme recibido en una estancia de una semana en su laboratorio para resolver dudas con respecto al funcionamiento del equipo.

A mi director y co-directora de tesis, el Dr. Amir Maldonado y la Dra. Elisa Martínez, por su entrega y paciencia, su disposición para ayudarme y por haber compartido conmigo su tiempo y sus conocimientos.

A mis sinodales, la Dra. Judith Tánori, el Dr. Ramón Moreno y Dr. Gabriel Espinosa por haber aceptado ser parte de mi comité, por el tiempo que me dedicaron con sus preguntas y correcciones que me ayudaron a mejorar mi trabajo.

A la Dra. Jimena González y a Emilio Madrid, por haberme ayudado tanto con la parte experimental de este trabajo y por alegrar mis días en el laboratorio durante mi estancia en España.

A Daniel Berrellez, por su paciencia y disposición para ayudarme sobre todo en la parte de microfluídica, pero también por ser un buen amigo y brindarme su apoyo dentro y fuera de la escuela.

A mis "Cayetanos", Cayetano, Fernando y Analila, por aceptarme en su grupo, por su compañía, su apoyo, las risas y todos los momentos que compartimos juntos, gracias por ser los mejores amigos que pude haber tenido en la maestría. Especialmente gracias a Analila, porque además de acompañarme en Hermosillo me acompañó en mi estancia en Madrid, y más que una amiga se convirtió en una hermana para mí.

A Manuel, quien se convirtió en alguien muy importante para mí en estos dos años de maestría, gracias por su compañía, paciencia y cariño. Gracias también a su mamá, por alimentarme tantas veces con su deliciosa comida pero sobre todo con su cariño.

A Alexa, por su amistad desde el 2012, por siempre estar para mí, aconsejándome, apoyándome y a veces hasta regañándome. Gracias además por su ayuda con las figuras, índices y otros detalles de esta tesis.

A Liz, mi mejor amiga desde la preparatoria, la universidad nos hizo tomar caminos diferentes y la maestría nos volvió a unir. Gracias por brindarme su amistad a pesar de la distancia y por haberla fortalecido siendo roomies en Hermosillo. Gracias por su apoyo incondicional y por su cariño sincero.

A mis roomies, Caree, Analila y Sofi, porque vivir con otras personas nunca es fácil, y no sólo nos llevamos bien, sino que creamos lazos de amistad sincera que prevalecerán a pesar del tiempo y la distancia.

A Ariel, mi mejor amigo, gracias por su apoyo siempre sin importar cualquier circunstancia.

A Juan Pablo, una amistad en la que nadie creía y se convirtió en una de las mejores que he tenido, gracias por todo.

A mis "travelers", Héctor, Emiliano, Manuel, Analila y Sofi, porque a pesar de que sólo hemos hecho un viaje juntos, hemos compartido muchos otros momentos que les agradezco infinitamente. Gracias por su apoyo y cariño.

A mis amigos extranjeros, Gisell, David, Sandy, Belén, Ester, Celina, Anna, Andrea, Manel, Emilio, por haberme brindado su apoyo y compañía cuando estuve lejos de casa y por seguir entregándome su amistad a pesar del tiempo y la distancia.

A mi familia, especialmente a mis padres Francisco y Lorena, y a mis hermanos Sofi y Franky, por siempre estar ahí para mí, dándome su apoyo, consejos y amor incondicional.

A Dios, por seguir regalándome el don de la vida aunque he estado cerca de perderla en varias ocasiones, gracias por permitirme la oportunidad de estudiar y de conocer personas tan maravillosas en el camino.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
LISTA DE ABREVIATURAS .....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT .....	10
HIPÓTESIS .....	12
JUSTIFICACIÓN .....	12
OBJETIVOS .....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES .....	17
2.1 Polímeros .....	17
2.1.1 Clasificación de los polímeros por su origen.....	17
2.1.1.1 Polímeros naturales .....	17
2.1.1.2 Polímeros semisintéticos.....	18
2.1.1.3 Polímeros sintéticos.....	18
2.2 Quitosano.....	18
2.2.1 Características.....	18
2.2.2 Propiedades .....	19
2.2.2.1 Propiedades físicas .....	19
2.2.2.2 Propiedades fisicoquímicas .....	20
2.2.2.3 Propiedades biológicas.....	21
2.2.3 Aplicaciones .....	21
2.3 Caracterización fisicoquímica del quitosano .....	22
2.3.1 Grado de desacetilación .....	22
2.3.2 Peso molecular .....	23
2.4 Nanopartículas de quitosano.....	23
2.4.1 Métodos de preparación .....	24
2.4.1.1 Gelificación Iónica (GI).....	24
2.4.1.2 Microfluídica (MF).....	25
2.5 Hidrogeles.....	25
2.5.1 Preparación capa por capa .....	26

2.6	Agentes entrecruzantes .....	26
2.6.1	Tripolifosfato de sodio .....	26
2.7	Surfactantes .....	27
2.7.1	Alcohol Polivinílico (PVA) .....	28
2.8	Albúmina de Suero Bovino (BSA) .....	28
2.9	Alginato .....	29
2.10	Gelatina .....	30
2.11	Técnicas de caracterización .....	31
2.11.1	Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	31
2.11.2	Microscopía Óptica (MO).....	31
2.11.3	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	32
2.12	Estudios de liberación.....	32
3.	DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	34
3.1	Materiales .....	34
3.2	Partículas de quitosano cargadas con FITC-BSA: preparación por el método de gelificación iónica .....	34
3.2.1	Determinación de la capacidad de carga (CC) de BSA de las partículas.....	36
3.2.2	Preparación de hidrogeles tipo sándwich con partículas de quitosano/FITC-BSA .....	37
3.2.3	Estudios de liberación a 20°C y 37°C .....	39
3.3	Partículas de quitosano con y sin FITC-BSA: preparación por el método de microfluídica.....	40
3.4	Caracterización de nanopartículas de quitosano.....	46
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	48
4.1	Partículas de quitosano (cargadas con FITC-BSA) preparadas por gelificación iónica .....	48
4.1.1	Determinación de la capacidad de carga (CC) de FITC-BSA en las partículas de quitosano.....	58
4.1.2	Estudios de liberación a 20°C y 37°C .....	60
4.2	Partículas de quitosano con y sin FITC-BSA preparadas por microfluídica.....	65
4.2.1	Caracterización de partículas de quitosano con y sin FITC-BSA por microfluídica .....	68
5.	CONCLUSIONES.....	72
	PERSPECTIVAS .....	74
	BIBLIOGRAFÍA.....	75

<b>Figura 18.</b> Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en agua, observado por microscopía electrónica de barrido. Los diámetros de agregados representativos están en el intervalo entre 15 y 30 micras...	53
<b>Figura 19.</b> Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en agua, observado por microscopía electrónica de barrido. Nótese la presencia de pequeñas partículas aglutinadas en aglomerados. ....	53
<b>Figura 20.</b> Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en una solución acuosa de ácido acético al 1 %, observada por microscopía óptica. ....	55
<b>Figura 21.</b> Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en la solución de ácido acético, observada por microscopía electrónica de barrido. ....	55
<b>Figura 22.</b> Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en agua, observado por microscopía electrónica de barrido. Nótese la presencia de pequeñas partículas aglutinadas en aglomerados. ....	56
<b>Figura 23.</b> Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en PBS, observada por microscopía óptica. ....	57
<b>Figura 24.</b> Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en PBS, observada por microscopía electrónica de barrido.....	57
<b>Figura 25.</b> Curva de liberación de FITC-BSA de un gel y de un sándwich multicapa a 20°C. ....	61
<b>Figura 26.</b> Curva de liberación de FITC-BSA de un gel y de un sándwich multicapa a 37°C. ....	62
<b>Figura 27.</b> Curva de liberación de FITC-BSA de los geles a 37°C.....	62
<b>Figura 28.</b> Curva de liberación de FITC-BSA de los sándwiches multicapa a 37°C....	63
<b>Figura 29.</b> Curvas de liberación promedio para tres geles y tres sándwiches multicapa. Los experimentos se realizaron a 37 °C. ....	64
<b>Figura 30.</b> a) Diseño de la máscara en AUTOCAD para un dispositivo en forma de Y con tres entradas y una salida. b) Diagrama del dispositivo de PDMS con las dimensiones de los microcanales. ....	65
<b>Figura 31.</b> a) Serie de seis dispositivos de PDMS antes del desprendimiento y corte. b) Dispositivo cortado y con entradas y salidas perforadas. c) Dispositivo de PDMS montado en el sistema de microfluídica. ....	66
<b>Figura 32.</b> Montaje del equipo de microfluídica en el microscopio óptico. ....	67
<b>Figura 33.</b> Dispositivo de PDMS adaptado al microscopio óptico. ....	67
<b>Figura 34.</b> Validación del dispositivo con colorantes vegetales. ....	68

<b>Figura 35.</b> Partículas correspondientes a la muestra CS/PVA 1 observadas a a) 10000x y b) 50000x. ....	68
<b>Figura 36.</b> Partículas correspondientes a la muestra CS/PVA 2 observadas a a) 5000x, b) 10000x y c) 50000x. ....	69
<b>Figura 37.</b> Muestra CS/PVA/BSA 1 observada a a) 1000x y b) 5000x. ....	70
<b>Figura 38.</b> Muestra CS/PVA/BSA 2 observada a a) 1000x y b) 5000 x. ....	70
<b>Figura 39.</b> Muestra CS/PVA/BSA 3 observada a a) 1000x y b) 5000 x. ....	71
<b>Figura 40.</b> Esquema de liberación de la BSA con respecto al tiempo.....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Algunas propiedades de la quitina y el quitosano (Pillai, Paul, &amp; Sharma, 2009).</b> .....	20
<b>Tabla 2. Diámetro promedio y polidispersidad de las partículas de quitosano cargadas con FITC-BSA.</b> .....	58
<b>Tabla 3. Resultados de cantidad de FITC-BSA contenida en cada muestra de geles y sándwiches.</b> .....	59

# LISTA DE ABREVIATURAS

**CS:** Quitosano

**TPP:** Tripolifosfato de sodio

**FITC-BSA:** Albúmina de suero bovino conjugado de isotiocianato de fluoresceína

**NPs:** Nanopartículas

**PDMS:** Polidimetilsiloxano

**MF:** Microfluídica

**DLS:** Dispersión dinámica de luz

**SEM:** Microscopía electrónica de barrido

**UHR:** Ultra alta resolución

**DA:** Grado de desacetilación

**UV:** Ultravioleta

**dpi:** Puntos por pulgada

**rpm:** Revoluciones por minuto

**nm:** Nanómetros

**mL:** Mililitros

**s:** Segundos

## RESUMEN

El presente trabajo consiste en la preparación de nanopartículas de quitosano (CS) por las técnicas de gelificación iónica (GI) y microfluídica (MF). El quitosano es un polisacárido derivado de la quitina, la cual se encuentra en las cáscaras del camarón y otros crustáceos. Por lo tanto, el quitosano es un polímero biodegradable, biocompatible, no tóxico, entre otras características. Las nanopartículas de este compuesto tienen muchas aplicaciones; entre ellas, la de portadores de fármacos, ya que el tamaño y la forma de estas nanopartículas pueden ser controlados de una manera precisa.

En este trabajo se investigó la posibilidad de encapsular moléculas de interés farmacéutico en las nanopartículas preparadas. Debido a la naturaleza hidrofílica del quitosano, el compuesto a encapsular tiene que ser hidrofílico. Por ello se eligió la albúmina de suero bovino conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA) que es una proteína importante con diversas aplicaciones biomédicas.

Las partículas se prepararon utilizando dos técnicas experimentales: gelificación iónica y microfluídica. En ambos casos se utilizó tripolifosfato de sodio (TPP) como entrecruzante. La gelificación iónica es la técnica más adoptada para fabricar nanopartículas de quitosano, ya que este método es simple, suave y relativamente poco tóxico. Además, el tamaño de las nanopartículas logradas puede ajustarse con precisión ajustando los parámetros del proceso, por ejemplo, la concentración de CS y TPP, la relación de peso CS/TPP, la relación de volumen, el valor de pH, etc.

Por otra parte, la microfluídica es una técnica con la que se pueden crear nanopartículas pequeñas y monodispersas a través de canales con dimensiones desde unas cuantas micras hasta cientos de micras, empleando cantidades muy pequeñas de fluido y controlando la presión, velocidad y relación de flujo. Esta técnica también sirve para mejorar la eficiencia de encapsulación de fármacos y/o la velocidad de su liberación.

Las técnicas de caracterización empleadas para estudiar las nanopartículas de quitosano fueron: microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y

dispersión dinámica de luz. En los experimentos se obtuvieron partículas de diámetros desde 60 nm hasta 20  $\mu\text{m}$  aproximadamente para el caso de la gelificación iónica; en el caso de la microfluídica, el diámetro obtenido estuvo en un intervalo entre 70 nm y 3  $\mu\text{m}$ .

## ABSTRACT

The present work consists in the preparation of chitosan nanoparticles by ionic gelation and microfluidic techniques.

Chitosan is a polysaccharide derived from chitin, which is found in the shell of shrimp and others crustaceans. Therefore, chitosan is a biodegradable, biocompatible, non-toxic polymer, among other characteristics. The nanoparticles of this compound have many applications; among them, as drug carriers, since the size and shape of these nanoparticles can be controlled precisely.

In this work, the possibility of encapsulating molecules of pharmaceutical interest in the prepared nanoparticles was investigated. Due to the hydrophilic nature of the chitosan, the compound to be encapsulated has to be hydrophilic. Therefore, bovine serum albumin (BSA) was chosen, which is an important protein with various biomedical applications.

The nanoparticles were prepared using two experimental techniques: ionic gelation and microfluidic. In both cases, sodium tripolyphosphate (TPP) was used as a crosslinker.

Ionic gelation is the most adopted technique for manufacturing chitosan nanoparticles, since this method is simple, soft and relatively non-toxic. In addition, the size of the achieved nanoparticles can be precisely adjusted by adjusting the process parameters, for example, the CS and TPP concentration, the CS / TPP weight ratio, the volume ratio, the pH value, etc.

On the other hand, microfluidics is a technique in which small and monodisperse nanoparticles can be created through channels with dimensions from a few microns to hundreds of microns, using very small amounts of fluid and controlling the pressure, speed and flow rate. This technique also helps to improve the efficiency of drug encapsulation and/or the rate of its release.

The characterization techniques used to study the chitosan nanoparticles were: optical microscopy, scanning electron microscopy and dynamic light scattering. In the experiments, particles with diameters from 60 nm to

approximately 20  $\mu\text{m}$  were obtained for the case of ionic gelation; In the case of microfluidics, the diameter obtained was in a range between 70 nm and 3  $\mu\text{m}$ .

# OBJETIVOS

## Objetivo General

Preparar nanopartículas de quitosano mediante las técnicas de gelificación iónica y microfluídica, estudiando algunos parámetros que influyen en las propiedades de las partículas.

## Objetivos Particulares

1. Elaborar nanopartículas de quitosano por gelificación iónica.
2. Implementar la técnica de microfluídica para la preparación de nanopartículas poliméricas en la Universidad de Sonora.
3. Construir un dispositivo de microfluídica para la preparación de nanopartículas de quitosano.
4. Caracterizar las nanopartículas obtenidas por diferentes técnicas como DLS, microscopía óptica y microscopía electrónica.

# 1. INTRODUCCIÓN

La nanociencia es la rama del conocimiento encargada del estudio, la comprensión y el control de fenómenos a escala nanométrica, así como de la preparación y manipulación de materiales en dicha escala (Bawarski N, Chidlowsky E, Bharali DJ, 2008).

Las nanotecnologías son, entonces, todas las herramientas y tecnologías empleadas en el campo de la nanociencia. En términos más generales, la nanotecnología incluye muchas herramientas y técnicas utilizadas para estudiar la materia en una escala inferior a 100 nm. Los sistemas estudiados en esta área de la ciencia y la tecnología incluyen (entre otros): nanotubos de carbono, nanocristales, puntos cuánticos, nanofibras, filtros nanoporosos, nanohilos, nanopartículas de óxidos metálicos, nanocapilares, dispersión de nanopartículas, nanocompuestos de polímero, etc. (Bawarski N, Chidlowsky E, Bharali DJ, 2008).

Las nanopartículas pueden alterar o participar en procesos biológicos por lo que su uso en la medicina podría dar solución a viejos problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos de uso tradicional (Goldberg M, Langer R, 2007).

Las nanopartículas utilizadas en la administración de fármacos para terapia o para diagnóstico son sólidos coloidales cuyo diámetro varía entre 2 nm y 1 000 nm. Partículas mayores de 200 nm no son muy utilizadas debido a que pueden activar el sistema inmunológico. Normalmente, el fármaco de interés es disuelto, encapsulado, adsorbido o adherido dentro o sobre nanocápsulas (sistema vesicular, en el cual el fármaco es confinado a una cavidad rodeada por una membrana polimérica) o nanoesferas (sistema matricial en el que el fármaco es física y uniformemente dispersado) (Bawarski N, Chidlowsky E, Bharali DJ, 2008).

Las ventajas del uso de nanopartículas para la administración de fármacos están dadas, principalmente, por su pequeño tamaño y el empleo de materiales biodegradables (Panyan J, 2003).

El tamaño y la polidispersidad son las características más importantes de las nanopartículas y pueden determinar el destino biológico, la toxicidad, la distribución *in vivo* y la capacidad de orientación de estos sistemas de suministro. Además, estas propiedades pueden influenciar en la carga y liberación de fármacos y en la estabilidad de las nanopartículas (Bawarski N, Chidlowsky E, Bharali DJ, 2008).

La nanotecnología permite que la liberación del fármaco sea mínimamente invasiva, ya que posibilita la fabricación de dispositivos a escala nanométrica, los cuales pueden atravesar poros y membranas celulares. Otra gran ventaja es que se puede incrementar la efectividad de un fármaco, controlando su liberación tomando en cuenta la dosis requerida, el tamaño, la morfología y las propiedades superficiales del compuesto (Moddaresi M, Brown MB, Zhao Y, Tamburic S, 2010).

De todos los enfoques que usan nanopartículas para encapsular fármacos, las nanopartículas poliméricas han adquirido una importancia significativa. Esto es porque algunos polímeros son biocompatibles y biodegradables. Además, porque existen varios métodos de formulación disponibles; la gama de aplicaciones se ha expandido para incluir una variedad de clases de fármacos químicos y formas de dosificación. Las partículas basadas en quitosano son particularmente apropiadas para la ruta de la mucosa, por su baja toxicidad, aceptable mucoadhesión y por sus propiedades físicas sintonizables (Munawar A. Mohammed, Jaweria T. M. Syeda, 2017).

El quitosano es un polisacárido encontrado en el exoesqueleto del camarón y otros crustáceos; se obtiene a partir de la desacetilación química o enzimática de la quitina; es un polímero natural, biocompatible, biodegradable y no tóxico que posee diversas propiedades deseables para la fabricación de sistemas de liberación de fármacos.

Entre la variedad de métodos desarrollados para la preparación de nanopartículas de quitosano, la técnica de gelificación iónica ha atraído una atención considerable debido a que este proceso no utiliza sustancias tóxicas,

no contiene disolventes orgánicos, y es conveniente y controlable (Fan, Yan, Xu, & Ni, 2012).

También se pueden crear nanopartículas pequeñas y monodispersas realizando su síntesis en canales microfluídicos, mediante la creación de un régimen de mezclado estrechamente definido mediante un flujo hidrodinámico enfocado. Este régimen de mezclado bien controlado puede ser ajustado con precisión con la plataforma de microfluídica (principalmente a través de la velocidad y relación de flujo) y es crucial en la creación de nanopartículas monodispersas con propiedades ajustables, tales como su eficiencia en la encapsulación de fármacos y la velocidad de liberación (Majedi et al., 2014).

En el presente trabajo se llevó a cabo la preparación de nanopartículas de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato de sodio (TPP) y cargadas con una molécula modelo: albúmina de suero bovino conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA). Dichas nanopartículas se prepararon por los métodos de gelificación iónica y microfluídica y fueron caracterizadas por técnicas de microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y dispersión dinámica de luz. Las nanopartículas obtenidas tuvieron diámetros desde 60 nm hasta 20  $\mu\text{m}$  aproximadamente para el método de gelificación iónica y de entre 70 nm y 3  $\mu\text{m}$  cuando fueron preparadas por microfluídica.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Polímeros

Los **polímeros** se forman por la unión de un gran número de grupos químicos idénticos y de bajo peso molecular, denominadas **monómeros** (Cedrón, Landa, & Robles, 2011).

Un polímero, por tanto, es un compuesto de alto peso molecular, formado por unidades estructurales repetitivas; se trata de moléculas orgánicas, que pueden ser de origen natural o sintético (Cedrón et al., 2011).

Estas macromoléculas tienen las siguientes características generales, útiles en diversas aplicaciones (Cedrón et al., 2011):

1. **Bajo punto de fusión**, propiedad que permite procesarlos fácilmente para darles formas diferentes.
2. **Baja densidad**, lo cual los hace útiles en industrias como la automotriz por ser productos ligeros.
3. **Generalmente pobre conductividad eléctrica y térmica**, dependiendo de su estructura química, que permite usarlos como aislantes.
4. **Poca reactividad química**, que permite tenerlos en contacto con alimentos sin riesgos.

#### 2.1.1 Clasificación de los polímeros por su origen

Según su origen, pueden existir tres tipos de polímeros: naturales, semisintéticos y sintéticos (Cedrón et al., 2011).

##### 2.1.1.1 Polímeros naturales

Los **polímeros naturales** existen en la naturaleza como tales. Las biomoléculas, como las proteínas, el ADN y los carbohidratos, pueden ser consideradas polímeros naturales. Otro ejemplo es el caucho (Cedrón et al., 2011).

### 2.1.1.2 Polímeros semisintéticos

Los **polímeros semisintéticos** han sido obtenidos mediante la transformación de un polímero natural. El caucho vulcanizado, componente de las llantas, es un ejemplo: se produce al hacer reaccionar caucho con azufre, a altas temperaturas (Cedron et al., 2011). El quitosano es otro ejemplo de este tipo de polímeros.

### 2.1.1.3 Polímeros sintéticos

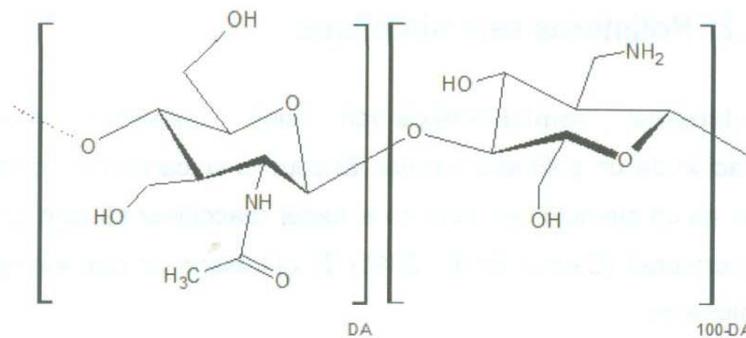
Los **polímeros sintéticos** son obtenidos industrialmente, haciendo reaccionar al monómero correspondiente. Ejemplos de polímeros sintéticos son el polietileno, el nylon y el poliestireno (Cedron et al., 2011).

## 2.2 Quitosano

### 2.2.1 Características

El **quitosano** es un polímero semisintético que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. La quitina forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos (Aguero, 2006).

La obtención de quitosano a partir de quitina se realiza por desacetilación de la misma, dejando libre el grupo amino del carbono 2, aunque este proceso nunca llega al 100% (Aguero, 2006). El quitosano es un polisacárido lineal compuesto por D-glucosamina (unidad desacetilada) ligada con el grupo  $\beta$ - (1-4) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) (Berat, Kitosan, Kaedah, & Intrinsik, 2013). Las estructuras químicas de la quitina y el quitosano se muestran en la Figura 1.



**Figura 1.** Estructura primaria de la quitina (izquierda) y el quitosano (derecha).

El quitosano es un polímero formado por unidades repetidas de D-glucosamina, por lo que la longitud de la cadena y, por tanto, su peso molecular, son características importante de la molécula (Aguero, 2006).

Este biopolímero se disuelve fácilmente en soluciones diluidas de la mayoría de los ácidos orgánicos tales como: ácido fórmico, acético, cítrico y tartárico, y también en ácidos minerales diluidos a excepción del ácido sulfúrico. Su grado de desacetilación (DD) varía desde un 60% hasta un 90% y los pesos moleculares (MW), varían desde 50 hasta 2000 KDa, atribuyéndose esta heterogeneidad a la falta de control durante el procesamiento (Mármol, Páez, Rincón, Araujo, & Aiello, 2011).

## 2.2.2 Propiedades

Dependiendo del estado ya sea sólido o en solución, la quitina y el quitosano presentan diferentes propiedades. En el estado sólido las propiedades dependen de la accesibilidad y la movilidad de las cadenas del polímero, parámetros relacionados con la cristalinidad y la morfología. En solución, las propiedades dependen de los parámetros de solubilidad y conformación de la cadena (Domard & Rinaudo, 1983).

### 2.2.2.1 Propiedades físicas

#### Estructura cristalina

La presencia y abundancia de los grupos hidroxilos (primario en C-6 y secundario en C-3) y el grupo *N*-acetil o amino (en C-2) en la quitina y el quitosano respectivamente, confieren a estas moléculas una tendencia a la formación de puentes de hidrógeno intra e inter moleculares, los cuales favorecen la formación de agregados lineales de alta cristalinidad (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007).

Contrario a la quitina, el quitosano presenta diferentes variantes que dependen del modo de preparación de la muestra, así como de su grado de desacetilación y de despolimerización. Por lo general, las moléculas de quitosano mantienen un solo pico al hacer algún experimento espectroscópico característico de la quitina, ya que debido a la presencia de los grupos acetamidos en el C-2 se reduce la cantidad de puentes de hidrógeno, y como consecuencia la estructura se vuelve más inestable (Pacheco & Lopez, 2010).

### 2.2.2.2 Propiedades fisicoquímicas

El peso molecular y la distribución del peso molecular del polímero son parámetros que afectan las propiedades de la quitina y el quitosano en solución, que aunado al grado de desacetilación (DA), juegan un papel importante en sus aplicaciones. La tabla 1 muestra intervalos de  $M_w$ , DA, viscosidad y principales disolventes de la quitina y el quitosano.

**Tabla 1. Algunas propiedades de la quitina y el quitosano** (Pillai, Paul, & Sharma, 2009).

Propiedad	Quitina	Quitosano
Peso molecular (g/mol)	$1 \times 10^6$ a $2.5 \times 10^6$	$5 \times 10^3$ a $10^5$
Grado de desacetilación	>40	0 a 40
Viscosidad (Cps)	No soluble	200-2000
Humedad (% p/p)	8-10	6-7
Solubilidad	DMAc-LiCl/TCA-MC*	Ácidos diluidos

\***DMAc-LiCl** es N, N-dimetil acetamida con cloruro de litio; **TCA-MC** es ácido tricloro acético con diclorometano.

**Tratamiento de agua:** agente floculante, agente coagulante, tratamientos de flotación para la remoción de aceite de pescado en agua, agentes filtrantes para piscinas y spas, remoción de metales, remoción de surfactantes, etc.

La lista de aplicaciones permite visualizar la importancia que tiene este polímero natural. Dos hechos son relevantes en las aplicaciones: por una parte, es un material que se puede obtener de desechos de industrias como la pesquera, lo cual reduce su costo y eliminando al mismo tiempo los desechos. Por otra parte, dado que se trata de una sustancia biodegradable, su utilización representa menor daño al medio ambiente.

## **2.3 Caracterización fisicoquímica del quitosano**

Tanto la composición de las cadenas del quitosano como sus dimensiones, suelen variar en dependencia del material de partida y de la rigurosidad del método de obtención. Por este motivo, el grado de desacetilación y el peso molecular son dos parámetros requeridos en la caracterización de una muestra quitosano, ya que ambos tienen una gran incidencia en sus propiedades (Hernández, 2010).

### **2.3.1 Grado de desacetilación**

El grado de desacetilación (GD) permite diferenciar el quitosano de la quitina y determina sus propiedades químicas, físicas y biológicas. (Pillai, Paul, & Sharma, 2009). En cuanto al grado de desacetilación, se ha establecido que la quitina con más de un 50% de desacetilación debe ser considerada quitosano, aunque algunos investigadores la definen como tal con un grado de desacetilación superior al 60%. Usualmente en el caso del quitosano el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 60-98%; sin embargo, también se ha reportado que para lograr una mayor actividad biológica, el contenido de los grupos acetilo debe encontrarse alrededor de un 40% (Rodríguez-Pedroso et al., 2009).

Para la determinación del grado de desacetilación se emplean diferentes métodos o técnicas, tales como (Giraldo, 2015):

- Espectroscopía Infrarroja (IR)

- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (H-RMN)
- Titulación potenciométrica
- Espectroscopía Ultravioleta (UV)
- Espectroscopía de Dicroísmo Circular (DC)
- Titulación coloidal
- Métodos enzimáticos

### 2.3.2 Peso molecular

El peso molecular (MW) es uno de los parámetros más fundamentales en la caracterización de un polímero. El peso molecular del quitosano puede ser determinado por diferentes técnicas como Cromatografía por Permeación en Gel (GPC), Dispersión Estática de Luz (SLS), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopía Infrarroja (IR) y medición intrínseca de la viscosidad. GPC es la técnica más poderosa para la caracterización del peso molecular de los polímeros. Sin embargo, es un método relativo y necesita para su calibración estándares de peso molecular para obtener la relación entre el volumen de elución y el peso molecular (Berat et al., 2013).

Uno de los métodos más simples y rápidos para la determinación del peso molecular de un polímero es la viscosimetría, aunque no es un método absoluto y requiere la determinación de constantes de ajuste. (Berat et al., 2013).

## 2.4 Nanopartículas de quitosano

Muchas aplicaciones contemporáneas requieren que los materiales se preparen de forma tal que al menos alguna de sus dimensiones esté en la escala nanométrica. Algunos ejemplos son las nanopartículas (esféricas o en forma de alambres o varilla) o los recubrimientos con espesores del orden de nanómetros.

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

## 2.4.1 Métodos de preparación

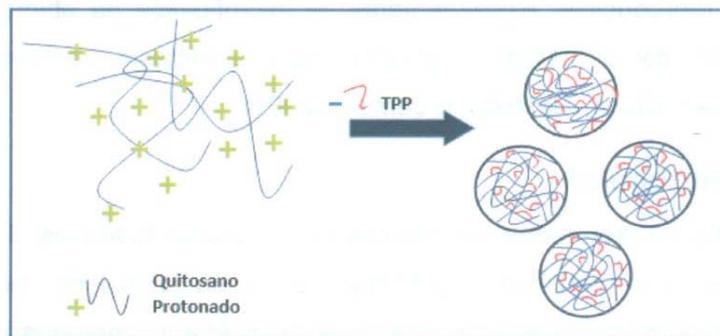
Algunos métodos de preparación de micro/nanopartículas de quitosano son (Agnihotri, Mallikarjuna, & Aminabhavi, 2004):

- Emulsión entrecruzada.
- Coacervación/precipitación.
- Secado por atomización
- Método de coalescencia emulsión-gota
- Gelificación iónica
- Método de micelas inversas
- Método de tamizado
- Microfluídica (Majedi et al., 2013)

Este trabajo se centrará en los métodos de gelificación iónica y de microfluídica, los cuales se describen brevemente a continuación.

### 2.4.1.1 Gelificación Iónica (GI)

La técnica de gelificación iónica se basa en las interacciones iónicas atractivas entre grupos químicos de carga opuesta del quitosano y de un agente entrecruzante. En el caso del quitosano, se aprovecha la carga positiva de los grupos amino primarios; al sistema se agrega tripolifosfato de sodio (TPP) que tiene grupos polianión cargados negativamente. El TPP funciona como agente de entrecruzamiento y es ampliamente utilizado debido a su ausencia de propiedades tóxicas y multivalentes (Fan et al., 2012). Este entrecruzamiento se lleva a cabo como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Esquema del entrecruzamiento del quitosano con el tripolifosfato de sodio (TPP) para la formación de partículas.

### **2.4.1.2 Microfluídica (MF)**

La microfluídica se ha convertido en una herramienta formidable en la experimentación de alto rendimiento y alto contenido, porque la miniaturización de las operaciones funcionales y los procesos analíticos casi siempre ofrece ventajas en comparación con el proceso de macroescala correspondiente. Tales beneficios son muchos e incluyen: la capacidad de procesar volúmenes de muestra ultra pequeños, rendimiento analítico mejorado, huellas instrumentales reducidas, rendimiento analítico ultra alto y la fácil integración de componentes funcionales dentro de sustratos monolíticos (Dressler, Howes, Choo, & Demello, 2018).

Aunque es una tecnología prometedora, el ámbito de los micro y nanofluidos enfrenta desafíos críticos. Por ejemplo, muchas propiedades físicas de los fluidos en la macroescala cambian radicalmente a micro y nanoescala. Además, muchos de estos fenómenos físicos aún están bajo estudio en el nivel de ciencia básica. Por lo tanto, la comprensión del comportamiento de los fluidos a escala micro y nano se vuelve obligatoria para desarrollar dispositivos micro y nanofluídicos (Bhushan, 2012).

Los sistemas microfluídicos permiten un control específico de las condiciones de reacción relacionadas con las estrategias convencionales de síntesis masiva (también conocida como síntesis en bulto). Tal control puede permitir controlar la reducción de tamaño así como la polidispersidad de las partículas obtenidas. Para cumplir estos requisitos, el método de síntesis de partículas debe ser eficiente y reproducible. Recientemente, la microfluídica ha abierto el nuevo vasto campo como método alternativo para la síntesis de nanopartículas (Krishnadasan, Brown, deMello, & deMello, 2007).

## **2.5 Hidrogeles**

Los hidrogeles son redes poliméricas entrecruzadas hidrófilas 3-D capaces de absorber una cantidad significativa de agua o fluidos biológicos. El entrecruzamiento en cadena se puede lograr mediante métodos químicos o físicos, y la gran variedad de esquemas de reacción de entrecruzamiento hacen

posible controlar la cinética de gelificación y las propiedades de hidrogel posteriores (Yu & Ding, 2008).

### **2.5.1 Preparación capa por capa**

El proceso básico consiste en sumergir un sustrato cargado (por ejemplo, catiónico) en una solución acuosa diluida de un polielectrolito aniónico y permitir que el polímero absorba y revierta la carga de la superficie del sustrato. El sustrato recubierto con carga negativa se enjuaga y se sumerge en una solución de polielectrolito catiónico, que adsorbe y recrea una superficie cargada positivamente. Las adsorciones secuenciales de polielectrolitos aniónicos y catiónicos permiten la construcción de películas multicapa (Chen & McCarthy, 1997).

El proceso tiene varias ventajas importantes sobre otras técnicas para preparar capas finas multicapa ordenadas. Las películas del ensamblaje se basan en adsorciones espontáneas, el sustrato puede tener, en principio, cualquier tamaño, forma, topografía o topología, y no es necesario ningún control estequiométrico para mantener las funcionalidades de la superficie, los defectos no se propagan (Chen & McCarthy, 1997).

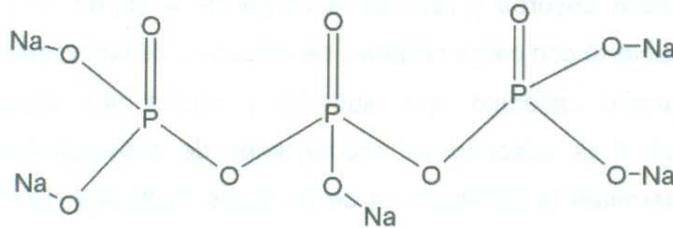
## **2.6 Agentes entrecruzantes**

Algunos sistemas de liberación a base de polímeros biodegradables necesitan ser entrecruzados para modular sus propiedades y mantener la estabilidad de la matriz y así cumplir el objetivo de liberar el fármaco a lo largo del tiempo deseado. El quitosano, como se ha comentado, se disuelve en condiciones ácidas, lo que limita su aplicación como sistema de liberación. El entrecruzamiento puede reducir la solubilidad del quitosano en solventes acuosos, aumentar su resistencia a la degradación química o biológica y ayudar a controlar la liberación de principios activos desde la matriz formada (Muzzarelli, 2009).

### **2.6.1 Tripolifosfato de sodio**

El tripolifosfato sódico (TPP) es un agente entrecruzante no tóxico, reconocido como GRAS (General Recognized As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration), que es capaz de formar geles al unirse con el quitosano por interacción iónica (Pacheco & Lopez, 2010). En la figura 3 se presenta la estructura química del TPP.

Concretamente, la formulación de micro y nanopartículas por interacción iónica entre el quitosano y el tripolifosfato sódico es muy común porque implica la mezcla de dos fases acuosas a temperatura ambiente sin el uso de solventes orgánicos (Pacheco & Lopez, 2010).



**Figura 3.** Estructura química del tripolifosfato de sodio (TPP).

## 2.7 Surfactantes

Los surfactantes o tensioactivos son materiales que reducen la tensión superficial (o tensión interfacial) entre dos líquidos o entre un líquido y un sólido. En sentido general, cualquier material que afecte a la tensión superficial interfacial puede considerarse un tensioactivo, pero en el sentido práctico, los tensioactivos pueden actuar como agentes humectantes, emulsionantes, agentes espumantes y dispersantes (Hirsch, 2015).

El surfactante es una molécula que reduce la tensión superficial; estos materiales tienen una cabeza hidrofílica soluble en agua y una cadena hidrofóbica soluble en sustancias orgánicas. Un surfactante actúa como un agente activo en las superficies y puede influir en gran medida en las propiedades fisicoquímicas de la interfaz (Jia & Qin, 2013).

La clasificación de los tensioactivos se basa en la capacidad de disociación de la cabeza polar cuando se encuentra en solución, Estas moléculas pueden ser iónicas o no-iónicas (Wittcoff, 2007).

### ➤ Tensioactivos iónicos

Los tensioactivos iónicos son moléculas que adquieren carga eléctrica cuando están en solución; la carga puede ser positiva (tensioactivos catiónicos) o negativa (aniónicos).

#### ➤ Tensioactivos no-iónicos

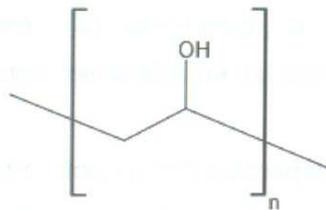
Los surfactantes o tensioactivos no-iónicos son aquellos que no son ionizables, se solubilizan mediante un efecto combinado de un cierto número de grupos solubilizantes débiles (hidrófilos) tales como un enlace tipo éter o grupos hidroxilos en su molécula.

En este trabajo se utilizó un tensioactivo no-iónico, el cual se describe a continuación.

### 2.7.1 Alcohol Polivinílico (PVA)

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero soluble en agua, no tóxico, biocompatible y biodegradable (Ye, Mohanty, & Ghosh, 2014).

El PVA se utiliza en diversas aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, tales como lentes de contacto, dispositivos de administración de fármacos, apósitos para heridas, dispositivos ortopédicos y órganos artificiales (Ye et al., 2014).

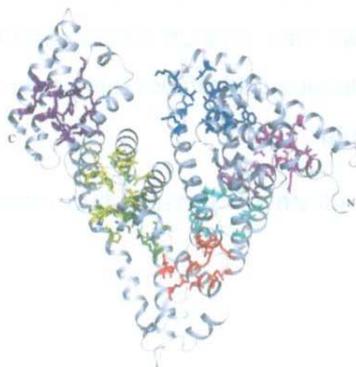


*Figura 4. Estructura química del alcohol polivinílico (PVA)*

### 2.8 Albúmina de Suero Bovino (BSA)

La albúmina de suero bovino es una proteína hidrosoluble que tiene numerosas aplicaciones. La albúmina sérica como portador de fármacos desempeña un papel vital en la administración de medicamentos debido a sus notables propiedades de unión. Debido al alto costo de utilizar albúmina sérica

humana (HSA), la albúmina sérica bovina (BSA) con un costo más bajo se usa ampliamente como una proteína modelo importante en lo que respecta a la interacción entre los compuestos y las albúminas séricas (Zheng et al., 2014). Su estructura química se muestra en la figura 5.



**Figura 5.** Estructura de la proteína BSA (Bujacz, 2012).

## 2.9 Alginato

Los alginatos son polisacáridos aislados de algas pardas como *Laminaria hyperborea* y *lessonia* que se encuentran en las aguas costeras de todo el mundo. Son copolímeros lineales no ramificados que contienen bloques homopoliméricos de ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) con enlaces (1,4) y su epímero C-5, residuos de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), respectivamente, que están covalentemente unidos entre sí en diferentes secuencias o bloques (Augst, Kong, & Mooney, 2006).

Los alginatos pueden prepararse con un amplio rango de pesos moleculares (MW, 50–100 000 kDa), y las soluciones acuosas de alginatos tienen características no newtonianas, es decir, la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizallamiento (adelgazamiento por cizallamiento). La viscosidad de una solución de alginato depende de la concentración del polímero y de la distribución de peso molecular. Dos bloques G de cadenas poliméricas adyacentes se pueden reticular con cationes multivalentes (por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Ba}^{2+}$ ) a través de interacciones con los grupos carboxílicos en los azúcares, lo que conduce a la formación de una red de gel (Augst et al., 2006). En la figura 6 se muestra la estructura química del alginato.

## **2.11 Técnicas de caracterización**

La caracterización de materiales se refiere a su identificación a partir del estudio de sus propiedades físicas, químicas, estructurales, etc. Existen para ello distintas técnicas de caracterización, de acuerdo a las propiedades que se requiera estudiar. Una vez conocidas las características del material puede establecerse la naturaleza del mismo, así como sus posibles aplicaciones (Cabrera, 2011).

Algunas de las técnicas de caracterización se enlistan a continuación.

### **2.11.1 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)**

La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés: "Dynamic Light Scattering") es una técnica física empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros. La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada (Pimentel & Martín-martínez, 2014). A partir del análisis de la intensidad dispersada capturada por un detector en función del tiempo, se puede determinar información sobre la dinámica de los agregados presentes en la muestra, en particular su coeficiente de difusión. Una vez obtenido este parámetro, se puede obtener el radio hidrodinámico de los agregados si se conoce la viscosidad del solvente y la temperatura.

### **2.11.2 Microscopía Óptica (MO)**

La microscopía óptica es una técnica de análisis con la que se observan preparaciones de muestras a diferentes aumentos y con diferentes técnicas de iluminación: transmisión, reflexión, campo claro (BF), campo oscuro (DF), luz polarizada (POL) y luz UV (Mertz, 2010).

El microscopio óptico es un equipo que permite la observación de muestras sólidas por transmisión, reflexión o fluorescencia (Buti, 2014).

Típicamente, en un microscopio óptico compuesto estándar hay tres lentes objetivas que son una lente de exploración (5 x), lente de la energía baja (10 x) o a veces lente de la energía media (20 x), y lente de alta potencia (40 x) ("Microscopio Óptico," 2015).

### **2.11.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que crea imágenes ampliadas que revelan información a escala microscópica sobre el tamaño, forma, composición, cristalografía y otras propiedades físicas y químicas de una muestra (Goldstein et al., 2018).

El microscopio electrónico de barrido explora la superficie de la imagen punto por punto, al contrario que el microscopio electrónico de transmisión, que examina una gran parte de la muestra cada vez. El SEM tiene menor resolución pero produce imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto.

Esta modalidad de la microscopía electrónica provee un examen morfológico con visualización directa de superficies. Las técnicas basadas en microscopía electrónica de barrido ofrecen diversas ventajas en el análisis morfológico y de tamaño; sin embargo, proveen información limitada acerca de la distribución y del verdadero promedio de población de partículas. Para la caracterización por SEM, se requiere que las nanopartículas se encuentren en forma de polvo seco, el cual es colocado en un soporte; la muestra se recubre con un metal que puede ser oro, plata o cromo, usando una máquina de pulverización (Calderon Perea & Calderon Perea, 2007). El tamaño de partícula obtenido por SEM se puede comparar con los resultados obtenidos por DLS (Calderon Perea & Calderon Perea, 2007).

### **2.12 Estudios de liberación**

Una vez que se tiene un sistema acarreador de un fármaco o molécula de interés, un estudio a seguir consiste en evaluar el perfil de liberación del mismo desde el sistema acarreador. Dicho estudio consiste (de manera general) en lo siguiente: una cantidad del sistema acarreador conteniendo el fármaco, se incuba en un medio conocido (de preferencia un tampón buffer) a condiciones específicas de interés (por ejemplo: temperatura) y se toman alícuotas con respecto al tiempo para poder cuantificar por un método analítico la cantidad de

fármaco liberado en el medio. Estos resultados se presentan en gráficas del porcentaje acumulado del fármaco con respecto al tiempo.

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En esta sección haremos un listado de todos los materiales y métodos usados en este trabajo. En particular, se describirán con cierto detalle los métodos de preparación de nanopartículas de quitosano por gelificación iónica y microfluídica. Así mismo, se explicará el procedimiento de incorporación de un fármaco en las nanopartículas, así como una técnica para estudiar su liberación.

#### 3.1 Materiales

Para la preparación de las partículas de quitosano por ambos métodos, fueron utilizados los siguientes materiales:

- Quitosano de bajo peso molecular (Sigma Aldrich).
- Tripolifosfato de sodio (TPP) (Acros).
- Ácido acético glacial (Scharlau).
- Agua ultra pura (Millipore).
- Alcohol polivinílico (PVA) (Sigma Aldrich).
- Albúmina de suero bovino conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA) (Sigma Aldrich).
- Gelatina de piel porcina (Sigma Aldrich).
- Alginato (Sigma Aldrich).
- Solución Salina amortiguada por Fosfatos (PBS, pH=7.4)

#### 3.2 Partículas de quitosano cargadas con FITC-BSA: preparación por el método de gelificación iónica

A continuación se describen los pasos llevados a cabo para la preparación, por la técnica de gelificación iónica, de partículas de quitosano cargadas con la proteína Albúmina de suero bovino (BSA).

- 1) Se prepararon 30 mL de solución de ácido acético al 1%, 30 mL de solución de quitosano al 0.5% y 6 mL de solución de TPP al 0.5%.
- 2) A la solución de TPP se le añadieron 6 mg de FITC-BSA.
- 3) Se filtró la solución de quitosano y se vertió en un matraz de tres bocas.
- 4) La solución de quitosano se agitó en un homogeneizador UltraTurrax a 10000 rpm.

- 5) Mientras la solución de quitosano se agitaba, se agregó gota a gota la solución de TPP con FITC-BSA de forma controlada mediante una bomba peristáltica (Figura 8).



**Figura 8.** Configuración experimental para la preparación de nanopartículas de quitosano.

- 6) Una vez añadida toda la solución de TPP con FITC-BSA, se dejó agitando durante 10 minutos más.
- 7) De la solución obtenida se tomaron 5 mL y se agregaron 10 mL de agua Milli Q en tubos para centrifugar.
- 8) Se agitó por 30 segundos en el vórtex para homogenizar.
- 9) Se centrifugó la solución resultante a 5000 rpm (Sigma 2-16P) por 20 minutos.
- 10) Se liofilizó el sobrenadante.

Las partículas de quitosano preparadas con este procedimiento (localizadas en el sobrenadante resultante de la centrifugación) fueron caracterizadas por microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y dispersión de luz. Dado que la molécula modelo (FITC-BSA) se añadió junto con el entrecruzante (TPP), se esperaba que las partículas resultaran cargadas con FITC-BSA; como se ve en el siguiente capítulo, esta hipótesis se corroboró. Sin embargo, cabe señalar que se dificultó la redispersión de las partículas con el procedimiento descrito. Por esta razón, se preparó el sistema con un procedimiento alternativo, siguiendo los mismos pasos hasta

el punto 9 de los párrafos precedentes, sin liofilizar el sobrenadante. Después de esto, se procedió de la siguiente manera:

1. El sobrenadante se utilizó para preparar partículas tal como se obtuvo después de centrifugar.
2. Una porción de la muestra del sobrenadante (10 mL) fue liofilizada para tener material suficiente para determinar la capacidad de carga (de FITC-BSA) de las partículas.
3. Se pesó el producto liofilizado (0.022 g).
4. Con el liofilizado se preparó una dispersión al 1% en 1 mL de solución de ácido acético al 1% y se agitó a 1000 rpm por agitación magnética.

### **3.2.1 Determinación de la capacidad de carga (CC) de BSA de las partículas**

La capacidad de carga (CC) de la proteína BSA por parte de las partículas de quitosano se define de la siguiente manera:

$$CC = \frac{C_{BSA}}{W_{ML}} \times 100\%$$

Donde CC es la capacidad de carga (en porcentaje de masa de BSA por masa de partículas de quitosano),  $C_{BSA}$  es la cantidad de BSA encapsulada (en mg/mL) y  $W_{ML}$  es la concentración de la muestra liofilizada (mg/mL).

La cantidad de proteína encapsulada ( $C_{BSA}$ ) se determinó estudiando la absorbancia de las muestras por espectrofotometría UV visible (UV-Vis). De hecho, la Ley de Beer-Lambert establece que hay una relación lineal entre absorbancia y concentración:  $A=ac+b$ , donde A es la absorbancia de la muestra y c la concentración de la sustancia de interés; a y b son parámetros de calibración que se obtienen previamente al medir muestras con concentración conocida.

Una vez encapsulada la molécula modelo (FITC-BSA) en las partículas, se determinó su capacidad de carga de la siguiente manera:

- 1) Se disolvieron 0.02 g de la muestra liofilizada de partículas en 2 mL de una solución de ácido acético al 1%. De esta forma, la concentración de partículas fue de 1 % (g por mL de solución).
- 2) La solución se sometió a agitación magnética por 26 horas aproximadamente.
- 3) La solución de partículas se analizó en el espectrofotómetro microvolumétrico NanoDrop para determinar su absorbancia; se utilizó como blanco o referencia la solución de ácido acético al 1%. Cabe hacer notar que para tener resultados confiables, el valor de la absorbancia no debe ser mayor a 1. Esto se debe a que en condiciones de alta absorbancia ocurre dispersión múltiple; la luz que logra pasar es casi nula y se confunde con el ruido de fondo. En un primer tiempo, las muestras resultaron con alta absorbancia. Por ello, se diluyó aún más el sistema (0.5 mL de esta solución en 5 mL de ácido acético al 1%) y se volvió a analizar. Los resultados se presentan en el capítulo siguiente.
- 4) Previamente se realizó la calibración del sistema, midiendo muestras de concentración conocida. Con esto, las constantes de la Ley de Beer-Lambert resultaron ser:  $a = 0.00514$  y  $b = -0.01467$  para absorbancias medidas a  $\lambda=280$  nm y  $a = 0.0482$  y  $b = 0.00841$  para absorbancias obtenidas a  $\lambda=495$  nm.
- 5) Debido a que el quitosano también contribuye a la absorbancia, se realizaron también mediciones en el espectrofotómetro pero usando como blanco la solución de quitosano al 0.5%.

### **3.2.2 Preparación de hidrogeles tipo sándwich con partículas de quitosano/FITC-BSA**

Una vez preparadas las partículas de quitosano cargadas con FITC-BSA, se procedió a preparar un sistema que permita controlar su liberación en aplicaciones. Para ello, se prepararon hidrogeles con capas alternadas de alginato/quitosano para retener partículas de quitosano/FITC-BSA; el procedimiento se realizó mediante la técnica capa por capa (*layer by layer* o LbL por sus siglas en inglés) utilizando el equipo *Spray Coater*. Los pasos seguidos fueron los siguientes:

- 1) Se rociaron alternadamente soluciones acuosas de alginato (Alg, 2.5 mg/mL, pH=3) y de quitosano (Chi, 1 mg/mL, pH=5) sobre portaobjetos de vidrio tratados con etanol, polietilenimina y agua. Con esto se consiguió una película multicapa constituida por 25 bicapas de Alg/Chi seguidas de una capa de Alg.
- 2) La gelatina compuesta se comenzó a preparar disolviendo gelatina de piel de cerdo a 40°C en una dispersión de la muestra de partículas durante una hora en constante agitación hasta una concentración final de 10% p/v de gelatina y 1 mg/mL de FITC-BSA.
- 3) Se depositaron 200 µL de dispersión de gelatina nanocompuesta sobre la película multicapa.
- 4) La muestra se mantuvo a 5°C durante 1 hora para gelificar el sistema.
- 5) Finalmente, se rociaron otras 25 bicapas de Alg/Chi sobre el sistema.

Con este procedimiento se consiguió un sistema compuesto de multicapas con las partículas de quitosano/FITC-BSA contenidas en el gel central. En la figura 9 se muestra un esquema del sistema.

- 6) La muestra se almacenó en el refrigerador durante 24 horas.
- 7) Una vez fuera del refrigerador, se dejó secar la muestra por 48 horas.



**Figura 9.** Esquema del hidrogel nanocompuesto tipo sándwich. Los círculos amarillos representan las partículas de quitosano/BSA.

Para los estudios de liberación realizados a 37°C, se prepararon cuatro “sándwiches” o películas multicapa de Alg/Chi con partículas de quitosano/FITC-BSA. Además, se prepararon geles disolviendo 0.2 g de gelatina en dos mililitros

- 4) Por cada 10  $\mu\text{L}$  de alícuota que se tomó, se agregaron otros 10  $\mu\text{L}$  de solución de PBS.
- 5) De los 10  $\mu\text{L}$  de cada alícuota, se usaron 2  $\mu\text{L}$  para analizar las muestras en el espectrofotómetro NanoDrop.
- 6) Se obtuvieron las absorbancias a  $\lambda=280\text{ nm}$  y  $\lambda=495\text{ nm}$  y posteriormente se hicieron cálculos de concentración, masa, porcentaje, etc. para graficar los datos en el programa informático Origin.

También se realizaron estudios de liberación atrapando en geles las partículas de quitosano/FITC-BSA preparadas sin liofilizar ( $37^{\circ}\text{C}$ ). A diferencia del anterior procedimiento, el nuevo se realizó por triplicado (3 geles y 3 sándwiches). Para llevar a cabo este estudio, el procedimiento fue el siguiente:

1. Se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  a los 10, 20, 30, 45 minutos y a 1, 1.5, 2, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 24 y 48 horas.
2. Una muestra de sándwich ("Sand 4") se utilizó para cuantificar la cantidad de FITC-BSA encapsulada, como se explica más adelante.
3. La muestra "Sand 4" se depositó en un vial y se le agregaron 0.64 mL (acorde con su masa que fue de 0.0064 g) de solución de ácido acético al 1%.
4. Esta muestra se puso en un baño a  $80^{\circ}\text{C}$ , bajo agitación magnética por aproximadamente 48 horas.
5. La muestra se analizó en el espectrofotómetro usando como blanco una solución de quitosano al 0.5%.
6. Se hicieron varias mediciones y al final se obtuvo un promedio de todas las absorbancias a 495 nm y se procedió al cálculo de la concentración para saber cuánta FITC-BSA había en total y así calcular cuánto de FITC-BSA hay en cada gel y cada sándwich.

### **3.3 Partículas de quitosano con y sin FITC-BSA: preparación por el método de microfluídica**

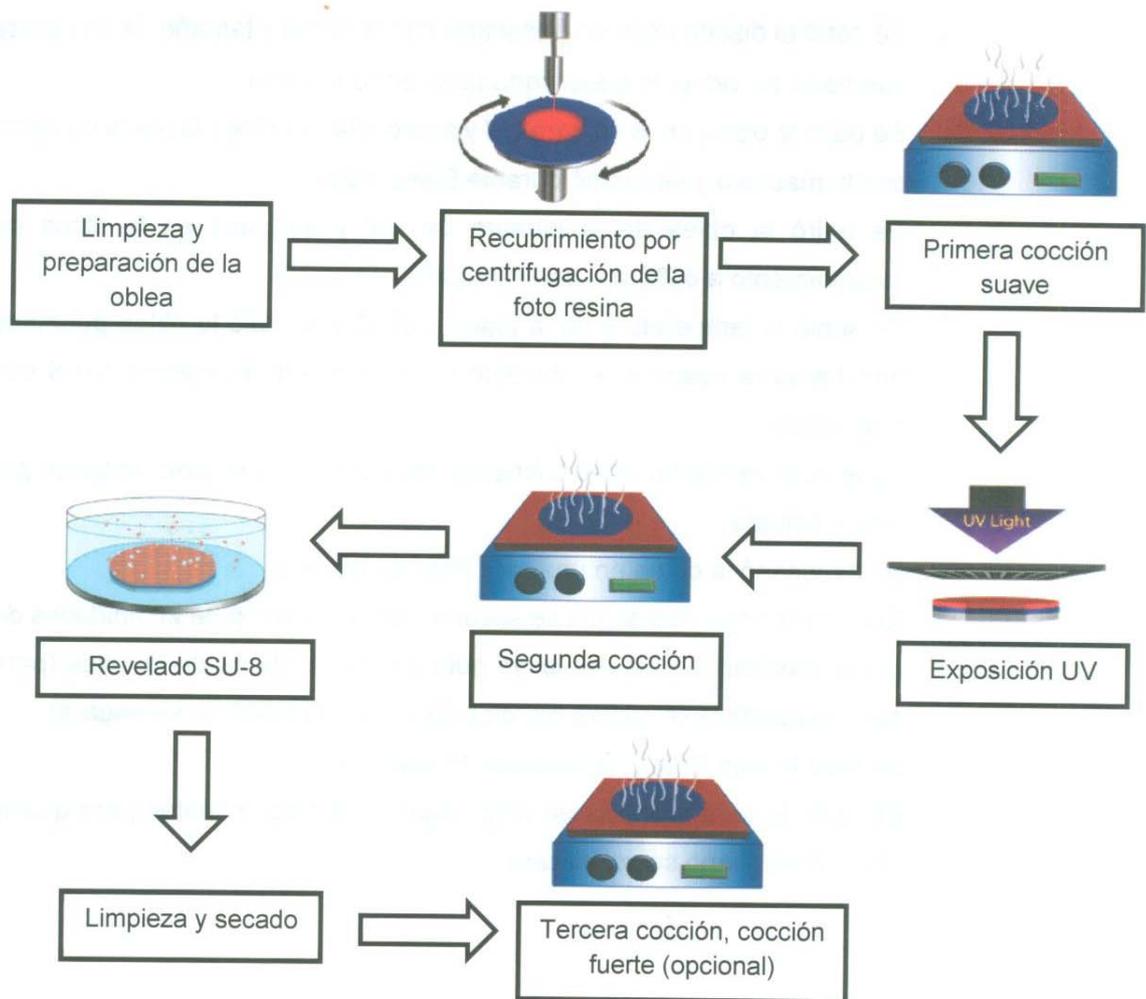
La primera etapa del experimental de microfluídica consistió en aprender a elaborar los dispositivos microfluídicos de polidimetilsiloxano (PDMS), los cuales

fueron elaborados en el Laboratorio de Biofísica de la Universidad de Sonora, siguiendo los pasos detallados a continuación:

1. Se realizó el diseño de la máscara en AUTOCAD (Figura 30-a).
2. Se imprimió la máscara sobre plástico de transparencias en negativo en una impresora de alta calidad, de resolución 3500 dpi. La máscara sirve para exponer una resina sensible a radiación UV con el objetivo de “grabar” la forma del diseño.
3. Se preparó el molde de la oblea siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del equipo disponible (*BlackHole Lab*), de acuerdo al diagrama general mostrado en la figura 11. El proceso inicia recubriendo una oblea de silicio con una resina sensible a la radiación ultravioleta: SU-8 2025. En la figura 11 se esquematiza el proceso, cuyos pasos fueron:
  - Se preparó la oblea de silicio limpiándola con acetona y luego con isopropanol; se secó con una pistola de aire.
  - Se colocó la oblea sobre una placa calentadora a 120°C y se dejó por 15 minutos.  
Para cubrir la oblea con una capa de fotorresina, se utilizó un recubridor por rotación (*spin coater*).
  - Se colocaron 5 mL de la resina SU-8 2025 sobre el centro de la oblea, la cual se colocó en el recubridor por rotación.
  - De acuerdo con el protocolo, las velocidades de rotación para los pasos inicial y final en el recubridor por rotación fueron las siguientes:
    - Paso inicial: 500 rpm, 10 s, 100 rpm/s.
    - Segundo paso: 1224 rpm, 30 s, 200 rpm/s.
  - Se dejó la oblea en el aparato durante unos minutos para que la resina se adhiriera bien.
  - Se calentó la placa de calentamiento a 65°C y se puso la oblea con la resina por dos minutos.
  - Se subió la temperatura de la placa a 95°C y se dejó la oblea por cinco minutos.

Una vez preparada la fotorresina en la oblea de silicio, se procedió a irradiarla con UV. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- Se cortó el diseño impreso (máscara) con la forma y tamaño de una pieza cuadrada de vidrio; la pieza cortada se pegó al vidrio.
- Se puso la oblea en la cámara UV y sobre ella se colocó la pieza de vidrio con la máscara y se irradió durante 9 segundos.
- Se retiró la oblea de la cámara de UV y se puso en la placa de calentamiento a 65°C por dos minutos.
- Se subió la temperatura de la placa a 95°C y se dejó la oblea por cinco minutos para evaporar el solvente y hacer que la fotorresina SU-8 sea más sólida.
- Se le puso revelador SU-8 cubriendo toda la oblea y se dejó agitando por cinco minutos.
- Se almacenó la oblea en una caja Petri de plástico.
- Con una jeringa de insulina se sacaron aproximadamente 20 unidades de clorotrimetilsilano y se distribuyó gota a gota alrededor de la oblea (para que la superficie se hiciera hidrofóbica y que el PDMS no se pegara).
- Se tapó la caja Petri y se dejó por 15 minutos.
- Se quitó la tapa y la caja se dejó abierta por cinco minutos para que el clorotrimetilsilano se volatilizara.



**Figura 11.** Diagrama del proceso de preparación de la oblea.

Una vez teniendo la oblea lista, se procedió a la elaboración del dispositivo de PDMS, de acuerdo al siguiente procedimiento:

4. Se preparó y vertió el PDMS, para ello:
  - Se pesaron en un vaso 80 g de PDMS (monómero) y 8 g de elastómero y se mezclaron hasta que cambió de color (a blanco).
  - Se introdujo el vaso con la mezcla en la cámara de vacío y se encendió la bomba.
  - Se reguló con la válvula de manera que no entrara aire, y ya que se empezaron a formar burbujas se abrió ligeramente la válvula para evitar que se derramara la mezcla.

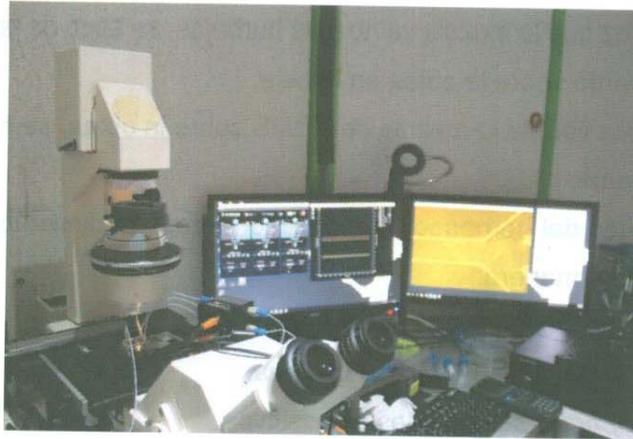
- Una vez que la mezcla ya no tuvo burbujas, se sacó de la cámara de vacío y se vertió sobre la oblea en la caja.
- 5. Una vez vertida la mezcla de PDMS sobre la oblea, se metió al horno por dos horas.
- 6. Después del horneado, se procedió al desprendimiento del PDMS de la siguiente manera:
  - Se cortó alrededor de la oblea con el bisturí.
  - Se desprendió el PDMS de la oblea.
- 7. Corte y perforación de los dispositivos.
  - Se cortaron los dispositivos con el bisturí y se perforaron las entradas y salidas de cada dispositivo.
- 8. Limpieza, montaje y sellado con plasma:

Una vez obtenidos los dispositivos de PDMS se procedió a montarlos sobre portaobjetos de vidrio y a sellarlos, de acuerdo a los siguientes pasos:

- Los dispositivos con sus respectivos portaobjetos se sometieron a baño ultrasónico con agua ultra pura en opción "degas" (desgasificar) por cinco minutos.
- Se secaron los dispositivos y los portaobjetos y se metieron al limpiador por plasma por dos minutos.
- Posteriormente se pusieron los dispositivos sobre los portaobjetos y se hizo presión para adherirlo.
- 9. Los dispositivos adheridos a los portaobjetos se metieron al horno por 15 minutos.
- 10. Finalmente, se procedió a validar el funcionamiento de los dispositivos contra fugas o taponeos de los microcanales, para lo cual se hicieron circular soluciones de colorantes vegetales por los canales.

El procedimiento para la preparación de partículas de quitosano con y sin FITC-BSA por microfluídica se describe a continuación:

1. Se montó el equipo de microfluídica adaptado al microscopio óptico (Figura 12).



**Figura 12.** Montaje del equipo de microfluídica adaptado al microscopio óptico. (En la pantalla derecha se aprecian los canales del diseño).

2. Se hicieron pruebas preliminares con agua en los canales.
3. Una vez asegurado que el equipo estuviera funcionando bien, se pusieron las soluciones:
  - **Canal 1:** Solución de TPP 0.5%
  - **Canal 2:** Solución de PVA 1%
  - **Canal 3:** Solución de Quitosano 0.5%
4. Los valores de flujo programados fueron:
  - **Canal 1:** 4.16  $\mu\text{L}/\text{min}$
  - **Canal 2:** 11.66  $\mu\text{L}/\text{min}$
  - **Canal 3:** 8.33  $\mu\text{L}/\text{min}$
5. Cabe decir que el sistema no permite fijar completamente el valor de los flujos; éstos fluctúan a partir de los valores programados, probablemente debido a caídas de presión inherentes al equipo. Se observó que conforme pasaba el tiempo los valores de los flujos iban bajando, por lo tanto se aumentó el valor de las presiones hasta que coincidieran más o menos con los valores de flujo deseados.
6. Después de aumentar las presiones, los flujos fueron los siguientes:
  - **Canal 1:** 4.16  $\mu\text{L}/\text{min}$
  - **Canal 2:** 11.54-11.91  $\mu\text{L}/\text{min}$
  - **Canal 3:** 1.58-1.75  $\mu\text{L}/\text{min}$
7. Después de mantener los flujos así por 10 minutos, se tomó la primera muestra ("CS/PVA 1").

8. Después de otros 10 minutos, los valores de los flujos siguen siendo los mismos y se tomó otra muestra ("CS/PVA 2").
9. Se cambió la solución de TPP por una de TPP con BSA.
10. Se tomaron muestras cada 15 minutos y las primeras dos salieron transparentes, hasta la tercera la muestra empezó a salir con color amarillo y desde ahí se empezaron a tomar en cuenta.
11. La primera muestra ("CS/PVA/BSA 1) se obtuvo con los siguientes valores de flujo:
  - **Canal 1:** 4.06  $\mu\text{L}/\text{min}$
  - **Canal 2:** 9.19  $\mu\text{L}/\text{min}$
  - **Canal 3:** 7.47  $\mu\text{L}/\text{min}$
12. La segunda muestra (CS/PVA/BSA 2) se tomó a los 15 minutos después de la primera muestra y la tercera muestra (CS/PVA/BSA 3) se tomó después de otros 15 minutos, a los siguientes valores de flujo:
  - **Canal 1:** 5.37  $\mu\text{L}/\text{min}$
  - **Canal 2:** 8.99  $\mu\text{L}/\text{min}$
  - **Canal 3:** 5.37  $\mu\text{L}/\text{min}$
13. Después de la tercera muestra, se terminó el experimento.

### **3.4 Caracterización de nanopartículas de quitosano**

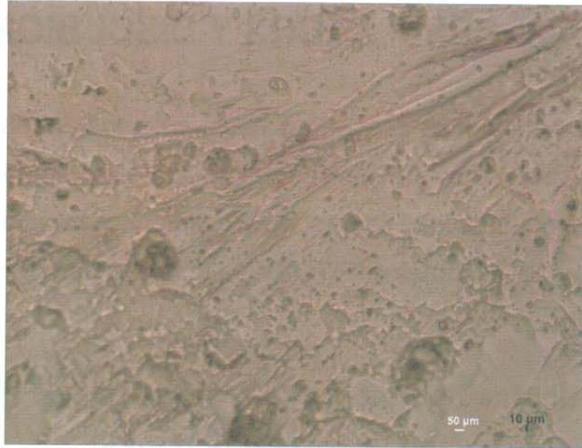
Las partículas de quitosano preparadas por gelificación iónica se caracterizaron por diferentes técnicas como microscopía óptica, dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de barrido; mientras que las partículas preparadas por microfluídica se caracterizaron solamente por microscopía electrónica de barrido.

Antes de la microscopía electrónica, se observaron las muestras en el microscopio óptico (Nikon Eclipse E400) y en el microscopio óptico con fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-s).

Se observaron las partículas de CS/BSA preparadas por gelificación iónica y por microfluídica por SEM UHR (Hitachi SU 8000).

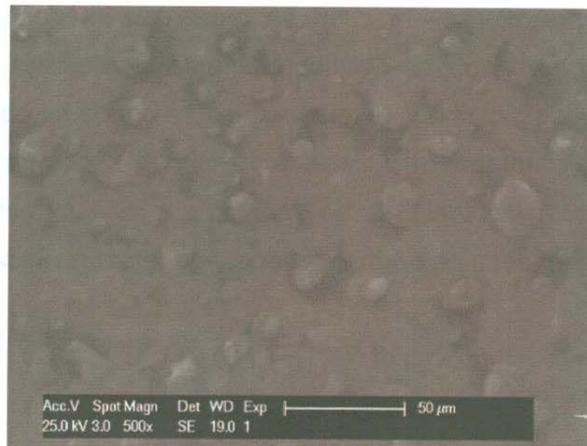
Para analizar por dispersión dinámica de luz (Malvern, Nano ZS), las muestras se trataron de la siguiente manera: se tomaron 10 gotas del precipitado y se

añadieron a 1 mL de solución de ácido acético 1% y lo mismo se hizo para 1 mL de agua y 1 mL de solución de PBS y posteriormente se filtraron dichas muestras y se depositaron en celdas de poliestireno para meterlas al equipo.



**Figura 13.** Muestra proveniente del sobrenadante sin liofilizar, observado por microscopía óptica. Nótese los grandes agregados, así como estructuras en forma de fibras.

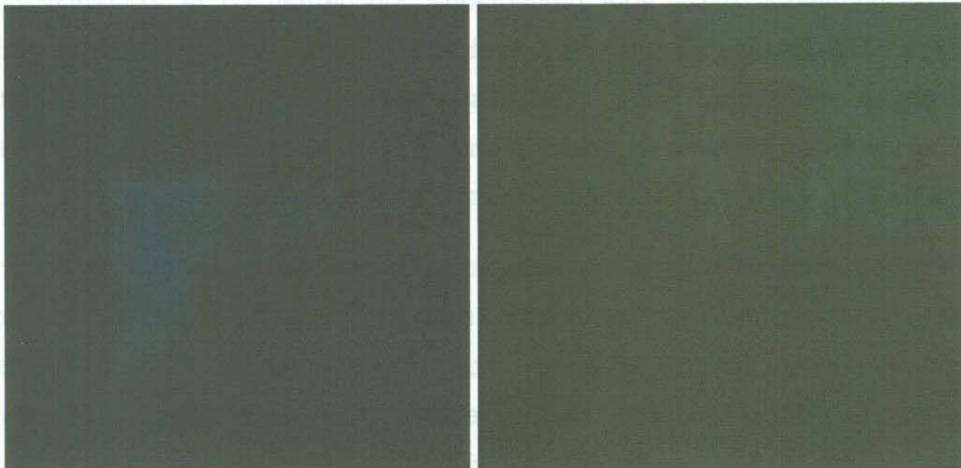
Cuando la misma muestra se observa por microscopía electrónica de barrido (figura 14) se aprecia una gran cantidad de agregados semiesféricos de diámetros mayores a 100 micras. También se pueden apreciar agregados de tamaño considerablemente menor. La diferencia entre lo observado por microscopía óptica y microscopía electrónica se debe a la preparación de la muestra en SEM. Esto es, los agregados son más o menos indetectables mediante la luz visible (microscopía óptica); sin embargo, para estudiar el sistema con SEM, la muestra se recubre con una capa delgada metálica, procedimiento que hace detectable la morfología de la muestra y por tanto los agregados.



**Figura 14.** Muestra proveniente del sobrenadante sin liofilizar, observado por microscopía electrónica de barrido. Nótese la presencia de agregados grandes (micropartículas de quitosano). La barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

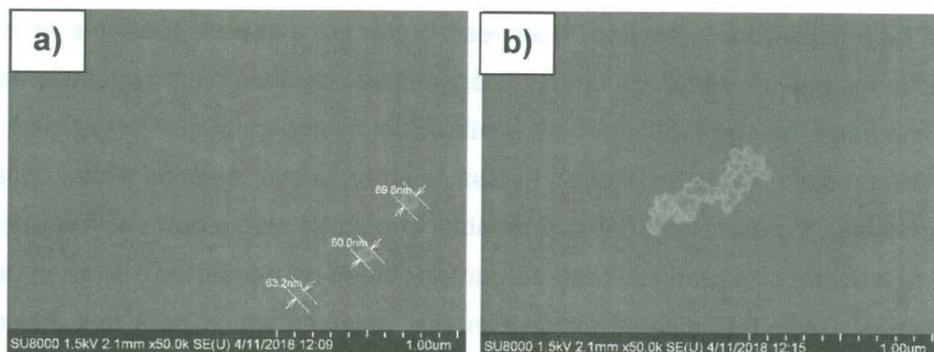
La naturaleza de los agregados se estudió además observando la muestra mediante microscopía óptica de fluorescencia (figura 15). En este caso se buscó aprovechar el hecho de que la proteína FITC-BSA es fluorescente. De hecho, presenta un máximo de emisión alrededor de 515 nm (verde) cuando se excita a 495 nm (frontera entre el azul y el verde).

En la figura 15 se presentan dos imágenes de microscopía de fluorescencia; en el lado izquierdo, la excitación se realizó con luz azul, mientras que en el derecho fue con luz verde. En ambas imágenes se observan patrones similares. Por una parte, hay un fondo tenue y continuo del mismo color que la excitación (azul en un caso, verde en el otro), el cual se atribuye a la reflexión difusa de la luz incidente. Pero por otra parte, en ambas imágenes se pueden observar por toda la muestra una gran cantidad de puntos verdes de diámetros del orden de 10 micras. Dado que dichos puntos tienen el color esperado para la emisión fluorescente de la FITC-BSA, se atribuye su existencia a la presencia de dicha proteína. Esto es, cada punto corresponde a una partícula (o a un aglomerado de partículas) de gel de quitosano. De esta forma, la microscopía óptica de fluorescencia nos revela la existencia de agregados, cargados con FITC-BSA, no visibles con la microscopía convencional.



**Figura 15.** Muestra proveniente del sobrenadante sin liofilizar, observado por microscopía óptica de fluorescencia. En la figura de la izquierda, la excitación se realizó con luz azul; en la derecha con luz verde. Los puntos verdes aparecen debido a la emisión de la proteína BSA encapsulada en partículas de quitosano.

Finalmente, en la figura 16 se presentan imágenes de SEM de la misma muestra, pero con una resolución más alta. Como se puede apreciar, en el sistema existen partículas esféricas de diámetros del orden entre 60 y 90 nm (Figura 16-a). En ocasiones, dichas esferas se aglomeran y aparecen agregados amorfos más grandes (Figura 16-b).

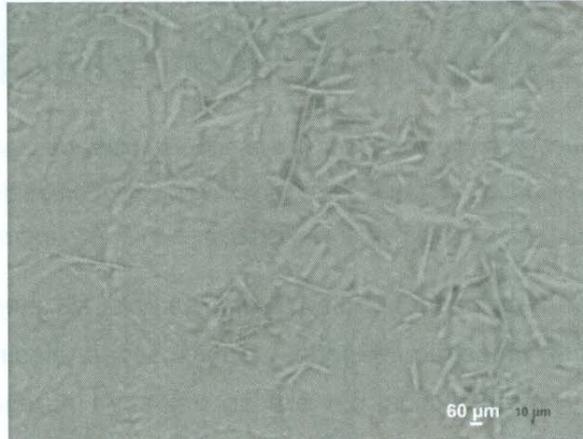


**Figura 16.** Muestra proveniente del sobrenadante sin liofilizar, observado por microscopía electrónica de barrido a más alta resolución. Las partículas observadas tienen diámetros entre 60 y 90 nm (a); en ocasiones, las partículas aparecen aglomeradas (b). La longitud total de la escala correspondiente a 1  $\mu$ m.

Los resultados hasta aquí presentados concuerdan en la existencia de agregados en la muestra obtenida del sobrenadante en nuestras preparaciones por gelificación iónica. Tales agregados (partículas de quitosano) presentan diámetros en un intervalo aproximado entre 0.06 y 10 micras. Más aún, existe proteína FITC-BSA encapsulada en las partículas de quitosano.

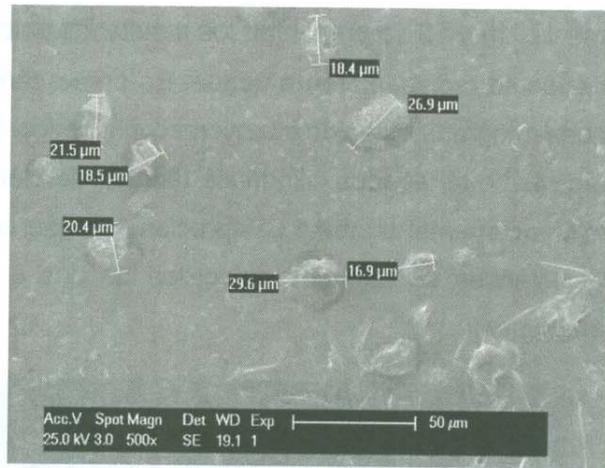
Como se comentó anteriormente, las muestras de sobrenadante fueron liofilizadas con el fin de almacenarlas en seco y dispersarlas de nuevo después en diferentes solventes. Se presenta a continuación el análisis de las muestras que, después de ser liofilizadas, fueron dispersadas en tres solventes diferentes: agua, solución de ácido acético y la solución amortiguadora PBS.

En las figuras 17, 18 y 19 se presentan los resultados obtenidos cuando las muestras liofilizadas se redispersaron en agua. En primer término, en la figura 17 se presenta una fotografía obtenida por microscopía óptica. En ella se pueden apreciar muy fácilmente agregados cilíndricos (fibras), de diámetros entre 20 y 50 micras, aproximadamente; también se aprecian, aunque con menor nitidez, agregados cuasiesféricos de tamaños del orden de dos o tres decenas de micras, aproximadamente.



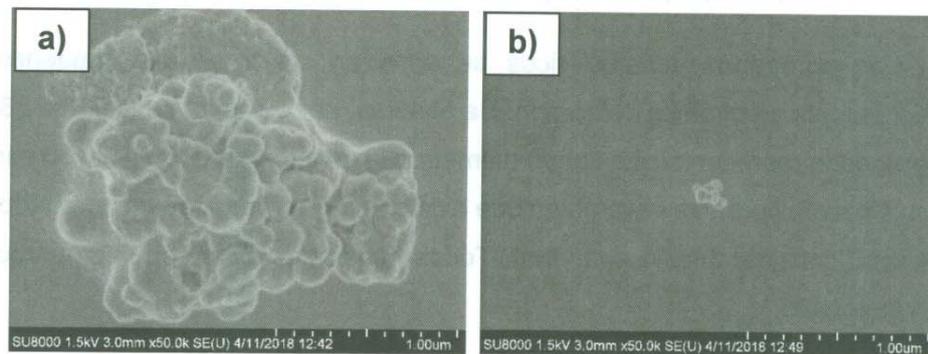
**Figura 17.** Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en agua, observado por microscopía óptica. Nótese la presencia de estructuras en forma de fibras, así como de algunos agregados.

Los agregados cuasiesféricos se aprecian mejor en las imágenes de microscopía electrónica de barrido. Se observa, por ejemplo, en la figura 18 que agregados representativos tienen diámetros en el intervalo entre 15 y 30 micras. En la misma figura se ve también que existe una gran cantidad de agregados de tamaño considerablemente menor. Todos esos agregados son micropartículas de quitosano.



**Figura 18.** Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en agua, observado por microscopía electrónica de barrido. Los diámetros de agregados representativos están en el intervalo entre 15 y 30 micras.

Los agregados más pequeños se pueden apreciar de mejor manera en la figura 19, donde se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido tomadas con mayor resolución. En ella se muestran agregados típicos, de dimensiones en el intervalo entre 0.5 y 2 micras. Es de remarcarse que estos objetos pequeños, consisten efectivamente de partículas aglomeradas en las forma de racimos.

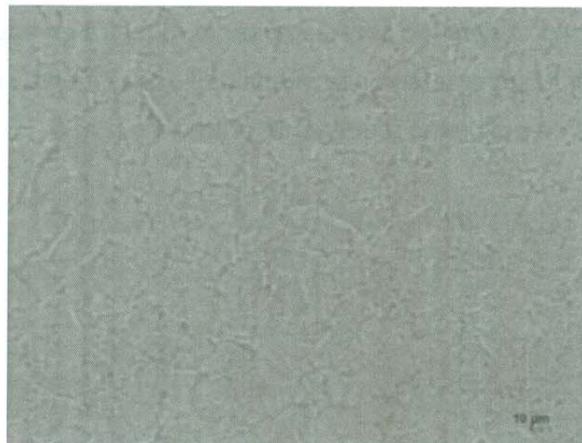


**Figura 19.** Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en agua, observado por microscopía electrónica de barrido. Nótese la presencia de pequeñas partículas aglutinadas en aglomerados.

Los resultados presentados hasta el momento, tanto para el sobrenadante estudiado tal como resulta del método de gelificación iónica como para la muestra redispersada en agua después de liofilizar, son bastante similares. La diferencia principal es que en el segundo caso hay más tendencia a formar agregados cilíndricos bien definidos (comparar figuras 13 y 17). Se pasa ahora a describir los resultados obtenidos al redispersar el sobrenadante en otros solventes.

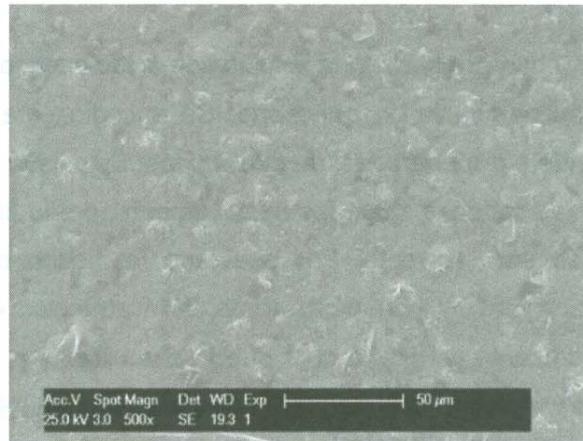
En el primer caso se utilizó una solución de ácido acético en agua al 1 % para redispersar las partículas de quitosano. Se escogió este solvente porque el quitosano tiende a protonarse en medios ácidos. Esto lleva a una repulsión más intensa entre las cadenas cargadas positivamente, por lo cual esta biomolécula se disuelve en este solvente. Por otro lado, el hecho de que el grado de protonación sea mayor, incrementa también la atracción electrostática con el agente entrecruzante (TPP), lo cual puede estabilizar de mejor manera a los agregados de quitosano. Los resultados se presentan en las figuras 20, 21 y 22.

Las imágenes de microscopía óptica revelan una textura similar a la de un arreglo denso de estructuras poligonales con algunos cilindros intercalados (figura 20). La interpretación de esta imagen se dificulta debido al bajo contraste mencionado anteriormente, aunque es notoria la ausencia de estructuras en forma cilíndrica, como las encontradas al redispersar la muestra en agua (figura 17).



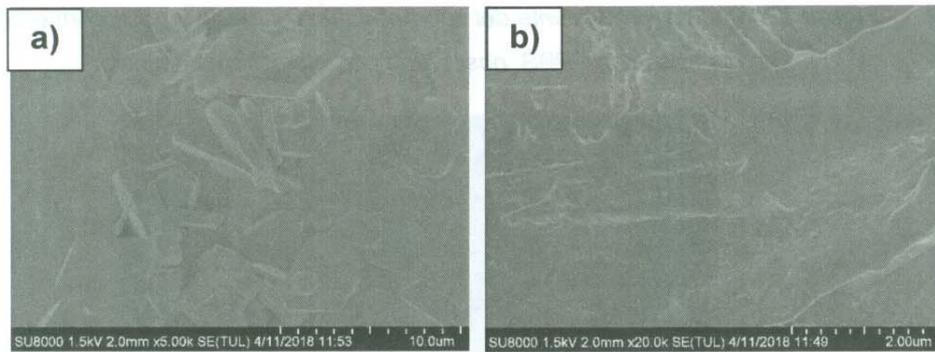
**Figura 20.** Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en una solución acuosa de ácido acético al 1 %, observada por microscopía óptica.

Cuando la muestra se observa en el microscopio electrónico de barrido se aprecia la existencia de una gran cantidad de agregados de diámetros entre 10 y 20 micras, aproximadamente (Figura 21).



**Figura 21.** Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en la solución de ácido acético, observada por microscopía electrónica de barrido.

Al estudiar las muestras con mayor resolución se observa que existen también agregados de caras relativamente regulares en la escala de una a cinco micras (figura 22). La forma de dichos agregados sugiere un proceso de cristalización, no observado al redispersar la muestra en agua, y probablemente provocado por el incremento en la intensidad de las fuerzas electrostáticas entre las moléculas de quitosano y el agente entrecruzante.



**Figura 22.** Muestra proveniente del sobrenadante liofilizado y posteriormente redispersado en agua, observado por microscopía electrónica de barrido. Nótese la presencia de pequeñas partículas aglutinadas en aglomerados.

Finalmente, la muestra liofilizada fue también redispersada en la solución amortiguadora PBS con el fin de hacer experimentos preliminares para estudiar la estabilidad de las partículas ante un  $\text{pH} = 7.4$ . En estas condiciones es de esperarse que el quitosano pierda su grado de protonación y que las partículas no sean estables. De hecho, los resultados obtenidos en este trabajo ponen en evidencia la ausencia de agregados similares a los descritos anteriormente. En las figuras 23 y 24 se muestran algunos de los pocos agregados observados por microscopía óptica y electrónica, respectivamente. Los resultados pueden ser considerados negativos en cuanto a la presencia de partículas de quitosano; sin embargo, se considera que es necesario realizar más experimentos de manera sistemática con este solvente para poder ser más concluyentes.



**Tabla 2. Diámetro promedio y polidispersidad de las partículas de quitosano cargadas con FITC-BSA.**

<b>Solvente de redispersión</b>	<b>Diámetro Promedio (nm)</b>	<b>Polidispersidad</b>
Agua	657.3	1
Solución de ácido acético al 1%	571.1	1
PBS	297.9	0.708

Estos resultados de DLS deben tomarse como una mera aproximación cualitativa debido a que la luz proveniente de la fluorescencia intrínseca de la proteína FITC-BSA necesariamente interfiere con la luz dispersada. En otra etapa de este proyecto sería conveniente repetir los experimentos de DLS con partículas de quitosano sin cargar con la proteína FITC-BSA.

Una vez mostrada la factibilidad de preparar partículas de quitosano mediante el método de gelificación iónica, se procedió a preparar un sistema diseñado para contener dichas partículas y conseguir la liberación controlada de la molécula modelo encapsulada. Los resultados se presentan en la sección siguiente.

#### **4.1.1 Determinación de la capacidad de carga (CC) de FITC-BSA en las partículas de quitosano**

Para determinar la cantidad de la molécula modelo encapsulada en las partículas de quitosano, se siguió el procedimiento descrito en la sección 3.2.1 para aplicar la Ley de Beer-Lambert. Los valores de absorbancia de la solución de partículas fueron 0.24 y 0.15 para longitudes de onda de 280 nm y 495 nm, respectivamente. Como referencia se usó la solución de ácido acético al 1%.

Utilizando la Ley de Beer-Lambert ( $A = ac + b$ ), con los valores de las constantes de calibración determinados previamente, se obtuvo la concentración de FITC-BSA:  $c = 49.546 \mu\text{g/mL}$  para  $\lambda=280 \text{ nm}$  y  $c = 29.375 \mu\text{g/mL}$  para  $\lambda=495 \text{ nm}$ . Recordando que la muestra fue diluida para obtener mejores valores

de absorbancia, las concentraciones obtenidas se multiplicaron por 11, que fue el factor de dilución, obteniendo concentraciones de  $574.38 \frac{\mu g}{mL} = 0.574 \text{ mg/mL}$  para  $\lambda=280 \text{ nm}$  y de  $323.125 \frac{\mu g}{mL} = 0.323 \text{ mg/mL}$  para  $\lambda=495 \text{ nm}$ .

Con las concentraciones calculadas, se puede proceder a calcular la capacidad de carga. Dado que se tomaron 0.02 g de sobrenadante liofilizado para dispersarlos en 2 mL de solución de ácido acético 1%, la concentración de partículas en solución fue de 10 mg/mL. Entonces la capacidad de carga obtenida para las absorbancias medidas a  $\lambda=280 \text{ nm}$  y  $\lambda=495 \text{ nm}$  fueron, respectivamente:

$$CC_{280} = \frac{C_{BSA}}{W_{ML}} \times 100\% = \frac{0.574 \text{ mg/ml}}{10 \text{ mg/ml}} \times 100\% = 5.74\%$$

$$CC_{495} = \frac{C_{BSA}}{W_{ML}} \times 100\% = \frac{0.323 \text{ mg/ml}}{10 \text{ mg/ml}} \times 100\% = 3.23\%$$

Los valores obtenidos resultaron similares. Las diferencias son una indicación de que el error experimental es del orden de 1-1.5%.

Con un procedimiento semejante al descrito anteriormente, aunque solamente midiendo varias veces y promediando la absorbancia a 495 nm ( $A_{495}=0.35$ ), se calculó la cantidad de proteína FITC-BSA encapsulada en los sistemas compuestos descritos en el capítulo 3: geles de proteína de piel de cerdo y sándwiches compuestos de capas de alginato/quitosano. En la tabla 3 se presenta un resumen de los resultados.

**Tabla 3. Resultados de cantidad de FITC-BSA contenida en cada muestra de geles y sándwiches.**

Muestra	Peso de la muestra (µg)	Cantidad de BSA en la muestra (µg)
Gel 1	17300	122.58
Gel 2	19500	138.17
Gel 3	13200	93.53
Sándwich 1	6900	48.89
Sándwich 2	7600	53.85

Sándwich 3	5800	41.09
Sándwich 4	6400	45.35

#### 4.1.2 Estudios de liberación a 20°C y 37°C

Se realizaron estudios de liberación de la FITC-BSA a 20°C y 37°C para los hidrogeles de Alg/Chi conteniendo partículas de quitosano.

A los geles se les llamó 'A' (uno a 20°C y otro a 37°C) y a los filmes 'B' (20°C) y 'C' (37°C).

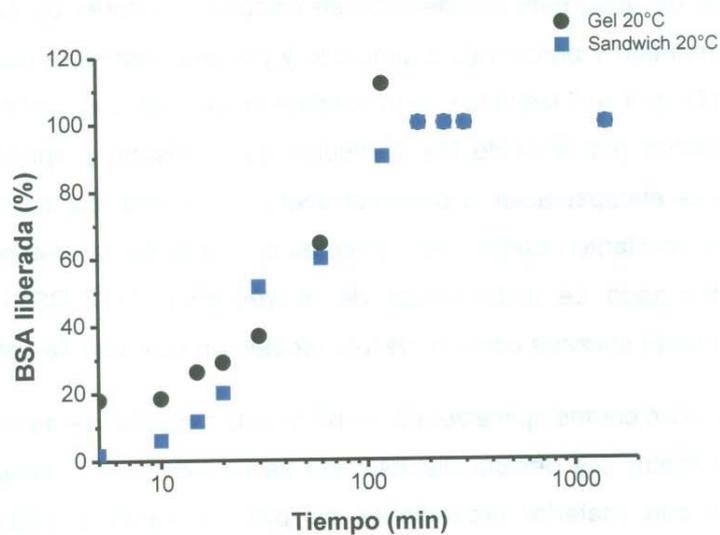
Las alícuotas tomadas se analizaron en el espectrofotómetro NanoDrop y con los valores de absorbancia obtenidos se calcularon valores de concentración, masa, porcentaje y porcentaje acumulado y posteriormente se graficaron en el programa OriginPro 8 los datos de porcentaje acumulado con respecto al tiempo. Una aplicación potencial de las partículas de quitosano preparadas en este trabajo es la encapsulación y posterior liberación controlada de fármacos. Por esta razón se planteó cargar las partículas con la proteína albúmina de suero bovino conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA), la cual es frecuentemente utilizada como molécula modelo en este tipo de estudios.

Dado que en ciertas aplicaciones las partículas cargadas se asientan a su vez en alguna matriz, se decidió distribuir las partículas en el volumen de un gel preparado con material proveniente de piel de cerdo (fundamentalmente colágeno). Este tipo de gelatina es muy usual porque tiene propiedades termosensibles: funde a 35 °C y por lo tanto permite liberar su contenido a esa temperatura, muy apropiada para la liberación en condiciones fisiológicas.

Además de encapsular las partículas de quitosano (cargadas a su vez con FITC-BSA) en estas gelatinas, se estudió un sistema multicapa, donde la gelatina cargada se colocó en el centro, recubriéndola por ambos lados por una sucesión de capas alternadas de quitosano y alginato. De esta forma, tenemos resultados de la liberación de FITC-BSA para dos tipos de sistemas: la gelatina o simplemente "geles" y los "sándwiches" multicapa.

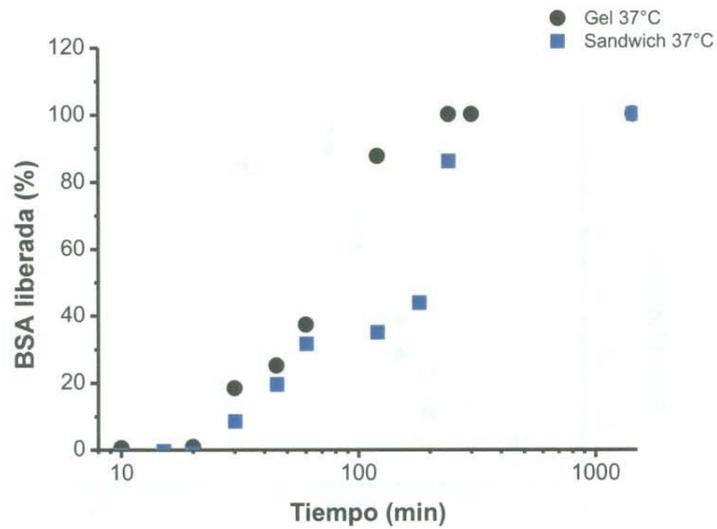
A continuación se presentan los resultados obtenidos, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.3. Cabe señalar que se trata de experimentos preliminares en esta etapa del proyecto. Más que hacer un estudio cuantitativo y sistemático, la intención de este trabajo fue probar la posibilidad de preparar tales sistemas y de seguir la liberación de FITC-BSA y tener una idea de los tiempos característicos.

En la figura 25 se presentan curvas de liberación en función el tiempo tanto para un sistema gel como para un sándwich multicapa, mantenidos a 20 °C. Es de notarse que las curvas son cualitativamente similares. La liberación ocurre en un tiempo del orden de 120 minutos.



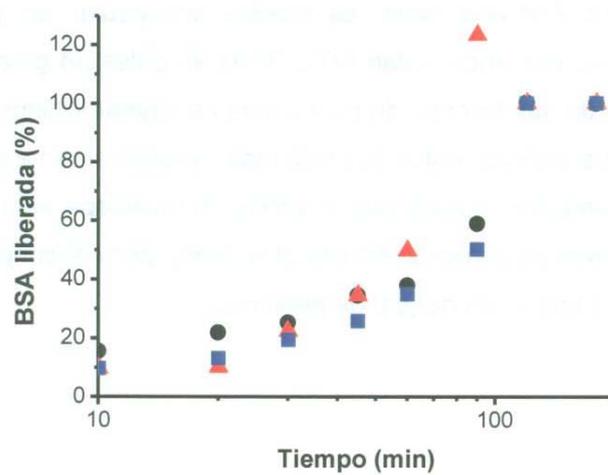
**Figura 25.** Curva de liberación de FITC-BSA de un gel y de un sándwich multicapa a 20°C.

En la figura 26 se presentan curvas de liberación para ambos sistemas pero ahora mantenidos a 37 °C. De nueva cuenta las curvas son cualitativamente similares entre sí. La liberación ocurre en un tiempo del orden de 240 minutos.

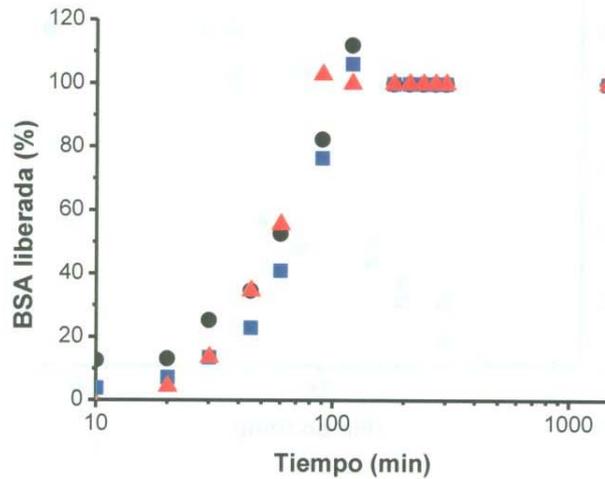


**Figura 26.** Curva de liberación de FITC-BSA de un gel y de un sándwich multicapa a 37°C.

Al repetir los experimentos, los resultados se reproducen, dentro de los márgenes del error experimental. Por ejemplo, en las figuras 27 y 28 se muestran los resultados de tres repeticiones tanto para los geles, como para los sándwiches multicapa, respectivamente.



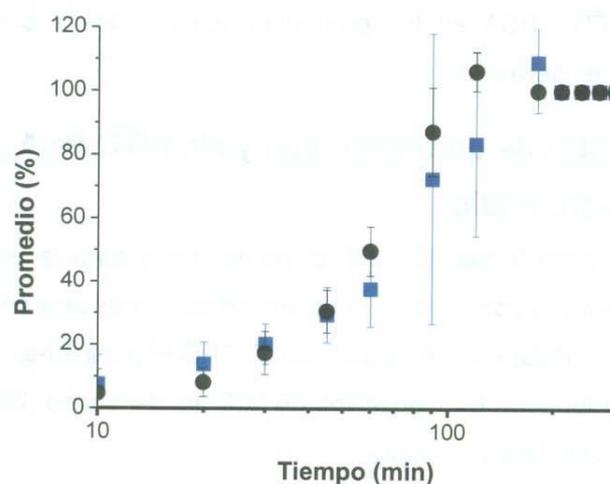
**Figura 27.** Curva de liberación de FITC-BSA de los geles a 37°C.



**Figura 28.** Curva de liberación de FITC-BSA de los sándwiches multicapa a 37°C.

En la figura 29 se graficó el promedio de los valores obtenidos respectivamente para los tres geles y para los tres sándwiches, para los experimentos realizados a 37°C. Se observa nuevamente que dentro de los márgenes experimentales, la tasa de liberación del gel solo y del gel atrapado entre las multicapas del alginato/quitosano tiene la misma dependencia temporal.

Las conclusiones parciales que se pueden obtener de estos resultados son las siguientes. Por una parte, es posible encapsular las partículas de quitosano (que a su vez encapsulan FITC-BSA) en geles de gelatina simple o contenidos dentro de sándwiches de multicapas de alginato/quitosano. Por otra parte, la tasa de liberación de estos dos sistemas es relativamente similar, lo cual es un resultado alentador, puesto que el sándwich multicapa se incorpora para dar mayor resistencia mecánica y térmica al sistema, pero el conjunto presenta las propiedades de liberación del gel de gelatina.



**Figura 29.** Curvas de liberación promedio para tres geles y tres sándwiches multicapa. Los experimentos se realizaron a 37 °C.

Se observaron comportamientos distintos entre el gel y el sándwich, al principio fue más rápida la liberación del gel y la del sándwich más lenta. Después se revirtió la situación y el sándwich liberó todo a las dos horas y el gel a las dos horas y media.

Después de las dos horas y media se tuvo toda la liberación de ambas muestras.

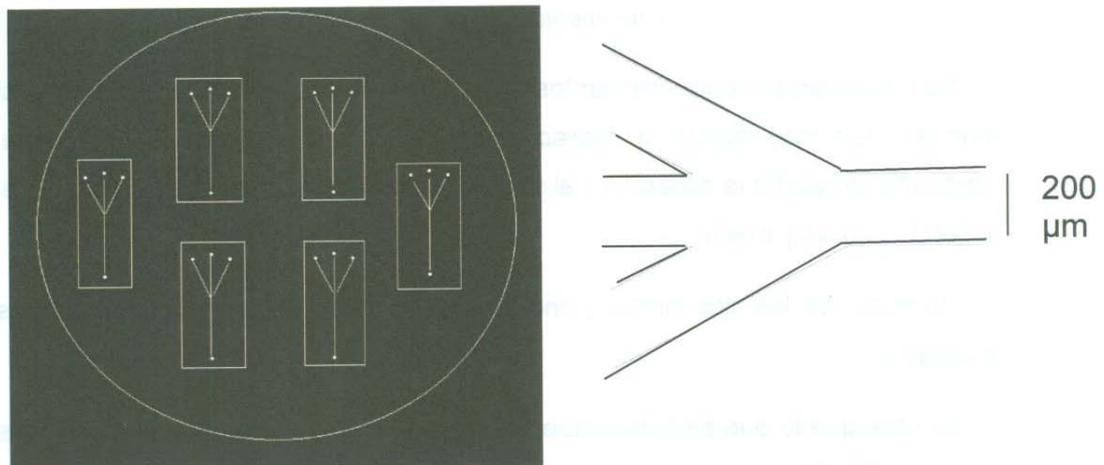
Se cree que lo que se estuvo liberando en realidad fueron las nanopartículas con la FITC-BSA y no sólo dicha molécula. Comparando con otro estudio de liberación realizado a hidrogeles tipo sándwich sin partículas de quitosano, se observó que la liberación fue más rápida, a los 40 minutos ya se había liberado toda y en las muestras de gel y sándwich con partículas tardó entre dos y horas y media en liberar todo.

Es posible que la liberación de la molécula modelo sólo sea más rápida que la de las partículas con la molécula debido a que la FITC-BSA sola no tiene interacciones y con las nanopartículas hay interacciones muy fuertes entre el quitosano y la FITC-BSA debido a sus cargas eléctricas opuestas, y también hay interacciones entre el quitosano y la gelatina, por lo tanto se tarda más en liberar.

Respecto a la liberación en membranas de diálisis, donde se observaba la liberación de la FITC-BSA en las partículas solas, a los 7 días aún no se observaba nada de liberación.

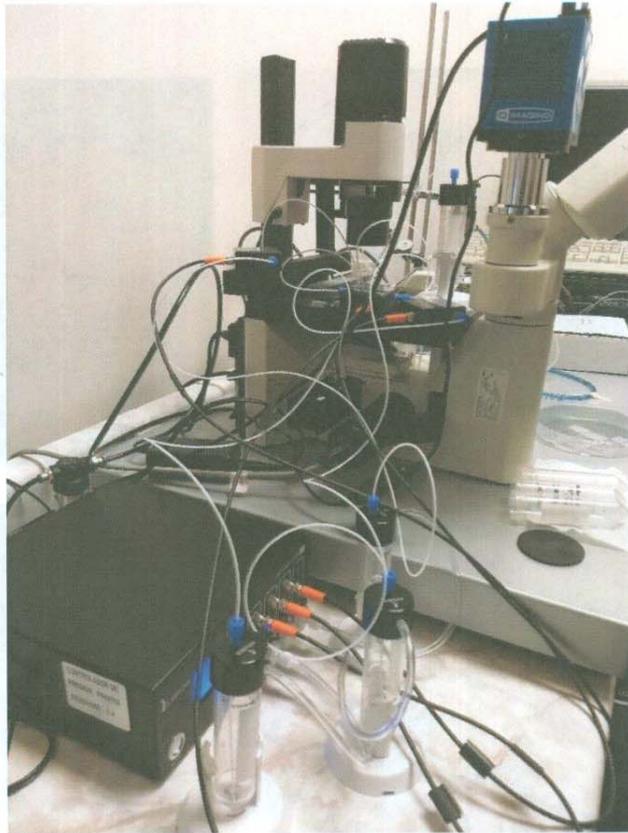
#### 4.2 Partículas de quitosano con y sin FITC-BSA preparadas por microfluídica

Como se indicó en la sección 3.3, el primer paso para la elaboración del dispositivo microfluídico consistió en la obtención de la máscara con el diseño de los microcanales. El diseño se realizó en AUTOCAD (Figura 30-a), donde en una sola máscara se dibujaron 6 dispositivos de 200  $\mu\text{m}$  de ancho, 22 mm de largo (total) (Figura 30-b) y 8 mm de altura.

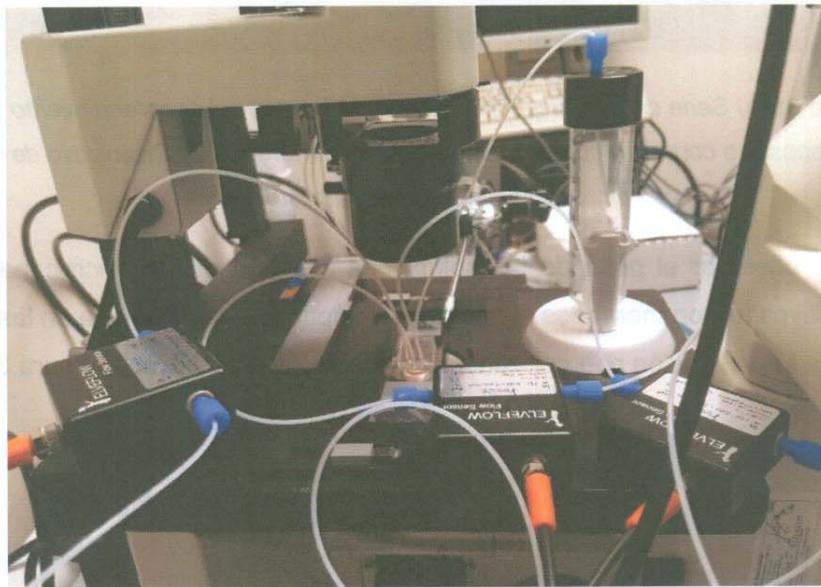


**Figura 30.** a) Diseño de la máscara en AUTOCAD para un dispositivo en forma de Y con tres entradas y una salida. b) Diagrama del dispositivo de PDMS con las dimensiones de los microcanales.

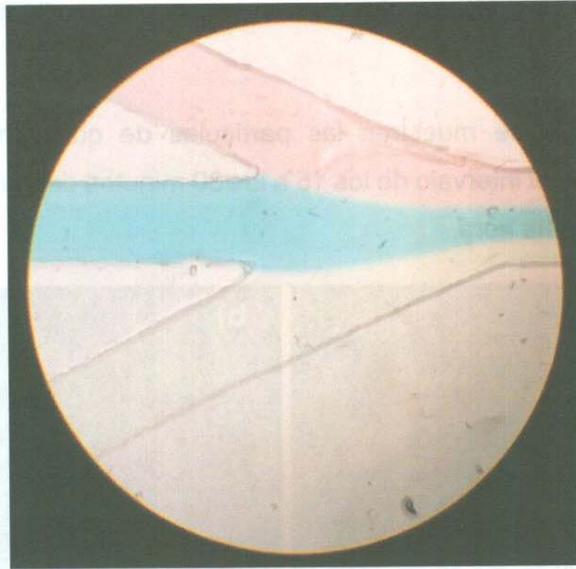
En la figura 31-a se muestra una serie de 6 dispositivos obtenidos, los cuales fueron cortados para obtener los dispositivos de manera individual, y perforados a nivel de las entradas y salidas de los microcanales, como se muestra en la figura 31-b. En la figura 31-c se muestra ya un dispositivo montado sobre el equipo de microfluídica para primeramente ser validado ante fugas y taponeos de los microcanales. Una vez validados, los dispositivos pueden ser utilizados para la preparación de partículas.



**Figura 32.** Montaje del equipo de microfluídica en el microscopio óptico.



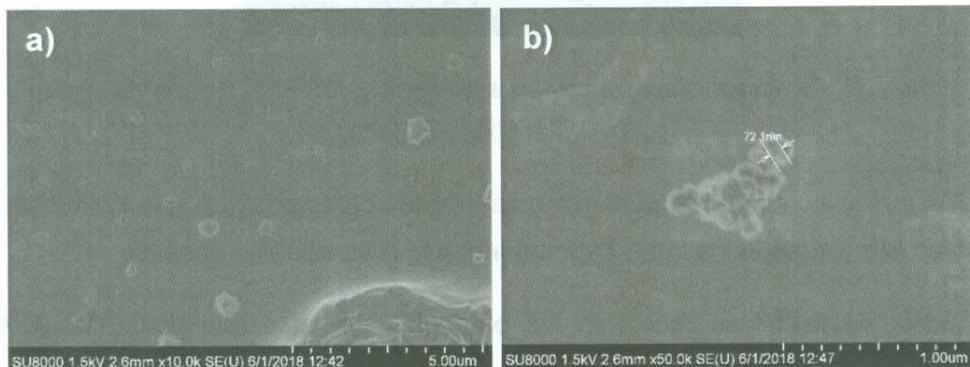
**Figura 33.** Dispositivo de PDMS adaptado al microscopio óptico.



**Figura 34.** Validación del dispositivo con colorantes vegetales.

#### 4.2.1 Caracterización de partículas de quitosano con y sin FITC-BSA por microfluídica

En la figura 35 se muestran las partículas de quitosano sin FITC-BSA obtenidas en los primeros 15 minutos, después de dejar correr el sistema por media hora.

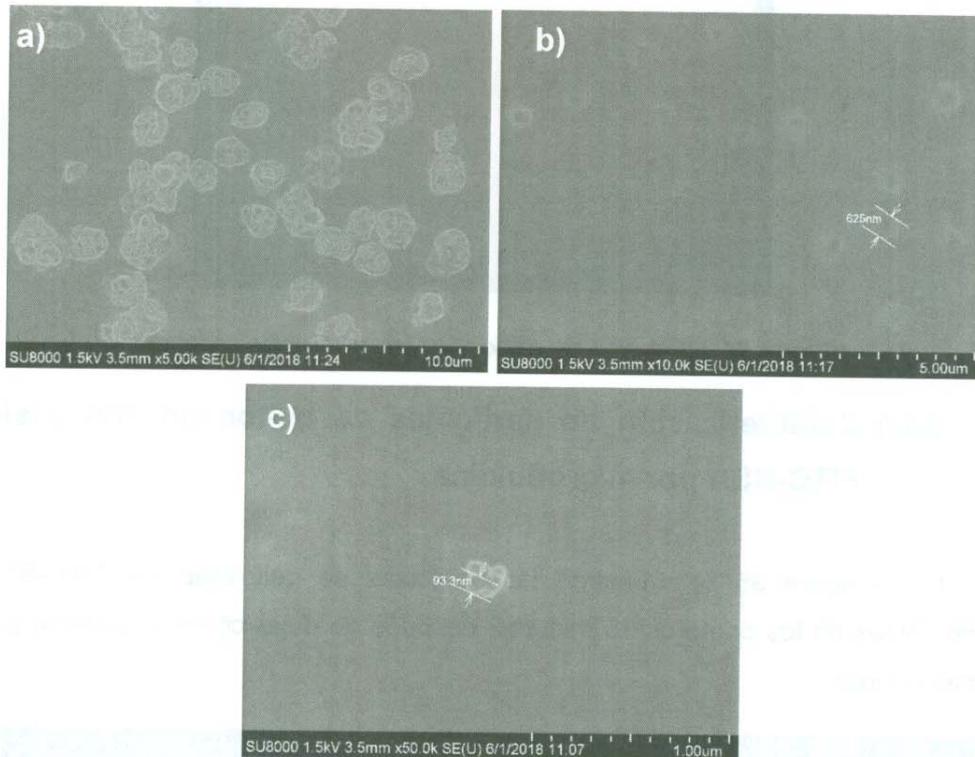


**Figura 35.** Partículas correspondientes a la muestra CS/PVA 1 observadas a a) 10000x y b) 50000x.

Se puede apreciar que se obtuvieron partículas con morfologías irregulares (figura 35-a). En la figura 35-b se observa la presencia de película y también

aglomeración de las partículas, las cuales presentaron un diámetro inferior a 100 nm.

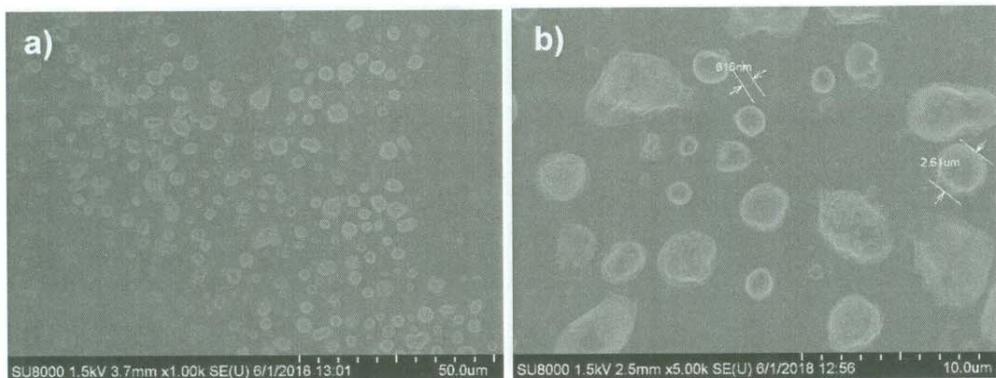
En la figura 36 se muestran las partículas de quitosano sin FITC-BSA obtenidas durante el intervalo de los 15 a los 30 minutos después de dejar correr el sistema por media hora.



**Figura 36.** Partículas correspondientes a la muestra CS/PVA 2 observadas a a) 5000x, b) 10000x y c) 50000x.

Se puede apreciar que presentan las mismas características que la muestra 1, siempre y cuando los flujos se mantengan lo más estables posibles.

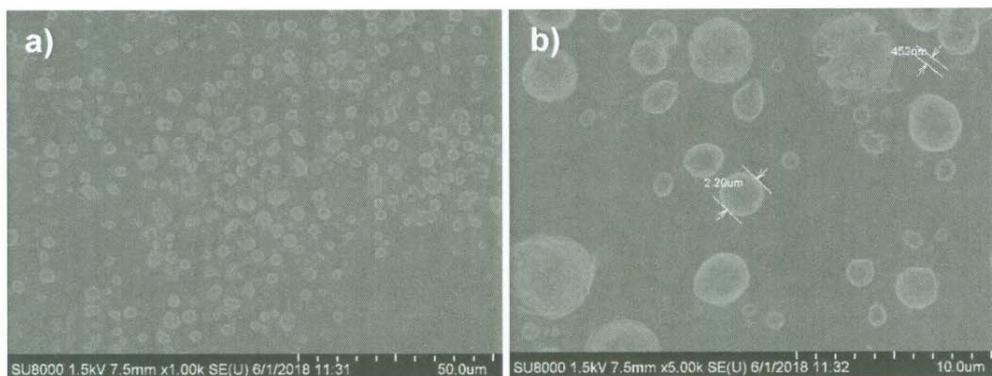
En la figura 37 se muestran las partículas de quitosano con FITC-BSA obtenidas en los primeros 15 minutos después de dejar correr el sistema por media hora, manteniendo presiones constantes.



**Figura 37.** Muestra CS/PVA/BSA 1 observada a a) 1000x y b) 5000x.

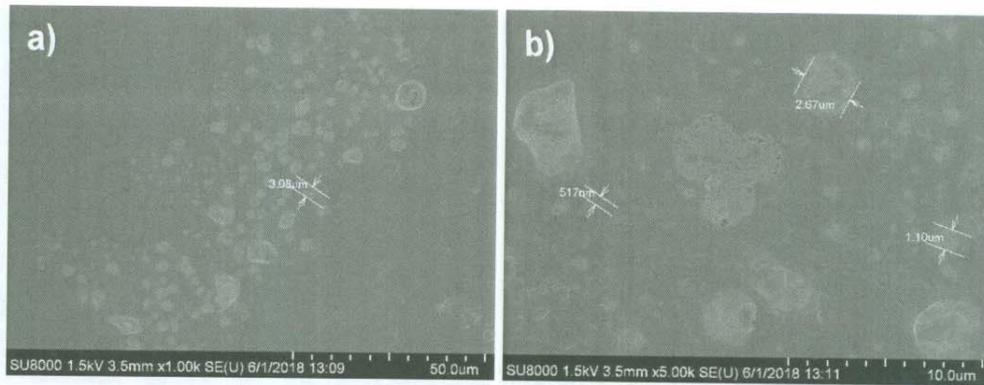
Si bien las condiciones de síntesis de estas partículas fueron diferentes a las obtenidas sin FITC-BSA (debido a la inestabilidad de los flujos), se puede apreciar que sí se obtuvieron partículas de quitosano con FITC-BSA. En este caso, se observó mayor cantidad de partículas. Además, se observaron dos poblaciones, una de partículas de diámetros micrométricos y otra de diámetros nanométricos.

En la figura 38 se muestran las partículas de quitosano con FITC-BSA obtenidas durante el intervalo de los 15 a los 30 minutos después de dejar correr el sistema por media hora.



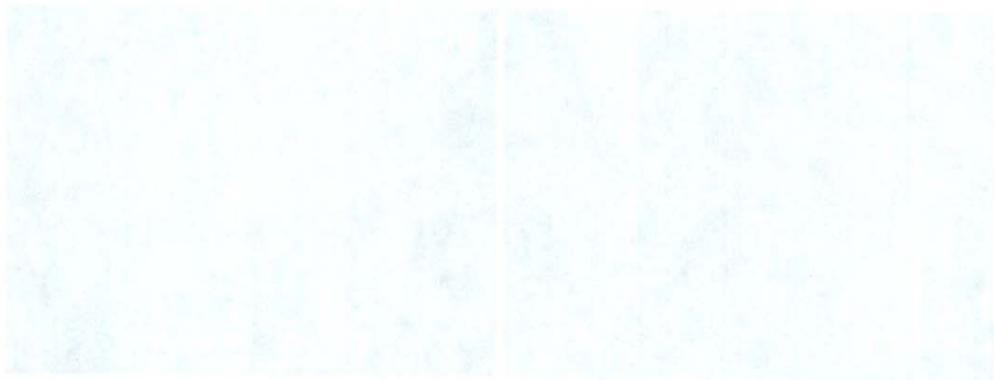
**Figura 38.** Muestra CS/PVA/BSA 2 observada a a) 1000x y b) 5000 x.

Con respecto a la muestra anterior (figura 37), se observaron más partículas y un poco más esféricas, igualmente de tamaños tanto nanométricos como micrométricos.



**Figura 39.** Muestra CS/PVA/BSA 3 observada a a) 1000x y b) 5000 x.

En este caso se pueden observar partículas más pequeñas y con cierta aglomeración, además se perdió el grado de esfericidad que habían adquirido, muy probablemente debido a que hubo variación de flujos aunque las presiones se mantuvieron constantes.



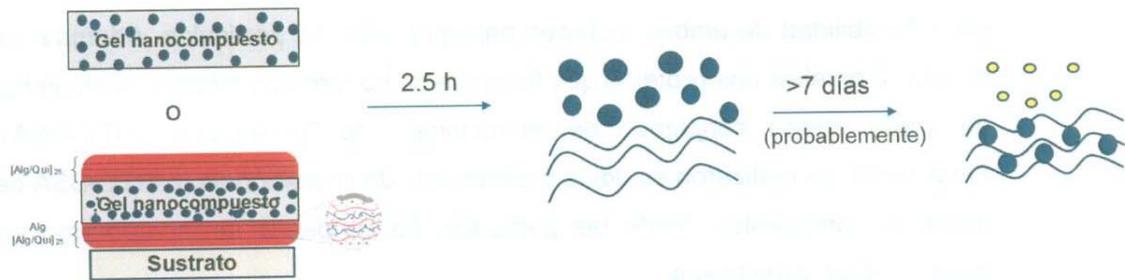
## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo se prepararon partículas de quitosano por dos métodos: gelificación iónica y microfluídica. Más que realizar un estudio cuantitativo y sistemático de las poblaciones de partículas obtenidas, este estudio se enfocó en la factibilidad de ambos métodos para preparar las partículas. Además, se incorporó en ellas una proteína que funciona como fármaco modelo: la albúmina de suero bovino conjugado de isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA). Finalmente, se realizaron estudios preliminares de liberación de la FITC-BSA de sistemas compuestos donde las partículas de quitosano se incorporaron en geles simples y multicapa.

De los resultados del estudio de la preparación y caracterización de las nanopartículas de quitosano por gelificación iónica y por microfluídica, se puede concluir lo siguiente:

- ✓ Se demostró que con ambos métodos, gelificación iónica y microfluídica, se pueden preparar partículas de quitosano tanto en escala nanométrica como micrométrica.
- ✓ Los resultados obtenidos, para este caso, no son directamente comparables debido a que por la técnica de microfluídica se agregó PVA como surfactante, mientras que por la de gelificación iónica no se usó surfactante.
- ✓ Para los resultados obtenidos por la técnica de gelificación iónica se observó que a mayor velocidad de agitación en el homogenizador, menor era el diámetro de las partículas obtenidas.
- ✓ Se prepararon también geles de gelatina y sándwiches Alg/Chi con las partículas cargadas con FITC-BSA y se realizaron estudios de liberación de estas muestras, obteniendo mejores resultados en los experimentos realizados a 37°C.
- ✓ En los estudios de liberación se observa que a las 2 horas y media ya se ha liberado el 100% de la FITC-BSA tanto en los geles de gelatina como en los sándwiches de Alg/Chi. Cabe señalar que se descartó la posibilidad de que el sistema liberara las nanopartículas completas de quitosano con FITC-BSA: se hicieron estudios de liberación de las nanopartículas solas (sin incorporar en geles). En experimentos de duración de hasta 7 días aún no había

liberación, con lo que se comprobó que en realidad lo que se liberaba en los experimentos con geles eran las partículas con FITC-BSA y no la FITC-BSA individual. Esto se representó en un esquema (Figura 40).



**Figura 40.** Esquema de liberación de la BSA con respecto al tiempo.

- ✓ En los experimentos llevados a cabo por la técnica de microfluídica se encontró una gran distribución de tamaños: partículas con diámetros desde 70 nm hasta 3  $\mu\text{m}$ . Es probable que esto se deba a características inherentes de los sistemas de control de flujo.

## PERSPECTIVAS

Para ambos métodos se pueden optimizar los parámetros de preparación de partículas, específicamente:

### **Para la técnica de gelificación iónica:**

- Se puede estudiar el efecto de la velocidad de agitación en el UltraTurrax sobre el tamaño de las partículas.

### **Para los estudios de liberación:**

- Usar como blanco soluciones con colágeno, alginato, quitosano o cualquier otro compuesto que pueda interferir en las absorbancias medidas en el espectrofotómetro, y así asegurar que las absorbancias obtenidas corresponden únicamente al fármaco liberado.

### **Para la técnica de microfluídica:**

- Sería conveniente realizar experimentos donde se pudiera controlar con mayor precisión los flujos.
- Se pueden variar ciertas condiciones como flujo y/o presión hasta obtener mejores resultados en cuanto a tamaño y morfología de las nanopartículas.

Para los dos métodos, también es necesario caracterizar de mejor manera la población de partículas: distribución de tamaños y formas. Para ello se requiere hacer una estadística contando del orden de 500 partículas.

- Domard, A., & Rinaudo, M. (1983). Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 5(1), 49–52. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(83\)90078-8](https://doi.org/10.1016/0141-8130(83)90078-8)
- Dressler, O. J., Howes, P. D., Choo, J., & Demello, A. J. (2018). Reinforcement Learning for Dynamic Microfluidic Control. *ACS Omega*, 3(8), 10084–10091. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01485>
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>
- Giraldo, J. (2015). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. *University of Concepcion*, (MAY). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3350.9287>
- Goldberg M, Langer R, J. X. (2007). Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomater Sci.*, 18, 241–268.
- Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W. M., Scott, J. H. J., & Joy, D. C. (2018). *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6676-9>
- GOYCOOLEA, F. M. (2009). *Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Harish Prashanth, K. V., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends in Food Science and Technology*, 18(3), 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>
- Hernández, C. (2010). *Liberación controlada de Difosfato de Cloroquina a través de MPs de Quitosano entrecruzadas con Glutaraldehído.pdf*.
- Hirsch, M. (2015). Surface Active Agents (Surfactants).
- Jia, L., & Qin, X. H. (2013). The effect of different surfactants on the electrospinning poly(vinyl alcohol) (PVA) nanofibers. *Journal of Thermal*

*Analysis and Calorimetry*, 112(2), 595–605. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2607-9>

- Krishnadasan, S., Brown, R. J. C., deMello, A. J., & deMello, J. C. (2007). Intelligent routes to the controlled synthesis of nanoparticles. *Lab on a Chip*, 7(11), 1434. <https://doi.org/10.1039/b711412e>
- Lárez Velásquez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4(2), 91–109. <https://doi.org/10.4236/ajac.2010.12012>
- Majedi, F. S., Hasani-Sadrabadi, M. M., Hojjati Emami, S., Shokrgozar, M. A., Vandersarl, J. J., Dashtimoghadam, E., ... Renaud, P. (2013). Microfluidic assisted self-assembly of chitosan based nanoparticles as drug delivery agents. *Lab on a Chip*, 13(2), 204–207. <https://doi.org/10.1039/c2lc41045a>
- Majedi, F. S., Hasani-Sadrabadi, M. M., Vandersarl, J. J., Mokarram, N., Hojjati-Emami, S., Dashtimoghadam, E., ... Renaud, P. (2014). On-chip fabrication of paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles for cancer therapeutics. *Advanced Functional Materials*, 24(4), 432–441. <https://doi.org/10.1002/adfm.201301628>
- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., & Aiello, C. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables . Una revisión de sus aplicaciones Chitin and Chitosan friendly polymer . A review of their applications. *Revista Tcnocientífica URU*, (August 2016), 53–58. <https://doi.org/2244-775X>
- Mertz, J. (2010). *Introduction to Optical Microscopy*.
- Microscopio Óptico. (2015).
- Moddaresi M, Brown MB, Zhao Y, Tamburic S, J. S. (2010). The role of vehicle nanoparticle interactions in topical drug delivery. *Intern J Pharmac.*, 400, 176–182.
- Munawar A. Mohammed, Jaweria T. M. Syeda, K. M. W. and E. K. W. (2017). An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 9, 53.

- Muzzarelli, R. A. A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>
- Pacheco, N., & Lopez, E. (2010). Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos : caracterización y aplicación.
- Panyan J, L. V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.*, 55, 329–347.
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 34(7), 641–678. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.04.001>
- Pimentel, R. C., & Martín-martínez, E. S. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, 8, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.estger.2014.09.005>
- Rodríguez-Pedroso, A. T., Ramírez-Arrebato, M. A., Rivero-González, ; D, Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L. L., & Bautista-Baños, ; S. (2009). Propiedades Químico-Estructurales Y Actividad Biológica De La Quitosana En Microorganismos Fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(3), 307–317.
- Salaheldin, H. I., Negm, A., & Osman, G. E. H. (2017). Porcine skin gelatin–silver nanocomposites: synthesis, characterisation, cell cytotoxicity, and antibacterial properties. *IET Nanobiotechnology*, 11(8), 957–964. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0015>
- Wittcoff, H. (2007). *Los tensoactivos y su clasificación*.
- Ye, M., Mohanty, P., & Ghosh, G. (2014). Morphology and properties of poly vinyl alcohol (PVA) scaffolds: Impact of process variables. *Materials Science and Engineering C*, 42, 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.029>
- Yu, L., & Ding, J. (2008). Injectable hydrogels as unique biomedical materials.

- Zheng, K., Liu, F., Xu, X. M., Li, Y. T., Wu, Z. Y., & Yan, C. W. (2014).  
Synthesis, structure and molecular docking studies of dicopper(II)  
complexes bridged by N-phenolato-N'-[2-(dimethylamino)ethyl]oxamide:  
The influence of terminal ligands on cytotoxicity and reactivity towards DNA  
and protein BSA. *New Journal of Chemistry*, 38(7), 2964–2978.  
<https://doi.org/10.1039/c4nj00092g>

## ANEXOS

2017 Presentación de cartel "PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA POR NANOPRECIPITACIÓN" en el XII Coloquio Bienal en Ciencia de Materiales. **Andrea Lorena Choza Farías**, Analila Luna Valenzuela, Amir Darío Maldonado Arce, María Elisa Martínez Barbosa. Hermosillo, Sonora, México.

2017 Presentación de cartel "ELABORACIÓN DE UN CHIP DE PDMS Y SÍNTESIS DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO POR MICROFLUÍDICA" en la XXII Reunión Universitaria de Investigación en Materiales. **Andrea Lorena Choza Farías**, María Elisa Martínez Barbosa, Daniel Uriel Berrellez Reyes, Amir Darío Maldonado Arce. Hermosillo, Sonora, México.

2018 Estancia de investigación "SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE GELES DE POLÍMEROS BASE DE QUITOSANO CON POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS" en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) de febrero a junio de 2018. Madrid, España.

