

Tesis Doctoral

Diseño de nano-microvehículos para insulina constituidos por quitosano como encapsulante

Prudkin Silva, Cecilia

2018

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Prudkin Silva, Cecilia. (2018). Diseño de nano-microvehículos para insulina constituidos por quitosano como encapsulante. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6502_PrudkinSilva

Cita tipo Chicago:

Prudkin Silva, Cecilia. "Diseño de nano-microvehículos para insulina constituidos por quitosano como encapsulante". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6502_PrudkinSilva

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Diseño de nano-microvehículos para insulina constituidos por
qitosano como encapsulante**

Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos
Aires en el área Química Biológica

Lic. Cecilia Prudkin Silva

Instituto de Química Biológica (IQUIBICEN-UBA-CONICET)

Director de tesis: Dr. Oscar E. Pérez

Consejero de Estudios: Dr. Julio J. Caramelo

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica – Facultad de
Ciencias Exactas y Naturales- Universidad de Buenos Aires (UBA).
IQUIBICEN-CONICET.

Lugar y fecha de defensa: Buenos Aires, 29 de Agosto de 2018.

Resumen

Diseño de Nano-microvehículos para insulina constituidos por quitosano como encapsulante

El objetivo de la presente Tesis fue diseñar nano-microvehículos encapsulantes en los que la proteína encapsulada fue la hormona Insulina (I) y el material encapsulante, un nuevo quitosano (CS) argentino. Este polisacárido es biodegradable, biocompatible y mucoadhesivo. Se pretende que estos nano-microvehículos actúen como una nueva forma de dosificación de I, alternativa (vía pulmonar o nasal) a la tradicional, con enormes implicancias para pacientes pediátricos.

En primer término se empleó la estrategia de "Autoensamblaje Molecular". Estos estudios comenzaron con la caracterización de ambas especies en soluciones acuosas. Las soluciones mixtas fueron consideradas a a pH de no interacción electrostática (pH2) y de interacción (pH6). Se empleó dispersión dinámica de luz, determinaciones de potencial z, espectrometría UV-visible y reometría. Se desarrolló un modelo de interacción molecular para I y CS basado en el pH del medio y en las concentraciones relativas de ambos biopolímeros en solución dando dos configuraciones, *core-shell* y *cluster*. Simulaciones computacionales complementaron el análisis. La estrategia alternativa empleada fue la Nanodeshidratación. Este proceso fue puesto a punto empleando este CS. Se obtuvieron partículas con diámetros mayores y se evaluó también su estabilidad coloidal.

El efecto del CS sobre la estructura proteica, para ambas estrategias, se determinó por espectroscopía infrarroja y por calorimetría diferencial de barrido. Además, se empleó microscopía electrónica de barrido y de fuerza atómica. Se determinó el perfil de liberación de la insulina encapsulada y su bioactividad con ensayos biológicos in-vitro, en líneas celulares adecuadas.

PALABRAS CLAVE: NANO-MICROVEHICULOS; INSULINA; QUITOSANO ARGENTINO;
AUTOENSAMBLAJE MOLECULAR; NANODESHIDRATACIÓN.

Abstract

Nano-microvehicles design for insulin, based on chitosan as the encapsulant material

The objective of this thesis was to design encapsulating nano-microvehicles in which the encapsulated protein was the insulin hormone (I) and the encapsulating material, a new Argentinean chitosan (CS). This polysaccharide is biodegradable, biocompatible and mucoadhesive. It is intended for these nano-microvehicles to be a new type of design for I administration as an alternative to the traditional one (pulmonary or nasal route), with enormous implications for pediatric patients.

Firstly, the "Molecular Self-assembly" strategy was used. These studies began with the characterization of both species in aqueous solutions. Mixed solutions were considered at pH of no electrostatic interaction and that of favoured interactions, pH2 and pH6, respectively. Dynamic light scattering, z-potential determinations, UV-visible spectrometry and rheometry were used. A molecular interaction model was developed for I and CS based on the pH of the solution and on the relative concentrations of both biopolymers. Two, configurations were obtained accordingly, the *core-shell* and *cluster* ones. Molecular interaction simulations completed the analysis. Nano-dehydration process was firstly set-up and used as the alternative way for nanoparticle obtention. Particles with larger diameters were obtained and their colloidal stability was also evaluated.

The effect of CS on the protein structure was determined, for both strategies, by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy were also used. The release profile of encapsulated insulin and its bioactivity were determined by *in-vitro* biological assays in suitable cell lines cultures.

KEY WORDS: NANO-MICROVEHICLES; INSULIN; ARGENTINEAN CHITOSAN;
MOLECULAR SELF-ASSEMBLY; NANO-DEHYDRATION.

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a dos instituciones públicas, CONICET y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, por proporcionar los fondos para mi formación doctoral. Ha sido sin duda un gran honor y una gran responsabilidad, haber tenido a mi disposición fondos provistos por todos los argentinos.

A las Dras. Karina Martínez, Florencia Mazzobre y Edith Farías, por compartir generosamente su tiempo y sus conocimientos conmigo. Por su amabilidad y sus sonrisas. También quiero destacar y agradecer los aportes y la buena onda de la Dra. Fernanda Elias, cruciales para los últimos experimentos.

A todos en el laboratorio de Biomateriales de CICATA-IPN, por hacerme sentir en casa y dar lo mejor para que pudiera avanzar con mi investigación. Al Dr. Eduardo San Martín, por hacerme sentir en familia estando tan lejos de la mía.

También quisiera agradecer a toda la gente linda de QB6, Ceci, Hernán, Carla, Tincho y Juan, con quien compartí mis primeros años de doctorado.

A todos mis compas del labo. A Ampí que es mi ídola y una de las personas con más entereza y aguante que conozco. A Pau por estar siempre ahí, por escuchar, por empatizar, aunque sea en formato audio. A Pako por alimentar mi lado geeky y contestar todas las preguntas que una física le puede hacer a un biólogo. A Jime, por hacer más de lo que le corresponde, humana y profesionalmente, y no bajar nunca los brazos. A todos por recibirme con los brazos abiertos y dejarme formar parte del labo por, soportarme en estos últimos tiempos tan complicados y revueltos.

A mi director, Oscar E. Pérez....por muchas razones. Por darme una segunda oportunidad, por confiar en mí, por acompañarme mientras aprendía a investigar, por dejar que arme mi camino y crecer profesionalmente. Por ser un excelente ser humano y tratar humanamente a los que lo rodean.

A mis compas de Bedelía, que supieron respetar mis ausencias y me distrajeron de la locura de la escritura.

A Diego y a Jorge, de UnLam, que me cubrieron para que pudiera seguir escribiendo.

A CoAmores y la experiencia de Cosensores, que me mostraron que se puede hacer Ciencia desde otro lugar, desde el pueblo y para el pueblo. Porque con ustedes me sentí parte de algo grande y hermoso que voy a recordar siempre.

A mis amigos físicos, esparcidos por quién sabe dónde, y a todos los meteorólogos por ponerle siempre la mejor onda.

A los Nefastos....ya ni me acuerdo cómo era estar sin toda esa locura hermosa.

A los amigos que dejé en Neuquén, y que me siguen acompañando.

A los que están lejos pero no importa, porque están cerca de todas formas.

A mis padres, a quienes les debo gran parte de lo que soy, por acompañarme en el camino que elegí, por estar siempre, por quererme. A Javier, el mejor hermano del mundo y a Chuni por el aguante.

A Marcela, por bancarme el minuto a minuto de las últimas semanas y ayudarme con los últimos pasos.

Al chocolate....

A Pompei...

Publicaciones realizadas en el marco de esta tesis

2018 Proposed molecular model for electrostatic interactions between insulin and chitosan. Nano-complexation and activity in cultured cells. Cecilia Prudkin Silva, Jimena H. Martínez, Karina D Martínez, María E Farías, Federico Coluccio-Leskow, Oscar E Pérez. *Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects*. *Colloids and Surfaces A* 537, 425–434, 2018.

2016 Caracterización fisicoquímica de quitosano encapsulante para el delivery de insulina. Cecilia Prudkin Silva, Oscar E. Pérez. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. Volumen 7 (4), 57-65, 2016.

Presentaciones en congresos

2018- **Insulina nanoencapsulada en matriz de quitosano** (autores: C. Prudkin Silva, C. Quiroz Reyes, E. San Juan, E. San Martín, O.E. Pérez). *XVIII Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados*. Buenos Aires. Mayo 30-Junio 1, 2018. Asistencia y presentación de póster.

2017- **Argentinean chitosan for encapsulation purposes** (autores: C Prudkin Silva, V.A Gómez Andrade, M.A Farías, O.E Pérez. *XII Simposio Argentino de Polímeros*. Los Cocos, Córdoba, Octubre 2017. Presentación de póster.

2016- **Insulin-chitosan nanocomplexes design for hormone controlled delivery** (autores: C Prudkin Silva, K.D. Martinez, F. Coluccio Leskow, O.E. Pérez). *Imaging Techniques for Biotechnology and Biomedical Applications*. La Plata, Noviembre 30-31, 2016. Asistencia y presentación de póster.

2016- **Protein-chitosan mass ratio determination for insulin nanoencapsulation** (autores: C Prudkin Silva, K.D. Martinez, F. Coluccio Leskow, O.E. Pérez. *Frontiers in Physical Sciences*. Buenos Aires, Argentina. Noviembre 14-18, 2016. Asistencia y presentación de póster.

2016- **Insulina nanoencapsulada en matriz de quitosano** (autores: C. Prudkin Silva, K.D. Martinez, S. Rodríguez, F. Coluccio Leskow y O. E. Pérez). *XVI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados*. Buenos Aires. Mayo 11-13, 2016. Asistencia y presentación de póster.

2016- **Interacciones carboximetilcelulosa-ácido fólico: estudio para su nanoencapsulación** (autores: F. Tarsia, C Prudkin Silva, F. Coluccio Leskow, S. Rodríguez, and O. E. Pérez). *XVI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados*. Buenos Aires. Mayo 11-13, 2016. Asistencia y presentación de póster.

2015- **Insulin-chitosan interactions for the protein nanocarriers design** (autores: Prudkin Silva, C. Martínez, K. Pérez, O.E). *II Workshop Polímeros Biodegradables y Biocompuestos, III Workshop of the project BIOPURFIL, Bio-based Polyurethane Composites with Natural Fillers*. Capital Federal, Noviembre 2015. Asistencia y presentación oral.

2015- **Caracterización fisicoquímica de biopolímeros encapsulantes para el delivery de insulina** (autor: Prudkin Silva, Cecilia). *5to Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales, JIM 2015*. Tandil, Buenos Aires, Octubre 2015. Asistencia y presentación de póster.

2015- **Nanocarriers biopoliméricos encapsulantes para el delivery de insulina** (autores: Prudkin S, C. Bonecco, MB. Pérez, OE). *XXIII Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM*). La Plata, Buenos Aires. Agosto 2015. Asistencia y presentación de póster.

Índice

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
NANOESCALA	16
1.1. COMPUESTOS ENCAPSULANTES POLIMÉRICOS	19
1.1.1. INTERACCIONES PROTEÍNA-POLISACÁRIDO	20
INTERACCIONES FÍSICO-QUÍMICAS Y ESTABILIDAD DE LOS SISTEMAS	20
Formación de complejos electrostáticos	21
1.2. ESTRATEGIAS Y MÉTODOS PARA LA GENERACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	22
1.3. RUTAS DE ADMINISTRACIÓN PARENTERALES Y NO PARENTERALES	25
1.4. TRANSPORTE DE NANOPARTÍCULAS EN TEJIDOS	28
1.5. BIOADHESIÓN	29
1.6. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE POLISACÁRIDOS	30
1.7. QUITOSANO	31
1.7.1. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	32
1.7.2. ESTADO DEL ARTE	33
1.8. INSULINA	35
BIBLIOGRAFÍA	39
OBJETIVO GENERAL DEL PLAN	55
OBJETIVOS PARTICULARES	55
CAPÍTULO 2: QUITOSANO ARGENTINO. CARACTERIZACIÓN E IMPACTO EN SISTEMAS CELULARES IN-VITRO.....	56
Introducción.....	57
UN POLISACÁRIDO DE INTERÉS MUNDIAL	58
QUITOSANO COMO BIOMATERIAL	59
APLICACIONES FARMACÉUTICAS	59
TOXICIDAD	61
MUCOADHESIÓN QUITOSANO-MUCINA	62
INTERNALIZACIÓN CELULAR	63
Materiales y Métodos	65
2.1. MATERIALES	66
2.2. MÉTODOS	66
2.2.1. Propiedades físico químicas	66

2.2.2.	DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS) Y POTENCIAL Z	74
2.2.3.	CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE FLUJO Y VISCOELÁSTICO	77
2.2.4.	MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM).....	82
2.2.5.	ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	83
2.2.6.	CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE LÍNEAS CELULARES	85
2.2.7.	ENSAYO DE REDUCCIÓN DE MTT.....	85
2.2.8.	EFEECTO DEL CS EN MONOCAPAS CELULARES. APERTURA DE UNIONES ESTRECHAS.	86
Resultados y Discusión		87
2.3.	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA.....	88
2.4.	CARACTERIZACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA PARA SOLUCIONES DE QUITOSANO ..	88
2.5.	IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES. ESPECTROSCOPIA FTIR	90
2.6.	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN MEDIANTE RMN	92
2.7.	REGÍMENES DE FLUJO	94
2.8.	SINERGISMO Y MUCOADHESIÓN DEL SISTEMA QUITOSANO-MUCINA.....	99
2.9.	TOPOGRAFÍA MOLECULAR DEL QUITOSANO MEDIANTE AFM.....	103
2.10.	ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR CON MTT EN CÉLULAS HeLa Y 3T3 EN CONTACTO CON CS	104
2.11.	EFEECTO DEL CS EN MONOCAPAS CELULARES. APERTURA DE UNIONES ESTRECHAS	106
Conclusiones parciales		109
BIBLIOGRAFÍA		112
CAPÍTULO 3: DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS VÍA AUTOENSAMBLAJE MOLECULAR		127
INTRODUCCIÓN.....		128
AUTOENSAMBLAJE MOLECULAR		129
NANOPARTÍCULAS DE TIPO CORE-SHELL (NÚCLEO-CUBIERTA)		130
Aplicaciones biomédicas		131
FLOCULACIÓN POR PUENTE		132
LIBERACIÓN CONTROLADA		133
MATERIALES Y MÉTODOS.....		135
3.1.	MATERIALES.....	136
3.2.	MÉTODOS	136
3.2.1.	PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS I-CS MEDIANTE EL PRINCIPIO DE AUTOENSAMBLAJE MOLECULAR (<i>CHARGE SCREENING METHOD</i>)	136
3.2.2.	DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS) Y POTENCIAL Z	138
3.2.3.	CINÉTICA DE AGREGACIÓN	139

3.2.4.	REGÍMENES DE FLUJO	140
3.2.6.	MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM).....	141
3.2.7.	ELECTROFORESIS CAPILAR	142
3.2.8.	ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	144
3.2.9.	SIMULACIONES COMPUTACIONALES.....	144
3.2.10.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS NANOPARTÍCULAS IC-CS EN CULTIVOS CELULARES 147	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		153
3.3.	DETERMINACIÓN DEL PH ÓPTIMO PARA LA INTERACCIÓN ELECTROSTÁTICA ENTRE I Y CS 154	
3.4.	CINÉTICA DE AGREGACIÓN	157
3.5.	TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS I-CS.....	162
3.6.	ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS SOLUCIONES ICS.....	167
3.7.	MODELO DE ASOCIACIÓN	171
3.8.	ULTRAESTRUCTURA.....	171
3.9.	CARACTERIZACIÓN TOPOGRÁFICA	172
3.10.	ELECTROFORESIS CAPILAR	174
3.11.	IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES. ESPECTROSCOPIA FTIR	177
3.12.	SIMULACIÓN DE MECANISMOS ELECTROESTÁTICOS PARA LA CONFORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	179
3.13.	ACTIVIDAD DE LA INSULINA COMPLEJADA Y VEHICULIZADA CON CS EN CULTIVOS CELULARES.....	187
3.13.1.	ENSAYO DE FOSFORILACIÓN DE AKT	187
3.13.2.	CONFORMACIÓN DE MONOCAPA CELULAR CALU-3 Y RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL	190
3.13.3.	CUANTIFICACIÓN DE IL-8	191
3.13.4.	INMUNOCITOQUÍMICA	192
BIBLIOGRAFÍA		198
INTRODUCCIÓN.....		206
MICROENCAPSULACIÓN POR DESHIDRATACIÓN.....		207
NANODESHIDRATACIÓN (NANOSPRAY DRYING).....		208
AUGE CIENTÍFICO		209
MATERIALES Y MÉTODOS.....		211
4.1.	MATERIALES.....	212
4.2.	MÉTODOS	212

4.2.1. PREPARACIÓN DE COMPLEJOS MEDIANTE EL PRINCIPIO DE NANODESHIDRATACIÓN (<i>NANO SPRAY DRYING</i>).....	214
4.2.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	216
4.2.3. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL Z OBTENIDOS POR DLS	220
4.2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	221
4.2.5. ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	221
4.2.6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	221
4.2.7. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).....	222
4.2.8. ELECTROFORESIS CAPILAR	224
4.2.9. ACTIVIDAD DE LA INSULINA COMPLEJADA Y VEHICULIZADA CON CS EN CULTIVOS CELULARES.....	224
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	225
4.3. PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES DE SECADO MEDIANTE NANOSPRAYING.....	226
4.4. CARACTERIZACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	227
4.5. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA Y DE POTENCIAL Z EN FUNCIÓN DEL PH.....	233
4.6. ESPECTROSCOPIA FTIR DE SOLUCIONES	237
4.7. ULTRAESTRUCTURA Y TOPOGRAFÍA DE NANOPARTÍCULAS NANODESHIDRATADAS..	239
4.8. ESPECTROSCOPIA FTIR DE LOS SISTEMAS ICS EN POLVO	247
4.9. CUANTIFICACIÓN DE I ENTRAMPADA	249
4.10. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).....	251
4.11. ELECTROFORESIS CAPILAR	253
4.12. ACTIVIDAD DE LA INSULINA COMPLEJADA Y VEHICULIZADA CON CS EN CULTIVOS CELULARES.....	253
CONCLUSIONES PARCIALES	255
BIBLIOGRAFÍA	258

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

NANOESCALA

Esencialmente, puede decirse que el término nanotecnología hace referencia a materiales y sistemas cuyas estructuras y componentes exhiben propiedades, fenómenos y procesos físicos, químicos y biológicos particulares, debido que son inherentes a la nanoescala.

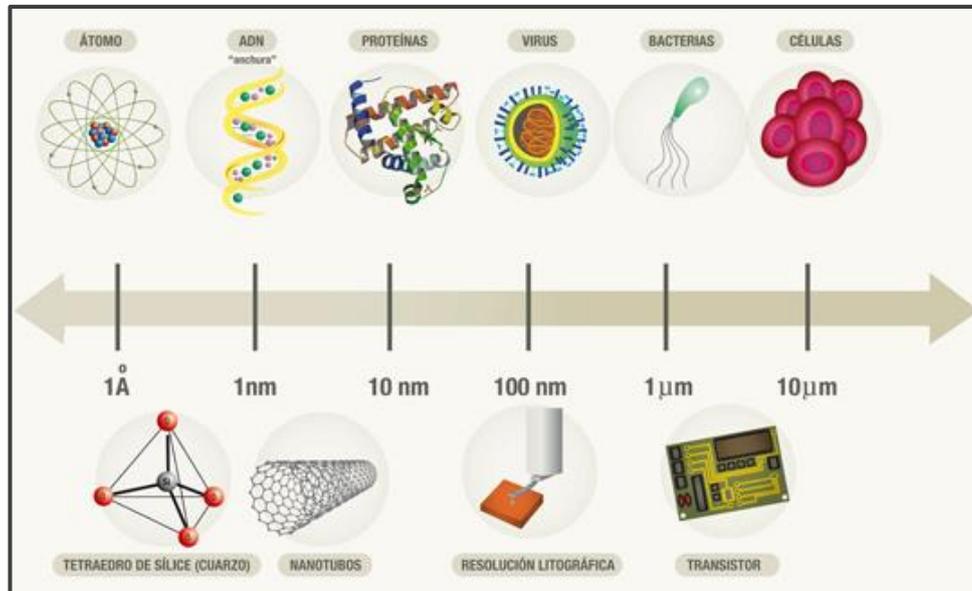


Fig.1.1: Escala de tamaños con distintas estructuras representativas. Se muestra comparativamente las dimensiones de estructuras conocidas. Extraído de [lananoteconologia.blogspot.com].

Se considera que un material está dentro de la nanoescala si al menos una de sus dimensiones "d" corresponde a $1 < d < 500 \text{ nm}$ (Ramsden 2016). Dicho de otra manera, la nanotecnología se caracteriza por el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales, dispositivos y sistemas que posean una organización funcional en al menos una dimensión dentro de la nanoescala.

Además, a la nanotecnología pueden asociársele al menos tres características ventajosas:

1. Brinda la posibilidad de crear materiales con combinaciones de propiedades novedosas.
2. Los dispositivos en la nanoescala requieren una menor cantidad de material para ser diseñados y sus funciones pueden verse acrecentadas al reducirse sus dimensiones.
3. Hace posible la fabricación de tecnologías y estructuras personalizadas.

Algunas de las geometrías correspondientes a las nano-estructuras más comunes se muestran en la Fig. 1.2.

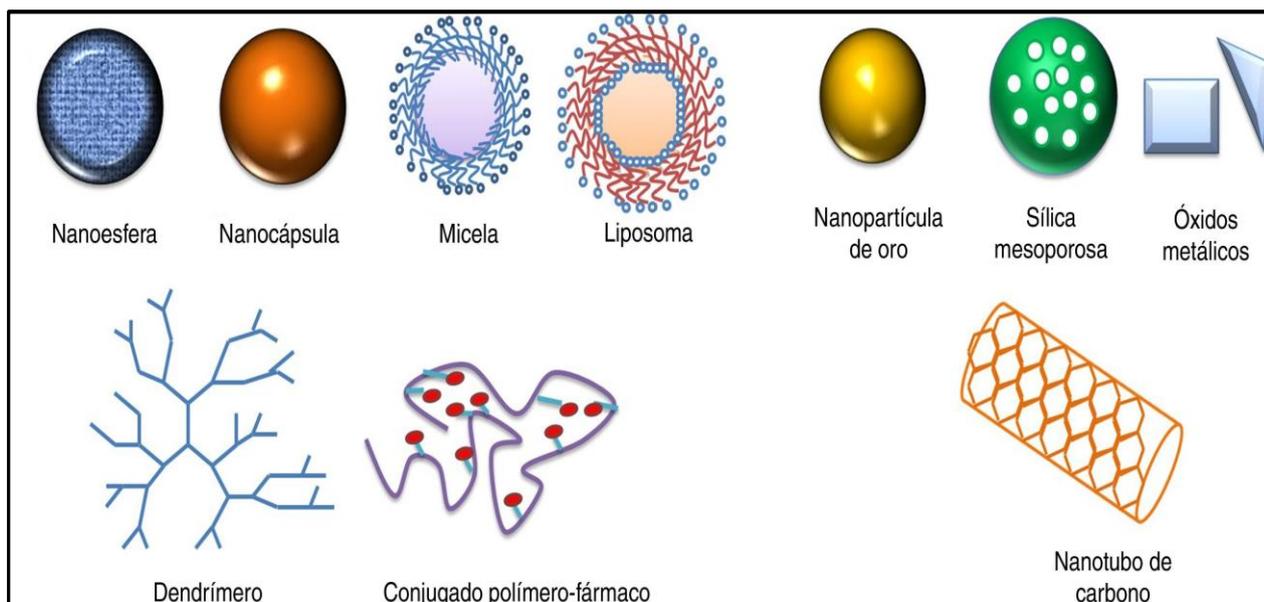


Fig. 1.2: Nano-estructuras. Adaptado de (Rojas-aguirre 2016).

La nanotecnología ha demostrado ser muy promisoría para distintas aplicaciones médicas, con más de una docena de aplicaciones en nano-medicina ya aprobadas para su uso clínico (Kamaly *et al.* 2012)(Shi *et al.* 2011).

En el caso de bioactivos y fármacos de naturaleza proteica, la nanotecnología puede i) proteger las proteínas de la degradación o desnaturalización en un entorno biológico, ii) aumentar la vida media en la circulación sistémica para proteínas con farmacocinéticas limitadas, iii) controlar la liberación de una droga manteniéndola dentro del rango de concentración terapéutico y iv) dirigir la acción de las drogas a tejidos, células y compartimentos intracelulares con afecciones y/o compromisos, aumentando la protección y eficacia de los agentes terapéuticos. Además, es posible seleccionar el tamaño de las nanopartículas, su hidrofobicidad y las cargas superficiales y es posible su funcionalización química (Gan & Wang 2007).

Algunos ejemplos de aplicaciones en nano-medicinas incluyen las formulaciones comerciales con agentes antitumorales como doxorubicina (Doxil y Myocet), daunorubicina (DaunoXome), paclitaxel (Abraxane) y amfotericina B (Ambisome) (Peer *et al.* 2007). Además, existen hoy en día formulaciones comerciales para el suministro o entrega, también denominado *delivery*, de proteínas nano-microencapsuladas, para la proteína morfogenética ósea-tipo 2 (Patel *et al.* 2008), insulina (Builders *et al.* 2008), factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (Han *et al.* 2001) y eritropoyetina recombinante humana (Morlock *et al.* 1998). Si bien la mayoría de estas formulaciones son de tipo inyectable, no suelen ser las más indicadas para una entrega a largo plazo.

Una vez que las proteínas han sido encapsuladas, su cinética de liberación depende del tamaño de partícula, la velocidad de degradación, la carga del polímero, la relación entre hidrofiliicidad y hidrofobicidad, la polidispersidad en cuanto al tamaño de partícula, la cantidad de proteína encapsulada y del entorno que la rodea (Ichikawa *et al.* 2005).

Los liposomas fueron los primeros nano-vehículos propuestos para la entrega de proteínas, a comienzos de los años '70 (Gregoriadis & Ryman 1972). A su vez, Speiser y col. investigaron la posibilidad de encapsular drogas o antígenos en nanopartículas poliacrílicas empleando técnicas de polimerización micelar (Birrenbach & Speiser 1976).

En la década de los '80, se propuso el empleo de nanocápsulas de poli-alquil-cianoacrilato para la administración oral de insulina (Dange *et al.* 1988). Finalmente, en los '90, Gasco y col. produjeron por primera vez nanopartículas lipídicas sólidas cargadas de proteínas (Morel *et al.* 1994) y Alonso y col. diseñaron las primeras nanopartículas de PLGA (Sánchez *et al.* 1993), PLA-PEG (Quellec 1998) y quitosano (Calvo 1997) para la entrega de proteínas y antígenos. De manera general, la tendencia se enfoca en el empleo de biomateriales biodegradables y biocompatibles, que puedan conformar nanoestructuras en base a técnicas simples y fácilmente escalables. La Fig 1.3 ilustra en términos científicos la producción en el tiempo referida a nanopartículas (NP) diseñadas con fines de encapsulación y entrega dirigida y controlada. Puede observarse el aumento exponencial de publicaciones en el campo referido.

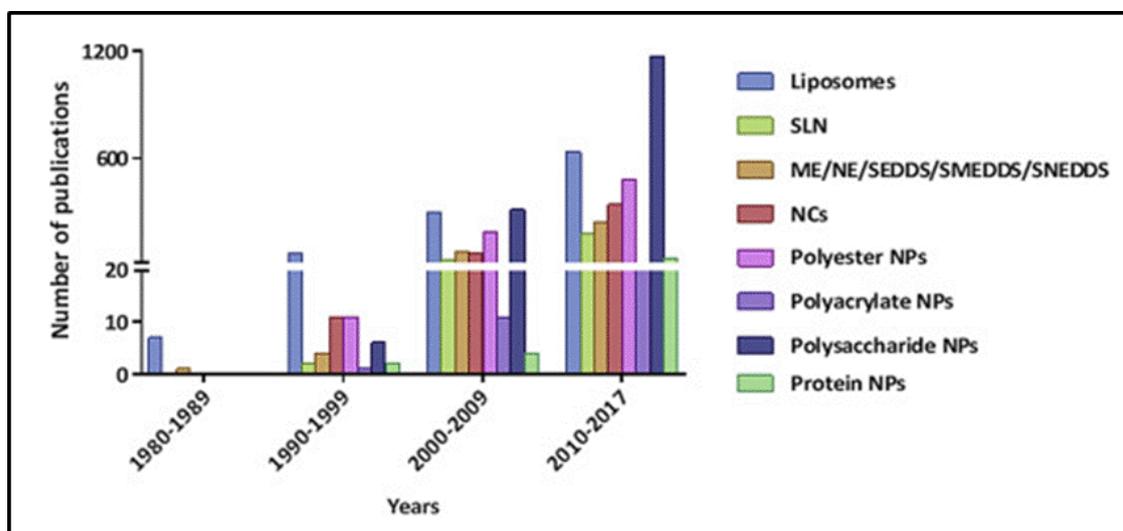


Fig. 1.3: Evolución en el número de publicaciones referidas a nanosistemas de aplicación en biomedicina, en el tiempo, desde 1980 en adelante. Adaptado de (Santalices *et al.* 2017).

Cabe mencionar, que si bien los liposomas y las nanopartículas biopoliméricas son las estructuras que reciben más atención, existe un creciente interés por el diseño de nanopartículas inorgánicas, hechas

de oro u óxido de hierro (Heinemann *et al.* 2014), silicio y tubos de carbono (Garcia-Fuentes *et al.* 2005).

En la actualidad, el mercado para proteínas y péptidos está creciendo exponencialmente, siendo las drogas compuestas de proteínas las más vendidas en años recientes, especialmente los anticuerpos (Mitragotri *et al.* 2014).

Se han hecho numerosos intentos para superar los impedimentos que presenta el uso de nano-vehículos para la entrega de drogas. Estos esfuerzos se han dirigido al diseño de nano-medicamentos que ya se encuentran en el mercado o que han superado la etapa de pruebas en animales (Weissig *et al.* 2014). Si bien muchas estrategias se han concentrado en variadas modalidades de administración (ocular, pulmonar, transdérmica), la mayoría de los diseños se concentran en la administración oral o en la entrega localizada hacia la cavidad abdominal (Lewis & Richard 2015) o en la entrega sistémica por vía oral o parenteral (Patel *et al.* 2014)(Santalices *et al.* 2017).

Por otro lado, siempre resulta un desafío extender la estabilidad proteica en estas formulaciones, evitar la desnaturalización y proteger las proteínas de la autoagregación.

En general, las nanopartículas tienden a agregarse para minimizar la energía libre superficial y dichos agregados y sus propiedades superficiales pueden desencadenar el proceso de opsonización en la sangre luego de la liberación sistémica, volviendo a las nanopartículas más reconocibles para los sistemas de defensa y exponiéndolas a ser removidas por las células de defensa del sistema inmunológico. Sin duda esta situación disminuiría la efectividad de las NP (Gref *et al.* 1994).

Además, la heterogeneidad y la naturaleza altamente iónica de la sangre puede fácilmente incrementar dicha agregación, ocasionando la pérdida de funcionalidad de las plataformas de entrega de drogas nanoparticuladas. Entonces, incrementar la vida media dentro del torrente sanguíneo es uno de los primeros objetivos al desarrollar NP como vehículos de entrega de drogas.

1.1. COMPUESTOS ENCAPSULANTES POLIMÉRICOS

El empleo de biopolímeros, tales como los polisacáridos, presenta múltiples ventajas en el desarrollo de nanopartículas. Los polisacáridos se encuentran entre las sustancias más abundantes de la naturaleza; son de bajo costo y su obtención es ampliamente conocida, lo que los convierte en reemplazantes naturales de los polímeros sintéticos.

Son además materiales seguros, no tóxicos y biodegradables. Sus diferentes composiciones les confieren un sinfín de estructuras y propiedades (peso molecular, carga, polaridad, solubilidad, etc.)

(Joye & McClements 2014) que aumentan en la mayoría de los casos la biodisponibilidad de los compuestos encapsulados.

En este marco, se han realizado varios intentos de desarrollar sistemas de encapsulación y posterior liberación "sitio-específica" de compuestos de importancia biológica, tanto en el sector alimentario como en el farmacéutico y el cosmético empleando estos materiales como agentes encapsulantes (Nasti *et al.* 2009). En los últimos años, ha habido un creciente interés en el diseño de sistemas de liberación sitio-dirigida o liberación sitio-específica (*delivery systems*) basados en estructuras poliméricas. De esta manera se encapsula, protege y libera compuestos bioactivos beneficiosos para un sistema biológico determinado.

1.1.1. INTERACCIONES PROTEÍNA-POLISACÁRIDO

Las interacciones proteína – polisacárido juegan un rol significativo en la estructura y estabilidad de muchos desarrollos farmacológicos. El control o la manipulación de estas interacciones macromoleculares, son un factor clave para el diseño de nuevos medicamentos, tanto en su desarrollo como en su formulación (Jones *et al.* 2010).

INTERACCIONES FÍSICO-QUÍMICAS Y ESTABILIDAD DE LOS SISTEMAS

La mezcla de proteínas y polisacáridos puede originar una fase estable o fases separadas, dando cuatro tipos de sistemas que difieren en sus estructuras y propiedades (Fig. 1.4): 1) una sola fase conteniendo complejos solubles, (determinado por interacciones electrostáticas y uniones hidrógeno que los estabilizan); 2) una sola fase conteniendo los diferentes biopolímeros en dominios en los cuales ambos polímeros se excluyen mutuamente debido a una limitada incompatibilidad termodinámica; 3) formación de un complejo electrostático insoluble y una fase soluble (coacervación); 4) un sistema de dos fases en que ambos biopolímeros están principalmente en fases diferentes (llamados también sistemas emulsión agua – agua) debido a incompatibilidad termodinámica (McCLEMENTS 2005).

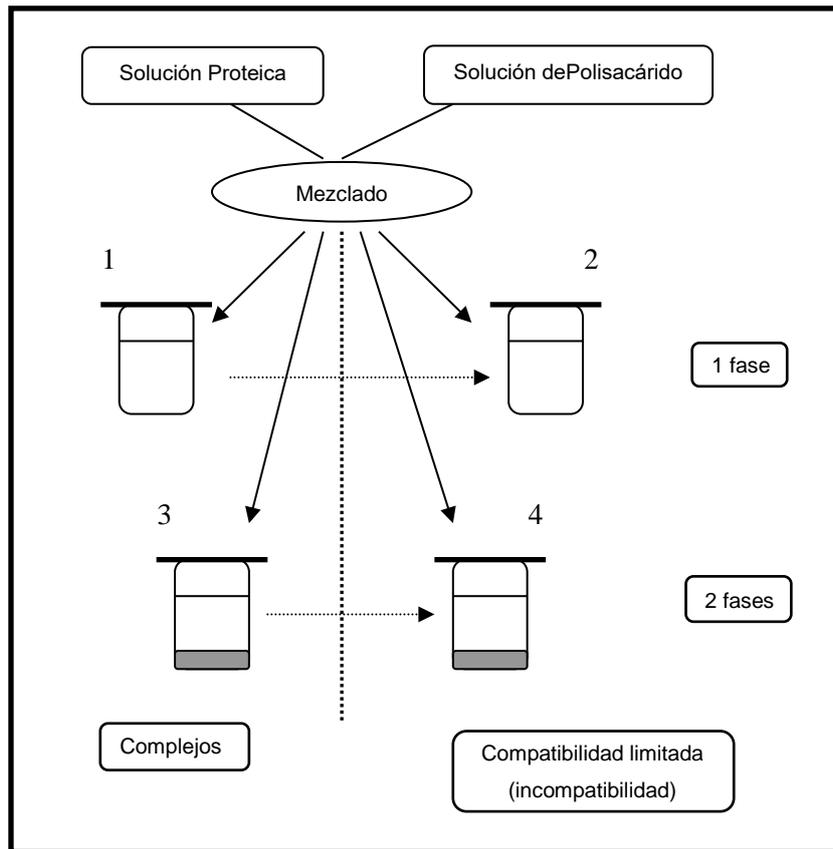


Fig. 1.4: Representación esquemática de cuatro posibles sistemas obtenidos de la mezcla de soluciones de proteína y polisacárido. Adaptado de (Tolstoguzov 1991).

FORMACIÓN DE COMPLEJOS ELECTROSTÁTICOS

Las interacciones macromoleculares involucradas en la formación de complejos pueden ser de tres tipos: a) entre polielectrolitos, b) entre grupos con cargas opuestas (ácidos y básicos) y c) entre otros grupos disponibles de los polielectrolitos. En el primer caso, la carga neta, forma, tamaño y flexibilidad de las macromoléculas son importantes, mientras que en los otros casos es importante la reactividad de los grupos de los residuos de aminoácidos disponibles en la superficie exterior de la molécula proteica y de las unidades de azúcares de las cadenas de los polisacáridos (Jones *et al.* 2010).

La formación de complejos electrostáticos es usualmente un proceso reversible que depende del pH y la fuerza iónica del medio, entre otros factores (Tabla 1.1) y está favorecida cuando los componentes presentan cargas opuestas. Ambos biopolímeros presentan un comportamiento electrostático dependiente del pH del medio: la proteína tiene carga (-) si $\text{pH} > \text{pI}$ (pH al cual la carga neta es cero); carga (+) si $\text{pH} < \text{pI}$. Los polisacáridos más usados presentan grupos químicos con un $\text{pK}_{\text{a}}_{\text{polisacárido}} < \text{pI}_{\text{proteína}}$. Aún a pH neutro pueden ocurrir interacciones electrostáticas entre polisacáridos aniónicos y subunidades cargadas positivamente de proteínas oligoméricas. Otro fenómeno que

participa en la formación de estos complejos es el mecanismo de regulación de carga, por el cual el equilibrio de protones de los distintos residuos titulables de una proteína se ve afectado por la presencia de otras proteínas, polisacáridos, superficies o membranas, dando lugar a interacciones moleculares atractivas entre las especies (Lund & Jónsson 2013).

Tabla 1.1: Factores que influyen en la formación de complejos proteína – polisacárido

Parámetros fisicoquímicos e interacciones	Parámetros internos	Parámetros externos
Interacciones electrostáticas. Interacciones no – electrostáticas. Uniones puente hidrógeno. Interacciones hidrofóbicas. Enlaces covalentes.	Densidad de carga, peso molecular, tamaño, relación de concentraciones biopolímero/ biopolímero. Conformación, topografía	Fuerza iónica, pH, temperatura, velocidades de deformación, tiempos de deformación, presión, forma de preparación de la mezcla, presencia de otros componentes*

*sales, lípidos, agentes con actividad superficial, polisacáridos

Durante la formación de los complejos electrostáticos, la carga neta disminuye, reduciéndose la hidrofiliidad y la solubilidad del complejo. Las partículas dispersas de complejo insoluble se agregan y en casos extremos precipitan, formando una fase dispersa de complejo de coacervación.

Algunas aplicaciones industriales de complejos proteína – polisacárido son la purificación de macromoléculas (ej. proteínas), la microencapsulación en biotecnología, cosméticos, farmacia y medicina, ingredientes alimentarios y los biomateriales (Myrick *et al.* 2014).

La versatilidad de los polisacáridos como material encapsulante queda demostrada en la variedad de aplicaciones para los que son utilizados. Por ejemplo, se emplean partículas de carboximetil-quitosano para entrapar doxorubicina, se emplea una combinación de pululano y colesterol para la entrega controlada de insulina, se diseñan microtúbulos de dextranos para encapsular y suministrar bioactivos en reconstrucciones de tejidos dañados y se construyen nanopartículas de tipo *core-shell* con un centro de gelatina y polisacáridos y una capa externa formada de polielectrolitos para el transporte y la entrega de galato de epigallocatequina (Myrick *et al.* 2014).

1.2. ESTRATEGIAS Y MÉTODOS PARA LA GENERACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Existen dos estrategias para la generación de nanopartículas: Arriba-abajo (*Top-down*) y Abajo-arriba (*Bottom-up*). En la primera, el proceso comienza con materiales de escala macroscópica, que se van reduciendo hasta obtener el tamaño de partícula deseado. Para la segunda estrategia, por el contrario, se busca el ensamble de componentes más pequeños para lograr estructuras más complejas (Ahmed & Aljaeid 2016).

Arriba-abajo (*Top-down*). Los procesos comúnmente asociados a esta estrategia son molienda, trituración, homogeneización y extrusión, que involucran la ruptura de sólidos o líquidos en partículas más pequeñas. Con este fin, se emplean con asiduidad las fuerzas de compresión, impacto y cortantes (Merisko-Liversidge *et al.* 2003). Si bien esta estrategia se emplea en la industria para generar partículas biopoliméricas, resulta complejo en muchos casos desarrollar partículas con propiedades estructurales bien definidas y que salvaguarden la integridad físico-química de los bioactivos (Joye & McClements 2014).

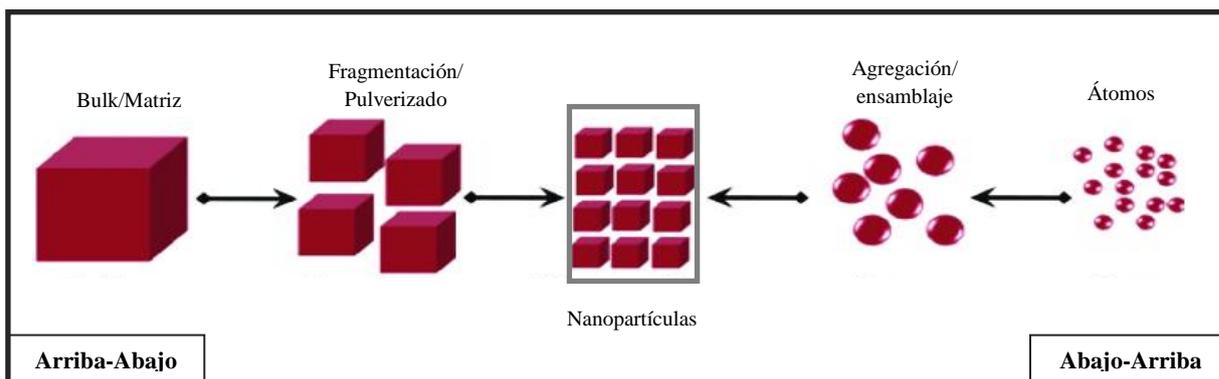


Fig. 1.5: Estrategias *Top-down* y *Bottom-up* para generar nanopartículas. Adaptado de (Pareek, V., Bhargava, A., Gupta, R., Jain, N., Panwar 2017).

Abajo-arriba (*Bottom-up*). Este enfoque se caracteriza por la construcción de partículas mediante autoensamblaje o auto-organización de moléculas debido a cambios en las condiciones del entorno, como pH, fuerza iónica, temperatura o concentración. Esta estrategia permite la formación de partículas muy pequeñas y un alto grado de control sobre sus propiedades (tamaño, morfología, etc.). A continuación se enumeran brevemente algunas de las técnicas más representativas de este enfoque.

Autoensamblaje molecular. Cuando un material anfifílico es disuelto en una solución acuosa, se forman autoagregados de manera espontánea, por medio de asociaciones intra- o intermoleculares entre los dominios hidrofóbicos, principalmente para minimizar la energía libre interfacial. Las nanopartículas así formadas exhiben características únicas, dependiendo de los constituyentes hidrofóbicos/hidrofílicos. En muchos casos, se obtienen estructuras de tipo *core-shell*: un centro hidrofóbico rodeado de una corona hidrofílica. (Yang *et al.* 2015a)

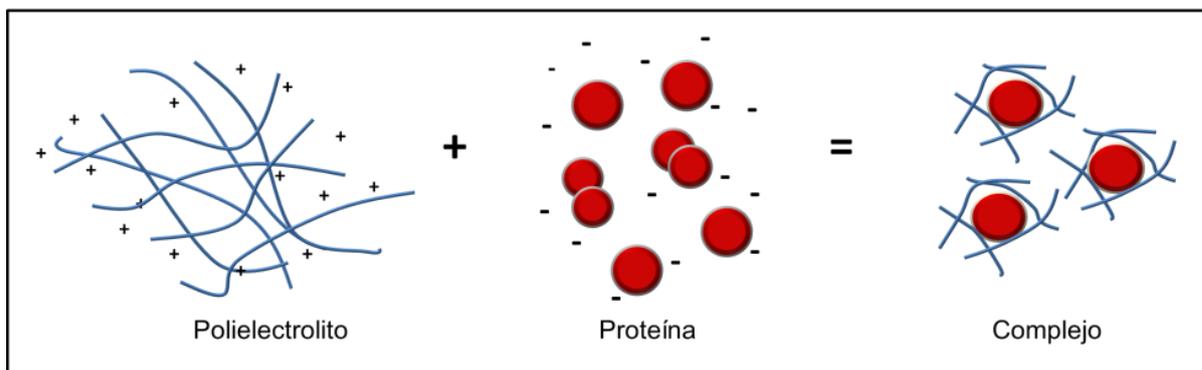


Fig. 1.6: Autoensamblaje molecular para especies de carga opuesta (interacción electrostática), con formación de partículas de tipo *core-shell*.

Gelificación iónica. Este método se basa en la habilidad que tienen los polielectrolitos para entrecruzarse en presencia de contraiones y formar cuentas/esferas de hidrogel. Dichas cuentas se producen al dejar gotear una solución polimérica que contiene la droga a encapsular, dentro de una solución acuosa de cationes polivalentes. Los cationes difunden dentro de las largas moléculas de polímero y forman un entramado tridimensional de regiones entrecruzadas iónicamente (Patil *et al.* 2012).

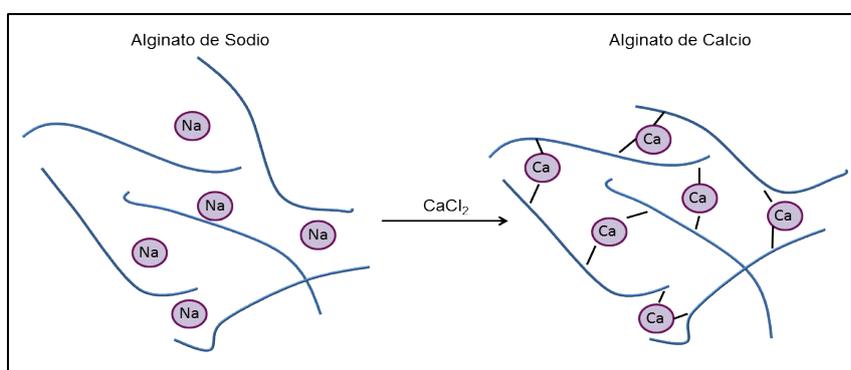


Fig. 1.7: Esquema de gelificación iónica. En el ejemplo, el agregado de calcio promueve la solidificación de la red de alginato.

Desolvatación. Un polisacárido es desolvatado por medio de cambios en la carga o la adición de un agente desolvatante, induciendo un efecto de coacervación. Entre los agentes que provocan la desolvatación más comunes se encuentran ciertos alcoholes y sales, dependiendo de la droga que se desee encapsular (Yang *et al.* 2015a).

Coacervación compleja. Ocurre cuando se mezclan dos polielectrolitos de cargas opuestas y tiene lugar una separación de fases, mediada por interacciones electrostáticas entre las dos especies. Como se detalló en la sección 1.3, se forman una fase rica de NP poliméricas, llamada coacervado y una fase de sobrenadante depletada o con escasa concentración de nanopartículas. Este método permite la

encapsulación de variadas drogas en fase acuosa a bajas temperaturas, preservando su actividad (Hudson & Margaritis 2014).

Liofilización. Puede emplearse como una forma de deshidratación para aquellos materiales termosensibles. Involucra el congelamiento, la sublimación y la desorción del agua de la solución polimérica. Esta técnica da origen a muestras con alto grado de porosidad, que pueden ser reconstituídas con relativa facilidad (Joye & McClements 2014). En realidad se trata de un proceso de entrapamiento físico de moléculas bioactivas.

Nanodeshidratación (*Nano Spray Drying*). La solución con las especies que conformarán las nanopartículas es impulsada a través de una rejilla con poros micrométricos, la cual vibra a frecuencias ultrasónicas. Esto produce un aerosol de pequeñas gotas cargadas, que gracias a un flujo de aire son secadas, para dar lugar a un polvo fino (Maged *et al.* 2016). Análogamente a la liofilización, es otro modo de entrapamiento físico de bioactivos.

1.3. RUTAS DE ADMINISTRACIÓN PARENTERALES Y NO PARENTERALES

El término parenteral hace referencia a la introducción dentro del cuerpo de alguna sustancia implantada, inyectada o infundida en los capilares, espacios tisulares o compartimentos corporales. Desde el lugar de la administración, la droga es transportada al sitio de acción. Ya que el procedimiento de administración se vale de una punción o una incisión, esta ruta se considera invasiva. Los ejemplos más comunes para esta ruta son las administraciones intradermal, subcutánea, intramuscular, intravenosa e intra-arterial (Ahmed & Aljaeid 2016).

La ruta parenteral suele ser la elegida a la hora de suministrar una gran cantidad de masa activa de proteínas y en el formato vacunas, debido a la baja biodisponibilidad y/o baja inmunogenicidad que presentan al emplear otro tipo de rutas (Dean *et al.* 2001). Sin embargo, las inyecciones periódicas no son apropiadas para todos los pacientes, niños por ejemplo, y muchas formulaciones inyectables tienen altos costos de producción. Es por esto que en años recientes ha habido un gran interés en rutas de administración no invasivas, como la ruta mucosa, que involucra las vías oral, bucal, nasal, pulmonar y vaginal (Christopeit *et al.* 2008)(Gradishar *et al.* 2005).

En términos generales estas rutas, si bien no invasivas, presentan bajos índices de absorción y el bioactivo es susceptible a la degradación enzimática. En términos más particulares las vías nasal y pulmonar son especialmente atractivas gracias a que la actividad proteolítica local suele ser baja (Duncan 2006)(Galley & Webster 2004). Aunque por otro lado estas rutas alternativas han sido asociadas a biodisponibilidades variables o bajas, limitada capacidad de entrega, condiciones extremas de pH, poca penetración de proteínas a través de mucosas o barreras dérmicas y una eficiencia de inhalación variable (Yu *et al.* 2016). Por último, los medicamentos administrados por estas vías pueden

desencadenar respuestas inmunológicas tanto a nivel local como sistémico. La Fig 1.8 muestra esquemáticamente las principales vías de administración de fármacos en el cuerpo humano.

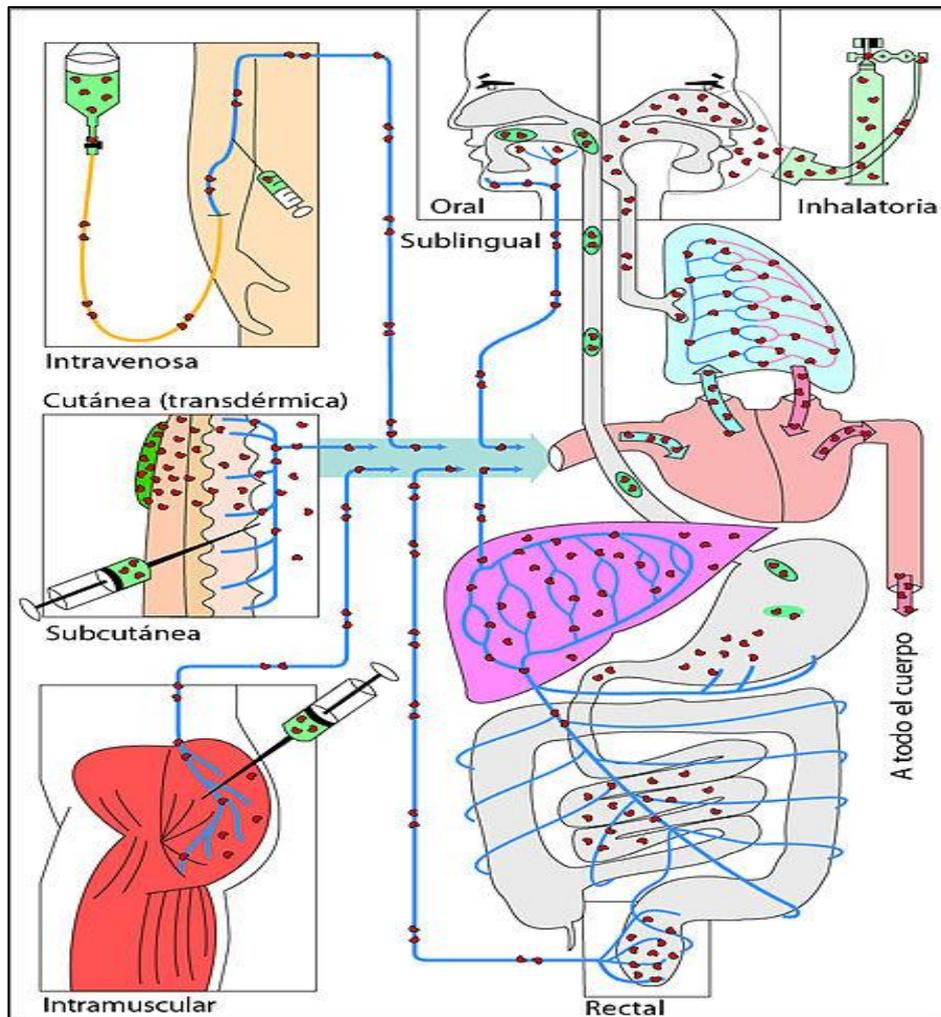


Fig. 1.8: Esquema que describe las principales vías de administración de fármacos en el cuerpo humano.

Autora: Mgtra. Yamilka Lineth Sanchez Alvarado.

En el diseño de una nueva forma de administración de un bioactivo encapsulado en una nanopartícula y al considerar cierta ruta de administración debe elegirse un polímero capaz de conservar su integridad al sortear todas las barreras que dicha ruta presentará, debe ser capaz de proteger el bioactivo que transporta y que una vez alcanzado el sitio de entrega, debe liberar de manera controlada su carga. En términos experimentales, estas restricciones determinan de qué manera habrá de comprobarse la efectividad de la nanopartícula en cada una de estas barreras, qué pHs se considerarán, qué líneas celulares serán las indicadas para las pruebas *in vitro*, qué respuestas celulares son las esperadas, etc.

Por ejemplo, si evaluamos las rutas de administración oral y pulmonar, exhibidas en la Fig1.9, es posible detectar cada una de las barreras a sortear, así como también los sitios de destino de cada ruta. Para la ruta pulmonar (Fig. 1.9.b), la mayoría de las barreras se relacionan con la aerolización de la nanopartícula y su desplazamiento mecánico por el sistema de conexiones que componen el sistema respiratorio. Una vez alcanzados los bronquiolos, éstas deben interactuar con una capa de mucosidad y con el epitelio pulmonar, para lograr que la droga de interés alcance el torrente sanguíneo.

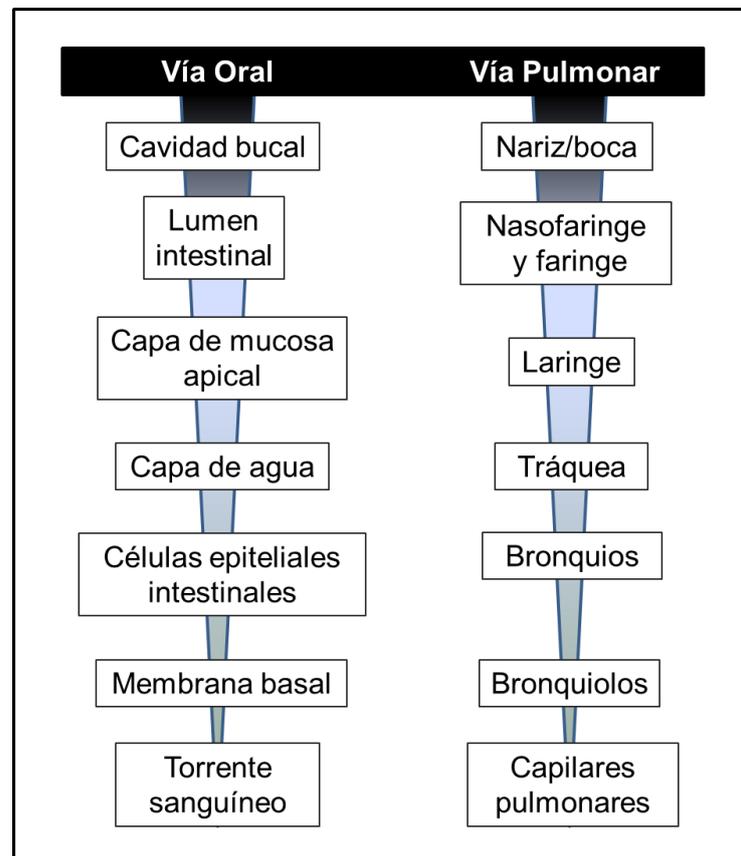


Fig. 1.9: Comparación de las barreras a sortear por un bioactivo o una droga durante su administración por vía oral y pulmonar. Adaptado de (Sharma *et al.* 2015)

Emplear el tracto respiratorio presenta múltiples ventajas para la entrega de proteínas bioactivas: 1) la actividad proteolítica es baja comparada con la del tracto intestinal, 2) es fácil obtener una respuesta inmune fuerte en ambas rutas a través del tejido linfático asociado a la mucosa, que contiene muchos folículos linfáticos (áreas de células β), macrófagos y células dendríticas y 3) estas rutas requieren dosis más bajas que la ruta oral (Dombu & Betbeder 2013a). Por estas razones, el tracto respiratorio posee un gran potencial como vía de administración. El epitelio de la vía aérea está firmemente cerrado por las uniones estrechas y la capa de mucosidad cubre las partes alta y central del tracto respiratorio (nariz, tráquea, bronquios y bronquiolos), lo que limita la absorción de proteínas en el lumen respiratorio (Amidi *et al.* 2010). Las uniones estrechas entre células epiteliales del epitelio distal son menos firmes (anteriores a los alveólos) y casi no existe mucosidad, lo que permite el acceso

relativamente simple de las proteínas bioactivas a los sistemas vasculares y linfáticos cercanos (Edwards *et al.* 2016).

La entrega por vía pulmonar se beneficia de la extensa superficie de intercambio de la estructura alveolar, una red muy densa de capilares y una barrera epitelial delgada, al tiempo que evita la proteólisis gastrointestinal y el metabolismo hepático. Esto se traduce en el aumento de la biodisponibilidad dentro del cuerpo y la reducción de efectos secundarios en zonas ajenas al sitio de acción (*off-target*) (Iyer *et al.* 2015).

Con estos antecedentes, en la presente Tesis se optó por explorar la vía pulmonar como vía de administración de los nanosistemas aquí diseñados y en función de ello se planificaron los experimentos conducentes a explorar la interacción del quitosano empleado con una capa de mucus, en la cual predomina la proteína Mucina, y el comportamiento de las nanopartículas generadas. Se constató la capacidad de la insulina encapsulada para activar su receptor, en fibroblastos 3T3 y en un modelo de epitelio pulmonar, la línea celular Calu-3.

1.4. TRANSPORTE DE NANOPARTÍCULAS EN TEJIDOS

El moco secretado por las células de los epitelios internos tiene como función excluir patógenos y otros materiales dañinos que podrían dañar las células, permitiendo al mismo tiempo la difusión de nutrientes, proteínas y moléculas esenciales (Washington *et al.* 2000). Este sistema constituye el primer mecanismo de defensa para atrapar y remover objetos en la nano y microescala, virus y bacterias.

Las mucosas protegen variados espacios del cuerpo humano: nariz, pulmones, vejiga y tracto reproductivo, entre otros. La capa de mucus se compone en un 90% de agua, mucinas (5%), lípidos y sales minerales. Las mucinas son proteína altamente glicosiladas que forman una red viscoelástica (Lai *et al.* 2009) y están cargadas negativamente debido a la presencia de ácido siálico y monosacáridos sulfatados dentro de las cadenas de azúcares. El espesor de la capa mucosa varía entre 300 μm en el estómago a 700 μm en el intestino, con poros de entre 20 y 200 nm de diámetro (Round *et al.* 2012). El epitelio debajo de esta cubierta de mucina consiste en otras capas de células unidas entre sí mediante uniones estrechas, con separaciones menores a 0,1 nm, que restringen el pasaje de NP (Ensign *et al.* 2013). Un esquema ilustrativo se resume en la Fig. 1.10.

Las nanopartículas pueden atravesar el tejido epitelial siguiendo la ruta paracelular o la transcelular. La primera constituye el pasaje de sustancias a través de los espacios intercelulares, por difusión. La

segunda ocurre directamente a través de las mismas células epiteliales (Yamanaka & Leong 2008), e intervienen caminos celulares más complejos con requerimiento de energía.

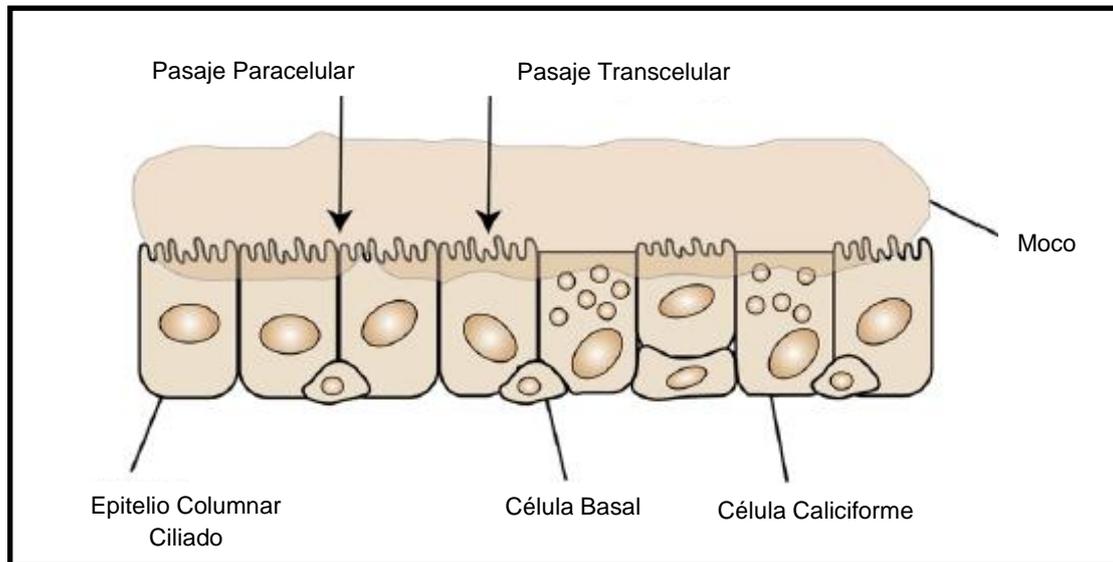


Fig. 1.10: Vista lateral esquemática del epitelio pulmonar. Adaptada de (Amidi *et al.* 2010).

La mucosidad inmoviliza partículas mediante interacciones hidrofóbicas y electroestáticas, además de puentes de hidrógeno. En el pulmón humano, existen dos capas de mucosidad: la periciliar, de tipo sólido y con un espesor entre 5 y 10 μm y la luminal, de tipo gel, de 60 μm de espesor. La primera presenta mayor contenido de agua y es cercana al epitelio. La segunda se encuentra entre las cilias celulares y su función es impulsar el moco dentro y fuera de los pulmones, capturando cualquier material externo (Jeon *et al.* 2013)(Barua & Mitragotri 2014).

1.5. BIOADHESIÓN

El término bioadhesión se define como el acoplamiento de un polímero o una macromolécula natural, a la mucosidad o superficie epitelial. Existe una variedad de fuerzas que pueden contribuir a anclar un polímero a la capa de mucus o a un tejido. Las fuerzas covalentes entre biopolímero y mucus son adecuadas si el material polimérico no es tóxico. Los mejores candidatos serán aquellos materiales capaces de generar interacciones electroestáticas o polares débiles, aun cuando las interacciones fuertes entre los grupos químicos del polímero y la mucosidad serán necesarias para mantener en contacto el material encapsulante o *carrier* conteniendo el bioactivo y el tejido por un período prolongado. De todas maneras, la fuerza de interacción resultante será una combinación de fuerzas

hidrofóbicas e hidrofílicas (J W Lee, J H Park 2000). La Figura 1.11 ilustra el fenómeno de bioadhesión que ocurre en un epitelio; ésta representa la liberación de un compuesto hipotético (en rojo) nanoencapsulado en nanopartículas (en verde) adheridas a una capa de mucus (azul).

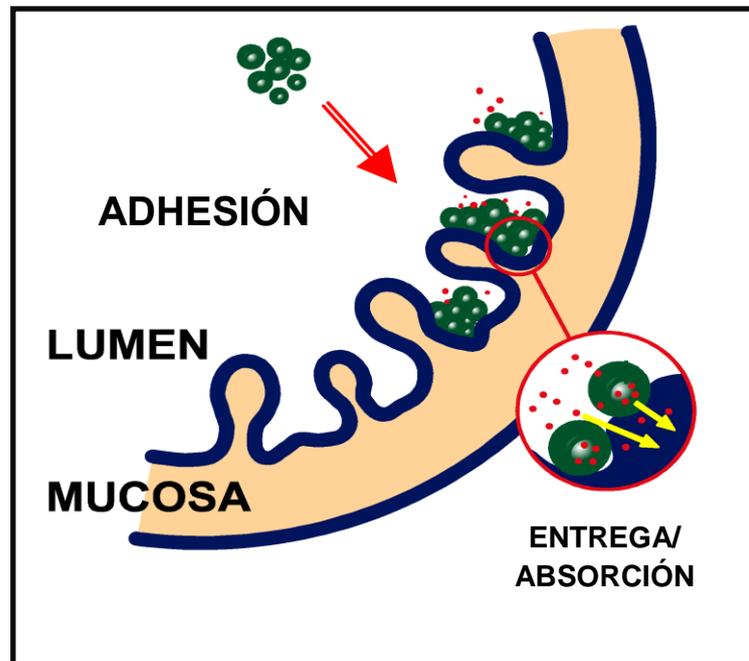


Fig. 1.11: Bioadhesión sobre superficie mucosa. Adaptado de (Irache *et al.* 2005).

1.6. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE POLISACÁRIDOS

Así como sucede con las proteínas, la estructura molecular de los polisacáridos depende de su secuencia de monómeros, las condiciones ambientales prevaletientes y su historia fisicoquímica y reológica. Los polisacáridos difieren entre sí en términos de tipo, número, secuencia y la clase de uniones de monosacáridos constituyentes de la secuencia principal. Estas diferencias químicas se traducen en propiedades moleculares diferentes, como peso molecular, grado de ramificación, estructura, flexibilidad, carga eléctrica e interacciones. A su vez, estas diferencias moleculares dan lugar a diferencias en las propiedades funcionales, como solubilidad, gelificación, capacidad de retención de agua, emulsificación y actividad superficial (Semenova 2017).

Existe cierto número de factores que deben ser tenidos en cuenta al momento de seleccionar polisacáridos apropiados – o una combinación de ellos- para fabricar un sistema de entrega basado en estos materiales. Es importante establecer las condiciones de la solución y del entorno en el que se encuentran las moléculas y que les permite asociarse con otros polisacáridos u otros tipos de

moléculas. Esto requiere conocer las propiedades fisicoquímicas de las especies involucradas, como las temperaturas de transición de eventos de deshidratación, transición vítrea (T_g), agregación, propiedades eléctricas, pK_a , sensibilidad a iones mono o polivalentes, o susceptibilidad a reacciones químicas o enzimáticas (Devi *et al.* 2017).

Para ciertas aplicaciones, es importante establecer las características eléctricas de las moléculas empleadas (potencial ζ versus pH), ya que las interacciones electroestáticas pueden ser usadas para ensamblar estructuras poliméricas específicas. La carga eléctrica de los polisacáridos depende de la naturaleza de los grupos iónicos a lo largo de la cadena, como así también de las condiciones de la solución. Algunos de estos materiales son neutros (almidón, celulosa), algunos aniónicos: (alginate, carragenano, xantano) y otros catiónicos (quitosano). La magnitud de la carga eléctrica depende del pH en relación al pK_a de los grupos cargados. Aquellos de naturaleza aniónica tienen a ser neutrales a pH suficientemente inferiores al pK_a y negativos a pHs superiores, mientras que los catiónicos tienden a ser neutrales a pHs superiores y positivos para pHs inferiores. Los grupos cargados más comunes son los sulfatos, como en carragenanos por ejemplo, grupos carboxilos como en la pectina, alginate, carboximetilcelulosa y aminos como en quitosano.

La carga eléctrica de los polisacáridos puede ser alterada por interacciones con otras especies iónicas de su entorno. Estas interacciones suelen involucrar iones mono o multivalentes como sodio o calcio, que se unen a grupos cargados de la cadena biopolimérica, alterando la carga total.

Tercero, es importante establecer la naturaleza de las partículas biopoliméricas que pueden formarse empleando polisacáridos, así como también su morfología, densidad, índice de refracción, tamaño, carga y estabilidad frente a pH, presencia de sales, temperatura y enzimas (Jones *et al.* 2010).

1.7. QUITOSANO

El quitosano (CS) ha sido considerado el biopolímero del siglo XXI debido a que en las últimas décadas, su estudio y sus consecuentes usos han crecido exponencialmente (Chen *et al.* 2013). Es biodegradable, biocompatible y no tóxico (Khan *et al.* 2000) y también son conocidas sus propiedades antimicrobianas y su capacidad de formar films (Assis *et al.* 2002).

Una de las características más significativas para ser utilizado en este trabajo de Tesis es, sin embargo, que posee excelentes propiedades de mucoadhesión. Como la absorción de la mayoría de los principios activos de medicamentos es controlada por un proceso de difusión pasiva, para incrementar dicha absorción es crucial mantener un gradiente de concentración tan pronunciado como sea posible. Este hecho representa la fuerza impulsora que maximiza la absorción del componente de interés. Para lograr este objetivo, el sistema de entrega tiene que mantenerse el mayor tiempo posible en contacto

íntimo con la membrana de absorción, lo que puede ser garantizado mediante la utilización de sistemas de administración mucoadhesivos.

1.7.1. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

El precursor del CS, la quitina (Q), es un homopolisacárido lineal formado por unidades de N-acetyl-β-D-glucosamina. El CS se obtiene tras un proceso de desproteínización y de remoción de un gran número de grupos acetilos de la estructura de la Q (desacetilación), quedando expuestos así los grupos aminos (Fig. 1.12), siendo éstos los responsables de la versatilidad de este polímero (Reads 2014)(Colina *et al.* 2014)(H Hernández *et al.* 2009).

El grado de desacetilación (DD) y el peso molecular (PM) son las características más importantes de su estructura y definen sus posibles aplicaciones. Se considera CS cuando el DD de la molécula es mayor al 50%.

Por otro lado, su PM puede variar entre 5kDa y 2000kDa, desde oligómeros hasta polímeros de largas cadenas (Ramírez *et al.* 2002).

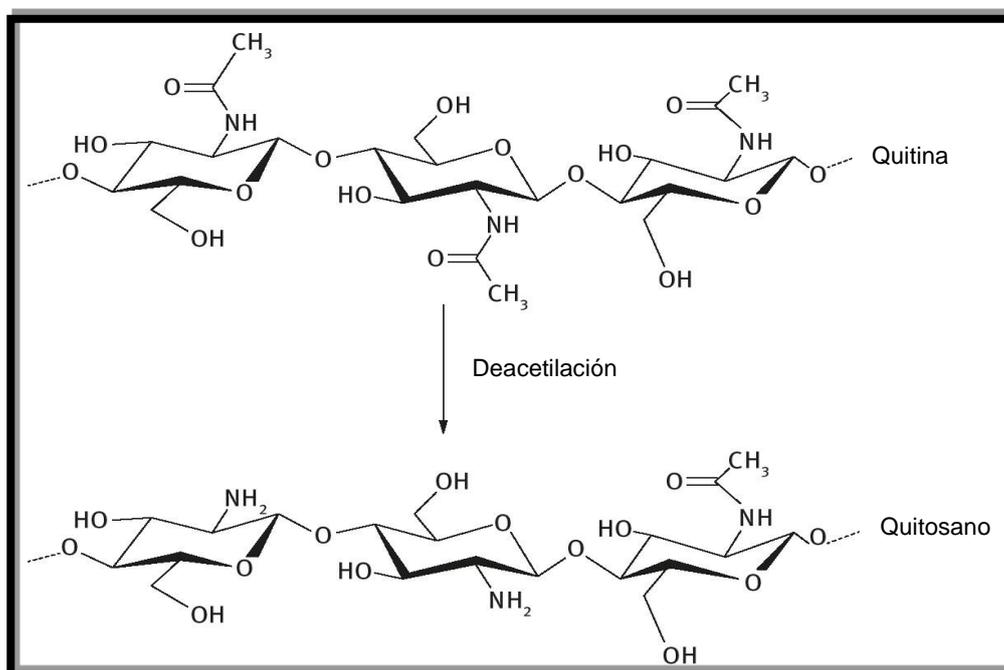


Fig 1.12: Estructuras químicas de la quitina y CS.

Las características de sus moléculas hacen de él un material muy versátil, permitiendo su uso en diferentes formas: en solución, films, hidrogeles, fibras, nanopartículas, microesferas, entre otras (Cremer *et al.* 2018)(Silva *et al.* 2017).

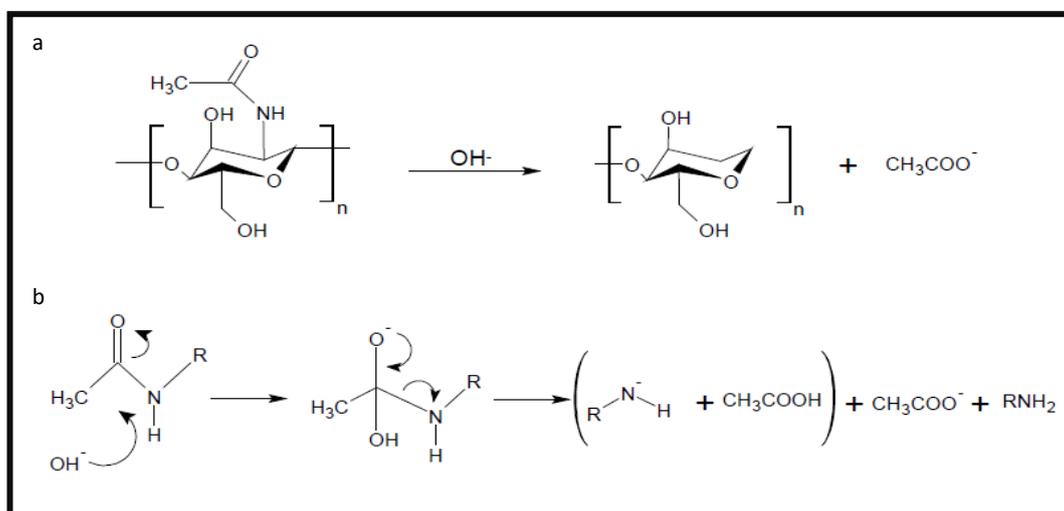


Fig. 1.13: Reacción de desacetilación del quitosano. (a) Reacción generalizada, y (b) Detalle del mecanismo de reacción (Montserrat Altamirano Pavón 2016).

1.7.2. ESTADO DEL ARTE

El CS es un polímero muy interesante ya que presenta baja alergenicidad (Cheung *et al.* 2015). También se ha reportado su carácter antitumoral al modificar los tiempos de entrega de las drogas y disminuir las dosis necesarias (Karagozlu & Kim 2014), antimicrobiano eficiente en forma de films contra *Escherichia coli* (ATCC 43895), *Salmonella typhimurium* (ATCC 19585), *Listeria innocua* y *Bacillus subtilis* (ATCC 1254) (Martins *et al.* 2014) y posee actividad antioxidante gracias a su capacidad antirradicalaria demostrada en estudios *in vitro* e *in vivo* (Ngo & Kim 2014). Tanto el peso molecular como el porcentaje de desacetilación (fracción molar de unidades desacetiladas) afectan y definen estas propiedades (Aranaz *et al.* 2009). Entre las aplicaciones más frecuentes para este polímero se encuentran su funcionalidad como excipiente farmacéutico y su potencial como material encapsulante, *nanocarrier* o nanovehículo (Felt *et al.* 1998), material para la reparación de heridas, como andamio para la ingeniería de tejidos (Zhang & Zhang 2002), el tratamiento de aguas servidas (Onsøyen & Skaugrud 1990). Se lo ha empleado en tratamientos para combatir la obesidad (Han *et al.* 1999). En este último caso, el CS interfiere con la actividad de la lipasa pancreática, lo que tiene un efecto directo en el almacenamiento de grasa en ratones.

Debido a que el CS deriva de un polímero natural, se lo suele catalogar como biocompatible, habiéndose demostrado su degradación *in vivo* por enzimas como la lisozima y la quitosanasasa, para dar lugar a oligómeros y unidades de N-glucosamina, la cual es de producción endógena en el cuerpo humano (Khor 2001). Sin embargo, para garantizar que un material sea biocompatible también debe evaluársele en términos de sus parámetros estructurales, su forma de administración, peso molecular, el uso asignado y la ruta de administración (Huang *et al.* 2004).

El quitosano empleado en este trabajo fue obtenido en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Tecnología Industrial (INTI), filial Mar del Plata. En la actualidad existe un proyecto conjunto entre dicho laboratorio y el Laboratorio Interdisciplinario de Dinámica Celular y Nano-Herramientas para escalar la producción de quitosano hasta un nivel de planta piloto y al mismo tiempo emplear el polímero como material encapsulante de bioactivos de valor para la industria farmacéutica. Dicho convenio quedó consolidado tras resultar financiado un subsidio de tipo PICT Start Up (Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica Start Up) en 2016, cuyo título es "Quitosano argentino para el desarrollo de nanocápsulas de tipo core-shell destinadas a la protección y liberación controlada de bioactivos".

La versatilidad de este material sumada a la disponibilidad de un producto de origen nacional supone un incentivo en su aplicación en variadas áreas de la industria como la cosmética, alimentaria, agrícola, médico-farmacéutica, biotecnológica, etc.

El desarrollo de nanopartículas a base de CS se encuentra limitado en el país debido a la inexistencia de este polisacárido con origen nacional, siendo muy altos sus costos de importación. Por lo tanto, si bien tener como paso previo a la generación de nanopartículas, la obtención de CS como etapa inicial, en realidad trae aparejado el beneficio de brindar a este biopolímero valor agregado como producto intermedio para futuros desarrollos.

Para la obtención de CS argentino se utiliza como materia prima residuos provenientes del procesado de crustáceos, principalmente sus exoesqueletos, los cuales poseen como principal componente estructural a la quitina. Actualmente, dichos residuos no son utilizados por las empresas pesqueras de nuestro país siendo volcados a cielo abierto provocando serios problemas ambientales (baja tasa de degradabilidad de los exoesqueletos, generación de olores, propagación de plagas). A modo de ejemplo, en la localidad de Trelew se desechan alrededor de 1470 toneladas anuales de exoesqueletos de langostinos, perdiendo así una fuente importante de materia prima para la obtención de CS (Fig. 1.14).



Fig. 1.14: Fotografías del sector de arrojado de residuos pesqueros en el Basural Municipal de Trelew – Marzo 2015 (Fuente: Informe Residuos de la pesca Trelew-Chubut Agosto 2015. Subsecretaría de educación ambiental. Municipalidad de Trelew).

Por lo dicho, este trabajo de Tesis no sólo plasma una innovación en el campo médico-farmacéutico mediante el desarrollo de NP de insulina, con el consecuente impacto en la salud de la sociedad, sino que plantea además una solución al problema ambiental que hoy generan los residuos del procesado de crustáceos, dejando abierta la puerta a nuevos desarrollos de productos a base de CS.

1.8. INSULINA

La insulina es una proteína globular (5,8 kDa) compuesta por dos cadenas polipeptídicas, la cadena A de 21 aminoácidos y la cadena B de 30 aminoácidos, unidas covalentemente por dos puentes disulfuro (Duan & Xu 2005). La representación de su estructura y secuencia aminoacídica se muestran en la Fig. 1.15. En sujetos sanos, inmediatamente después de ingerir alimentos, se secreta insulina desde las células β pancreáticas a la circulación portal, alcanzando insulinemias elevadas, con niveles máximos de hasta 80 uU/ml a los 30 min. La insulina secretada se unirá a las células del tejido adiposo, hígado y músculo, estimulando la entrada de nutrientes a la célula y evitando así un ascenso excesivo de la glicemia postprandial. Estos niveles retornan a niveles basales a las 2-3 h de la ingesta (Eyzaguirre & Codner 2006).

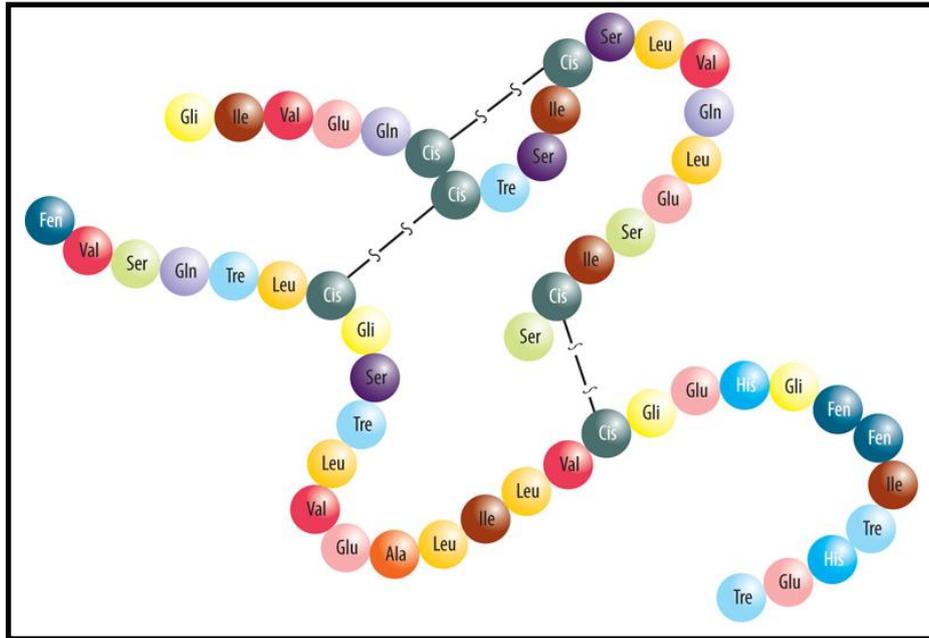


Fig. 1.15: Estructura de la Insulina. Adaptada de (Fernández-Tresguerres *et al.* 1999).

La insulina es liberada *via* exocitosis en el torrente sanguíneo, para contribuir a la utilización de glucosa periférica la que será destinada en la generación de energía (McPherson, R. A., Pincus 2017). Las respuestas coordinadas que estimulan la oxidación de la glucosa, inhibiendo al mismo tiempo la gluconeogénesis llevan a la acción hipoglicémica de la insulina. La concentración de glucosa decrece cuando la insulina dirige los transportadores de glucosa (GLUT4) hacia las membranas celulares e incrementa el transporte hacia las células diana (Choudhury *et al.* 2017), fenómeno representado en la Fig. 1.16.

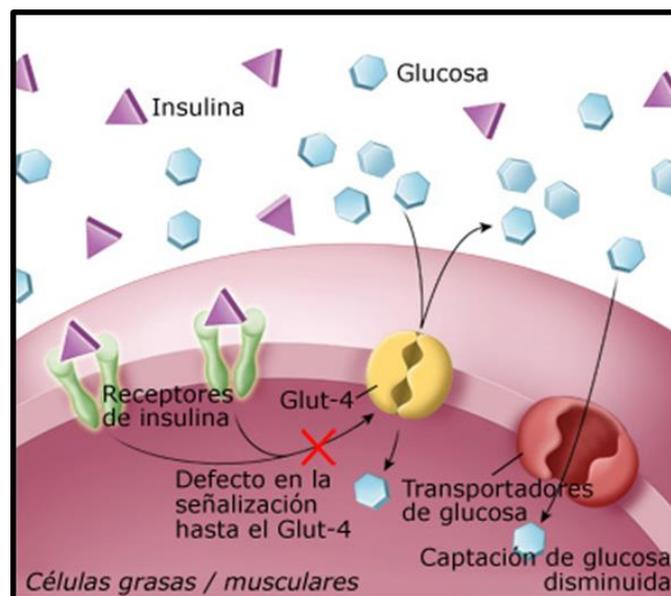


Fig. 1.16: Esquema de DM tipo 2: resistencia a la insulina. Extraído de <https://dtk.ucsf.edu/es/>.

El objetivo de la terapia con insulina es proveer un reemplazo de esta hormona para todos los pacientes que lo requieran. Sin embargo, es posible que surja algún tipo de resistencia a la insulina (Weiss, M., Steiner, D. F., Philipson 2014). En este contexto, las nanopartículas se destacan como un medio conveniente, seguro y no invasivo para la entrega de esta proteína (Kesharwani *et al.* 2018).

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad compleja que se caracteriza fundamentalmente por una insuficiencia absoluta o relativa de la secreción de insulina (DM tipo 1), y por una sensibilidad o resistencia de los tejidos al efecto metabólico de la insulina (DM tipo 2). La frecuencia de la diabetes va en aumento tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, debido al envejecimiento de la población, la tendencia al sedentarismo y el mejoramiento del control de las enfermedades infectocontagiosas (Gonz *et al.* 2000). Se estima que en todo el mundo, en 2012, había 371 millones de personas con DM, lo que representa un incremento de 125 millones en los últimos cinco años. En América Latina se estimaba que en el año 2010 existían 15 millones de personas con esta enfermedad, cifra que aumentaría aproximadamente un 14% en los siguientes 10 años. Específicamente en la Argentina, la cifra estimada era de 1.426.000 personas con DM en el año 2.000, previéndose que llegarán a 2.457.000 en el año 2030 (Gagliardino *et al.* 2013).

Las formas de administración de insulina más utilizadas son inyecciones y dispositivos de infusión continua subcutánea (bombas). La administración oral de esta hormona no es muy común debido a que presenta una baja biodisponibilidad, principalmente a causa del pH gástrico y las barreras enzimáticas del tracto intestinal y físicas del epitelio intestinal. La administración intraperitoneal, por otro lado, requiere que la insulina atraviese la cavidad peritoneal antes de alcanzar el torrente sanguíneo (Peer *et al.* 2007). La búsqueda de otras formas de administración más efectivas ha llevado al desarrollo de nanopartículas que actúan como nanovehículos para esta hormona.

Si bien la vía oral no es la más indicada para su administración, existen en la actualidad múltiples diseños de nanopartículas de insulina, que involucran diferentes materiales encapsulantes: dextrano, alginato, poli (ácido γ -glutámico), ácido hialurónico, ácido poliláctico y PCL (policaprolactona), entre otros (Fonte *et al.* 2015). Muchas de estas formulaciones incluyen excipientes tales como inhibidores enzimáticos y potenciadores de absorción (Alai *et al.* 2015), los cuales facilitan el recorrido de la insulina a través del tracto digestivo.

Además de la vía oral, se ha ensayado en ratas la administración intratraqueal de insulina en polvo, microencapsulada con quitosano, y se ha demostrado que el encapsulado aumenta la distribución hacia los pulmones y que el efecto es más pronunciado y prolongado en el tiempo que aquel de la insulina no encapsulada (Al-Qadi *et al.* 2012). Sin embargo, la vía nasal es en la actualidad la más considerada, luego de la oral. Por ejemplo, se ha demostrado que la absorción de insulina encapsulada en nanopartículas de quitosano conjugado con PEG (polietilenglicol) aumenta, y que la biodisponibilidad mejora al entrar en contacto con la mucosa respiratoria (Zhang *et al.* 2008)(Duan & Mao 2010). También se han empleado liposomas mucoadhesivos, que ha probado ser capaces de reducir los niveles de glucosa en sangre (Jain *et al.* 2007). Por último, se ha empleado una combinación de insulina

y L-CPP (Péptido penetrador celular) para aumentar la permeabilidad de la proteína a través de las células epiteliales nasales de ratas *Sprague Dawley* (Khafagy *et al.* 2009)(Dombu & Betbeder 2013b).

Las insulinas empleadas actualmente son insulinas humanas recombinantes. En general se clasifican como insulinas de acción rápida, análogos de acción rápida e insulinas de acción intermedia. Los análogos de insulina son insulinas que poseen modificaciones en ciertos aminoácidos, lo que cambia sus farmacodinámicas y sus tiempos de acción. Una lista de algunas de las insulinas más empleadas se da en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2: Tipos de insulina y tiempo de acción (adaptada de (Asenjo *et al.* 2007)).

Insulina	Tipo de Insulina	Inicio de acción	Pico de acción	Duración
NPH	Regular	2 hr	6 hr	12 hr
Glargina (Lantus)	Análogo de acción basal	2 a 4 hr	sin pico	24 hr
Detemir (Levemir)	Análogo de acción basal	15 a 30 min	sin pico	12 hr
Cristalina	Rápida	30 min	3 hr	6 hr
Lispro (Humalog)	Análogo de acción ultrarrápida	< 30 min	30 a 90 min	4 hr
Aspartica (Novorapid)	Análogo de acción ultrarrápida	< 30 min	30 a 90 min	4 hr
Glulisina (Apidra)	Análogo de acción ultrarrápida	10 a 15 min	30 a 60 min	4 hr

Los distintos esquemas de administración de insulina buscan imitar la secreción normal por parte del páncreas y a pulsos de secreción en relación a la ingesta de alimentos. El esquema a utilizar depende por una parte de la disponibilidad de las distintas insulinas así como del régimen de vida del paciente: horarios de vigilia, hábitos de alimentación y de actividad física.

Dentro de este contexto, el desarrollo de nanoencapsulados de insulina utilizando CS se enmarca dentro de una nueva generación innovadora de fármacos que persiguen como objetivos optimizar las cantidades administradas de esta hormona, disminuir o eliminar el riesgo de efectos no deseados (secundarios y tóxicos), mejorar la pauta posológica y acrecentar el intervalo temporal de su biodisponibilidad (“Sistemas de liberación Bioadhesivos Bioadhesive delivery systems” 2000).

BIBLIOGRAFÍA

- Agilent Technologies. (2011). Technical Overview: Polymer Molecular Weight Distribution and Definitions of MW Averages. *Agilent Technologies Technical Data*, **1**, 1–4.
- Ahmed, & Aljaeid. (2016). Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Design, Development and Therapy*, **10**, 483–507.
- Aiba. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, **14**(4), 225–228.
- Al-Qadi, Grenha, Carrión-Recio, Seijo, & Remuñán-López. (2012). Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations. *Journal of Controlled Release*, **157**(3), 383–390.
- Alai, Lin, & Pingale. (2015). Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. *Journal of Food and Drug Analysis*, **23**(3), 351–358.
- Alaimo, Gorojod, & Kotler. (2011). Neurochemistry International The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are involved in manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. *Neurochemistry International*, **59**(2), 297–308.
- Alhosseini, Moztafzadeh, Mozafari, ... Jalali. (2012). Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 25–34.
- Alvarado-Palacios, San Martín-Martínez, Gómez-García, Estanislao-Gómez, & Casañas-Pimentel. (2015). Nanoencapsulation of the Aranto (*Kalanchoe daigremontiana*) aquoethanolic extract by nanospray dryer and its selective effect on breast cancer cell line. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **7**(5), 888–895.
- Alvarenga. (2011). Characterization and Properties of Chitosan. *Biotechnology of Biopolymers*, 91–108.
- Amidi, Mastrobattista, Jiskoot, & Hennink. (2010). Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv Drug Deliv Rev*, **62**(1), 59–82.
- Anitha, Rani, Krishna, ... Jayakumar. (2009). Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, **78**(4), 672–677.
- Aranaz, Mengfbar, Harris, ... Heras. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, **3**, 203–230.
- Argenis Caicedo, & Perilla. (2015). Effect of pH on the rheological response of reconstituted gastric mucin | Efecto del pH en la respuesta reológica de mucina gástrica reconstituida. *Ingeniería e Investigación*, **35**(2), 1–6.
- Arpagaus. (2010). Laboratory Scale Spray Drying of Inhalable Particles : A Review, (February 2017).
- Arpagaus, John, Collenberg, & Rütli. (2017). *Nanocapsules formation by nano spray drying. Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. doi:10.1016/B978-0-12-809436-5.00010-0
- Asenjo, Muzzo, Perez, Ugarte P, & Willshaw. (2007). Consenso en el diagnóstico y tratamiento de la diabetes tipo 1 del niño y del adolescente. *Revista Chilena de Pediatría*, **78**(5), 534–541.
- Assis, Bernardes-Filho, Vieira, & Filho. (2002). AFM characterization of chitosan self-assembled films. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **51**(7), 633–638.
- Atitar, & Belhadj. (n.d.). World ' s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher The

Relevance of ATR-FTIR Spectroscopy in Semiconductor Photocatalysis.

- Bagre, Jain, & Jain. (2013). Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: In vitro and in vivo assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, **456**(1), 31–40.
- Barth. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1767**(9), 1073–1101.
- Barua, & Mitragotri. (2014). Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today*, **9**(2), 223–243.
- Berger, Reist, Mayer, Felt, Peppas, & Gurny. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, **57**, 19–34.
- Bhaskar, K. R., Gong, D. H., Bansil, R. A. M. A., Pajevic, S. I. N. I. S. A., Hamilton, J. A., Turner, B. S., LaMont. (1991). Profound increase in viscosity and aggregation of pig gastric mucin at low pH. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **261**(5), G827–G832.
- Bhattacharjee. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, **235**, 337–351.
- Birrenbach, & Speiser. (1976). Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **65**(12), 1763–1766.
- Blasi, P., A. Schoubben, S. Giovagnoli. (2010). Alginate micro- and nanoparticle production by spray drying. In Products, ed., *Meeting on lactose as a carrier for inhalation products*, Parma: Meeting on lactose as a carrier for inhalation products, pp. 137–138.
- Boateng, Matthews, Stevens, & Eccleston. (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems : A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(8), 2892–2923.
- Boonyai, Bhandari, & Howes. (2004). Stickiness measurement techniques for food powders: A review. *Powder Technology*, **145**(1), 34–46.
- Büchi Labortechnik. (2011). *Nano Spray Dryer B-90, literature review and applications en*.
- Builders, Kunle, Okpaku, Builders, Attama, & Adikwu. (2008). Preparation and evaluation of mucinated sodium alginate microparticles for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **70**(3), 777–783.
- Bürki, Jeon, Arpagaus, & Betz. (2011). New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer, **408**, 248–256.
- Calvo. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, **63**, 125–132.
- Catalunya. (n.d.). ANEXO A : MATERIALES Y MÉTODOS.
- Celli, Gregor, Turner, Afdhal, Bansil, & Erramilli. (2005). Viscoelastic properties and dynamics of porcine gastric mucin. *Biomacromolecules*, **6**(3), 1329–1333.
- Chan, H.K., Clark, A., Gonda, I., Mumenthaler, M., Hsu. (1997). Spray dried powders and powder blends of recombinant human deoxyribonuclease (rhDNase) for aerosol delivery. *Pharmaceutical Research*, **14**(4).
- Chan. (2006). Dry powder aerosol drug delivery-Opportunities for colloid and surface scientists. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **284–285**, 50–55.
- Chang, Wang, Hu, Zhou, Xue, & Luo. (2017). Pectin coating improves physicochemical properties of caseinate/zein nanoparticles as oral delivery vehicles for curcumin. *Food Hydrocolloids*, **70**, 143–151.

- Chantarasataporn, Tepkasikul, Kingcha, ... Chirachanchai. (2014). Water-based oligochitosan and nanowhiskey chitosan as potential food preservatives for shelf-life extension of minced pork. *FOOD CHEMISTRY*. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.019
- Chellat, Tabrizian, Dumitriu, ... Yahia. (1999). In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex, (X).
- Chen, Hu, & Huang. (2009). Talanta Chitosan modified ordered mesoporous silica as micro-column packing materials for on-line flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry determination of trace heavy metals in environmental water samples, **78**, 491–497.
- Chen, Mi, Liao, ... Sung. (2013). Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev*, **65**(6), 865–879.
- Cheung, Ng, Wong, & Chan. (2015). *Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. Marine Drugs*, Vol. 13. doi:10.3390/md13085156
- Choi, & Han. (2018). Food Hydrocolloids Development of a novel on e off type carbon dioxide indicator based on interactions between sodium caseinate and pectin. *Food Hydrocolloids*, **80**, 15–23.
- Choudhury, Pandey, Kui, ... Kesharwani. (2017). Journal of Traditional and Complementary Medicine An update on natural compounds in the remedy of diabetes mellitus : A systematic review. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*. doi:10.1016/j.jtcme.2017.08.012
- Christopeit, Lenz, Forstpointner, ... Schalhorn. (2008). Nine months to progression using fourth-line liposomally encapsulated paclitaxel against hepatocellular carcinoma. *Chemotherapy*, **54**(4), 309–314.
- Colina, Ayala, Rincón, ... Montilla. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangejos escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **15**(1), 21–43.
- Cooper. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. (Associates, Ed.), 2a edn, Sunderland (MA), Estados Unidos.
- Coppi, Iannuccelli, Bernabei, & Cameroni. (2002). Alginate microparticles for enzyme peroral administration, **242**, 263–266.
- Cremer, Gutierrez, Martinez, ... Lozano. (2018). Development of antimicrobial chitosan based nanofiber dressings for wound healing applications, **5**(1), 6–14.
- CYTED. (2000). *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. (Pilosof, A. M., & Bartholomai, Ed.), Eudeba.
- Czechowska-biskup, Jarosińska, Rokita, Ulański, & Rosiak. (2012). Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparison of Methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, **17**, 5–20.
- Damge, Michel, Aprahamian, & Couvreur. (1988). New Approach for Oral Administration of Insulin With Polyalkylcyanoacrylate Nanocapsules as Drug Carrier, **37**(July 1987).
- de Alvarenga, Pereira de Oliveira, & Roberto Bellato. (2010). An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **80**(4), 1155–1160.
- Dean, Rzhetsky, & Allikmets. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, **11**(7), 1156–66.
- Demir, & Degim. (2013). Preparation of chitosan nanoparticles by nano spray drying technology. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, **38**(3), 127–133.
- Desai, & Park. (2005). Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, **22**(2), 179–192.

- Devi, Sarmah, Khatun, & Maji. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide – protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, **239**, 136–145.
- Dombu, & Betbeder. (2013a). Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials*, **34**(2), 516–525.
- Dombu, & Betbeder. (2013b). Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials*, **34**(2), 516–525.
- Doncaster, C. P., Davey. (2007). *Analysis of variance and covariance: how to choose and construct models for the life sciences*, Cambridge University Press.
- Dorđević, Balanč, Belščak-Cvitanović, ... Nedović. (2014). *Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. Food Engineering Reviews*, Vol. 7. doi:10.1007/s12393-014-9106-7
- Drosou, Krokida, & Biliaderis. (2017). Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying Technology*, **35**(2), 139–162.
- Duan, & Mao. (2010). New strategies to improve the intranasal absorption of insulin. *Drug Discovery Today*, **15**(11–12), 416–427.
- Duan, & Xu. (2005). Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen Comp Endocrinol*, **142**, 44–52.
- Duncan. (2006). Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature Reviews Cancer*, **6**(9), 688–701.
- Dutta, Dutta, & Tripathi. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **63**(01), 20–31.
- Edwards, Hanes, Caponetti, ... Langer. (2016). Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2893421> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this article : You may need to l, **276**(5320), 1868–1871.
- El-Hefian, Elgannoudi, Mainal, & Yahaya. (2010). Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turkish Journal of Chemistry*, **34**(1), 47–56.
- Ensign, Hoen, Maisel, Cone, & Hanes. (2013). Enhanced vaginal drug delivery through the use of hypotonic formulations that induce fluid uptake. *Biomaterials*, **34**(28), 6922–6929.
- Estevinho, Rocha, Santos, & Alves. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. *Trends in Food Science and Technology*, **31**(2), 138–155.
- Eyzaguirre, & Codner. (2006). Análogos de insulina: en búsqueda del reemplazo fisiológico, 239–250.
- Ezrin. (1971). *Polymer Molecular Weight Methods*.
- Fabián Vigliocco, Sergio Rillo, Julieta Heba. (2014). Caracterización De Quitosano Para La Industria Alimentaria Por Resonancia Magnética Nuclear De Protón, (1), 1–5.
- Felt, Buri, & Gurny. (1998). Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **24**(11), 979–993.
- Feng, Boraey, Gwin, Finlay, Kuehl, & Vehring. (2011). Mechanistic models facilitate efficient development of leucine containing microparticles for pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **409**(1–2), 156–163.
- Fernández-Tresguerres, Ruiz, Cachofeiro, ... Tamargo Menéndez. (1999). *Fisiología humana, 4e.*, Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

- Fonte, Araújo, Silva, ... Sarmiento. (2015). Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.010
- Franzen, Singh, & Okos. (1990). Kinetics of Nonenzymatic Browning in Dired Skim Milk. *Journal of Food Engineering*, **11**, 225–239.
- Gagliardino, Costa, Faingold, Litwak, & Fuente. (2013). Insulina y control de la diabetes en la Argentina, **73**, 520–528.
- Galley, & Webster. (2004). Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia*, **93**(1), 105–113.
- Gan, & Wang. (2007). Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **59**(1), 24–34.
- García-fuentes, & Alonso. (2012). Chitosan-based drug nanocarriers : Where do we stand ? *Journal of Controlled Release*, **161**(2), 496–504.
- García-Fuentes, Torres, & Alonso. (2005). New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. *International Journal of Pharmaceutics*, **296**(1–2), 122–132.
- Gautier S., C. Arpagaus, N. Schafroth, M. Meuri. (2010). Very fine chitosan microparticles with narrow & controlled size distribution using spray-drying technologies. *Drug Delivery Technology*, **10**(8), 30–37.
- Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, **40**(9), 1107–1121.
- Gomaa, El-khordagui, Boraie, & Darwish. (2010). Chitosan microparticles incorporating a hydrophilic sunscreen agent. *Carbohydrate Polymers*, **81**(2), 234–242.
- Gonz, Vald, & Mojena. (2000). Características Clínicas De La Diabetes Mellitus En Un Área De Salud. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2000;16(2):144-9, **16**(2), 144–149.
- Gorzelanny, Pöppelmann, Pappelbaum, Moerschbacher, & Schneider. (2010). Biomaterials Human macrophage activation triggered by chitotriosidase-mediated chitin and chitosan degradation. *Biomaterials*, **31**(33), 8556–8563.
- Gowthamarajan, & Singh. (2010). Dissolution testing for poorly soluble drugs: A continuing perspective. *Dissolution Technologies*, **17**(3), 24–32.
- Gradishar, Tjulandin, Davidson, ... O'Shaughnessy. (2005). Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **23**(31), 7794–7803.
- Gref, Minamitake, Peracchia, Trubetskoy, Torchilin, & Langerll. (1994). Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres. *Science*, **263**(March).
- Gregoriadis, & Ryman. (1972). Fate of Protein???Containing Liposomes Injected into Rats: An Approach to the Treatment of Storage Diseases. *European Journal of Biochemistry*, **24**(3), 485–491.
- Guo, Liu, Hong, & Li. (2010). Preparation and characterization of chitosan poly(acrylic acid) magnetic microspheres. *Marine Drugs*, **8**(7), 2212–2222.
- H Hernández, E Águila, O Flores, E L Viveros, & E Ramos. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, **22**(3), 57–60.
- Hamdani, Wani, Bhat, & Siddiqi. (2018). Effect of guar gum conjugation on functional, antioxidant and antimicrobial activity of egg white lysozyme. *Food Chemistry*, **240**, 1201–1209.
- Han, Kimura, & Okuda. (1999). Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association*

- for the Study of Obesity*, **23**(2), 174–9.
- Han, Lee, Gao, & Park. (2001). Preparation and evaluation of poly(L-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, **75**(3), 259–69.
- Hartel, Shastry, Hartel, & Shastry. (1991). Sugar crystallization in food products Sugar Crystallization in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **30**(1), 37–41.
- Heinemann, Kalies, Schomaker, ... Ripken. (2014). Delivery of proteins to mammalian cells via gold nanoparticle mediated laser transfection. *Nanotechnology*, **25**(24). doi:10.1088/0957-4484/25/24/245101
- Hendrik Lemmer. (2013). Paracellular drug absorption enhancement through tight junction modulation. *Expert Opin. Drug Deliv*, **10**(1), 103–114.
- Hermans, & Bernard. (1999). State of the Art Lung Epithelium – specific Proteins Characteristics and Potential Applications as Markers. *Am J Respir Crit Care Med*, **159**(2), 646–78.
- Heuser, & Cárdenas. (2014). Chitosan-copper paint types as antifouling. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **59**(2), 2415–2419.
- Horiba. (2016). a Guidebook To Particle Size Analysis.
- Hou, Yu, Shen, Shi, Su, & Zhao. (2017). Triphenyl Phosphine-Functionalized Chitosan Nanoparticles Enhanced Antitumor Efficiency Through Targeted Delivery of Doxorubicin to Mitochondria. *Nanoscale Research Letters*, **12**(1), 1–9.
- HPLC 2. (n.d.).
- HPLC1. (n.d.).
- Huang, Khor, & Lim. (2004). Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, **21**(2), 344–353.
- Hudson, & Margaritis. (2014). Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals. *Crit Rev Biotechnol*, **34**(2), 161–179.
- Ichikawa, Iwamoto, & Watanabe. (2005). Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of enzymatic hydrolysates of chitosan and carboxymethyl cellulose. *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**(9), 1637–1642.
- Irache, Huici, Konecny, Espuelas, Campanero, & Arbos. (2005). Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules*, **10**(1), 126–145.
- Iyer, Hsia, & Nguyen. (2015). Nano-Therapeutics for the Lung: State-of-the-Art and Future Perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, **21**(36), 5233–44.
- J W Lee, J H Park. (2000). Bioadhesive dosage forms: the next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **89**(7), 850–866.
- Jain, Chalasani, Khar, Ahmed, & Diwan. (2007). Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. *Journal of Drug Targeting*, **15**(6), 417–427.
- Jayakumar, Prabakaran, Reis, & Mano. (2005). Graft copolymerized chitosan — present status and applications, **62**, 142–158.
- Jeon, Kim, Choi, ... Kim. (2013). Designed Nanocage Displaying Ligand-Specific Peptide Bunches for High Affinity and Biological Activity. *Acsnano*, **7**(9), 7462–7471.
- Jiang, Cai, & Li. (2017). Chitosan-based spray-dried mucoadhesive microspheres for sustained mucosal drug delivery. *Powder Technology*, **312**, 124–132.

- Jianing Pu , J. David Bankston. (n.d.). Production of Microencapsulated Crawfish (*Procambarus clarkii*) Astaxanthin in Oil by Spray Drying Technology, (August 2014), 37–41.
- Jones, Decker, & McClements. (2010). Comparison of protein-polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer complexation before or after particle formation. *Journal of Colloid and Interface Science*, **344**(1), 21–29.
- Joye, & McClements. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **19**(5), 417–427.
- Kamaly, Xiao, Valencia, Radovic-Moreno, & Farokhzad. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, **41**(7), 2971.
- Karagozlu, & Kim. (2014). *Anticancer effects of chitin and chitosan derivatives*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st edn, Vol. 72, Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800269-8.00012-9
- Kasaai. (2007). Calculation of Mark – Houwink – Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent – temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, **68**, 477–488.
- Kasaai. (2009). Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(5), 1667–1676.
- Kaye, Purewal, & Alpar. (2009). Development and testing of particulate formulations for the nasal delivery of antibodies. *Journal of Controlled Release*, **135**(2), 127–135.
- Kean, & Thanou. (2010). Biodegradation , biodistribution and toxicity of chitosan ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **62**(1), 3–11.
- Kesharwani, Gorain, Low, ... Pandey. (2018). Nanotechnology based approaches for anti-diabetic drugs delivery. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **136**, 52–77.
- Khafagy, Morishita, Isowa, Imai, & Takayama. (2009). Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin. *Journal of Controlled Release*, **133**(2), 103–108.
- Khan, Peh, & Ch'ng. (2000). Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, **33**, 303–311.
- Khor. (2001). *Chitin: fulfilling a biomaterials promise*, Amsterdam: Elsevier.
- Krzysztof, & Krzysztof. (2011). Spray Drying Technique. I: Hardware and Process. *International Journal of Drug Development and Research*, **3**(2), 26–33.
- Kulkarni, Bari, Surana, & Pardeshi. (2016). In vitro, ex vivo and in vivo performance of chitosan-based spray-dried nasal mucoadhesive microspheres of diltiazem hydrochloride. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **31**, 108–117.
- Kumar. (2000). A review of chitin and chitosan applications q, **46**, 1–27.
- Kumar, Shen, & Burgess. (2014). Nano-amorphous spray dried powder to improve oral bioavailability of itraconazole. *Journal of Controlled Release*, **192**, 95–102.
- Lai, Wang, & Hanes. (2009). Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**(2), 158–171.
- Lee, Heng, Ng, Chan, & Tan. (2011). Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, **403**(1–2), 192–200.

- Lee, Kwon, Kim, Jo, & Jeong. (1998). Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system, **51**, 213–220.
- Lewis, & Richard. (2015). Challenges in the delivery of peptide drugs: an industry perspective. *Therapeutic Delivery*, **6**(2), 149–163.
- Li, Ai, Yokoyama, ... Zhong. (2013). Properties of chitosan-microencapsulated orange oil prepared by spray-drying and its stability to detergents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(13), 3311–3319.
- Li, Anton, Arpagaus, Belleiteix, & Vandamme. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*, **147**(2), 304–310.
- Li, Wu, & Zhao. (2016). Antibacterial activity and mechanism of chitosan with ultra high molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, **148**, 200–205.
- Liu, Zhang, Zhu, ... Huang. (2016). Efficient mucus permeation and tight junction opening by dissociable “mucus-inert” agent coated trimethyl chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *Journal of Controlled Release*, **222**, 67–77.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D. (2000). *Molecular Cell Biology*. (Freeman, Ed.), 4a edn, Nueva York.
- Lund, & Jönsson. (2013). Charge regulation in biomolecular solution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **46**(3), 265–281.
- M. Ways, Lau, & Khutoryanskiy. (2018). Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers*, **10**(3), 267.
- M.L. Lorenzo-Lamosa, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato. (1998). Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **52**, 109–118.
- Ma, Jian, Chang, & Yu. (2008). Fabrication and Characterization of Citric Acid-Modified Starch Nanoparticles / Plasticized-Starch Composites, 3314–3320.
- Madhumathi, Binulal, Nagahama, Tamura, Shalumon, & Selvamurugan. (2009). International Journal of Biological Macromolecules Preparation and characterization of novel χ -chitin – hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications, **44**, 1–5.
- Maged, Mahmoud, & Ghorab. (2016). Nano spray drying technique as a novel approach to formulate stable econazole nitrate nanosuspension formulations for ocular use. *Molecular Pharmaceutics*, **13**(9), 2951–2965.
- Mahdavinia, & Pourjavadi. (2004). EUROPEAN POLYMER Modified chitosan from poly (acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt- and pH-responsiveness properties, **40**, 1399–1407.
- Malvern-Instruments. (2011). Size Measurement and Molecular Weight Estimation of Globins using Dynamic Light Scattering From Malvern Instruments. Retrieved from M.I. Ltd, Size Measurement and Molecular Weight Estimation of Globins using Dynamic Light Scattering From Malvern Instruments, (03.17.2017).
- Mandal, Jana, Ghorai, & Jana. (2018). Functionalized chitosan with self-assembly induced and subcellular localization-dependent fluorescence “switch on” property. *New Journal of Chemistry*, **42**(8). doi:10.1039/c8nj00067k
- Manual de Operación Nano Spray Dryer Buchi 90. (n.d.).
- Manuscript. (2016). Islam, N., & Ferro, V. (2016). Recent advances in chitosan-based nanoparticulate pulmonary drug delivery. *Nanoscale*, **8**(30), 14341–14358. doi:10.1039/C6NR03256G
- Martínez. (2016). Rol de alfa-sinucleína en la función y dinámica mitocondrial en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson, 82–83.

- Martins, Facchi, Follmann, Pereira, Rubira, & Muniz. (2014). Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**(11), 20800–20832.
- McClements. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*, CRC Press.
- McCLEMENTS. (2005). *Food emulsions: principles, practice and techniques.*, New York: CRC Press.
- Mckenna, & Lyng. (2001). Instrumental techniques in the quality control Rheological measurements of foods.
- McPherson, R. A., Pincus. (2017). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book*, Elsevier Health Sciences.
- Menchicchi, Fuenzalida, Bobbili, Hensel, Swamy, & Goycoolea. (2014). Structure of Chitosan determines its interactions with mucin. *Biomacromolecules*, **15**(10), 3550–3558.
- Merisko-Liversidge, Liversidge, & Cooper. (2003). Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **18**(2), 113–120.
- Miller, Bourassa, & Smith. (2013). FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1828**(10), 2339–2346.
- Minamia, Suzuki, Okamoto, Fujinagab, & Shigemasa. (1998). Carbohydrate Polymers Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway, **8617**(98).
- Minet, Carroll, Rooney, ... Richards. (2013). Chemosphere Slow delivery of a nitrification inhibitor (dicyandiamide) to soil using a biodegradable hydrogel of chitosan. *CHEMOSPHERE*. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.08.043
- Mitragotri, Burke, & Langer. (2014). Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: Formulation and delivery strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, **13**(9), 655–672.
- Mizrahi S., Labuza, T., Karel. (1970). Computer-aided predictions of extend of browning in dehydrated cabbage. *Journal of Food Science*, **35**(7), 799–803.
- Mlalila, Swai, Kalombo, & Hilonga. (2014). Effects of spray-drying on w/o/w multiple emulsions prepared from a stearic acid matrix. *Nanotechnology, Science and Applications*, **7**, 105.
- Mohammed, & Borchers. (2015). An extensive library of surrogate peptides for all human proteins. *Journal of Proteomics*, **129**, 93–97.
- Monserrat Altamirano Pavón. (2016). *Remoción de Pb (II) por medio de adsorción en quitosano*. doi:10.13140/RG.2.2.27395.71200
- Moore, & Cerasoli. (2017). Particle Light Scattering Methods and Applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 543–553.
- Morel, Rosa Gasco, & Cavalli. (1994). Incorporation in lipospheres of [d-Trp-6]LHRH. *International Journal of Pharmaceutics*, **105**(2), 8–10.
- Morlock, Kissel, Li, Koll, & Winter. (1998). Erythropoietin loaded microspheres prepared from biodegradable LPLG – PEO – LPLG triblock copolymers : protein stabilization and in-vitro release properties, **56**, 105–115.
- Moschetti, Sharpe, Fischer, ... Hyvönen. (2016). Engineering Archeal Surrogate Systems for the Development of Protein–Protein Interaction Inhibitors against Human RAD51. *Journal of Molecular Biology*, **428**(23), 4589–4607.
- Mosmann. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**(1–2), 55–63.

- Mozafari. (2006). Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nano therapy. In Mozafari, ed., *NANOCARRIER TECHNOLOGIES*, Springer, pp. 1–16.
- Mukhopadhyay, Chakraborty, Bhattacharya, Mishra, & Kundu. (2015). PH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, **72**, 640–648.
- Mukhopadhyay, Sarkar, Chakraborty, Bhattacharya, Mishra, & Kundu. (2013). Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo studies in diabetic animal model. *Materials Science and Engineering C*, **33**(1), 376–382.
- Muramatsu, Masuda, Yoshihara, & Fujisawa. (2003). In vitro degradation behavior of freeze-dried carboxymethyl-chitin sponges processed by vacuum-heating and gamma irradiation, **81**, 327–332.
- Myrick, Vendra, & Krishnan. (2014). Self-assembled polysaccharide nanostructures for controlled-release applications. *Nanotechnology Reviews*, **3**(4). doi:10.1515/ntrev-2012-0050
- N.G. Schipper, K.M. Vårum. (1996). Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res*, **13**(11).
- Nagahama, Nwe, Jayakumar, Koiwa, Furuike, & Tamura. (2008). Novel biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications, **73**, 295–302.
- NanoZetasizer. Molecular weight measurements with the Zetasizer Nano system (2011), pp. 1–6.
- Nasti, Zaki, de Leonardis, ... Tirelli. (2009). Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. *Pharm Res*, **26**(8), 1918–1930.
- Ngan, Wang, Hiep, ... Dzung. (2014). Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity. *Research on Chemical Intermediates*, **40**(6), 2165–2175.
- Ngo, & Kim. (2014). *Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st edn, Vol. 73, Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0
- O'Toole, Henderson, Soucy, ... Gobin. (2012). Curcumin encapsulation in submicrometer spray-dried chitosan/tween 20 particles. *Biomacromolecules*, **13**(8), 2309–2314.
- Onsøyen, & Skaugrud. (1990). Metal recovery using chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (Oxford, Oxfordshire : 1986)*, **49**(4), 395–404.
- Pan, Li, Zhao, ... Cui. (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm*, **249**(1–2), 139–147.
- Parada, Miranda, & Salvador. (2004). Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **5**(1), 1–16.
- Pareek, V., Bhargava, A., Gupta, R., Jain, N., Panwar. (2017). Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, **9**(7), 527–544.
- Patel, Cholkar, & Mitra. (2014). Recent developments in protein and peptide parenteral delivery approaches. *Therapeutic Delivery*, **5**(3), 337–365.
- Patel, Yamamoto, Ueda, Tabata, & Mikos. (2008). Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomaterialia*, **4**(5), 1126–1138.
- Patil, Chavanke, & Wagh. (2012). A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**(SUPPL. 4),

27–32.

- Peer, Karp, Hong, Farokhzad, Margalit, & Langer. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, **2**(12), 751–760.
- Peña, Izquierdo-barba, Martínez, & Vallet-regí. (2006). New method to obtain chitosan / apatite materials at room temperature, **8**, 513–519.
- Penalva, Esparza, Agüeros, Gonzalez-Navarro, Gonzalez-Ferrero, & Irache. (2015). Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. *Food Hydrocolloids*, **44**, 399–406.
- Pérez, Carrera-Sánchez, Rodríguez-Patino, & Pilosof. (2007). Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, **21**(5–6), 794–803.
- Pérez, Sánchez, Pilosof, & Rodríguez Patino. (2009). Kinetics of adsorption of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, **336**(2), 485–496.
- Pérez, Wargon, & M.R. Pilosof. (2006). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, **20**(7), 966–974.
- Peter, Thodi, Kumar, ... Jayakumar. (2009). Development of novel a -chitin / nanobioactive glass ceramic composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, **78**(4), 926–931.
- Philippova, Volkov, Sitnikova, Khokhlov, Desbrieres, & Rinaudo. (2001). Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative. *Biomacromolecules*, **2**(2), 483–490.
- Prabaharan, & Mano. (2005). Chitosan-Based Particles as Controlled Drug Delivery Systems, 41–57.
- Prudkin Silva, Martínez, Martínez, Farías, Leskow, & Pérez. (2018). Proposed molecular model for electrostatic interactions between insulin and chitosan. Nano-complexation and activity in cultured cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **537**(August 2017), 425–434.
- Prusty, & Sahu. (2013). Development and Evaluation of Insulin Incorporated Nanoparticles for Oral Administration. *ISRN Nanotechnology*, **2013**, 1–6.
- Quellec. (1998). Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization. *Journal of Biomedical Materials Research*, **15**(1), 274–54.
- Ramírez Barragán, Delgado Fornué, & Andrade Ortega. (2016). Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica , FTIR y Raman. *Coloquio de Investigación Multidisciplinaria*, **4**(1), 769–776.
- Ramirez, Plascencia, Huerta, Vásquez, & Shirai. (2002). Obtención y caracterización de quitinas parcialmente desacetiladas mediante tratamiento biológicoquímico. *VIII Simposio Latinoamericano de Polímeros, II Simposio Iberoamericano de Quitina. Libro de Resúmenes.*, 593–594.
- Rampino, Borgogna, Blasi, Bellich, & Cesàro. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, **455**(1–2), 219–228.
- Ramsden. (2016). *What is nanotechnology? Nanotechnology*. doi:10.1016/B978-0-323-39311-9.00007-8
- Rania O. Salama, Daniela Traini, Hak-Kim Chan, Adrian Sung, Alaina J. Ammit. (2009). Preparation and Evaluation of Controlled Release Microparticles for Respiratory Protein Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **98**(9). doi:10.1002/jps
- Rao. (2014). *Flow and Functional Models for Rheological Properties of Fluid Foods*. (Media, Ed.)*International Food Research Journal*, Vol. 17. doi:10.1007/978-1-4614-9230-6

- Razmi, Divsalar, Saboury, Izadi, Haertlé, & Mansuri-Torshizi. (2013). Beta-casein and its complexes with chitosan as nanovehicles for delivery of a platinum anticancer drug. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **112**, 362–367.
- Reads. (2014). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos, (May).
- Reddy, Reddy, & Jiang. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, **33**(6), 362–369.
- Rinaudo. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, **31**(7), 603–632.
- Rojas-aguirre. (2016). Q úmica, 286–291.
- Round, Rigby, Garcia De La Torre, Maclerzanka, Mills, & MacKie. (2012). Lamellar structures of MUC2-rich mucin: A potential role in governing the barrier and lubricating functions of intestinal mucus. *Biomacromolecules*, **13**(10), 3253–3261.
- Rudin, A. Choi. (2012). The elements of polymer science & engineering. In *Mechanical properties of polymer solids and liquids.*, Academic Press.
- Saikia, & Gogoi. (2015). Chitosan: A Promising Biopolymer in Drug Delivery Applications. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, **s4**. doi:10.4172/1747-0862.S4-006
- Sakurai, Maegawa, & Takahashi. (2000). Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan / poly (N -vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer*, **41**, 7051–7056.
- Sampaio, Frota, Magalhães, ... Trevisan. (2015). Chitosan/mangiferin particles for Cr(VI) reduction and removal. *International Journal of Biological Macromolecules*, **78**, 273–279.
- Sánchez-Brenes, A., Sibaja-Ballester, M. D. R., Vega-Baudrit, J., Madrigal-Carballo. (2007). Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (Pleuroncodes planipes) con potenciales aplicaciones biomédicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **8**(4), 241–267.
- Sánchez, Vila-Jato, & Alonso. (1993). Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled release of cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*, **99**(2–3), 263–273.
- Sandoval Aldana, Rodriguez Sandoval, & Fernandez Quintero. (2005). APLICACIÓN DEL ANÁLISIS POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MODIFICACIONES DEL ALMIDÓN, **72**, 45–53.
- Santalices, Gonella, Torres, & Alonso. (2017). Advances on the formulation of proteins using nanotechnologies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **42**, 155–180.
- Sarmiento, Ferreira, Veiga, & Ribeiro. (2006). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers*, **66**(1), 1–7.
- Schmid, Arpagaus, Friess, Schmid, Arpagaus, & Friess. (2011). Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for - pharmaceutical applications, **7450**(May 2010). doi:10.3109/10837450.2010.485320
- Sebastien Guoin. (2004). Micro- encapsulation : industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 330–347.
- Semenova. (2017). Current Opinion in Colloid & Interface Science Protein – polysaccharide associative interactions in the design of tailor-made colloidal particles. *COCIS*, **28**, 15–21.
- Shalumon, Binulal, Selvamurugan, ... Jayakumar. (2009). Electrospinning of carboxymethyl chitin / poly (vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, **77**(4), 863–869.

- Sharma, Haque, & Wilson. (1996). Association tendency of β -lactoglobulin AB purified by gel permeation chromatography as determined by dynamic light scattering under quiescent conditions. *Food Hydrocolloids*, **10**(3), 323–328.
- Sharma, Sharma, Nam, Doss, Lee, & Chakraborty. (2015). Nanoparticle based insulin delivery system: the next generation efficient therapy for Type 1 diabetes. *Journal of Nanobiotechnology*, **13**(1), 74.
- Shi, Xiao, Kamaly, & Farokhzad. (2011). Self-assembled targeted nanoparticles: Evolution of technologies and bench to bedside translation. *Accounts of Chemical Research*, **44**(10), 1123–1134.
- Shigemasa, Saito, Sashiwa, & Saimoto. (1994). Enzymatic degradation of Chitin and Partially Deacetylated Chitins. *International Journal of Biological Macromolecules*, **16**(1), 43–49.
- Silva, Rodrigues, Silva, Reis, & Duarte. (2017). Engineered tubular structures based on chitosan for tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Applications*, **0**(0), 088532821774469.
- Singla, & Chawla. (2001). Chitosan : some pharmaceutical and biological aspects – an update, (Illum 1998), 1047–1067.
- Sinsuebpol, Chatchawalsaisin, & Kulvanich. (2013). Preparation and in vivo absorption evaluation of spray dried powders containing salmon calcitonin loaded chitosan nanoparticles for pulmonary delivery. *Drug Design, Development and Therapy*, **7**, 861–873.
- Sistemas de liberación Bioadhesivos Bioadhesive delivery systems. (2000), 115–128.
- Smith, Wood, & Dornish. (2004). Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions, **21**(1).
- Sogias, Williams, & Khutoryanskiy. (2008). Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, **9**(7), 1837–1842.
- Sou, Forbes, Gray, ... Morton. (2016). Designing a multi-component spray-dried formulation platform for pulmonary delivery of biopharmaceuticals : The use of polyol , disaccharide , polysaccharide and synthetic polymer to modify solid-state properties for glassy stabilisation. *Powder Technology*, **287**, 248–255.
- Sou, Kaminskas, Nguyen, Carlberg, Mcintosh, & Morton. (2013). The effect of amino acid excipients on morphology and solid-state properties of multi-component spray-dried formulations for pulmonary delivery of biomacromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **83**, 234–243.
- Sriamornsak, & Wattanakorn. (2008). Rheological synergy in aqueous mixtures of pectin and mucin. *Carbohydrate Polymers*, **74**(3), 474–481.
- Stetefeld, McKenna, & Patel. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, **8**(4), 409–427.
- Suriñach, Baro, Bordas, Clavaguera, & Clavaguera-Mora. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, **31**, 11–17.
- Teng, Li, Luo, Zhang, & Wang. (2013). Cationic β - Lactoglobulin Nanoparticles as a Bioavailability Enhancer: Protein Characterization and Particle Formation.
- Thevarajah, Bulanadi, Wagner, Gaborieau, & Castignolles. (2016). Towards a less biased dissolution of chitosan. *Analytica Chimica Acta*, **935**, 258–268.
- Tolstoguzov. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein- polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, **4**(6), 429–468.
- Uragami, Saito, & Miyata. (2015). Pervaporative dehydration characteristics of an ethanol / water azeotrope through various chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers*, **120**, 1–6.
- Vanschalk. (n.d.). CC BY-SA 3.0.

- Venkatesham, Ayodhya, Madhusudhan, Veera Babu, & Veerabhadram. (2014). A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*, **4**(1), 113–119.
- Vesterager, Kjems, Yang, ... Perez Quiñones. (2013). Self-assembled nanoparticles of modified-chitosan conjugates for the sustained release of dl - alpha -tocopherol. *Carbohydrate Polymers*, **92**, 856–864.
- Vorburger, Dagata, Wilkening, & Iizuka. (1999). Industrial uses of STM and AFM. *Computer Standards & Interfaces*, **21**(2), 196.
- Wang, Chen, Wang, & Xing. (2014). Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate – chitosan beads. *Process Biochemistry*, **49**(10), 1682–1690.
- Washington, Washington, & Wilson. (2000). *Physiological pharmaceuticals: barriers to drug absorption*, CRC Press.
- Weiss, M., Steiner, D. F., Philipson. (2014). *Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships*.
- Weissig, Pettinger, & Murdock. (2014). Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *International Journal of Nanomedicine*, **9**, 4357–4373.
- Xiao, Gömmel, Davidson, & Zhong. (2011). Intrinsic tween 20 improves release and antilisterial properties of co-encapsulated nisin and thymol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(17), 9572–9580.
- Yamanaka, & Leong. (2008). Engineering strategies to enhance nanoparticle-mediated oral delivery. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **19**(12), 1549–1570.
- Yang, Han, Zheng, Dong, & Liu. (2015a). Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **123**, 53–66.
- Yang, Xu, Qu, & Li. (2015b). The influence of amino acids on aztreonam spray-dried powders for inhalation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **10**(6), 541–548.
- Yao, Ji, Yin, & Wang. (1995). Investigation of pH-Sensitive Drug Delivery System of Chitosan / Gelatin Hybrid Polymer Network, **38**, 77–82.
- Yin, Fei, Cui, Cui, & Chunhua. (2007). Superporous hydrogels containing poly (acrylic acid- co -acrylamide)/ O -carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks. *Biomaterials*, **28**, 1258–1266.
- Yokoyama, Fukushima, Uehara, ... Okano. (1998). Characterization of physically entrapment and chemically conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for in vivo delivery to a solid tumor. *J. Contr. Rel.*, **50**, 79–92.
- Yu, Wu, Shi, & Farokhzad. (2016). Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. *Journal of Controlled Release*, **240**, 24–37.
- Zhang, Huang, Wang, ... Anfusio. (2017). Atomic force microscopy for two-dimensional materials: A tutorial review. *Optics Communications*, (May). doi:10.1016/j.optcom.2017.05.015
- Zhang, Mujeeb, Feng, Li, & Du. (2016). Physically entrapped gelatin in polyethylene glycol scaffolds for three-dimensional chondrocyte culture. doi:10.1177/0883911516633893
- Zhang, Nie, Guo, Wang, Cui, & Xie. (2018). Conformational properties of a bioactive polysaccharide from *Ganoderma atrum* by light scattering and molecular modeling. *Food Hydrocolloids*, **84**, 16–25.
- Zhang, & Zhang. (2002). Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, **61**(1), 1–8.
- Zhang, Zhang, Jiang, & Xia. (2013). The hypolipidemic activity of chitosan nanopowder prepared by ultrafine milling. *Carbohydrate Polymers*. doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.037

Zhang, Zhang, Wu, Wang, Niu, & Li. (2008). Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68**(3), 526-534.

Ziani, Oses, Coma, & Maté. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT - Food Science and Technology*, **41**(10), 2159-2165.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL DEL PLAN

El objetivo de este trabajo de Tesis fue el desarrollo de matrices nanoparticuladas biopoliméricas, con al menos una dimensión en la nanoescala, las que serán generadas mediante las técnicas de autoensamblaje molecular y nanodeshidratación. Dichas nanopartículas serán empleadas en la encapsulación de un ligando de alto interés farmacológico y médico, la insulina, constituyendo nanovehículos para esta proteína fundamental en la fisiología. Como agente encapsulante se utilizará el biopolímero quitosano. Por último, se contemplarán la eficacia de encapsulación y la biodisponibilidad del ligando en líneas celulares modelo. Se pretende que en un futuro estos nanovehículos puedan ser administrados a pacientes a través de la vía pulmonar.

OBJETIVOS PARTICULARES

Objetivo 1: llevar a cabo la caracterización físicoquímica de las especies en estado nativo

Objetivo 2: encontrar las condiciones adecuadas para la generación de nanopartículas con dimensiones definidas y reproducibles.

Objetivo 3: caracterizar de manera físicoquímica y nanocroestructural las nanopartículas.

Objetivo 4: evaluar la biodisponibilidad del componente encapsulado.

La Tesis se encuentra articulada en cuatro partes. La primera se concentra en el quitosano y su caracterización físico-química. El diseño y la caracterización de nanopartículas mediante autoensamblaje se presenta en la segunda parte, mientras que la tercera parte se enfoca en la nanodeshidratación. Por último, se presentan las conclusiones generales.

**CAPÍTULO 2: QUITOSANO ARGENTINO.
CARACTERIZACIÓN E IMPACTO EN
SISTEMAS CELULARES IN-VITRO**

INTRODUCCIÓN

UN POLISACÁRIDO DE INTERÉS MUNDIAL

Hasta el año 2012, existían más de 9.600 artículos sobre nanopartículas de CS en la literatura especializada, acumulando más de 120.000 citas y un índice H de 118, lo que indica no sólo el alto impacto de este polisacárido sino también enmarcado en el auge de la nanotecnología (Garcia-fuentes & Alonso 2012) (Fig. 2.1).

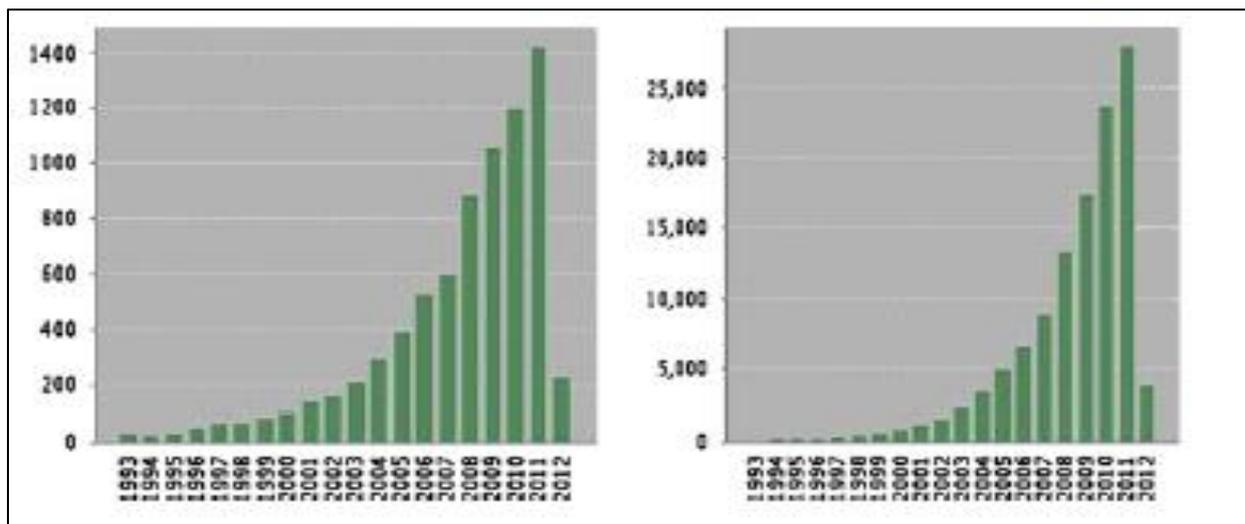


Fig. 2.1: Impacto bibliográfico de medicamentos con CS. Izq: Número de artículos publicados por año. Der: Número de citas relacionados con publicaciones de ese tópico. Adaptado de (Garcia-fuentes & Alonso 2012).

En la actualidad, el quitosano es producido comercialmente en Noruega, India, Japón, Polonia, China y Estados Unidos principalmente (Dutta *et al.* 2004). Posee múltiples aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales (en la remoción de iones) y como membrana en procesos de purificación (Uragami *et al.* 2015). En la industria alimentaria se emplea como suplemento para reducir el colesterol y las grasas (Zhang *et al.* 2013), como material para embalaje (Chen *et al.* 2009), conservante y aditivo (Chantarasataporn *et al.* 2014). En la industria agrícola, sus usos se orientan al recubrimiento de semillas y fertilizantes (Minet *et al.* 2013) y a la liberación controlada de agroquímicos (Vesterager *et al.* 2013). Está presente en cremas corporales (Gomaa *et al.* 2010) y lociones cosméticas y forma parte de los excipientes de muchos medicamentos (Jayakumar *et al.* 2005).

Tanto el CS como la quitina pueden procesarse para dar lugar a geles (Nagahama *et al.* 2008), membranas (Gomaa *et al.* 2010)(Madhumathi *et al.* 2009)(Jayakumar *et al.* 2005), nanofibras (Shalumon *et al.* 2009), esferas (Wang *et al.* 2014), micropartículas (Prabaharan & Mano 2005), nanopartículas (Anitha *et al.* 2009), andamios para el crecimiento de células (Peter *et al.* 2009)(Madhumathi *et al.* 2009) y esponjas (Muramatsu *et al.* 2003).

QUITOSANO COMO BIOMATERIAL

La diversidad de aplicaciones del CS como biomaterial se relaciona con sus propiedades al interactuar con el cuerpo humano: bioactividad, actividad antimicrobiana, biodegradabilidad enzimática, permeabilidad epitelial, todas ellas que refuerzan la adhesión y la proliferación de diferentes clases de células (Peña *et al.* 2006). Este material ha sido probado para aplicaciones tales como lentes de contacto, adhesivo para tejidos, suturas, etc. De todas maneras, existen dos campos biomédicos en los cuales su uso está más extendido. Primero, se ha usado de manera conjunta con quitina para el tratamiento de heridas, úlceras y quemaduras, debido a sus características hemostáticas y su efecto acelerador en la cura de heridas. En segundo lugar, debido a su afinidad celular y su biodegradabilidad, se lo ha empleado en la regeneración y restauración tisular, lo que significa que su uso es habitual en el campo de la ingeniería de tejidos (Singla & Chawla 2001).

APLICACIONES FARMACÉUTICAS

El CS se emplea como vehículo para la entrega controlada por vía oral y como matriz o material encapsulante para distintas formulaciones en la forma de esferas o gránulos. Además, las películas delgadas de este polímero muestran una baja tasa de hinchamiento (*swelling*) en agua, pero pueden prepararse membranas con diferentes capacidades hidrofílicas, al combinar redes semi o interpenetradas. Con este fin, se combina CS con polímeros de alta hidrofiliidad, tales como el polivinil alcohol, polivinilpirrolidona, y gelatina (Kumar 2000).

También es posible combinarlo con polianiones de origen natural como la pectina, el alginato o la carboximetil celulosa (CMC), o de origen sintético como el ácido poliacrílico (Berger *et al.* 2004). Un ejemplo lo constituye el desarrollado de una red que combina glutaraldehído con una mezcla de CS y gelatina que es sensible al pH, hinchándose a pHs ácidos y deshidratándose a pHs básicos (Yao *et al.* 1995). Microcápsulas de CS-CMC han sido testeadas como matrices protectoras contra la acidez del entorno estomacal, así como también microesferas de CS-Xantano, biodegradables y sensibles al pH, se emplean para proteger drogas de los entornos gástricos e intestinales (Chellat *et al.* 1999).

El CS es un buen candidato para la entrega de genes no-virales porque es un polímero catiónico y puede complejarse con plásmidos de DNA cargados negativamente (Lee *et al.* 1998).

Actualmente se sabe que el CS es biodegradado por un número de enzimas que incluyen lisozimas, di-N-acetilcolitobiosa, N-acetil-beta-D-glucosaminidasa y quitinotriosidasa, que se encuentran en las mucosas humanas y otros fluidos fisiológicos (Kean & Thanou 2010)(Gorzelanny *et al.* 2010). Por otro lado, la citotoxicidad del CS depende de su concentración, con una Ic_{50} (valor medio de la concentración inhibitoria máxima) va desde 0,02 a 0,2 % p/v para la mayoría de las líneas celulares.

Los valores de Ic_{50} también dependen del peso molecular y del grado de desacetilación (N.G. Schipper, K.M. Vårum 1996). Con respecto a la inmunoreactividad del CS, algunos autores han reportado la habilidad de este biopolímero y algunos de sus subproductos para activar la proliferación de macrófagos y linfocitos sin desencadenar procesos inflamatorios (Gorzelanny *et al.* 2010)(Minamia *et al.* 1998).

Desde un punto de vista regulatorio, este polisacárido posee la categoría GRAS (Generally Recognized as Safe) otorgada por la Administración de Alimentos y Drogas estadounidense (FDA) y se emplea como suplemento dietario para prevenir la absorción de grasas y en vendas para diversas heridas (Boateng *et al.* 2008).

En nuestro país, el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) lista al quitosano como un producto permitido para el control de plagas, enfermedades, al considerarlo útil contra las infecciones provocadas por hongos. Por otro lado, la ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) ha autorizado la comercialización de Neocement, un cemento óseo a base de fosfato de calcio, cuya fase líquida contiene quitosano y de una laca ungueal (Niogermox) entre cuyos excipientes se encuentra el hidroxipropil-CS. Por último, también ha autorizado la comercialización de unos apósitos para heridas (CLO-SUR P.A.D) que emplean CS como agente activo antimicrobiano. [www.anmat.gov.ar] [www.senasa.gob.ar]

Cabe destacar, que al ser un producto que suele obtenerse de los crustáceos, está catalogado como posible agente alergénico.

En la Tabla 2.1 se muestran algunas de las formulaciones en desarrollo en la actualidad, que incluyen CS en su formulación.

Tabla 2.1 Aplicaciones farmacéuticas de nanopartículas de quitosano (adaptada de (Saikia & Gogoi 2015))

Destino	Droga	Formulación
Colon	Diclofenac sódico	Centro de CS recubierto con microesferas acrílicas
	Riboflavina	Film de CS con Citrato
	Ácidoalendrónico	Liposomacubierto de CS
	Mesalazina	Cápsula de CS
Riñones	Prednisolona	CS de bajo peso molecular
Ojos	Diclofenac sódico	Liposoma cubierta de CS de bajo peso molecular
	Indometacina	Nanocápsula de Policaprolactona cubierta de CS
	Levocetirizina	Hidrogel de CS con Glucosa-1-fosfato
Hígado	Doxorubicina	NP, CS-Enoxolona/PEG
	Fosfatodiamónico	Micela, CS conjugado con MPEG/CS conjugado con Lactosa-PEG
	Fluorouracilo	NP, CS galactosilado
	Adriamicina	NP, CS conjugado con glicirricina
Pulmones	Paclitaxel	NP de CS-Poli ácido coglicólico láctico

TOXICIDAD

Mukhopadhyay y col. (2015) estudiaron la toxicidad crónica *in-vivo* de nanopartículas de insulina y CS (65 kDa, DD 82%), administradas por vía oral a ratones (Mukhopadhyay *et al.* 2015). La toxicidad se evaluó comparando valores iniciales y finales, de la función hepática y de los riñones. Se realizaron también análisis histopatológicos para descartar daños en órganos internos. Por último, se examinó la biodegradabilidad del CS bajo la acción de microorganismos de la flora presente en el lumen intestinal. Luego de administrar las nanopartículas con un contenido equivalente de 30 mg/kg/cuerpo de CS durante un mes, no se detectaron signos de toxicidad. Los estudios histopatológicos no detectaron cambios en la morfología ni en la fisiología de los órganos internos, como el hígado y los riñones. Por último, pudo observarse que los microorganismos del lumen intestinal degradaron exitosamente el CS. Todos estos resultados indican que el CS empleado es un material seguro para la conformación de estas nanopartículas.

MUCOADHESIÓN QUITOSANO-MUCINA

El peso molecular de la familia de glicoproteínas mucinas varía entre 500 kDa y 20 MDa, pero todas tienden a formar grandes agregados por medio de interacciones hidrofóbicas entre grupos no polares, uniones puente hidrógeno entre unidades de azúcares y puentes disulfuro entre residuos de cisteínas. La mayoría de las mucinas están cargadas negativamente debido a la presencia de ácidos siálicos y ésteres de sulfato, completamente ionizados a $\text{pH} > 2.6$. Por otro lado el CS, que es un polisacárido catiónico, posee grupos amino e hidroxilo en cada monómero (excepto en las unidades acetiladas, sin aminas primarias). Los grupos amino poseen cargas positivas cuando están protonados, lo cual facilita la interacción electrostática con las moléculas de la mucina, cargadas negativamente. Cuando los grupos amino no están protonados, pueden establecer uniones puente hidrógeno con la mucina, al mismo tiempo que lo hacen los grupos hidroxilos. La atracción electrostática pareciera ser el mecanismo principal para la mucoadhesión del CS, aunque también posee contribuciones como uniones puente hidrógeno y efectos hidrofóbicos. El pH de las soluciones además de la presencia de otras especies puede cambiar la contribución relativa de cada interacción química (Sogias *et al.* 2008). El creciente interés de la comunidad científica en la propiedad mucoadhesiva del CS queda de manifiesto a continuación en la Fig. 2.2, donde se muestra la evolución del número de publicaciones en el tiempo, justamente en las que el tópico abordado fue la mucoadhesión del polisacárido.

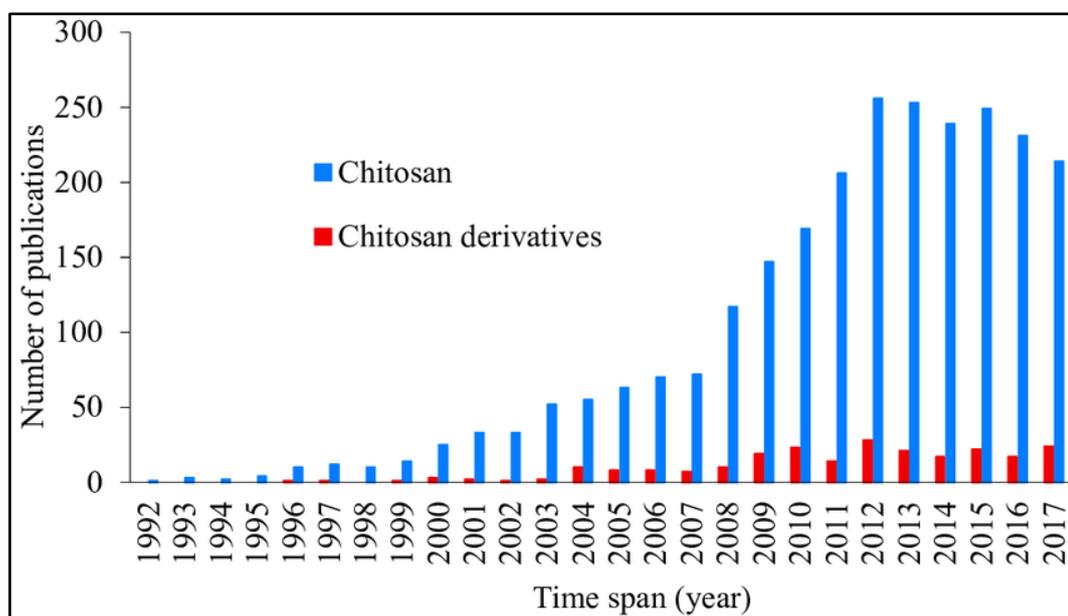


Fig. 2.2: Número de publicaciones relacionadas con las propiedades mucoadhesivas del CS y sus derivados. Adaptado de (M. Ways *et al.* 2018).

INTERNALIZACIÓN CELULAR

La dependencia de la absorción celular de los sistemas con CS con el peso molecular y el DD podría relacionarse como también el tamaño y el potencial ζ de la nanopartícula. Por ejemplo, se ha reportado que la internalización/absorción de partículas de poliestireno en el intestino es mayor si su tamaño es de alrededor de 100nm que si es de 500 o 1000nm. Sin embargo, estos resultados son dependientes también de la línea celular empleada, por lo que deben ser considerados como resultados parciales (Huang *et al.* 2004).

La vía pulmonar parece ser una ruta de administración muy conveniente para nanopartículas compuestas de CS. En la Fig. 2.3 se muestra el porcentaje que corresponde a cada agente terapéutico que es inoculado a través de la vía pulmonar, y que posee CS en su formulación.

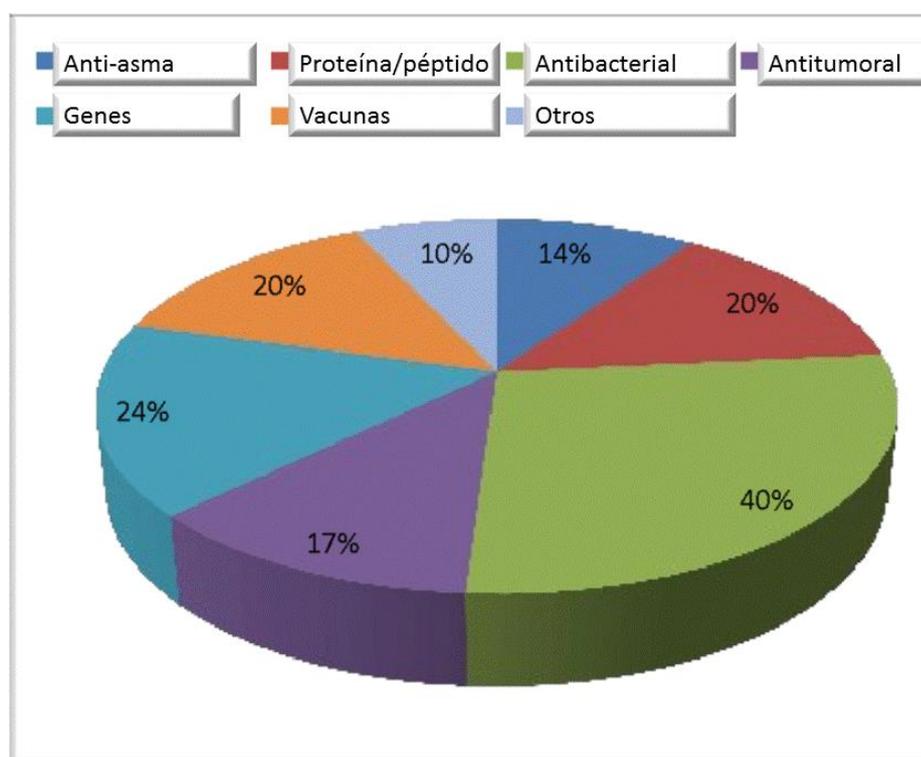


Fig. 2.3: Agentes terapéuticos para la entrega por vía pulmonar, que poseen CS en sus formulaciones. Adaptado de (Manuscript 2016).

Numerosos estudios dan cuenta de la internalización de nanocomplejos de CS dentro del entorno celular. Para estos ensayos, las líneas celulares empleadas suelen ser de epitelio alveolar basal humano (A549) y de cáncer cervical humano (HeLa). Por ejemplo, Hou y col. (2017) reportaron la preparación de complejos de CS, tripolifosfato sódico (TPP) y doxorubicina, una reconocida droga antitumoral, y su aplicación en ambas líneas. Las nanopartículas se distribuyeron uniformemente por todo el citoplasma en un período de 6 horas, versus las 3 hs que le tomó a la droga sin encapsular (Hou *et al.* 2017). Si

bien el mecanismo de entrada a la célula está todavía poco claro, existen indicios de que podría tratarse de una endocitosis de la droga encapsulada mediada por balsa lipídica (*lipid-raft*) (Mandal *et al.* 2018) (para la línea HeLa).

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

El CS donado por el Laboratorio de Microbiología (INTI, MDP), fue sometido a un proceso de purificación antes de su uso. Brevemente, se lo disolvió en ácido acético 1% p/p, se lo precipitó mediante el agregado de Na(OH) 4N hasta alcanzar un pH de 7 y se lo lavó con agua bidestilada, sobre un papel de filtro (Mukhopadhyay *et al.* 2013). Para su secado se agregó Etanol y se depositó sobre un vidrio reloj en una estufa a 40°, hasta su deshidratación completa.

El CS ya purificado, se disolvió nuevamente en una solución de ácido acético en agua, 1% p/p, para lograr una solución de polisacárido cuya concentración fuera de 1% p/p. Finalmente se centrifugó durante 20 minutos a 4500 rpm, descartándose la fracción precipitada. De ahí en más, el quitosano empleado fue el disuelto en el sobrenadante y se lo denominó "CS purificado" (CS_p). De dicha solución madre se prepararon las soluciones subsiguientes, siempre empleando ácido acético 1% p/p como disolvente. Luego de cada dilución se mantuvo la nueva solución a 4°C durante 24 hs. para asegurar la completa hidratación del polímero.

El quitosano donado, sin ningún tipo de purificación, fue denominado quitosano nativo o CS_n.

Ya que el quitosano empleado en esta Tesis no es comercial, fue necesario caracterizar ciertos aspectos que comúnmente se encuentran en la hoja técnica de un producto de estas características.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

Determinación del Peso Molecular

Son muchas las técnicas existentes para la determinación experimental del peso molecular medio de un polímero. Sin embargo, se ha encontrado que se obtienen valores algo distintos en función de la técnica utilizada. De ahí la existencia de distintas formas de expresar el peso molecular de una muestra, entre los que destacan el peso molecular promedio en número (Mn), el peso molecular promedio en peso (Mw) y otros más complejos como el peso molecular promedio viscosimétrico (Mv) (Catalunya n.d.).

Se considera al peso molecular medio en número (Mn) como la sumatoria de los productos de la masa molar de cada fracción, multiplicado por su fracción molar (ec. 2.1):

$$M_n = \frac{\sum (N_i M_i)}{\sum N_i} \quad (2.1)$$

El peso molecular medio pesado M_w se define como la sumatoria de los productos de la masa molar de cada fracción de su peso, multiplicado por la fracción w_i (ec. 2.2):

$$M_w = \sum (w_i M_i) \quad (2.2)$$

La polidispersidad (PD) se define como la razón entre el peso molecular medio másico M_w promedio y el peso molecular medio numérico M_n , brinda información del ancho de la distribución de peso molecular, siendo esta de tipo normal y suele tomar valores entre 1,5 y 3 (Pérez *et al.* 2009).

Por viscosimetría. Para calcular la viscosidad intrínseca de un polímero en solución se siguen los siguientes pasos: primero se mide el tiempo de caída, a través de un capilar, de un conjunto de disoluciones diluidas de distinta concentración y el tiempo de caída del disolvente puro. Luego, a partir de estos valores se calcula la viscosidad relativa η_{rel} y la viscosidad específica η_{sp} , lo que permite obtener las viscosidades inherente η_{inh} y reducida η_{red} . Para mayor claridad, se definen las expresiones para las diferentes viscosidades (ec- 2.3-2.6):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \approx \frac{t}{t_0} \quad (2.3)$$

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \approx \frac{t - t_0}{t_0} \quad (2.4)$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (2.5)$$

$$\eta_{inh} = \frac{\ln \eta_{red}}{c} \quad (2.6)$$

Donde η y η_0 son, respectivamente, las viscosidades de la disolución y la del disolvente puro, t es el tiempo de paso de la disolución por un capilar y t_0 el tiempo de paso del disolvente puro por el mismo capilar.

Finalmente, se representa conjuntamente la viscosidad inherente y la reducida frente a la concentración del polímero disuelto y se obtienen las regresiones lineales correspondientes a los puntos experimentales. La viscosidad intrínseca será el valor medio de las ordenadas en el origen de ambos ajustes. Una vez calculada la viscosidad intrínseca, se determina el peso molecular viscosimétrico (M_v) de la solución de polímero a partir de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Parada *et al.* 2004) (ec. 2.7):

$$[\eta] = K(M_v)^a \quad (2.7)$$

Los parámetros K y a son las llamadas constantes de Mark-Houwink y dependen del polímero, del disolvente y de la temperatura. En este caso sus valores fueron de $1,81 \cdot 10^{-3}$ mL/g y 0,93 respectivamente (Kasaai 2007).

Las mediciones se realizaron a 25°C con un viscosímetro Ubbelohde (Thermoscientific, Beverly, MA, USA). El peso molecular determinado a partir de la viscosidad intrínseca promedio M_v para CS_p resultó de (356±8) KDa.

Por dispersión Estática de Luz. Se estimó el peso molecular tanto de CS_n como de CS_p empleando la herramienta de determinación de peso molecular del equipo Zetasizer (Nano-Zs, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). Esta metodología necesita de un solvente de referencia (Tolueno) y del solvente empleado para disolver los dos tipos de quitosano (ácido acético 0.5% p/v). De manera sucinta, se mide la intensidad de la dispersión de la muestra relativa a la de una referencia conocida, en este caso el tolueno.

Luego, se emplea la ecuación de Rayleigh (ec. 2.8),

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2C \quad (2.8)$$

donde K es una constante óptica, R_θ es la relación de Rayleigh de luz dispersada sobre luz incidente, M es el peso molecular promedio y A_2 es el 2° coeficiente del virial. Estos son parámetros que se utilizan para generar una curva de Debye (*Debye plot*), que es un ajuste lineal de KC/R_θ vs concentración. Para esta gráfica, la ordenada al origen es la inversa del peso molecular y la pendiente es el doble del 2°

coeficiente del virial. De esta manera se obtiene no sólo el peso molecular M , sino también la tendencia del polímero a agregarse o a solvotarse, según sea el signo de A_2 .

Para CS_n, el peso molecular estimado fue de 305 KDa, valor que guarda mucha similitud con el resultado obtenido por el método reológico. Para el CS_p el valor fue de 102, lo que indica que durante el proceso de purificación, que implica disolución y precipitación, una fracción de alto peso molecular presente en el material original se elimina y su peso molecular se reduce. Aunque no necesariamente todo el material eliminado sea de naturaleza polisacáridica. Dicha reducción sugiere la presencia de agregados de bajo orden u oligómeros en el material purificado (NanoZetasizer 2011).

Por cromatografía por exclusión molecular (GPC). La cromatografía por exclusión por tamaño es una técnica analítica que separa macromoléculas disueltas por tamaño con base en su elución desde columnas llenas de un gel poroso. Es un tipo de cromatografía líquida con una fase estacionaria sólida y la fase móvil líquida. El método está basado en la circulación de una fase móvil que arrastra a la mezcla de compuestos a separar a través de una fase estacionaria sólida, y se denomina GPC (*Gel Permeation Chromatography*). Dependiendo de la afinidad relativa que por ambas fases tengan los distintos compuestos presentes en la mezcla resultará su separación (Fig. 2.4).

Las moléculas se separan de más grandes a más pequeñas en proporción a su peso molecular en disolución. Las moléculas muy grandes quedan excluidas del lecho empaquetado y son las primeras que eluyen en el volumen muerto. Las moléculas más pequeñas podrán penetrar en los poros en diverso grado, en función de su tamaño (Fig. 2.4), siendo las más pequeñas las que más se difunden en la estructura del poro y las últimas en eluir.

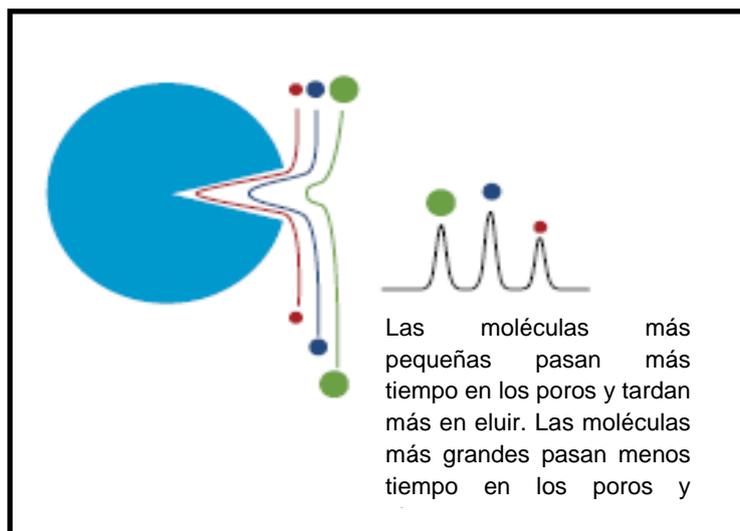


Fig. 2.4: Esquema que ilustra cómo se comportan moléculas de distinto tamaño en un poro de la fase sólida, y los tiempos de elución correspondientes.

El orden de elución normalmente sigue al peso molecular. Sin embargo, el verdadero mecanismo de la GPC se basa en el tamaño en disolución. Algunas moléculas son cilíndricas, o lineales y rígidas por lo que podrían eluir antes de lo esperado debido a su mayor radio hidrodinámico en disolución (radio hidrodinámico o radio de giro) (Malvern-Instruments 2011). Además, las diferentes fases móviles pueden afectar el orden de elución debido a los cambios de tamaño en disolución.

Cuando la GPC se acopla a detectores basados en dispersión de luz, viscosímetro y detectores de concentración, lo que se conoce como detección triple, es posible medir el peso molecular absoluto, el tamaño molecular y la viscosidad intrínseca, y obtener información sobre la estructura macromolecular, la conformación, la agregación y la ramificación del polisacárido.

Este tipo de cromatografía se realiza en columnas cilíndricas rellenas con algunos de los geles que se fabrican con este fin y que pueden ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados (*sephadex*), agarosa (*sepharose*, Bio-gel A), poliacrilamida (Bio-gel B), etc. Todos estos geles (fase estacionaria) se hallan constituidos por gránulos (partículas) de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado.

El peso molecular a tope de pico M_p se define como la moda de la distribución de peso molecular y suele informarse para distribuciones muy agudas, como los estándares de calibración (Agilent Technologies 2011).

La determinación del peso molecular del CS_p se realizó entonces por GPC en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (GPC-HPLC). Se utilizó una bomba Shimadzu LC-20AT y un detector de índice de refracción Shimadzu RID-10A. El análisis se realizó utilizando la columna Supelco TSKGP4000PW (300 × 7,8 mm, rango 1-80 kDa) y como solvente de elución una solución 0,2M de ácido

acético-0,2M de acetato de sodio en una relación 3:2 (pH entre 4 y 4,5) preparada con agua de calidad HPLC. Se trabajó a flujo constante de 0,6 ml/min y temperatura ambiente. Se inyectaron 100 μ l de cada solución en análisis, de aproximadamente 5 mg/ml del CS_p (muestra, estándar o patrones) disuelto en el solvente de corrida y filtrado a través de una membrana de Nylon de tamaño de poro 0,22 μ m. Las mediciones se hicieron por duplicado.

La curva de calibración así como la determinación de los valores de M_p, M_n, M_w y PD se realizaron utilizando el programa LC Solution GPC software (Shimadzu).

En la Fig. 2.5 se muestra el cromatograma correspondiente a CS_p. Para esta muestra existen dos picos de interés, que corresponden a dos poblaciones diferentes. Ya que se trata de un material polimérico, originado en una síntesis a escala de laboratorio (no piloto o industrial), es esperable la presencia de dos o más poblaciones. Los diferentes pesos moleculares de ambas poblaciones y del CS_n se resumen en la Tabla 2.2.

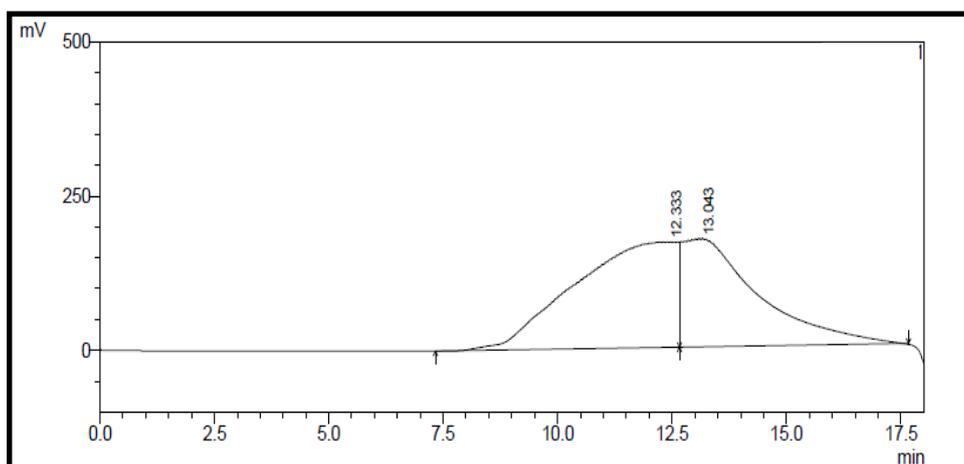


Fig. 2.5: Cromatograma correspondiente a CS_p. Se destacan dos tiempos de retención, 12.333 y 13.043 minutos.

Es interesante destacar que la polidispersidad inicial del polímero es notoria y cercana a 4 (Tabla 2.2, fila inferior), y que luego del proceso de purificación al que se lo somete, ésta decrece más de la mitad. Este resultado da cuenta no sólo de la PD intrínseca del material polimérico sino también de los efectos de la purificación realizada.

Tabla 2.2: Tiempo de retención (tr), pesos moleculares Mp, Mn y Mw y Polidispersidad (PD) para muestras de CS_p y CS_n. 25°C; n=2±SD.

	CS_p 1	CS_p 2	CS_n
tr (min)	12,3±0,2	13,051±0,2	12,428±0,2
Mp (KDa)	264,7±0,1	153±1	246±16
Mn (KDa)	492±4	58±4	129±17
Mw (KDa)	847±11	98±1,0	537±22
PD	1,721±0,008	1,7±0,1	4,2±0,4

Cabe aclarar, que los pesos moleculares obtenidos por los distintos procedimientos no son comparables entre sí. Por ejemplo, el Mv se obtiene mediante parámetros determinados experimentalmente y mide la muestra como un todo. Si ésta es muy polidispersa o si hay más de alguna fracción, no es posible discernirlo y se obtiene un resultado promedio. En general mediante GPC, si la muestra posee un sólo pico y un comportamiento relativamente gaussiano, es probable que el Mv sea similar a Mp y/o Mn (Ezrin 1971).

Determinación del Grado de Desacetilación de CS purificado

Ya que este dato resulta de gran relevancia para comprender y predecir otras características referidas a la funcionalidad del CS, se emplearon las técnicas de Análisis Elemental y RMN para determinar el grado de desacetilación (DD, por sus siglas en inglés).

Análisis Elemental. El contenido porcentual de carbono (C) y Nitrógeno (N) fue determinado con un Analizador Elemental CHN EA 1108 (Carlo Erba, New Jersey, USA)[3]. Se obtuvo la relación de masas C/N y se calculó el DD (Li *et al.* 2016) considerando la ecuación (2.9)

$$\frac{C}{N} = \frac{[6 + (1 - DD) \times 2] \times 12}{1 \times 14} \quad (2.9)$$

El grado de desacetilación obtenido fue del 72% (Prudkin Silva *et al.* 2018). Cabe recordar que se considera quitosano, cuando el grado de desacetilación de la quitina es mayor al 50 % (Rinaudo 2006).

Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Es la herramienta analítica que proporciona mayor información estructural y estereoquímica en un tiempo asequible. La técnica no es destructiva y tiene aplicaciones en todas las áreas de la Química, Bioquímica y Biología. Disponiendo de accesorios

adecuados hasta permite la observación de tejidos. La RMN es una espectroscopia de absorción cuyo fundamento es la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. Las partes fundamentales de un espectrómetro de RMN son un imán, que es en realidad una bobina superconductor y suministra el campo magnético principal, un oscilador de radiofrecuencias que suministra la energía necesaria para cambiar la orientación de los núcleos, una bobina detectora que recibe las señales y un sistema informatizado que gobierna todo el aparato y que incluye un sistema de amplificación y registro. Entre los núcleos más frecuentes en los compuestos orgánicos, son magnéticamente activos el protón (^1H), carbono (^{13}C), nitrógeno (^{15}N), fósforo (^{31}P) y flúor (^{19}F). En la Fig. 2.6 se muestra el espectro correspondiente al Etanol.

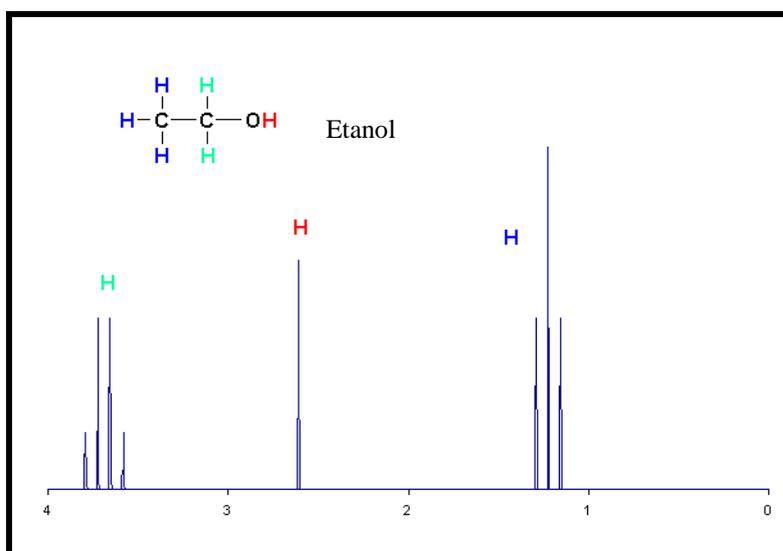


Fig. 2.6: Espectro ^1H correspondiente al Etanol. Adaptada de(Vanschaik n.d.).

Las muestras, generalmente, son disoluciones en disolventes que no tengan átomos de protio (^1H). Frecuentemente se usan el deuterocloroformo, hexadeuterodimetilsulfóxido, óxido de deuterio, deuterobenceno, deuteropiridina y otros.

Para los análisis realizados en esta Tesis se empleó un equipo FT-NMR Bruker Avance DPX400 (Bruker, Massachusetts, Estados Unidos). La porción de muestra se disuelve en ácido fórmico al 5% en agua deuterada, para lograr una concentración final de 10 mg/ml (Fabián Vigliocco, Sergio Rillo, Julieta Heba 2014) (ec. 2.10):

$$DA = \left[\left(\frac{1}{3} H_{AC} \right) / H_2 \right] \times 100 \quad (2.10)$$

Donde DA es el grado de acetilación porcentual, H_{AC} es el área del pico a 1,88-1,91 ppm asignada a los 3 protones del grupo metilo del acetilo (se divide por este número de protones para normalizar) y H_2 es el área del pico a 3,00 ppm asignada al protón unido al carbono 2 correspondiente a la unidad monomérica del quitosano desacetilado.

2.2.2. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS) Y POTENCIAL Z

Distribución de tamaños. Estas determinaciones se llevaron a cabo en un equipo de dispersión dinámica de luz (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra) provisto con un láser He-Ne (633 nm) y un correlator digital, modelo ZEN3600. Las mediciones se realizaron a un ángulo de dispersión fijo de 173°. El equipo Zetasizer Nano-ZS determina tamaño de partículas cuyo diámetro hidrodinámico se encuentra en el rango de 0,6 nm a 6 μ m.

La dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés, *Dynamic Light Scattering*) es una técnica no invasiva, que requiere poco volumen de muestra para su análisis y se emplea para la medición del tamaño de partícula, principalmente en la escala submicrónica. Las aplicaciones más usuales del DLS son las mediciones de tamaño y distribución de tamaños de las gotas de una nanoemulsión y partículas dispersas o disueltas en un líquido como proteínas, polímeros, micelas, nanopartículas y dispersiones coloidales (Stetefeld *et al.* 2016).

Debido a la dependencia del tamaño de partícula con la intensidad de dispersión de luz, la asociación de diferentes biopolímeros puede determinarse fácilmente por medio de instrumentos de dispersión de luz. Es por ello que en este trabajo, se seleccionó esta técnica para la caracterización de interacciones en solución, con el objetivo de evaluar el efecto de las condiciones del medio sobre el estado de asociación, la agregación o el autoensamblaje de las moléculas en estudio.

La intensidad de dispersión de luz de una molécula es proporcional al cuadrado del peso molecular. Por lo tanto, esta técnica es muy sensible a la aparición de formas asociadas o agregadas. La técnica de DLS también permite determinar las poblaciones existentes en una muestra con múltiples tamaños de partículas.

En un equipo de DLS, las partículas en la muestra dispersan la luz en diferentes direcciones, la cual incide en ellas desde una fuente de luz láser a una determinada longitud de onda. La luz dispersada que fluctúa con el tiempo debido al movimiento browniano de las partículas es recibida por un detector óptico y relacionado con el tamaño de la partícula.

Existen dos aproximaciones que pueden ser utilizadas para obtener el tamaño de partícula:

(i) análisis de *Cumulantes* que ajusta una exponencial simple a la función de correlación para obtener el tamaño de diámetro promedio (diámetro hidrodinámico promedio o *Z-average*) y una estimación del ancho de la distribución (índice de polidispersidad) que es considerada como un indicador del grado de agregación (Sharma *et al.* 1996). Los resultados que se obtienen mediante este análisis son aplicables con propósitos de comparación de un simple valor pero es inadecuado para dar una completa descripción de los resultados de la distribución en sistemas polidispersos.

(ii) análisis de *Contin* que ajusta una exponencial múltiple a la función de correlación para obtener los percentiles de distribución de los tamaños de diferentes soluciones. Los mismos se informan en un gráfico de intensidad relativa de luz dispersada por las partículas en varios rangos de tamaños (distribución de tamaños por intensidad). La distribución de tamaño original generada por el equipo de DLS es la distribución de tamaños por intensidad y puede convertirse a distribución de tamaños por volumen o número mediante la teoría de Mie (1908) (Moore & Cerasoli 2017), con el objetivo de analizar la importancia de los diferentes picos en relación a la cantidad de partículas presentes en la muestra.

Para diferenciar fácilmente estas distribuciones, pueden considerarse dos poblaciones de partículas esféricas de 5 y 50 nm de diámetro d , presentes en igual número. Si se grafica la distribución de dichas poblaciones según su número, se obtienen dos picos con una relación 1:1, localizados en 5 y 50 nm respectivamente (Fig. 2.7). Si se considera la distribución por volumen, los dos picos cambian a una relación 1:1000, porque el volumen de una esfera es proporcional a d^3 . Si por último se grafica la distribución por intensidad, el cociente entre los picos es ahora 1:1.000.000, debido a que la intensidad dispersada es proporcional a d^8 (aproximación de Rayleigh). Es importante considerar entonces todas las distribuciones a fin de comprender correctamente el comportamiento de la muestra analizada.

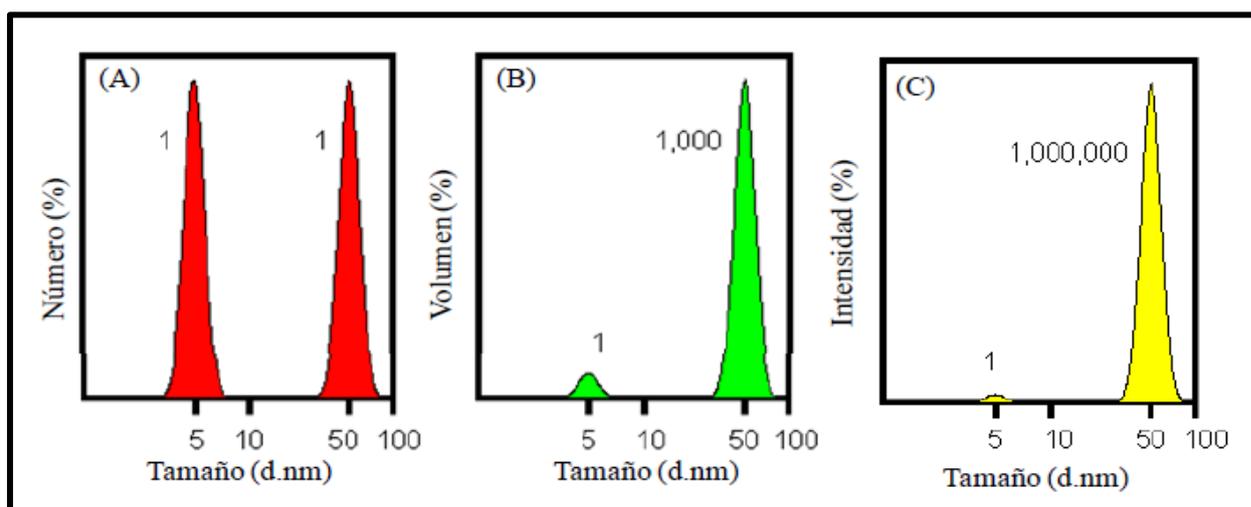


Fig. 2.7: Distribución en (A) número, (B) volumen y (C) intensidad de una muestra bimodal de partículas de 5 y 50 nm presentes en igual cantidad.

Las determinaciones de tamaño de partícula con su distribución, para los sistemas analizados se realizaron a 25°C y se informan como el promedio y la desviación estándar de diez lecturas hechas sobre 2-3 soluciones independientemente preparadas como réplicas. Con este propósito, un volumen de 1 ml de cada muestra fue dispensado dentro de cubetas de poliestireno descartables de 1 cm de arista.

Carga superficial de las partículas en solución. El desarrollo de una carga neta en la superficie de una partícula, afecta la distribución de iones de la región interfacial circundante. Esto resulta en un aumento de la concentración de iones de carga opuesta a la partícula que están cercanos a la superficie. Así, se genera una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula (Fig. 2.8). La capa de líquido que rodea a la partícula se la puede encontrar de dos formas: una región interna, conocida como capa de Stern donde las moléculas de solvente están fuertemente ligadas a la partícula cargada, y una región externa, conocida como capa difusa, donde la unión es menos fuerte. Existe un límite imaginario que termina en la capa difusa, donde los iones y la partícula forman una entidad estable.

Cuando una partícula se mueve (debido a la gravedad por ejemplo), lo hace con los iones que conforman la capa Stern y la difusa. Este límite se conoce como plano *slipping* y su correspondiente se conoce como potencial ζ (Bhattacharjee 2016).

Se considera que una suspensión coloidal es estable cuando tiene valores de potencial ζ mayores a 30 mV en valor absoluto (± 30 mV). El factor más importante que afecta el potencial ζ es el pH, especialmente cuando se estudian proteínas. A pH mayores al punto isoeléctrico el potencial ζ es menor a cero, a pH menores es positivo y cero en el punto isoeléctrico (pI).

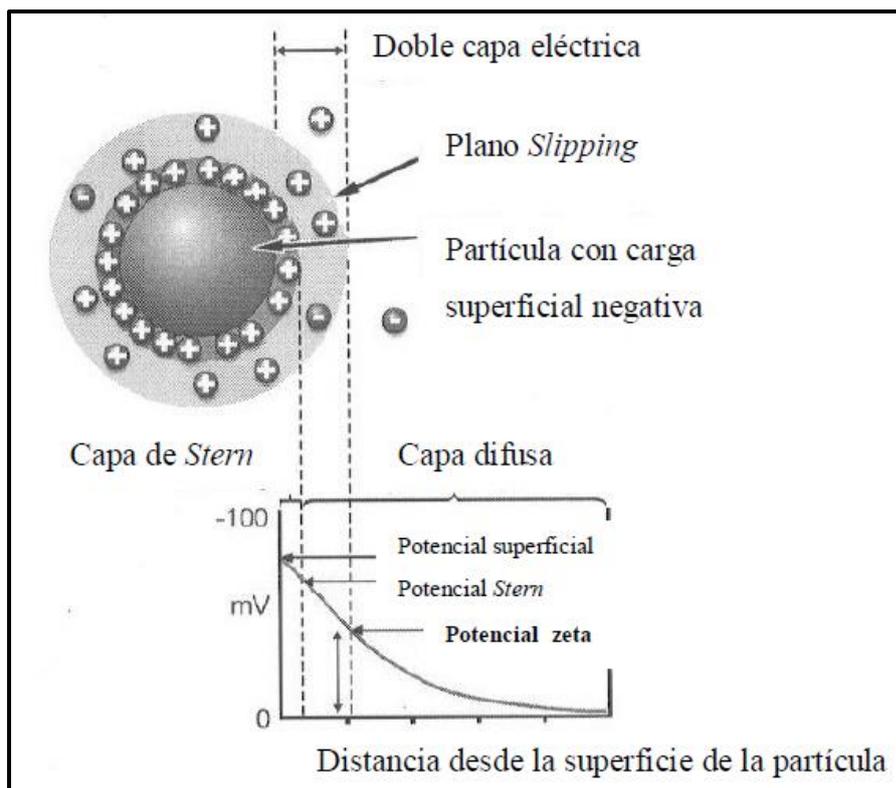


Fig. 2.8: Esquema de una partícula cargada y la doble capa eléctrica que la rodea (Malvern Instruments, 2001).

Las determinaciones de la carga neta superficial de las partículas en solución, se realizaron mediante la medición del potencial zeta (ξ) en el mismo equipo Zetasizer Nano-Zs. Se emplearon celdas de medición cuya denominación es Disposable Capillary cells (DTS1060, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). El equipo aplica un campo eléctrico que pasa entre los electrodos ubicados a cada lado de dicha cubeta. La determinación del potencial ζ se basa en la medición de la dirección y velocidad de las partículas al aplicar el campo eléctrico.

Las determinaciones de potencial ζ , realizadas a 25°C, se informan como el promedio y la desviación estándar de diez lecturas realizadas sobre 2-3 soluciones independientemente preparadas.

2.2.3. CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE FLUJO Y VISCOELÁSTICO

El comportamiento de flujo de las dispersiones de quitosano para diversas concentraciones se registró a través de un reómetro de esfuerzo de corte controlado para Physica (MCR 301)(Graz, Austria) con sistema de cono y plato (CP 50), gap de 0,099 mm. A tal fin, se vertieron 570 μ l de cada muestra en el plato del reómetro, el cual operó en modo rotatorio. La temperatura fue controlada a 25 °C por un sistema Peltier (Viscotherm VT2, PaarPhysica) (Fig. 2.9). Se registró la evolución del esfuerzo de corte en función de la velocidad de deformación linealmente creciente desde 0 a 300 s^{-1} . Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.



Fig. 2.9: Reómetro Para Physica MCR 300 con sistema de platos paralelos (PP30/S).

Curva de flujo. El concepto de fluido newtoniano implica que existe una proporcionalidad fija entre el esfuerzo de corte τ y la velocidad de deformación. Debido a la $\dot{\gamma}$ forma relativamente simple de una curva de flujo, estos líquidos pueden caracterizarse por un único término, llamado constante de proporcionalidad o viscosidad (Fig. 2.10 a). Más aún, un solo experimento como la medición del esfuerzo de corte sobre cierta superficie, a una velocidad de deformación fija, es suficiente para cuantificar las características reológicas del fluido. Sin embargo, no son demasiados los fluidos que cumplen esta relación (agua, leche, aceites vegetales, algunas soluciones diluidas). La mayoría de los fluidos se clasifican como no Newtonianos y exhiben curvas de flujo como las curvas b y c de la Fig. 2.10. Dichos fluidos no pueden ser caracterizados por una única medición a velocidad constante. En muchos casos el esfuerzo de deformación no depende solamente de la velocidad sino también del tiempo.

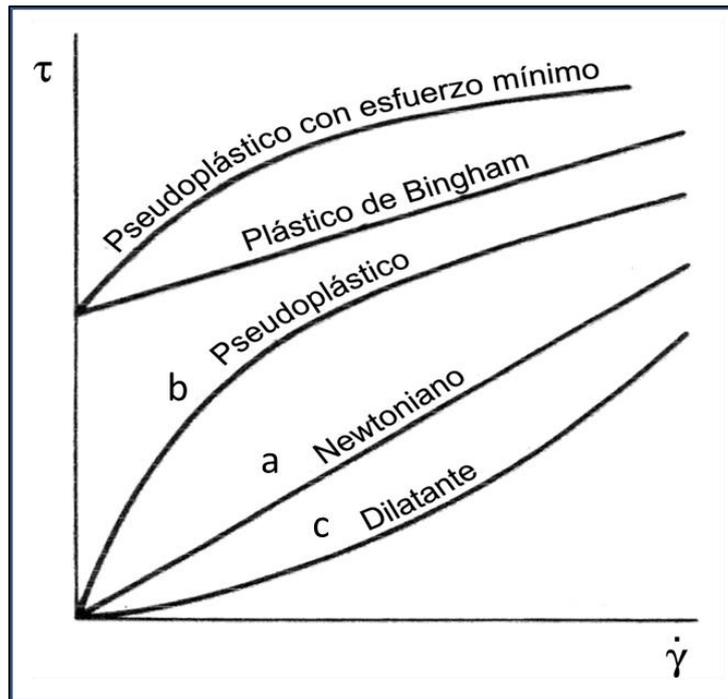


Fig. 2.10: Curvas de flujo para fluidos newtonianos (a), pseudoplásticos (b) y dilatantes (c).

El término *pseudoplástico* suele aplicarse a estos materiales (leche concentrada, gomas, etc) debido a que la pendiente de la curva disminuye al aumentar la velocidad de deformación (Fig. 2.10b). Los fluidos *dilatantes* se corresponden a la curva c) y experimentan un crecimiento del esfuerzo de deformación al aumentar la velocidad.

En vez de aplicar una regresión lineal para obtener ecuaciones que expliquen este comportamiento, se considera más conveniente graficar el logaritmo del esfuerzo de corte en función del logaritmo de la velocidad de deformación (Mckenna & Lyng 2001). Para la mayoría de los fluidos, ya sean dilatantes o pseudoplásticos, esto arroja como resultado una línea recta y lleva a la ecuación 2.11, que suele denominarse Ley de la Potencia:

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (2.11)$$

Donde τ es el esfuerzo de corte, la $\dot{\gamma}$ velocidad de deformación, K el índice de consistencia y n el índice de flujo, que refleja la cercanía del sistema con un fluido newtoniano.

El parámetro K en el caso de fluidos newtonianos, cuando $n=1$, corresponde a la viscosidad del fluido. Para valores de $n < 1$ la solución se considera pseudoplástica y para $n > 1$ dilatante (Rao 2014).

Se obtuvieron los valores de esfuerzo de corte frente a las velocidades de deformación, trabajando en modo rotatorio y a continuación los datos se ajustaron utilizando la ecuación de la ley de potencia a partir de los datos experimentales.

Ensayos oscilatorios. La caracterización del comportamiento viscoelástico se realizó por medio de ensayos oscilatorios. Éstos consisten en someter a la muestra a una deformación sinusoidal y medir el estrés resultante.

La deformación se expresa como (ec. 2.12):

$$\gamma = \gamma_0 \text{sen}(\omega t) \quad (2.12)$$

Donde γ_0 es la amplitud de la onda de deformación y ω , la frecuencia de oscilación. El esfuerzo o estrés resultante varía con la misma frecuencia ω , pero presentando un desfase δ con respecto a la deformación (ec. 2.13):

$$\sigma = \sigma_0 \text{sen}(\omega t + \delta) \quad (2.13)$$

Para sólidos elásticos δ es cero, es decir, la deformación y el esfuerzo están en fase; mientras que para líquidos Newtonianos, el estrés y la deformación están fuera de fase con δ igual a 90° . Los fluidos viscoelásticos exhiben un comportamiento intermedio y su ángulo de fase varía entre 0° y 90°

La relación entre deformación y esfuerzo puede describirse mediante el módulo complejo G^* , definido como (ec. 2.14):

$$G^* = G' + iG'' \quad (2.14)$$

La componente en fase G' se denomina módulo de almacenamiento (o elástico), mientras que la componente fuera de fase G'' se conoce como módulo de pérdida (o viscoso) y corresponde a la contribución líquida. La relación entre la componente viscosa y la elástica es la $\text{tg } \delta$ o tangente del ángulo de pérdida o viscoelasticidad relativa (ec. 2.15):

$$\text{tg } \delta = \frac{G''}{G'} \quad (2.15)$$

δ representa el desfase existente entre el esfuerzo y la deformación, siendo un parámetro indicativo de la relación entre la energía disipada y la almacenada por el material, y de la viscoelasticidad del mismo.

Las mediciones se realizaron en la región viscoelástica lineal (LVE), lo cual implica la examinación de la estructura de la muestra de una manera no destructiva. En estudios iniciales, se encontraron las condiciones de amplitud y frecuencia de deformación que permitirían trabajar en LVE. En dicha zona,

las propiedades reológicas no son dependientes de la deformación. En la Fig. se presenta, a modo de ejemplo, un espectro mecánico de un sistema con carácter de gel, donde se muestra la variación de G' y G'' en función de la frecuencia.

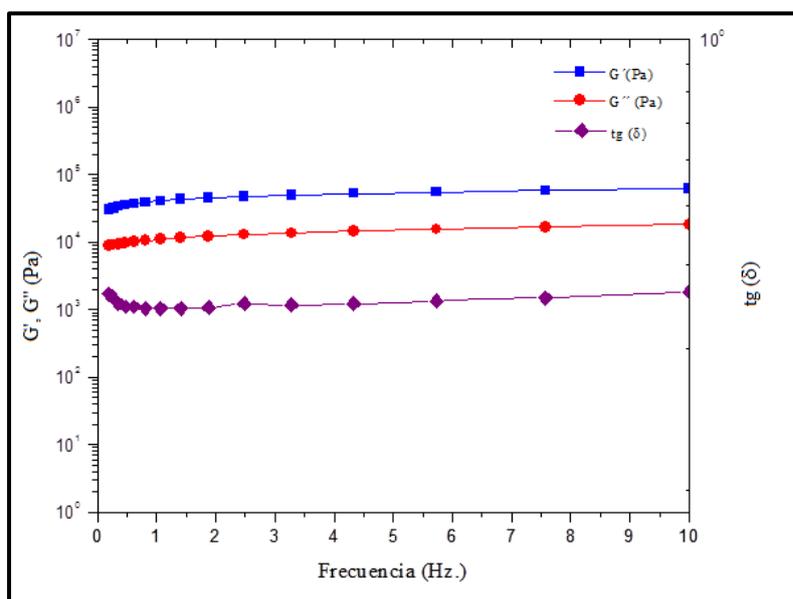


Fig. 2.11: Espectro mecánico típico de un material viscoelástico tipo gel.

Existen varios fenómenos que dan origen a cambios en el comportamiento reológico de un sistema binario, como el entrelazamiento de cadenas, cambios conformacionales e interacciones químicas. Estos fenómenos pueden establecerse entre un polímero mucoadhesivo y la mucina, por ejemplo. La interacción a nivel de grupos funcionales a menudo resulta en la formación de mezclas que exhiben sinergismo reológico, es decir, que se comportan como un gel al ser mezcladas (Sriamornsak & Wattanakorn 2008).

Los parámetros del sinergismo reológico se miden analizando el comportamiento de ambos componentes del módulo dinámico (G' y G'') en función de la frecuencia. Para cada sistema, si $\text{tg}\delta < 1$ el comportamiento se considera elástico o de tipo sólido-gel, mientras que si $\text{tg}\delta > 1$ existe una componente líquida predominante o se dice que el comportamiento dominante es de tipo viscoso.

En primer lugar se determinó la región LVE, para ello se sometieron las muestras a un barrido de amplitud para determinar dónde los valores de los módulos son independientes de la deformación aplicada. Las mezclas de CS y Mu fueron preparadas y almacenadas *over-night* a 4°C. El volumen adecuado de las soluciones en análisis fueron dispuestas sobre el plato inferior del reómetro y se esperó 5 min para borrar su historia reológica. Luego, se realizaron barridos de frecuencia de deformación en el rango de 0.1-15 Hz. Con el fin de determinar las componentes de la mucoadhesión, la frecuencia elegida para el análisis de $\Delta G'$, $\Delta G''$ y $\text{tg}\delta$ fue de 1 Hz.

Las mediciones para explorar el comportamiento viscoelástico se realizaron en el mismo reómetro descrito para curvas de flujo, pero en modo oscilatorio. La temperatura de los ensayos fue constante a 37°C y el gap fue de 0,099 mm. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

2.2.4. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

El microscopio de fuerza atómica forma parte del conjunto de técnicas conocido como microscopías de barrido por sondas que consiste en recorrer la superficie de la muestra con una punta o sonda de prueba, monitoreando su interacción y generando a partir de ella un mapa tridimensional de la topografía y de las propiedades de dicha interacción (conductividad eléctrica, fricción, magnetización y temperatura entre otros) (Vorbürger *et al.* 1999).

El AFM permite observar características superficiales a nivel molecular y atómico de muestras conductoras y no conductoras, a través de la medición de fuerzas de atracción y repulsión entre la sonda de prueba y la superficie. La punta, que posee algunos micrones de largo y un diámetro del orden de la decena de nanómetros, está situada en el extremo libre de un fleje (*cantilever*) liviano de entre 100 μm y 200 μm de largo (Fig. 2.12). Las fuerzas entre la punta y la superficie de la muestra generan una flexión en el *cantilever* que es medida por un detector. La punta y el *cantilever* constituyen el sensor de fuerza. La fuerza interatómica que se asocia más frecuentemente a dicha deflexión es la de Van der Waals; ésta es repulsiva cuando el *cantilever* se ubica a algunos angstroms de distancia de la superficie de la muestra y atractiva a distancias del orden de las decenas o cientos de angstroms (Zhang *et al.* 2017). El AFM puede operar en dos modos principales: contacto (*contact mode*) y contacto intermitente (*tapping mode*). En este último, el *cantilever* oscila de forma tal que al final del recorrido la punta golpea suavemente la superficie de la muestra. Este modo es más seguro que el modo de contacto pues elimina las fuerzas laterales de fricción o arrastre entre la punta y la muestra y por lo tanto es menos probable que esta última resulte dañada.

Las imágenes presentadas se obtuvieron empleando con un dispositivo SPM - Veeco Multimode NanoScope IVA (Veeco, Nueva York, Estados Unidos) con una punta Veeco de Si₃N₄/Au, en modo *Tapping*.

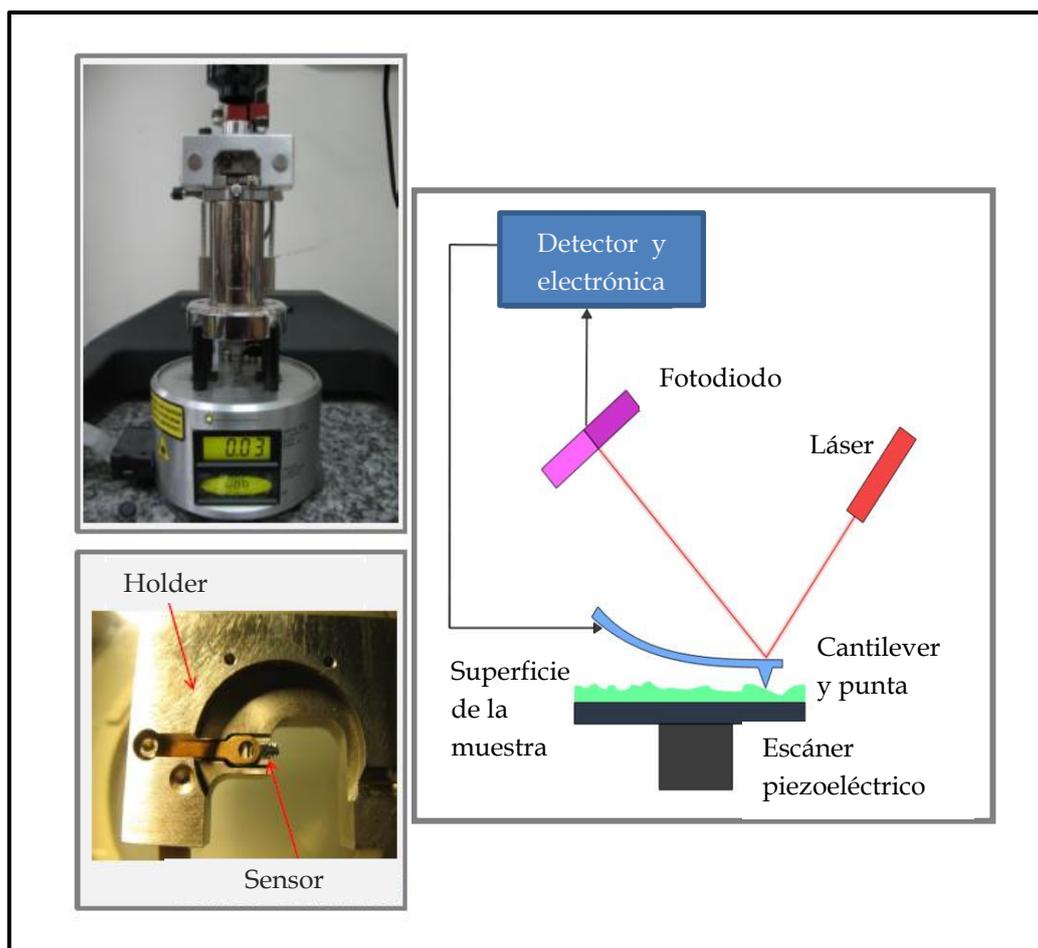


Fig. 2.12: Modelo de microscopio de fuerza atómica. A la izquierda, fotografías del AFM empleado (arriba) y del soporte y el sensor de fuerza (abajo). A la derecha, esquema de funcionamiento.

2.2.5. ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier se sustenta en el hecho que la mayoría de las moléculas absorben luz en la región infrarroja del espectro electromagnético, típicamente entre los 4000 a 400 cm^{-1} . La energía absorbida se relaciona con la frecuencia de vibración natural de cada una de las uniones presentes en la molécula y por lo tanto de este modo puede identificarse la presencia de variados tipos de uniones así como también de grupos funcionales. Esta técnica es especialmente útil para el estudio de compuestos orgánicos, debido a la presencia de grupos funcionales, cadenas laterales y entrecruzamientos que poseen frecuencias vibracionales bien definidas. La abundancia de bandas de absorción específicas garantiza poder identificar la identidad de compuestos puros o sus modificaciones. A su vez, pueden seguirse procesos de polimerización, identificarse sustituciones, identificarse interacciones polímero-aditivo, identificar curados y mezclas y monitorearse la formación de complejos polímero-analito (Ma *et al.* 2008).

Reflección total atenuada (ATR). Durante una medición, la muestra es colocada sobre un cristal con un índice de refracción mayor al de la muestra, usualmente mayor a 2. La luz infrarroja es direccionada al cristal y dirigida hacia la interfase de la muestra/cristal, con un ángulo de incidencia que hace que se refleje completamente en dicha interfase. Luego de varias reflexiones, la luz deja el cristal y es enfocada en el detector. Luego de reflejarse en la interfase, la luz penetra en la muestra como una onda evanescente, con la misma frecuencia que la luz incidente pero con una amplitud distinta. La onda puede ser absorbida por la muestra, por lo que la luz que llega al detector brinda información respecto al espectro infrarrojo de la muestra (Barth 2007) (Fig. 2.13).

Se empleó un equipo Nicolet 8700, con un accesorio ATR Smart Orbit de única reflexión horizontal con cristal de diamante. El rango espectral fue de 4000-400 cm^{-1} . Se realizaron 64 barridos por muestra, con una resolución de 4 cm^{-1} . El software para procesamiento de datos fue OMNIC versión 7.3 de Thermo Electron Corporation.

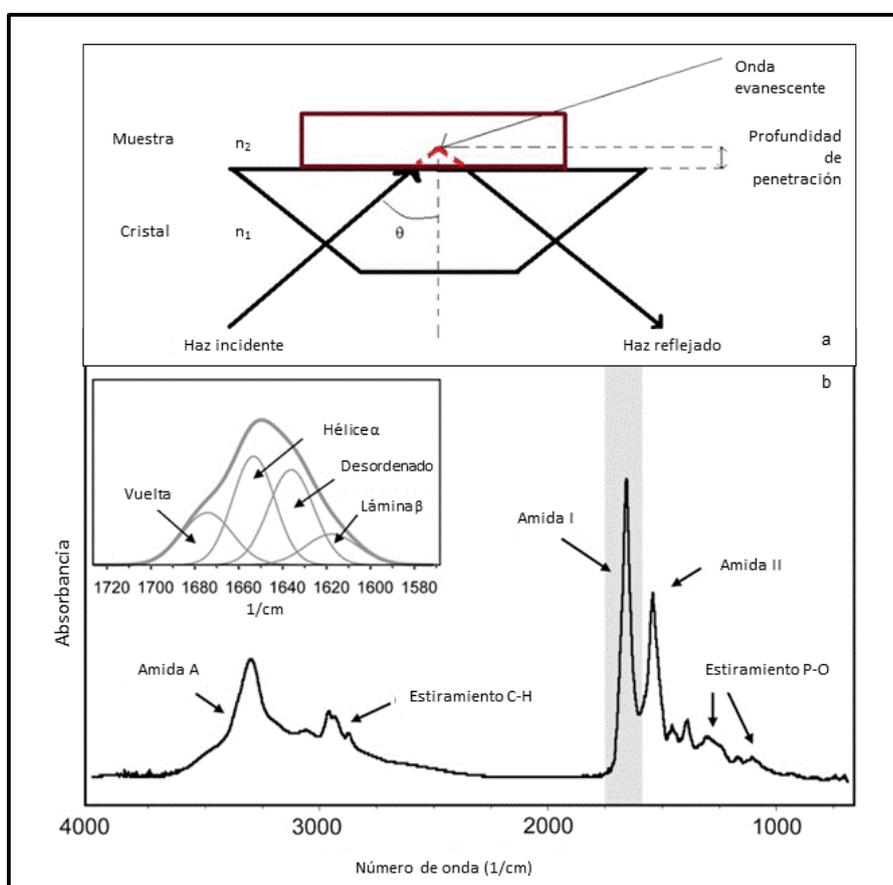


Fig. 2.13: Esquema del fundamento de análisis por ATR (a). Espectro de absorbancia para proteínas, mostrando los grupos funcionales y las regiones espectrales de mayor relevancia (b). Adaptados de (Atitar & Belhadj n.d.) y (Miller *et al.* 2013) respectivamente.

2.2.6. CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Se emplearon dos líneas celulares: fibroblastos de origen murino 3T3-L1 (ATCC® CRL-1658™) y epiteliales humanas HELA (ATCC® CCL-2™). Ambas fueron crecidas en placas de Petri. El medio empleado fue DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino y penicilina/estreptomicina (50 U/ml; 50 mg/ml) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) (Prudkin Silva *et al.* 2018). La incubación se realizó en una estufa gaseada a 37 °C y en atmósfera con 5 % CO₂ y 100 % de humedad.

2.2.7. ENSAYO DE REDUCCIÓN DE MTT

Se realizaron ensayos para conocer el rol que poseen el tiempo de exposición y la concentración de CS en la proliferación celular de ambas líneas celulares.

Las sales de tetrazolio, como el MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), poseen un anillo que es capaz de ser reducido por varias deshidrogenasas celulares generando formazan, un producto azul oscuro y parcialmente insoluble. Esta reacción tiene lugar en todas las células metabólicamente activas y es, por lo tanto, un indicador de viabilidad celular. En este trabajo se siguió la metodología original descrita por Mosmann (1983) (Mosmann 1983) con ligeras modificaciones (Alaimo *et al.* 2011). Se agregó la solución de CS a las células en cultivo, permitiendo que el polisacárido estuviera en contacto con éstas durante 1, 6 y 24 hs. Luego se lavaron con PBS y se incubaron con MTT 0,125 mg/mL en medio de cultivo sin suero a 37°C durante 90 min. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y el formazan se solubilizó en 200µL de DMSO. La absorbancia se midió a 570nm y se le restó la absorbancia de referencia medida a 655nm (Martínez 2016).

Para disolver el CS_p, se empleó una solución de Medio DMEM 5% v/v, suplementado con Penicilina/Estreptomicina (50 U/ml; 50 mg/ml), a la que se le agregó la cantidad necesaria de una solución madre de CS_p 2% p/p, para lograr concentraciones finales del polisacárido entre 0,5 y 50 µg/ml.

Los resultados del diseño experimental fueron sometidos a un análisis estadístico a fin de discernir la importancia relativa de cada factor y de la interacción entre éstos, sobre la viabilidad celular.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de 2 factores con interacción: uno de los factores es el tiempo (24, 48 y 72 hs.) y el otro la concentración de CS (0; 0,5; 5 y 50 µg/ml). Los tratamientos quedan determinados por la combinación de los niveles de los factores. Con este modelo estadístico se analizaron todas las variables respuesta medidas en ambas líneas celulares.

En todos los casos se utilizó estadística paramétrica y para que las conclusiones del (ANOVA) sean válidas, al realizar el diseño experimental se verificaron los supuestos de manera que las muestras sean aleatorias y las observaciones independientes. Además se pusieron a prueba los supuestos de distribución normal de la variable respuesta en cada tratamiento e igual variabilidad entre los tratamientos. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza se estudiaron mediante los test de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. A su vez, antes de verificar los supuestos del modelo se recurrió al análisis cualitativo de herramientas gráficas para visualizar el efecto de los tratamientos, su variabilidad y los posibles *outliers* (Doncaster, C. P., Davey 2007). Los análisis estadísticos y los cálculos del tamaño muestral fueron efectuados utilizando el programa estadístico Infostat, FCA, Universidad de Córdoba, Argentina.

2.2.8. EFECTO DEL CS EN MONOCAPAS CELULARES. APERTURA DE UNIONES ESTRECHAS

Para este ensayo se empleó la línea celular HELA. Para su cultivo se procedió según 2.2.7. El cultivo celular se dejó crecer durante 24 horas hasta su confluencia en monocapa, y luego se añadió una solución 0.5 % p/v de CS_p. Luego de 1, 6 y 24 horas las células fueron fijadas con las sondas rodaminafaloidina, para luego observar mediante microscopía confocal los efectos que el polisacárido ejerce tanto en la monocapa como en la actina (Smith *et al.* 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

Análisis Elemental. La composición porcentual de los CS_n y CS_p y de la quitina de la cual fue obtenido el CS_n se muestra en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: composición porcentual obtenida mediante Análisis Elemental, n=3±SD.

	N %	C %	H %
CS _p	6,9 ± 0,2	38,8 ± 0,3	6,7 ± 0,2
CS _n	6,6 ± 0,2	38,9 ± 0,3	6,9 ± 0,2
Quitina A	6,7 ± 0,2	44,8 ± 0,3	6,5 ± 0,2

Contenido total de Nitrógeno. Se determinó el contenido total de N para ambos CS y para uno comercial de referencia (Sigma Aldrich), mediante el método Kjeldahl (Tabla 2.4).

Tabla 2.4: Contenido total de nitrógeno mediante método Kjeldahl.

	N total %
CS _p	7,22±0,3
CS _n	7,04±0,2
CS comercial	7,5±0,1

Esta determinación, si bien suele realizarse de manera rutinaria, no distingue el aporte de material proteico remanente luego de la síntesis de CS, por lo que sus valores son solamente cualitativos.

2.4. CARACTERIZACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA PARA SOLUCIONES DE QUITOSANO

En la sección anterior se obtuvo el peso molecular promedio del CS. Si bien constituye un dato valioso, hay recordar que como la mayoría de los polímeros, el CS es polidisperso y por lo tanto es posible que en una solución se encuentren cadenas lineales de variados tamaños. Para visibilizar esta característica, se realizaron mediciones de distribución de tamaño para un rango amplio de concentraciones de CS (1·10⁻³-1·10⁻¹⁰ % p/p), a fin de evaluar cómo varía el tamaño, determinado

como radio hidrodinámico, con la concentración, al pH de máxima solubilidad del polímero. A medida que la concentración aumenta, dicha distribución se desplaza hacia valores menores (Fig. 2.14, flecha negra).

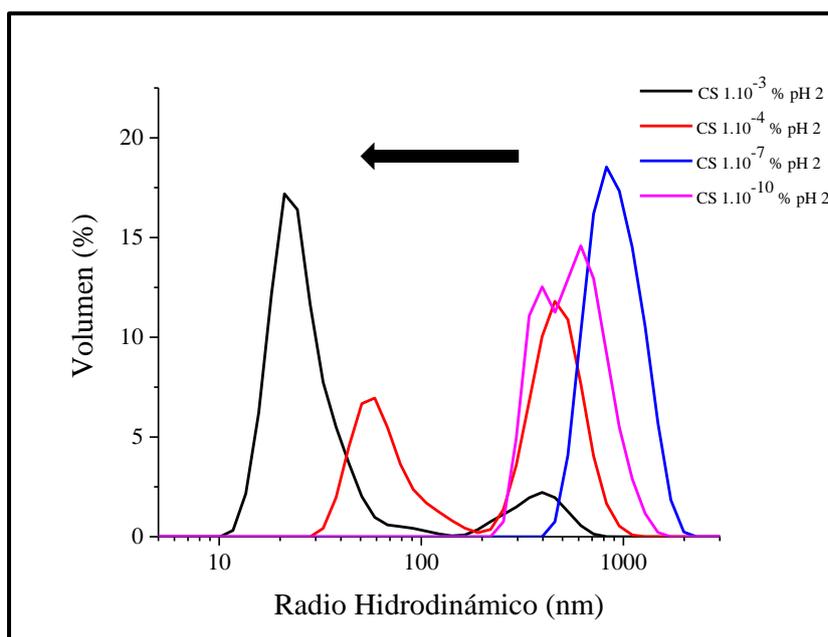


Fig. 2.14: Distribución de tamaño de partícula basado en datos de DLS para quitosano a pH 2. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

Ya que hay una relación entre la disposición molecular del polímero en solución y su posible futura interacción con la insulina, se realizó un estudio por DLS para obtener la distribución de tamaños del CS (CS_p) a los pHs de mezcla y de interacción para la formación de los complejos. En la Fig. 2.15 se muestran tales distribuciones, para las tres concentraciones estudiadas (1·10⁻²⁰%, 1·10⁻³⁰% y 1·10⁻⁴⁰% p/p).

Las distribuciones más polidispersas y/o aquellas con picos localizados en mayores tamaños de partícula, es decir mayor radio hidrodinámico, corresponden a una disposición espacial más expandida de las moléculas de CS en solución (Philippova *et al.* 2001).

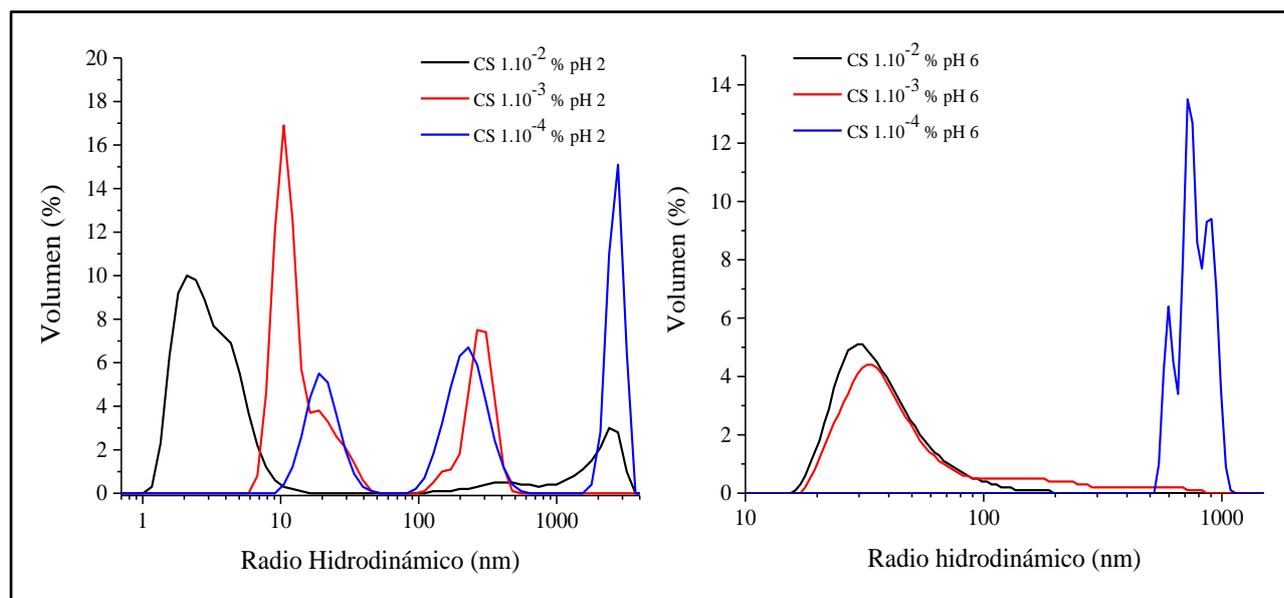


Fig. 2.15: Distribución de tamaño de partícula basado en datos de DLS para quitosano a pH 2 (a) y 6 (b). Las concentraciones de CS consideradas fueron de $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ y $1 \cdot 10^{-2}$ %, p/p. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

En realidad, el fenómeno de agregación de polisacáridos es muy común en solución acuosa debido a la interacción intermolecular (como el enlace de hidrógeno y la fuerza de Van der Waals). Sin embargo, esta interacción se ve fuertemente afectada por el solvente de la solución y la estructura de los polisacáridos (Zhang y col, 2018)(Zhang *et al.* 2018). Este resultado guarda analogía además, con lo observado al analizar la variación del tamaño de partícula con el pH de la solución en la que se encuentra la macromolécula.

2.5. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES. ESPECTROSCOPIA FTIR

Las modificaciones sufridas por el CS luego de la purificación en medio ácido se evaluaron comparando los espectros obtenidos mediante Espectroscopía IR para el CS obtenido y provisto por INTI (CS_n), y el producto final luego de la purificación (CS_p).

En la figura 2.16 pueden observarse los resultados correspondientes a la Espectroscopía FTIR-ATR para la quitina original de partida para la obtención de CS y el CS_p. Las muestras se mantuvieron en un desecador hasta el momento de las respectivas mediciones, para evitar hidratación de las muestras y originar señales no deseadas.

La región 1 se atribuye a la elongación de las uniones O-H/N-H y C-H ($3.500-3.000 \text{ cm}^{-1}$ aprox.). La quitina exhibe dos picos en esa región (en 3.426 y 3.268 cm^{-1}) pero esta definición se pierde para

ambos quitosanos. Esto puede ser indicio de una modificación en las uniones puente hidrógeno o de un aumento de la interacción agua-CS para los CS (Prusty & Sahu 2013). Evidentemente la preponderancia de grupos con estas uniones fue mayor en la quitina de partida.

La región 2 da cuenta de la tensión de grupos C-H en 2.867 cm^{-1} para la Q y 2.887 cm^{-1} para los CS. Los enlaces $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ and $-\text{CH}_2$, and $-\text{CH}_3$ de los grupos alifáticos, en torno a 2.300 cm^{-1} , se recuadran en la región 3 (Venkatesham *et al.* 2014).

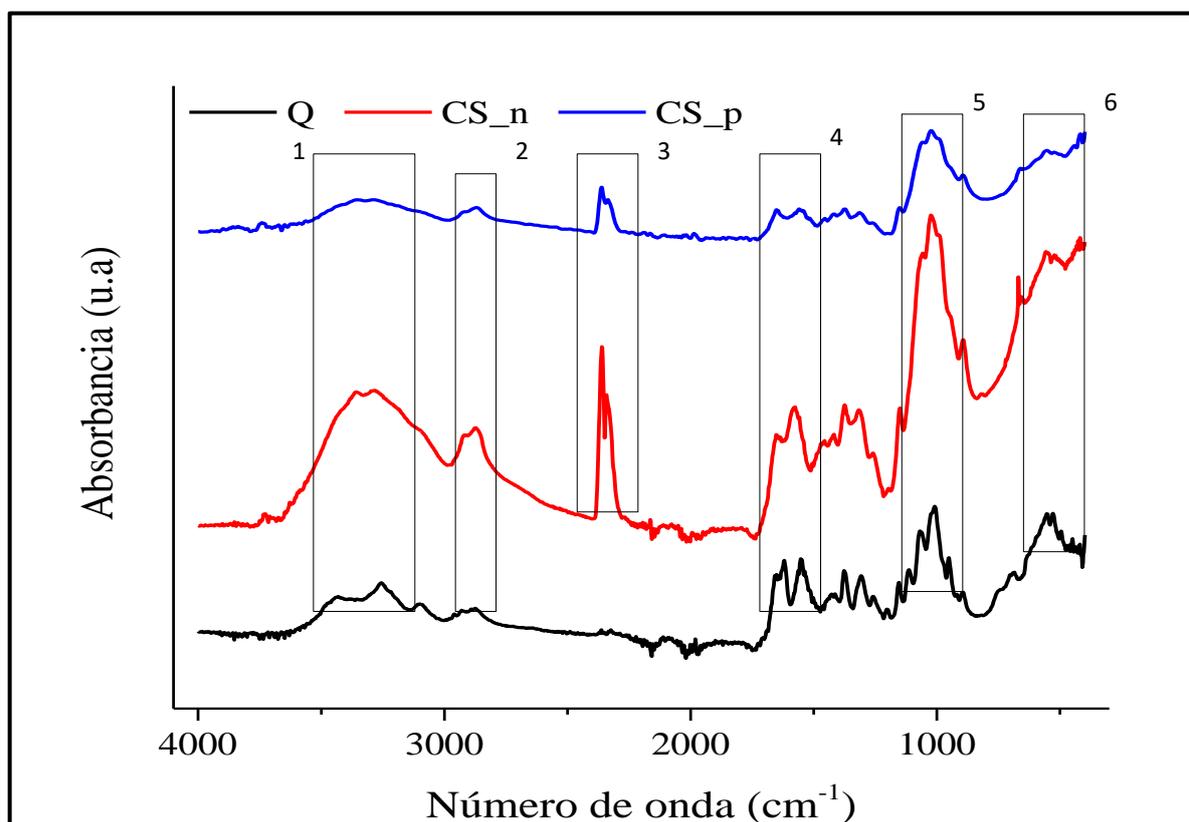


Fig. 2.16: Espectros de FT-IR para quitina (-), quitosano nativo (-) y quitosano purificado (-). Las mediciones se realizaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Entre 1700 y 1500 cm^{-1} (región 4) se encuentran las señales correspondientes al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) (1.652 cm^{-1} aprox.) y la deformación del grupo NH_2 en torno a 1.554 cm^{-1} .

En el espectro correspondiente al CS_p puede apreciarse una disminución en la intensidad de la señal asociada al grupo carbonilo (1650 cm^{-1}). En comparación a los espectros de Q y CS_n . No puede descartarse la existencia de reacciones en las que participa el grupo carbonilo con los amino, durante el proceso de purificación llevado a cabo a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, condiciones para la formación de entidades intermediarias de Maillard. Es sabido que el aumento de la temperatura tiene un efecto acelerador sobre la formación de color vía pardemaiiento no enzimático. Esto se debe a que el calor favorece cada una de las etapas de la reacción. Los trabajos de Mizrahi (1970) (Mizrahi S., Labuza, T., Karel 1970),

Hartel & Shastry (1991) (Hartel *et al.* 1991) y Franzen, *et al.* (1990) (Franzen *et al.* 1990) constituyen algunos ejemplos de determinaciones de pardeamiento en distintos sistemas pulverizados.

La región 5 encuadra las señales correspondientes a las tensiones C-O-C, C-O y C-H, alrededor de 1000 cm^{-1} . Por último, la región 6, con picos en torno a 543 cm^{-1} , evidencia una rotación del anillo glicosídico dentro y fuera del plano de simetría (Heuser & Cárdenas 2014)(Alhosseini *et al.* 2012).

De manera general, puede considerarse que los aumentos o las disminuciones de las señales se deben a variaciones en los grados de libertad de los grupos funcionales, a la pérdida parcial de dichos grupos, a un reordenamiento espacial de las moléculas o a una combinación de dichos factores.

La comparación a simple vista de los espectros de CS_n y CS_p deja en evidencia que, si bien éstos son similares, el proceso de purificación al cual se ve sometido el CS_n no resulta inocuo para dicho material.

2.6. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DESACETILACIÓN MEDIANTE RMN

Dado que se ha demostrado que el grado de desacetilación influye en propiedades importantes como la bioadhesión (Menchicchi *et al.* 2014), la disolución (Thevarajah *et al.* 2016) y la biodegradabilidad (Shigemasa *et al.* 1994)(Aiba 1992). La caracterización funcional del quitosano y sus derivados es hoy en día una de las áreas de investigación más productivas. Por ello se procedió a su determinación analítica.

A continuación se presenta un espectro típico para el quitosano purificado (Fig. 2.17).

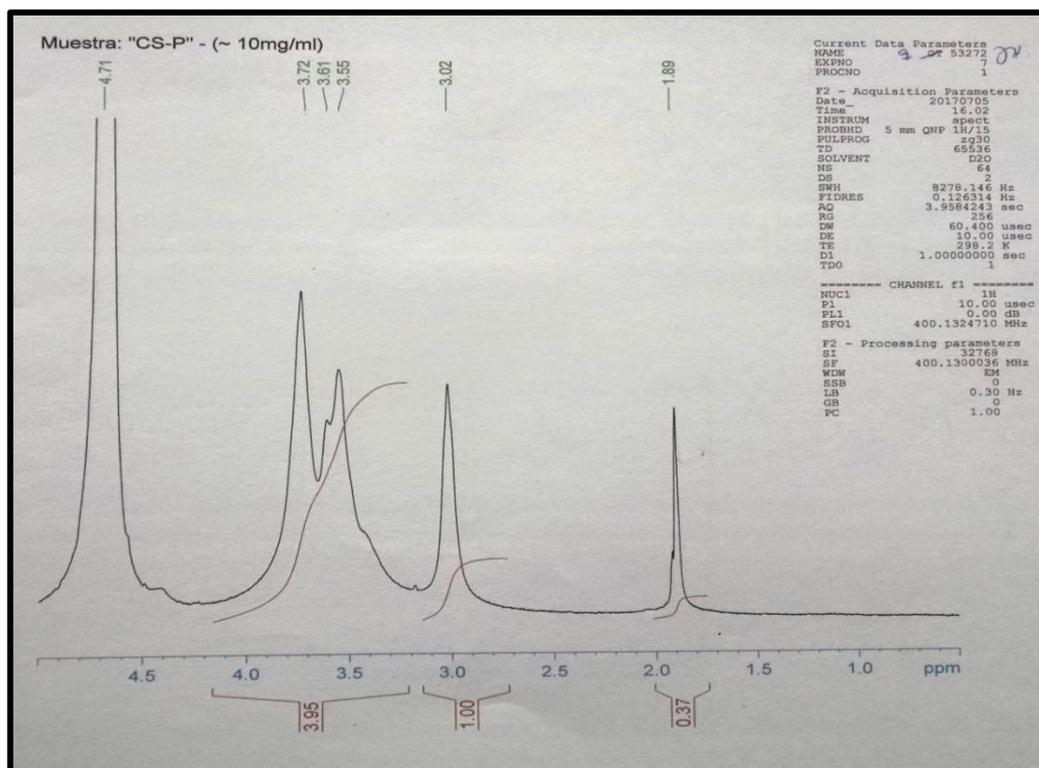


Fig. 2.17: Espectro H¹ -RMN para CS_n. Asignación de picos principales y las áreas correspondientes.

De dicho espectro pudieron obtenerse las áreas correspondientes a H_{AC} y H₂ de la ecuación 10 y así calcular el DD. Las áreas y los valores de DD para CS_n y CS_p, obtenidos a través del software correspondiente, se muestran en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Áreas correspondientes a H_{AC} y H₂ y DD para CS_n y CS_p.

	H _{AC}	H ₂	DD (%)
CS _n	0,4	1	86,6
CS _p	0,37	1	87,6

El grado de desacetilación puede ser determinado mediante técnicas tan diferentes como análisis elemental, titulación, conductometría, HPLC-UV, FTIR y RMN entre otras. Antes de elegir o inclinarse por una de ellas, múltiples factores deben ser tenidos en cuenta. Por ejemplo, aquellos métodos de bajo costo pueden no resultar lo suficientemente precisos. Algunos de ellos no son adecuados para CS con altos grados de DD debido a problemas con la solubilidad. Por otro lado, las muestras tienen que ser extremadamente bien purificadas a fin de remover impurezas como proteínas, humedad o material inorgánico (Alvarenga 2011).

Por ejemplo de Alvarenga (2010) reportó que las diferencias en los resultados obtenidos mediante titulación conductométrica y RMN podrían deberse a la presencia de impurezas en las soluciones empleadas para la titulación (de Alvarenga *et al.* 2010). Por su parte, Czechowska-Biskupet al. (2012) emplearon las técnicas de RMN, FTIR y espectroscopía UV-vis para hallar el DD. Encontraron que esta última técnica arrojó buenos resultados pero demanda un tiempo excesivo y una calibración cuidadosa. La espectroscopía FTIR fue un método rápido, pero su reproducibilidad se vio afectada, ya que hay una fuerte influencia del operador quien elige las líneas de base necesarias para los cálculos (Czechowska-biskup *et al.* 2012).

De manera general, un método debería ser exacto y confiable. Es esencial tomar en cuenta el tiempo de medición, la precisión del método y la exactitud de los resultados. Al considerar estas variables, la espectroscopía RMN resulta ser uno de los métodos más adecuados para la obtención del grado de desacetilación del quitosano (Kasaai 2009).

2.7. REGÍMENES DE FLUJO

La viscosidad de las soluciones poliméricas deben ser caracterizadas en sistemas que serán empleados en sistemas farmacéuticos y biomédicos, ya que la combinación de dos biopolímeros en solución puede alterar la viscosidad de la mezcla final. La mezcla de tales soluciones podría ocasionar dificultades al momento del procesamiento de los materiales, modificar su degradabilidad, su biodisponibilidad, modificar grupos funcionales o potencialmente aumentar su citotoxicidad (Reddy *et al.* 2015).

La viscosidad aparente (μ_{ap}) del quitosano corresponde a la pendiente de la curva que relaciona el torque con la velocidad de deformación. En la Figura 2.18a puede apreciarse que la relación entre estos dos parámetros es lineal, lo que indica que la solución de CS_p se comporta como un fluido newtoniano al menos en un régimen de concentración igual a $1 \cdot 10^{-2}$ %, p/p, y temperatura de 25°C. A partir del ajuste lineal de los puntos experimentales, dicha viscosidad resultó igual a $(376 \pm 2) \cdot 10^{-7}$ cP. En la Figura 2.18b se aprecia cómo la viscosidad varía mínimamente para un amplio rango de velocidades de deformación, lo que demuestra el carácter newtoniano del CS en solución para dicha concentración.

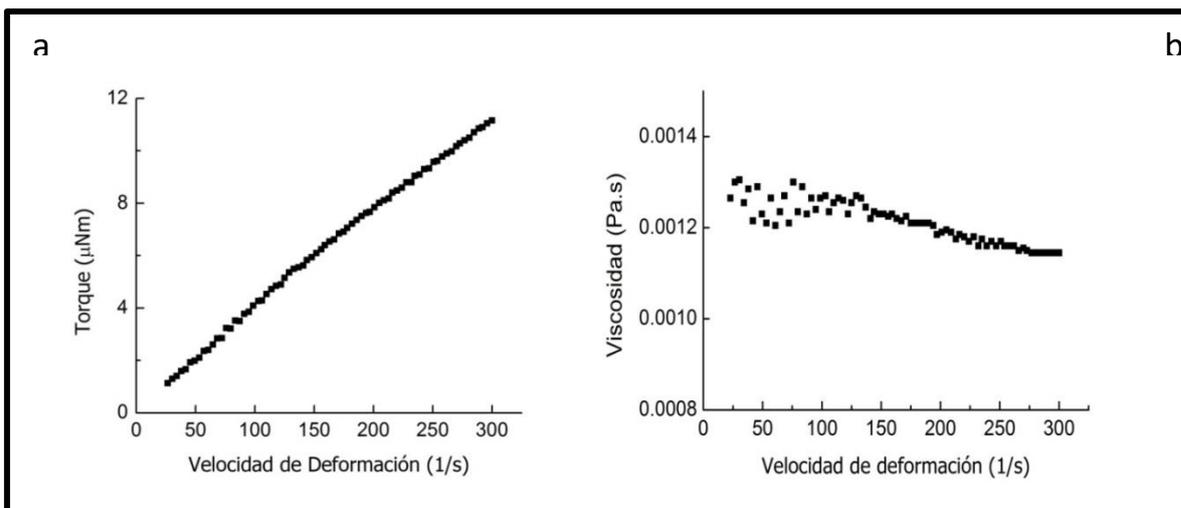


Fig. 2.18: Curva de flujo (a) y evolución de la viscosidad en función de la velocidad de deformación (b) para una solución de quitosano, $1 \cdot 10^{-2}$ % p/p, pH 2, 25°C.

Los parámetros derivados del ajuste de los datos experimentales mediante el modelo de la ley de Potencia se muestra en la Tabla 2.4. Allí se evidencia que las soluciones de CS para diversas concentraciones tienden a un comportamiento newtoniano y que K es aproximadamente constante para todas ellas (Mckenna & Lyng 2001).

Tabla 2.6: Parámetros derivados de la ley de la potencia. Índice de consistencia K y de flujo n, para disoluciones con diversas concentraciones de quitosano, pH 2 y 25°C, $n=4 \pm SD$.

[CS] (% p/p)	K (Pa·s)	n
$1 \cdot 10^{-7}$	$0,00104 \pm 0,00005$	$0,985 \pm 0,009$
$1 \cdot 10^{-5}$	$0,0013 \pm 0,0001$	$0,956 \pm 0,021$
$1 \cdot 10^{-4}$	$0,00114 \pm 0,00002$	$0,982 \pm 0,004$
$1 \cdot 10^{-3}$	$0,0027 \pm 0,0002$	$0,866 \pm 0,013$
$1 \cdot 10^{-2}$	$0,00183 \pm 0,00009$	$0,918 \pm 0,009$

El índice de consistencia suele tomarse como un indicador de la viscosidad de un fluido. Esta interpretación concuerda con el hecho de que a medida que la concentración del polímero decrece, también lo hace K. Por otra parte, valores decrecientes de n para concentraciones crecientes de CS_p

dan cuenta del efecto que tiene el aumento de concentración del polisacárido en cuanto al alejamiento de un comportamiento de tipo newtoniano.

El CS es un biopolímero con características mucoadhesivas, lo que resulta ideal si se piensa en el desarrollo de un fármaco de dimensiones nanométricas, que se administrará por la vía pulmonar. Ya que los tejidos epiteliales de esa parte del cuerpo se encuentran parcial o totalmente cubiertos por secreciones de mucosa, rica en mucina (Hermans & Bernard 1999), cobra suma importancia la interacción entre el polímero y esta barrera natural.

A continuación se muestran en la tabla 2.7 los índices de consistencia K y de flujo n para soluciones 0,01% p/p de CS_p y 5% p/p de mucina porcina (Mu), una proteína mayoritaria en las secreciones de los epitelios y presente también en el pulmonar, con un pl de entre 2 y 3 (Argenis Caicedo & Perilla 2015). También se presentan dichos valores para la mezcla de ambas especies, a pH 2 y 7 (Tabla 2.8).

Tabla 2.7: Parámetros derivados de la ley de la potencia. Índice de consistencia k y de flujo n, para una solución de CS_p 0,01% p/p, una solución de mucina 5% p/p y para la mezcla de ambas especies, a pH 2 y 25°C; n=2 ± SD.

pH 2	Mu 5%	CS 0.01%	CS 0.01% + Mu 5%
K	0,03130±0,0004	0,0020±0,0003	0,0490±0,0006
n	0,881±0,002	0,81±0,03	0,749±0,002

Tabla 2.8: Parámetros derivados de la ley de la potencia. Índice de consistencia k y de flujo n, para una solución de CS_p 0.01% p/p, una solución de mucina 5% p/p y para la mezcla de ambas especies, a pH 7 y 25°C; n=2 ± SD.

pH 7	Mu 5%	CS 0.01%	CS 0.01% + Mu 5%
K	0,0140±0,0001	0,003±0,003	0,130±0,003
n	0,906±0,002	0,748±0,021	0,447±0,004

La interacción entre estas dos especies se aprecia en el aumento del K de la mezcla CS+Mu, para ambos pHs (Tablas 2.7 y 2.8). Sin dudas el aumento más significativo se da a pH 7, con un incremento de un orden de magnitud. Posiblemente, este fenómeno se deba a la formación de una red interpenetrada mixta, donde el agua queda más atrapada y es menos susceptible a fluir (Pérez *et al.* 2006).

El quitosano es capaz de formar sistemas interpenetrados en solución de alta viscosidad. Según Berger *et al.* (2004) (Berger *et al.* 2004), los hidrogeles de quitosano entrecruzados se clasifican como hidrogeles iónicos y covalentes. Estos últimos se dividen en tres grupos: quitosano entrecruzado consigo mismo, redes poliméricas híbridas y redes de polímeros interpenetrados. El sistema I-CS pertenecería a la segunda categoría. El entrecruzamiento involucra naturalmente dos unidades

estructurales, las cuales pueden o no pertenecer a la misma cadena polimérica. Las principales interacciones que se presentan en este tipo de sistemas corresponden a enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, las cuales se forman entre unidades acetiladas del quitosano. El mayor grado de entrecruzamiento siempre se obtiene cuando predominan los enlaces covalentes. Entre los agentes entrecruzantes más empleados se encuentran los dialdehídos como el glioxal y el glutaraldehído. La reacción se da entre el grupo aldehído que forma un enlace imina covalente con los grupos amino primarios del quitosano, debido a la resonancia establecida con enlaces dobles adyacentes vía reacción de Schiff (Sánchez-Brenes, A., Sibaja-Ballester, M. D. R., Vega-Baudrit, J., Madrigal-Carballo 2007).

Se ha reportado la preparación de sistemas de redes interpenetradas de ácido poliacrílico-co-acrilamida/O-carboximetilquitosano, un quitosano modificado químicamente con buenas propiedades mecánicas y elevada capacidad de hinchamiento de geles y con alta viscosidad de las suspensiones de partida. Se reportó incluso que estos sistemas son mucoadhesivos y pueden ser utilizados para la liberación controlada de péptidos y proteínas. La capacidad de hinchamiento de estos sistemas complejos resultó dependiente de la composición (Yin *et al.* 2007). En otro trabajo, Mahdavinia y col (2004) (Mahdavinia & Pourjavadi 2004) sintetizaron el terpolímero quitosano/ácido poliacrílico-co-acrilamida. El sistema, de alta viscosidad, presentó propiedades interesantes para su empleo como matriz portadora de agentes bioactivos. La capacidad de hinchamiento de los geles constituidos fue dependiente de la composición, el pH y de la presencia de sales.

Las curvas de flujo para CS, Mu y CS+Mu a pHs 2 y 7 se muestran en la Fig. 2.19. A pH 2, puede observarse que Mu posee un comportamiento levemente dilatante ($n < 1$) que se profundiza tras el agregado del CS (Fig. 2.19a). Este mismo fenómeno, pero más pronunciado, queda en evidencia a pH 7 (Fig. 2.19b).

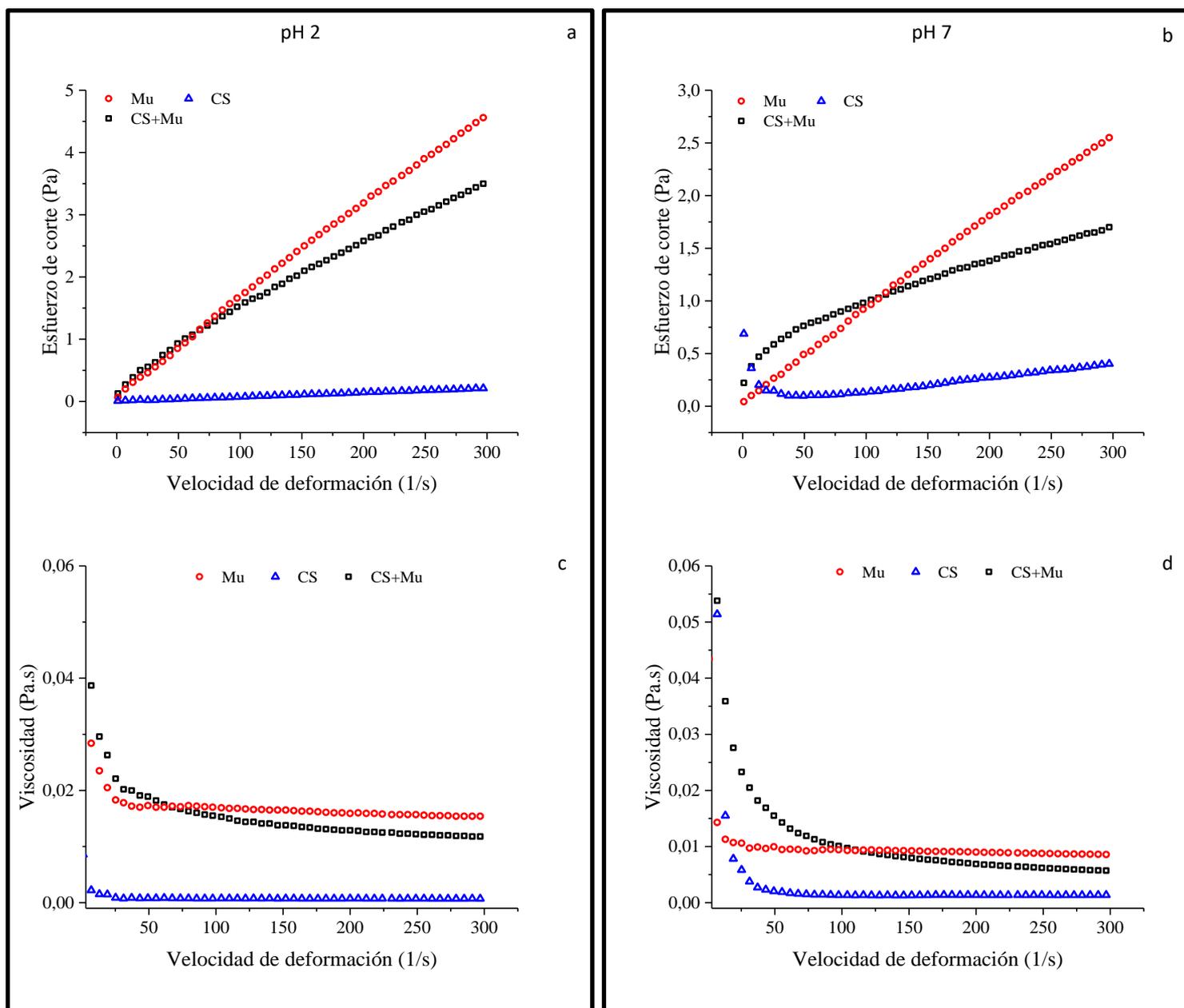


Fig. 2.19: Curva de flujo (a y b) y evolución de la viscosidad en función de la velocidad de deformación (c y d) para soluciones de CS, Mu y CS+Mu, a pHs 2 y 7. 25°C.

En cuanto a los resultados de viscosidad en función de la velocidad de deformación, el valor de la pendiente para la mezcla se encuentra entre el valor de la mucina y el del quitosano (Fig. 4.6c y d), para ambos pHs. Se ha reportado en la literatura que la Mu se comporta como un gel, con un importante carácter sólido, a pH 2 y que su viscosidad decrece notablemente al aumentar el pH, ya que las moléculas ganan movilidad al abrirse los poros que contienen al agua entrampada (Celli *et al.* 2005). Además, se ha descrito la formación de grandes agregados a pHs ácidos, para concentraciones

cercanas a las empleadas en este trabajo de Tesis. Este comportamiento indicaría que el centro peptídico es el responsable de la agregación, y no las cadenas laterales del polisacárido (Bhaskar, K. R., Gong, D. H., Bansil, R. A. M. A., Pajevic, S. I. N. I. S. A., Hamilton, J. A., Turner, B. S., LaMont 1991). Al formar la mezcla CS-Mu a pH 2, la cercanía con el pI de la Mu permitiría que puedan establecerse uniones electroestáticas entre el biopolímero y los agregados de Mu (Razmi *et al.* 2013). La influencia del estado de agregación de la Mu y su viscosidad a distintos pHs queda expuesta al comparar las Fig. 4.6 c y d. La viscosidad de la proteína y de la mezcla decrecen a la mitad, aproximadamente, con el aumento de pH y el correspondiente alejamiento del pI de la Mu, ya que las cargas superficiales de la proteína se recomponen bajo estas condiciones.

2.8. SINERGISMO Y MUCOADHESIÓN DEL SISTEMA QUITOSANO-MUCINA

Las interacciones asociativas entre CS y Mu pudieron ser evaluadas al comparar los parámetros viscoelásticos (G' y G'') de las soluciones mezcla frente a aquellas de las especies libres.

La interacción entre CS y Mu se calculó considerando la variación de los valores del módulo viscoso/elástico de la mezcla (G'' o G' respectivamente), menos la suma del módulo de ambas especies (ec. 2.16 y 2.17):

$$\Delta G' = G'_{C+M} - (G'_C + G'_M) \quad (2.16)$$

$$\Delta G'' = G''_{C+M} - (G''_C + G''_M) \quad (2.17)$$

Estas magnitudes son similares a las componentes viscosas de la bioadhesión (Sriamornsak & Wattanakorn 2008). El software del reómetro dinámico arroja los valores de G' , G'' y el de la viscosidad relativa ($\text{tg } \delta$). Los valores de $\Delta G'$ y $\Delta G''$ obtenidos se muestran en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9. Valores de $\Delta G'$ y $\Delta G''$ para sistemas binarios CS+Mu para pH 2 y 7, a 1 Hz; n= 2 \pm SD.

	$\Delta G'$	$\Delta G''$
pH2	0,65 \pm 0,04	0,52 \pm 0,05
pH7	0,49 \pm 0,05	0,54 \pm 0,11

A pH 2, puede notarse que el comportamiento elástico es el que domina la mezcla ($\Delta G' > \Delta G''$), lo que se traduce en un comportamiento general de la mezcla de tipo sólido/gel. A pH 7, en cambio, el aporte de la componente viscosa es mayoritario y el comportamiento dominante del sistema resultante es de tipo viscoso o líquido. Este cambio de régimen podría deberse a cambios en el estado de agregación de la Mu al variar el pH.

En la Fig. 2.20 se exhiben las variaciones de los módulos elástico y viscoso en función de la frecuencia de deformación para el CS_p (denominado CS), la Mu y la mezcla. Para el CS a pH 2 puede notarse un cambio de régimen para valores cercanos a 4 y a 10, como se evidencia por la intersección entre G' y G'' ; esta intersección podría indicar que el biopolímero se encuentra entrecruzado. La $\text{tg } \delta$ es menor a la unidad, lo que describe un comportamiento dominante de tipo elástico. A pH 7, si bien no se observa ninguna intersección de los parámetros viscoelásticos, el comportamiento sigue siendo de tipo elástico, incrementando su intensidad. Para la Mu, no se observan cambios de régimen para ningún valor de pH considerado. La viscoelasticidad relativa ($\text{tg } \delta$), para esta concentración (5% p/v) se mantiene muy cercana a la unidad, indicando que no existe un tipo de componente dominante para esta solución.

Cuando al CS se le adiciona Mu, a pH 2, la $\text{tg} \delta$ resulta <1 , siendo dominante el comportamiento elástico; a pH 7, sin embargo, la mezcla exhibe características viscosas ($\text{tg} \delta >1$). Esta modificación del comportamiento al variar el pH, que ocasiona que el comportamiento de la mezcla pase de elástico a viscoso podría ser consecuencia del aumento de la viscosidad aparente, en casi un orden de magnitud, como se mostró en las tablas 2.7 y 2.8 al registrar la variación del índice de consistencia K.

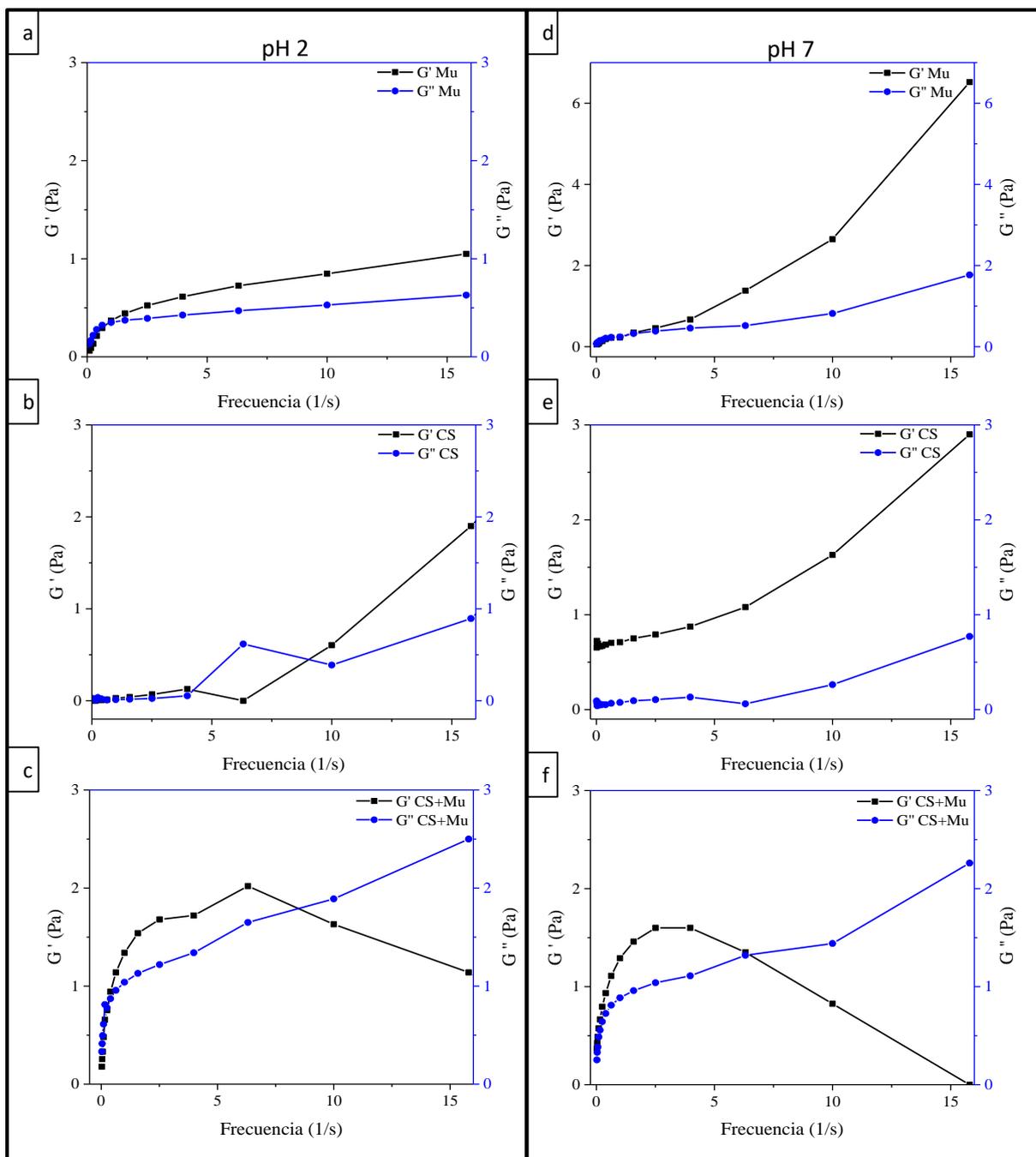


Fig. 2.20: Variación de los módulos elástico y viscoso en función de la frecuencia de barrido para a) Mu 5% p/v, b) CS 0.01% p/p y c) CS+Mu para pH2 y d) Mu 5% p/v, e) CS 0.01% p/p y f) CS+Mu para pH7.

Para ambos pHs es evidente que la presencia de Mu en la mezcla es lo que define el tipo de comportamiento que tendrá la misma. Su presencia sería capaz de definir el comportamiento dominante, como puede notarse al comparar la variación de la tangente del ángulo de pérdida de la Mu y de la mezcla (Tabla 2.10).

Tabla 2.10. Valores de $tg\delta$ para CS, MU y la mezcla CS+Mu a pHs 2 y 7, a 1 Hz; $n= 2 \pm SD$.

	CS	Mu	CS+Mu
pH2	0,36±0,05	0,69±0,05	0,75±0,03
pH7	0,0457±0,0004	0,98±0,01	0,74±0,08

La magnitud y forma de las curvas que describen el comportamiento de G' y G'' se relacionan directamente con la fortaleza del gel que conforma la muestra. Para un gel fuertemente entrecruzado, G' suele ser mucho más grande que G'' y no se ve influenciado por la frecuencia de deformación durante el barrido dinámico. Éste parece ser el caso para la muestra de CS a pH 7.

A pH 2, los grupos carboxilos y el ácido siálico de la mucina poseen cargas negativas. Por lo tanto, las uniones entre hidrógenos de la mezcla podrían ser reemplazadas por interacciones electroestáticas, significando para ésta un comportamiento más elástico. A pH 7 sin embargo, tanto el polímero como la Mu están cargados negativamente, lo que ocasiona la fluidificación de la mezcla.

De manera general, puede afirmarse que una solución se comporta como un gel si se trata de una estructura para la cual G' es mucho mayor que G'' y ambos módulos son independientes de la frecuencia (CYTED 2000).

El punto gel es aquel para el cual existe un cambio abrupto en la viscosidad de una solución que contiene componentes poliméricos o polimerizables. La solución experimenta un proceso de gelificación que se refleja en la pérdida o disminución de la fluidez y que incluye la presencia de estructuras planas o tridimensionales entrecruzadas (Rudin, A. Choi 2012).

Si bien para ninguna de las muestras puede considerarse la independencia total de los parámetros G' y G'' frente a la frecuencia de deformación, sí resulta interesante al menos comparar los valores máximos alcanzados por cada uno de los módulos y cómo se ven afectados por la variación del pH.

Para el CS, el aumento de pH conlleva el aumento de G' , lo que indicaría la conformación de un gel fuertemente entrecruzado. Para la Mu se observa un comportamiento similar pero la modificación del comportamiento "lineal" entre 1 y 10 Hz al pasar de pH 2 a 7 podría estar dando cuenta de cambios estructurales que llevan a esta proteína de un estado de agregación a pH ácido hacia otro un menos agregado para pHs básicos.

Para la mezcla, los comportamientos a ambos pHs no parecen diferir sustancialmente, salvo por pequeñas diferencias en las intensidades y la frecuencia de entrecruzamiento de G' y G'' , aún a sabiendas que ambas especies tienen comportamientos diferentes para cada condición y que existe un sinergismo que aumenta al hacerlo el pH (Sriamornsak & Wattanakorn 2008). Una posible explicación

para esta situación podría surgir de considerar que las cargas moleculares para cada especie también varían al variar el pH, por lo que las interacciones que sostienen la mezcla no son las mismas en cada situación, como se ha comentado con anterioridad.

2.9. TOPOGRAFÍA MOLECULAR DEL QUITOSANO MEDIANTE AFM

Una matriz polimérica, como la estudiada aquí puede ser observada y caracterizada por microscopía de fuerza atómica. De esta manera, empleando esta técnica se obtuvieron imágenes para diversas concentraciones de CS mediante AFM. Las muestras fueron diluidas por un factor de 1/5000 antes de su examinación. Se presentan tanto la imagen correspondiente a la altura como a la amplitud, para una mejor visualización.

Puede observarse que existe un alto grado de aglomeración y que estos agregados poseen variados tamaño (Fig 2.21). Esto tiene concordancia con el alto grado de polidispersidad obtenido por otros métodos que presenta el quitosano argentino empleado en esta Tesis. La imagen presenta una definición “tipo valle”, donde abundan regiones planas de sustrato coexistiendo con la muestra que se presenta en cúmulos polidispersos.

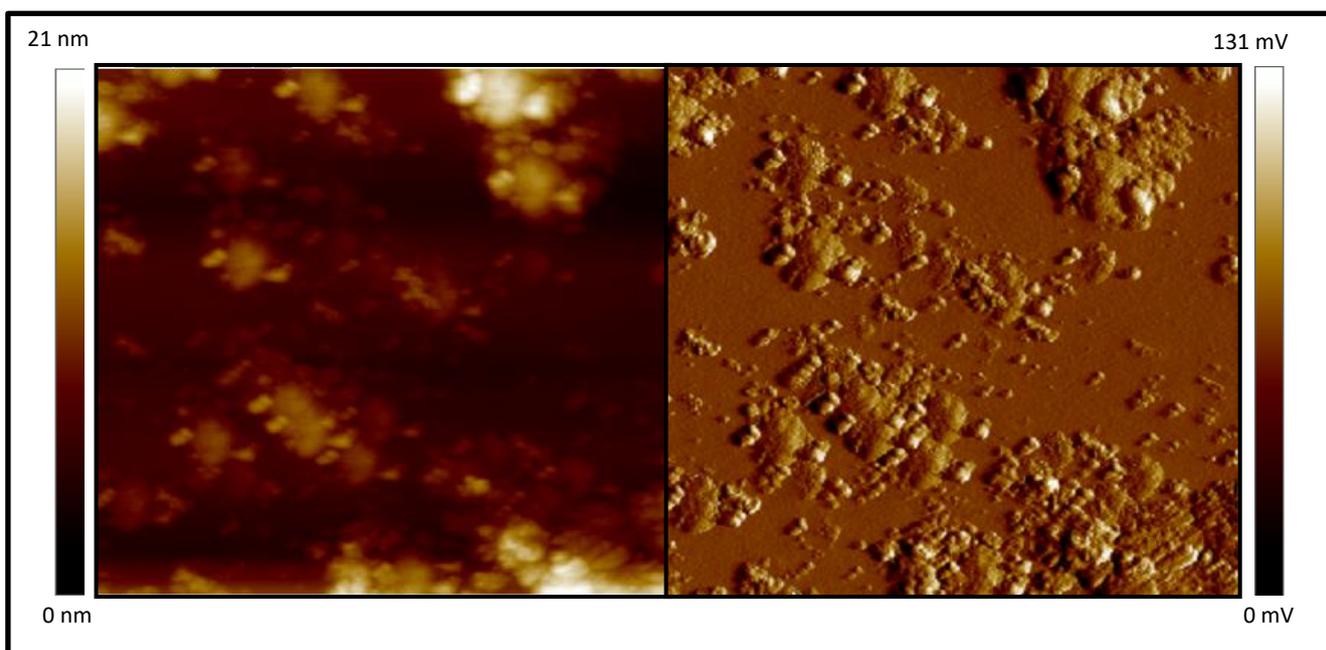


Fig. 2.21: Imágenes obtenidas mediante Microscopía de Fuera Atómica correspondiente a una solución de CS 10⁻²% p/p. Se muestran tanto la altura (barras laterales) como la amplitud (a la derecha), para mayor claridad.

2.10. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR CON MTT EN CÉLULAS HeLa Y 3T3 EN CONTACTO CON CS

Se evaluó la posible citotoxicidad del CS polimérico sobre una línea celular humana epitelial (HeLa) y una línea murina de fibroblastos (3T3-L1). La primera línea celular se empleó debido a su versatilidad, para poner a punto las condiciones del experimento. La segunda, por su parte, es de gran interés ya que presenta una gran cantidad de receptores de insulina, lo que la hace ideal para experimentos *in-vivo* que se describirán en capítulos posteriores.

Para ello se realizó un ensayo de viabilidad (MTT) con diferentes concentraciones de CS_p y también se evaluó el efecto del tiempo de incubación para cada una de las concentraciones ensayadas. El análisis estadístico (ANOVA de 2 factores -tiempo y concentración- con interacción seguido de la prueba post-hoc de Tuckey (n=12)) determinó que ni la concentración ni la combinación de tiempo son factores que afecten significativamente la viabilidad celular, al menos en las líneas evaluadas (misma letra agrupa las diferentes concentraciones a cada tiempo y difieren entre el tiempo inicial, el medio y el tiempo final). Como se muestra en la Fig. 2.22 hay un aumento significativo de la absorbancia en función del tiempo, indicando proliferación celular y viabilidad (A, B y C). A pesar de observarse una separación en el valor de la absorbancia a diferentes concentraciones, no son diferencias significativas. Este ensayo indicaría que la presencia de CS_p no posee efectos deletéreos para las células al menos en las concentraciones empleadas.

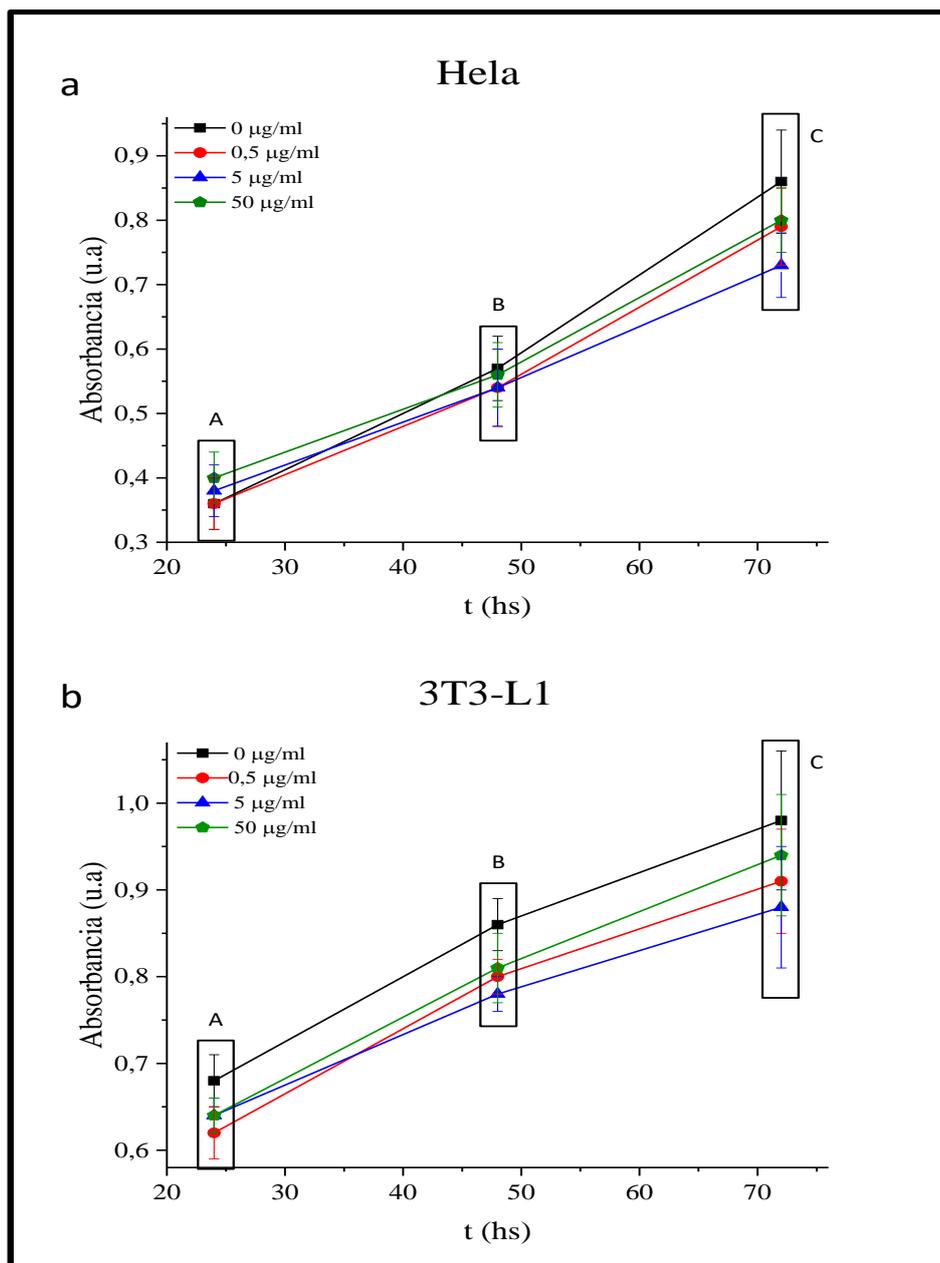


Fig. 2.22. Absorbancia vs tiempo. Análisis indicativo de proliferación celular para células HeLa (a) y 3T3-L1 (b) en presencia de distintas concentraciones de CS. Los datos de absorbancia se expresan como la media \pm SD. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

La concentración máxima empleada en este ensayo (50 $\mu\text{g/ml}$ ó 0,05% p/v) duplica la concentración empleada en el capítulo 3, referente al diseño y generación de nanopartículas autoensambladas, lo cual constituye una prueba concreta de la inocuidad del biopolímero en las líneas celulares consideradas.

2.11. EFECTO DEL CS EN MONOCAPAS CELULARES. APERTURA DE UNIONES ESTRECHAS

Se ha reportado que los complejos hidrofílicos, como los constituidos por CS, pueden incrementar la permeabilidad paracelular a partir de la disrupción reversible de las uniones estrechas, aumentando la eficiencia en el transporte de los compuestos que encapsulan (Liu *et al.* 2016). Por ejemplo, Smith y col. (2004) estudiaron los cambios en las propiedades de barrera de una monocapa de la línea celular Caco-2 (carcinoma de colon humano) para diversas concentraciones de CS. Observaron que existía una disminución en la resistencia transepitelial de hasta un 83%, y que ese efecto era dependiente de la concentración de CS (Smith *et al.* 2004). Por otro lado, la localización inmunofluorescente de ZO-1 (*Zone occludin-1*) reveló la pérdida de esta proteína en áreas discretas, lo que indicaría que la disrupción de las uniones estrechas se relaciona con la translocación de proteínas que intervienen en las uniones desde la membrana hacia el citoesqueleto.

Por otro lado, a fin de hacer valer este incremento en la permeabilidad que presenta el CS, se ha propuesto su uso como un agente para el aumento de absorción en diversas formulaciones, como una manera de aumentar la biodisponibilidad de aquellos ingredientes farmacéuticos activos con baja permeabilidad de membrana.

Lemmer y Hamman (2013) evaluaron el efecto que múltiples compuestos poseen como moduladores de uniones estrechas, incluyendo EDTA (ácido etilendiaminotetra acético), la toxina zonula occludens, geles de Aloe Vera y quitosano. Con respecto a este último, observaron una redistribución de proteínas como Actina-F y ZO-1, así como también cambios en el citoesqueleto (Hendrik Lemmer 2013). La adición de Heparina, cargada negativamente, inhibió el efecto del CS sobre estas proteínas, indicando que la carga positiva del biopolímero sería necesaria para lograr un aumento en la absorción de la droga de interés.

En la Fig. 2.23 se muestra de manera esquemática la distribución de algunos de los complejos proteicos mencionados, involucrados en la apertura de las uniones estrechas.

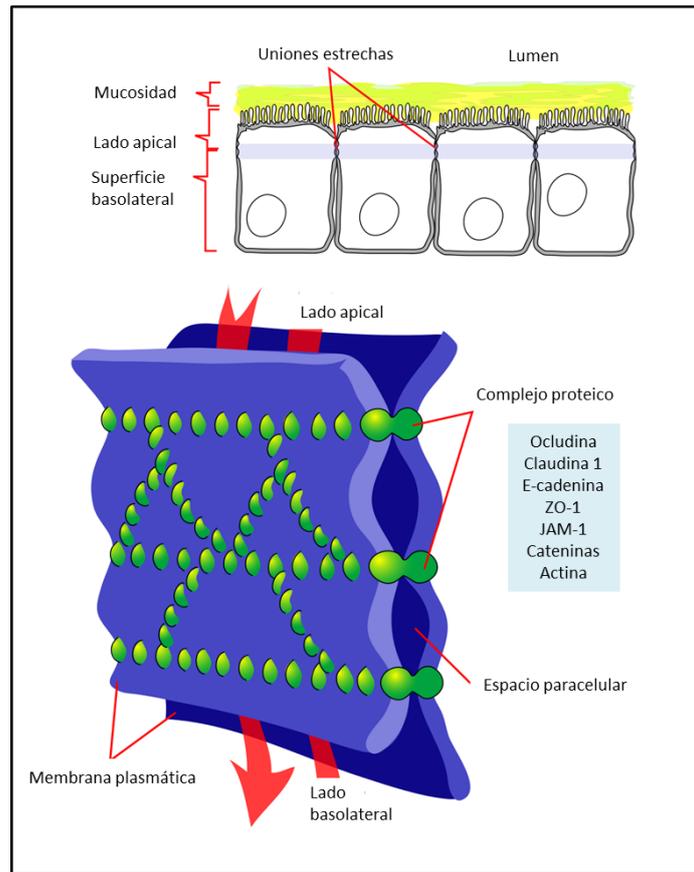


Fig. 2.23: Esquema correspondiente a la estructura de una unión estrecha y complejos proteicos asociados a su apertura. Adaptado de (Cooper 2000) y (Lodish H, Berk A, Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D. 2000).

Los resultados del ensayo destinado a evaluar los posibles efectos que la presencia de este polímero tuvo sobre una monocapa de células HeLa se muestran en la Fig. 2.24. Las imágenes de la columna izquierda muestran las células control, mientras que las imágenes en la columna derecha muestran aquellas expuestas a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de CS_p. Puede observarse que para tiempos cortos (1 hora) las uniones intracelulares se rompieron de manera transiente, pero luego de 6 horas la monocapa se reconstituyó, reforzando la actina cortical y disminuyendo el número de fibras de estrés. El CS_p argentino empleado en este trabajo de Tesis no es una excepción a lo reportado en la literatura científica, en cuanto a su acción sobre las uniones estrechas intercelulares.

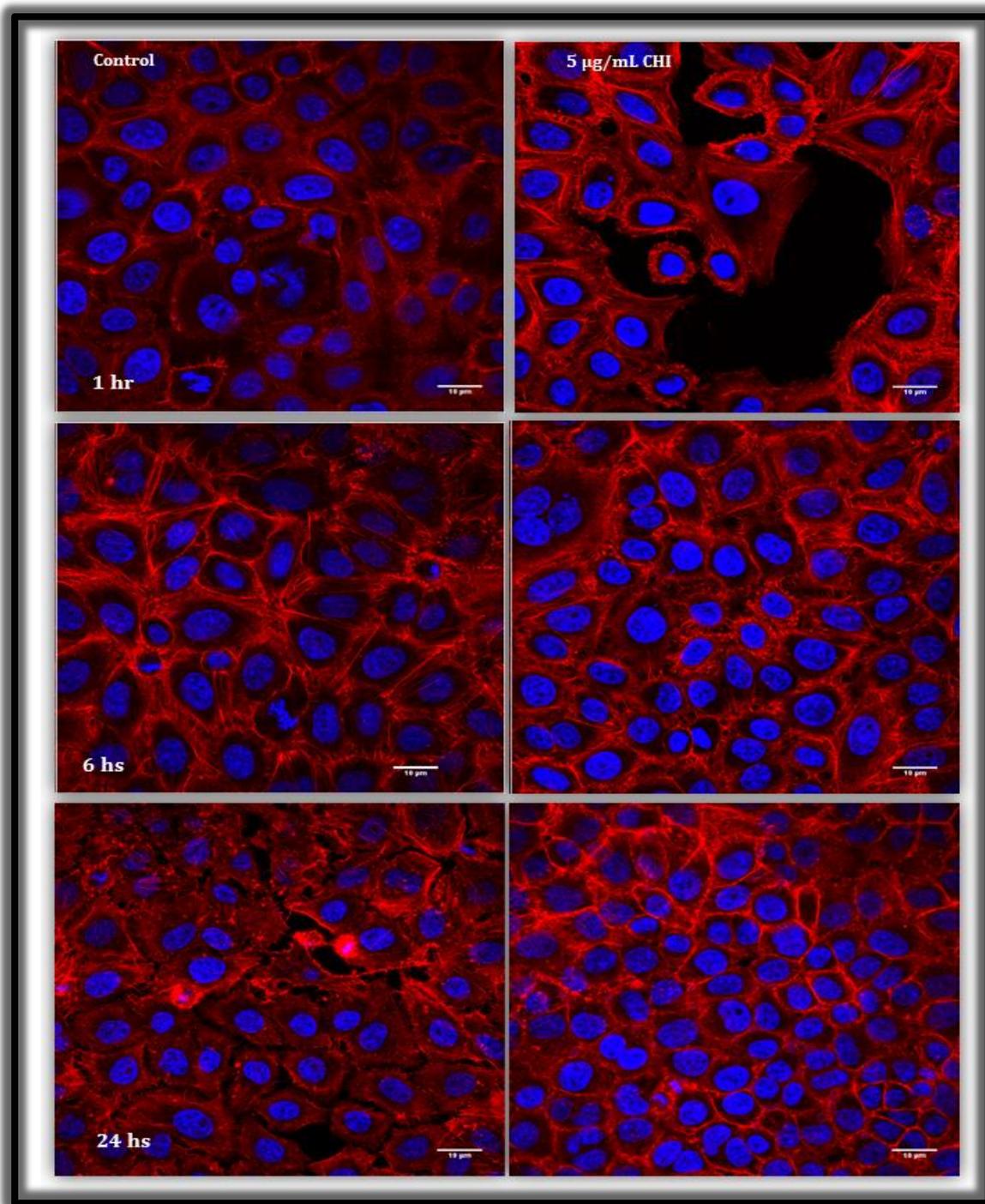


Fig. 2.24: Reconstitución de monocapa de células Hela tras el tratamiento con CS_p. La presencia del polímero afecta las uniones intracelulares y la red de actina de manera transiente. Se incluyen los tiempos del ensayo en las figuras. La barra de escala corresponde a 10 µm.

Conclusiones parciales

Los materiales basados en quitosano están involucrados en una enorme cantidad de aplicaciones médicas, farmacéuticas, alimentarias, cosméticas y aplicaciones de bioingeniería como la biorremediación, descontaminación de radionúclidos y reemplazo óseo, sólo por nombrar algunas. Debido a la flexibilidad intrínseca y conformacional de la molécula de quitosano, debida a su variabilidad, el desarrollo de materiales novedosos se ha llevado a cabo principalmente en forma empírica. En este capítulo, se ha caracterizado el quitosano argentino empleado en este trabajo de Tesis a través de distintas técnicas analíticas y de uso corriente en este tipo de materiales.

El conocimiento de las propiedades físico-químicas y composicionales proporcionó una caracterización mejorada que influyó en la potencial modificación o funcionalización del biopolímero, control de calidad de la síntesis y constituyó un paso más hacia la comprensión de las relaciones estructura-propiedades de este polímero complejo.

El polisacárido mostró una estructura más expandida en el seno de soluciones de regímenes más diluidos, según lo hallado en las distribuciones de tamaño de partícula a los pHs de estudio.

Por otro lado, la espectroscopía FTIR nos demostró que el proceso de purificación llevado a cabo en nuestro laboratorio devuelve un producto con características diferentes en cuanto a las regiones asignadas a los grupos químicos. Debido a su origen natural y la variación en las condiciones de obtención y procesamiento de la quitina de partida, el quitosano puede tener amplias distribuciones en cuanto al grado de desacetilación. Por ello, en este trabajo el grado de desacetilación fue determinado por dos métodos diferentes; los resultados indicaron que efectivamente se trata de un quitosano obtenido por un proceso adecuado para producir un material que reúne múltiples características y comportamientos que también poseen los quitosanos reportados en la literatura. Este atributo molecular es de gran importancia ya que influye en la funcionalidad posterior del polisacárido. La caracterización funcional del quitosano y sus derivados es hoy en día una de las áreas de investigación más productivas.

En cuanto al flujo de las soluciones poliméricas, éstas mostraron un comportamiento newtoniano y la viscosidad no varió en el rango de concentraciones consideradas. Dicho resultado debiera ser tenido en cuenta para el diseño de nanopartículas, ya que la viscosidad no debe ser impedimento cinético a la hora de promover la unión entre quitosano y proteína.

Se determinó instrumentalmente la propiedad de mucoadhesión expresada en términos de sinergismo en el sistema quitosano-mucina. Las interacciones asociativas entre las especies se evaluaron sobre los componentes del módulo viscoelástico (G' y G''). A pH fisiológico se observó un comportamiento "tipo gel entrecruzado". El comportamiento fue distinto a pH 2 donde el carácter gel decreció por fluidificación del sistema.

El análisis de la topografía en la nanoescala, mostró estructuras tipo valles, irregulares y dispersas, correspondientes a agregados de quitosano.

En otro orden, ni la concentración ni la combinación de tiempo de tratamiento de quitosano-células son factores que afecten significativamente la viabilidad celular, al menos en las líneas HeLa y 3T3. Este hecho guarda significancia práctica, ya que es la primera vez que se caracteriza este quitosano en términos de su efecto en sistemas *in vitro*, punto de partida para el desarrollo de un nanovehículo para un bioactivo.

Desde el punto de vista fisiológico y para una eventual función de encapsulación de bioactivos con entrega controlada de los mismos, se encontró que el quitosano argentino actúa en forma similar a otros reportados en la literatura especializada e incluso a aquellos de calidad analítica en cuanto a su acción sobre las uniones estrechas intercelulares. Las uniones intracelulares se desorganizaron, pero luego de un lapso de horas la monocapa se reconstituyó, reforzando la actina cortical y disminuyendo el número de fibras de estrés.

En términos particulares y pertinentes a este trabajo, la comprensión de las propiedades moleculares de este material permitió un diseño más eficiente y racional de las nanopartículas con Insulina, lo cual se aborda en los capítulos subsiguientes. Así el conocimiento de sus propiedades físico-químicas y funcionales se puede utilizar para adaptarlas a las necesidades específicas del presente trabajo.

En términos más generales y en perspectiva, la naturaleza de carga positiva de este polisacárido en un amplio rango de pH, sumado a su degradabilidad enzimática asociada, con analogía estructural con glicosaminoglicanos (GAG) de la matriz extracelular, son atributos que contribuyen juntos al creciente interés a su empleo como biomaterial.

Una limitación a su uso en clínicas está relacionada con la baja reproductividad de las características fisicoquímicas del quitosano entre lotes, así como la presencia de contaminantes no previstos. Además, para el desarrollo de biomateriales avanzados basados en quitosano, es necesario aún regular normas internacionales relativas a la gama de requisitos para su uso en dispositivos médicos.

La posibilidad de unir electrostáticamente proteínas y péptidos al quitosano, para entrega dirigida de entidades biológicamente activas en terapias celulares, es un campo que permanece inmensamente inexplorado. La posibilidad de producir matrices con diversas cinéticas de degradación ofrece variadas oportunidades para ampliar el uso de materiales basados en quitosano. Todos los estudios referentes a este quitosano argentino se encuentran en etapas iniciales y son el puntapié a una caracterización completa y definitiva de este polímero.

BIBLIOGRAFÍA

- Agilent Technologies. (2011). Technical Overview: Polymer Molecular Weight Distribution and Definitions of MW Averages. *Agilent Technologies Technical Data*, **1**, 1–4.
- Ahmed, & Aljaeid. (2016). Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Design, Development and Therapy*, **10**, 483–507.
- Aiba. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, **14**(4), 225–228.
- Al-Qadi, Grenha, Carrión-Recio, Seijo, & Remuñán-López. (2012). Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations. *Journal of Controlled Release*, **157**(3), 383–390.
- Alai, Lin, & Pingale. (2015). Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. *Journal of Food and Drug Analysis*, **23**(3), 351–358.
- Alaimo, Gorojod, & Kotler. (2011). Neurochemistry International The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are involved in manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. *Neurochemistry International*, **59**(2), 297–308.
- Alhosseini, Moztafzadeh, Mozafari, ... Jalali. (2012). Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 25–34.
- Alvarado-Palacios, San Martín-Martínez, Gómez-García, Estanislao-Gómez, & Casañas-Pimentel. (2015). Nanoencapsulation of the Aranto (*Kalanchoe daigremontiana*) aquoethanolic extract by nanospray dryer and its selective effect on breast cancer cell line. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **7**(5), 888–895.
- Alvarenga. (2011). Characterization and Properties of Chitosan. *Biotechnology of Biopolymers*, 91–108.
- Amidi, Mastrobattista, Jiskoot, & Hennink. (2010). Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv Drug Deliv Rev*, **62**(1), 59–82.
- Anitha, Rani, Krishna, ... Jayakumar. (2009). Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, **78**(4), 672–677.
- Aranaz, Mengfbar, Harris, ... Heras. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, **3**, 203–230.
- Argenis Caicedo, & Perilla. (2015). Effect of pH on the rheological response of reconstituted gastric mucin | Efecto del pH en la respuesta reológica de mucina gástrica reconstituida. *Ingeniería e Investigación*, **35**(2), 1–6.
- Arpagaus. (2010). Laboratory Scale Spray Drying of Inhalable Particles : A Review, (February 2017).
- Arpagaus, John, Collenberg, & Rützi. (2017). *Nanocapsules formation by nano spray drying. Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. doi:10.1016/B978-0-12-809436-5.00010-0
- Asenjo, Muzzo, Perez, Ugarte P, & Willshaw. (2007). Consenso en el diagnóstico y tratamiento de la diabetes tipo 1 del niño y del adolescente. *Revista Chilena de Pediatría*, **78**(5), 534–541.
- Assis, Bernardes-Filho, Vieira, & Filho. (2002). AFM characterization of chitosan self-assembled films. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **51**(7), 633–638.

- Atitar, & Belhadj. (n.d.). World ' s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher The Relevance of ATR-FTIR Spectroscopy in Semiconductor Photocatalysis.
- Bagre, Jain, & Jain. (2013). Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: In vitro and in vivo assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, **456**(1), 31–40.
- Barth. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1767**(9), 1073–1101.
- Barua, & Mitragotri. (2014). Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today*, **9**(2), 223–243.
- Berger, Reist, Mayer, Felt, Peppas, & Gurny. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, **57**, 19–34.
- Bhaskar, K. R., Gong, D. H., Bansil, R. A. M. A., Pajevic, S. I. N. I. S. A., Hamilton, J. A., Turner, B. S., LaMont. (1991). Profound increase in viscosity and aggregation of pig gastric mucin at low pH. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **261**(5), G827–G832.
- Bhattacharjee. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, **235**, 337–351.
- Birrenbach, & Speiser. (1976). Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **65**(12), 1763–1766.
- Blasi, P., A. Schoubben, S. Giovagnoli. (2010). Alginate micro- and nanoparticle production by spray drying. In Products, ed., *Meeting on lactose as a carrier for inhalation products*, Parma: Meeting on lactose as a carrier for inhalation products, pp. 137–138.
- Boateng, Matthews, Stevens, & Eccleston. (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems : A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(8), 2892–2923.
- Boonyai, Bhandari, & Howes. (2004). Stickiness measurement techniques for food powders: A review. *Powder Technology*, **145**(1), 34–46.
- Büchi Labortechnik. (2011). *Nano Spray Dryer B-90, literature review and applications en.*
- Builders, Kunle, Okpaku, Builders, Attama, & Adikwu. (2008). Preparation and evaluation of mucinated sodium alginate microparticles for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **70**(3), 777–783.
- Bürki, Jeon, Arpagaus, & Betz. (2011). New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer, **408**, 248–256.
- Calvo. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, **63**, 125–132.
- Catalunya. (n.d.). ANEXO A : MATERIALES Y MÉTODOS.
- Celli, Gregor, Turner, Afdhal, Bansil, & Erramilli. (2005). Viscoelastic properties and dynamics of porcine gastric mucin. *Biomacromolecules*, **6**(3), 1329–1333.
- Chan, H.K., Clark, A., Gonda, I., Mumenthaler, M., Hsu. (1997). Spray dried powders and powder blends of recombinant human deoxyribonuclease (rhDNase) for aerosol delivery. *Pharmaceutical Research*, **14**(4).
- Chan. (2006). Dry powder aerosol drug delivery-Opportunities for colloid and surface scientists. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **284–285**, 50–55.
- Chang, Wang, Hu, Zhou, Xue, & Luo. (2017). Pectin coating improves physicochemical properties of caseinate/zein nanoparticles as oral delivery vehicles for curcumin. *Food Hydrocolloids*, **70**, 143–151.

- Chantarasataporn, Tepkasikul, Kingcha, ... Chirachanchai. (2014). Water-based oligochitosan and nanowhiskey chitosan as potential food preservatives for shelf-life extension of minced pork. *FOOD CHEMISTRY*. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.019
- Chellat, Tabrizian, Dumitriu, ... Yahia. (1999). In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex, (X).
- Chen, Hu, & Huang. (2009). Talanta Chitosan modified ordered mesoporous silica as micro-column packing materials for on-line flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry determination of trace heavy metals in environmental water samples, **78**, 491–497.
- Chen, Mi, Liao, ... Sung. (2013). Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev*, **65**(6), 865–879.
- Cheung, Ng, Wong, & Chan. (2015). *Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. Marine Drugs*, Vol. 13. doi:10.3390/md13085156
- Choi, & Han. (2018). Food Hydrocolloids Development of a novel on e off type carbon dioxide indicator based on interactions between sodium caseinate and pectin. *Food Hydrocolloids*, **80**, 15–23.
- Choudhury, Pandey, Kui, ... Kesharwani. (2017). Journal of Traditional and Complementary Medicine An update on natural compounds in the remedy of diabetes mellitus : A systematic review. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*. doi:10.1016/j.jtcme.2017.08.012
- Christopeit, Lenz, Forstpointner, ... Schalhorn. (2008). Nine months to progression using fourth-line liposomally encapsulated paclitaxel against hepatocellular carcinoma. *Chemotherapy*, **54**(4), 309–314.
- Colina, Ayala, Rincón, ... Montilla. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangejos escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **15**(1), 21–43.
- Cooper. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. (Associates, Ed.), 2a edn, Sunderland (MA), Estados Unidos.
- Coppi, Iannuccelli, Bernabei, & Cameroni. (2002). Alginate microparticles for enzyme peroral administration, **242**, 263–266.
- Cremer, Gutierrez, Martinez, ... Lozano. (2018). Development of antimicrobial chitosan based nanofiber dressings for wound healing applications, **5**(1), 6–14.
- CYTED. (2000). *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. (Pilosof, A. M., & Bartholomai, Ed.), Eudeba.
- Czechowska-biskup, Jarosińska, Rokita, Ulański, & Rosiak. (2012). Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparison of Methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, **17**, 5–20.
- Damge, Michel, Aprahamian, & Couvreur. (1988). New Approach for Oral Administration of Insulin With Polyalkylcyanoacrylate Nanocapsules as Drug Carrier, **37**(July 1987).
- de Alvarenga, Pereira de Oliveira, & Roberto Bellato. (2010). An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **80**(4), 1155–1160.
- Dean, Rzhetsky, & Allikmets. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, **11**(7), 1156–66.
- Demir, & Degim. (2013). Preparation of chitosan nanoparticles by nano spray drying technology. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, **38**(3), 127–133.
- Desai, & Park. (2005). Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, **22**(2), 179–192.

- Devi, Sarmah, Khatun, & Maji. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide – protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, **239**, 136–145.
- Dombu, & Betbeder. (2013a). Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials*, **34**(2), 516–525.
- Dombu, & Betbeder. (2013b). Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials*, **34**(2), 516–525.
- Doncaster, C. P., Davey. (2007). *Analysis of variance and covariance: how to choose and construct models for the life sciences*, Cambridge University Press.
- Dorđević, Balanč, Belščak-Cvitanović, ... Nedović. (2014). *Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. Food Engineering Reviews*, Vol. 7. doi:10.1007/s12393-014-9106-7
- Drosou, Krokida, & Biliaderis. (2017). Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying Technology*, **35**(2), 139–162.
- Duan, & Mao. (2010). New strategies to improve the intranasal absorption of insulin. *Drug Discovery Today*, **15**(11–12), 416–427.
- Duan, & Xu. (2005). Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen Comp Endocrinol*, **142**, 44–52.
- Duncan. (2006). Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature Reviews Cancer*, **6**(9), 688–701.
- Dutta, Dutta, & Tripathi. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **63**(01), 20–31.
- Edwards, Hanes, Caponetti, ... Langer. (2016). Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2893421> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this article : You may need to l, **276**(5320), 1868–1871.
- El-Hefian, Elgannoudi, Mainal, & Yahaya. (2010). Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turkish Journal of Chemistry*, **34**(1), 47–56.
- Ensign, Hoen, Maisel, Cone, & Hanes. (2013). Enhanced vaginal drug delivery through the use of hypotonic formulations that induce fluid uptake. *Biomaterials*, **34**(28), 6922–6929.
- Estevinho, Rocha, Santos, & Alves. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. *Trends in Food Science and Technology*, **31**(2), 138–155.
- Eyzaguirre, & Codner. (2006). Análogos de insulina: en búsqueda del reemplazo fisiológico, 239–250.
- Ezrin. (1971). *Polymer Molecular Weight Methods*.
- Fabián Vigliocco, Sergio Rillo, Julieta Heba. (2014). Caracterización De Quitosano Para La Industria Alimentaria Por Resonancia Magnética Nuclear De Protón, (1), 1–5.
- Felt, Buri, & Gurny. (1998). Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **24**(11), 979–993.
- Feng, Boraey, Gwin, Finlay, Kuehl, & Vehring. (2011). Mechanistic models facilitate efficient development of leucine containing microparticles for pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **409**(1–2), 156–163.
- Fernández-Tresguerres, Ruiz, Cachofeiro, ... Tamargo Menéndez. (1999). *Fisiología humana, 4e.*, Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

- Fonte, Araújo, Silva, ... Sarmiento. (2015). Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.010
- Franzen, Singh, & Okos. (1990). Kinetics of Nonenzymatic Browning in Dired Skim Milk. *Journal of Food Engineering*, **11**, 225–239.
- Gagliardino, Costa, Faingold, Litwak, & Fuente. (2013). Insulina y control de la diabetes en la Argentina, **73**, 520–528.
- Galley, & Webster. (2004). Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia*, **93**(1), 105–113.
- Gan, & Wang. (2007). Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **59**(1), 24–34.
- Garcia-fuentes, & Alonso. (2012). Chitosan-based drug nanocarriers : Where do we stand ? *Journal of Controlled Release*, **161**(2), 496–504.
- Garcia-Fuentes, Torres, & Alonso. (2005). New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. *International Journal of Pharmaceutics*, **296**(1–2), 122–132.
- Gautier S., C. Arpagaus, N. Schafroth, M. Meuri. (2010). Very fine chitosan microparticles with narrow & controlled size distribution using spray-drying technologies. *Drug Delivery Technology*, **10**(8), 30–37.
- Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, **40**(9), 1107–1121.
- Gomaa, El-khordagui, Boraie, & Darwish. (2010). Chitosan microparticles incorporating a hydrophilic sunscreen agent. *Carbohydrate Polymers*, **81**(2), 234–242.
- Gonz, Vald, & Mojena. (2000). Características Clínicas De La Diabetes Mellitus En Un Área De Salud. *Rev Cubana Med Gen Integr 2000;16(2):144-9*, **16**(2), 144–149.
- Gorzelanny, Pöppelmann, Pappelbaum, Moerschbacher, & Schneider. (2010). Biomaterials Human macrophage activation triggered by chitotriosidase-mediated chitin and chitosan degradation. *Biomaterials*, **31**(33), 8556–8563.
- Gowthamarajan, & Singh. (2010). Dissolution testing for poorly soluble drugs: A continuing perspective. *Dissolution Technologies*, **17**(3), 24–32.
- Gradishar, Tjulandin, Davidson, ... O'Shaughnessy. (2005). Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **23**(31), 7794–7803.
- Gref, Minamitake, Peracchia, Trubetskoy, Torchilin, & Langerll. (1994). Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres. *Science*, **263**(March).
- Gregoriadis, & Ryman. (1972). Fate of Protein???Containing Liposomes Injected into Rats: An Approach to the Treatment of Storage Diseases. *European Journal of Biochemistry*, **24**(3), 485–491.
- Guo, Liu, Hong, & Li. (2010). Preparation and characterization of chitosan poly(acrylic acid) magnetic microspheres. *Marine Drugs*, **8**(7), 2212–2222.
- H Hernández, E Águila, O Flores, E L Viveros, & E Ramos. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, **22**(3), 57–60.
- Hamdani, Wani, Bhat, & Siddiqi. (2018). Effect of guar gum conjugation on functional, antioxidant and antimicrobial activity of egg white lysozyme. *Food Chemistry*, **240**, 1201–1209.
- Han, Kimura, & Okuda. (1999). Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association*

- for the Study of Obesity, **23**(2), 174–9.
- Han, Lee, Gao, & Park. (2001). Preparation and evaluation of poly(L-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, **75**(3), 259–69.
- Hartel, Shastry, Hartel, & Shastry. (1991). Sugar crystallization in food products Sugar Crystallization in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **30**(1), 37–41.
- Heinemann, Kalies, Schomaker, ... Ripken. (2014). Delivery of proteins to mammalian cells via gold nanoparticle mediated laser transfection. *Nanotechnology*, **25**(24). doi:10.1088/0957-4484/25/24/245101
- Hendrik Lemmer. (2013). Paracellular drug absorption enhancement through tight junction modulation. *Expert Opin. Drug Deliv*, **10**(1), 103–114.
- Hermans, & Bernard. (1999). State of the Art Lung Epithelium – specific Proteins Characteristics and Potential Applications as Markers. *Am J Respir Crit Care Med*, **159**(2), 646–78.
- Heuser, & Cárdenas. (2014). Chitosan-copper paint types as antifouling. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **59**(2), 2415–2419.
- Horiba. (2016). a Guidebook To Particle Size Analysis.
- Hou, Yu, Shen, Shi, Su, & Zhao. (2017). Triphenyl Phosphine-Functionalized Chitosan Nanoparticles Enhanced Antitumor Efficiency Through Targeted Delivery of Doxorubicin to Mitochondria. *Nanoscale Research Letters*, **12**(1), 1–9.
- HPLC 2. (n.d.).
- HPLC1. (n.d.).
- Huang, Khor, & Lim. (2004). Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, **21**(2), 344–353.
- Hudson, & Margaritis. (2014). Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals. *Crit Rev Biotechnol*, **34**(2), 161–179.
- Ichikawa, Iwamoto, & Watanabe. (2005). Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of enzymatic hydrolysates of chitosan and carboxymethyl cellulose. *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**(9), 1637–1642.
- Irache, Huici, Konecny, Espuelas, Campanero, & Arbos. (2005). Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules*, **10**(1), 126–145.
- Iyer, Hsia, & Nguyen. (2015). Nano-Therapeutics for the Lung: State-of-the-Art and Future Perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, **21**(36), 5233–44.
- J W Lee, J H Park. (2000). Bioadhesive dosage forms: the next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **89**(7), 850–866.
- Jain, Chalasani, Khar, Ahmed, & Diwan. (2007). Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. *Journal of Drug Targeting*, **15**(6), 417–427.
- Jayakumar, Prabakaran, Reis, & Mano. (2005). Graft copolymerized chitosan — present status and applications, **62**, 142–158.
- Jeon, Kim, Choi, ... Kim. (2013). Designed Nanocage Displaying Ligand-Specific Peptide Bunches for High Affinity and Biological Activity. *Acsnano*, **7**(9), 7462–7471.
- Jiang, Cai, & Li. (2017). Chitosan-based spray-dried mucoadhesive microspheres for sustained oromucosal drug delivery. *Powder Technology*, **312**, 124–132.

- Jianing Pu , J. David Bankston. (n.d.). Production of Microencapsulated Crawfish (*Procambarus clarkii*) Astaxanthin in Oil by Spray Drying Technology, (August 2014), 37–41.
- Jones, Decker, & McClements. (2010). Comparison of protein-polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer complexation before or after particle formation. *Journal of Colloid and Interface Science*, **344**(1), 21–29.
- Joye, & McClements. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **19**(5), 417–427.
- Kamaly, Xiao, Valencia, Radovic-Moreno, & Farokhzad. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, **41**(7), 2971.
- Karagozlu, & Kim. (2014). *Anticancer effects of chitin and chitosan derivatives*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st edn, Vol. 72, Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800269-8.00012-9
- Kasaai. (2007). Calculation of Mark – Houwink – Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent – temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, **68**, 477–488.
- Kasaai. (2009). Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(5), 1667–1676.
- Kaye, Purewal, & Alpar. (2009). Development and testing of particulate formulations for the nasal delivery of antibodies. *Journal of Controlled Release*, **135**(2), 127–135.
- Kean, & Thanou. (2010). Biodegradation , biodistribution and toxicity of chitosan ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **62**(1), 3–11.
- Kesharwani, Gorain, Low, ... Pandey. (2018). Nanotechnology based approaches for anti-diabetic drugs delivery. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **136**, 52–77.
- Khafagy, Morishita, Isowa, Imai, & Takayama. (2009). Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin. *Journal of Controlled Release*, **133**(2), 103–108.
- Khan, Peh, & Ch'ng. (2000). Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences : A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, **33**, 303–311.
- Khor. (2001). *Chitin: fulfilling a biomaterials promise*, Amsterdam: Elsevier.
- Krzysztof, & Krzysztof. (2011). Spray Drying Technique. I: Hardware and Process. *International Journal of Drug Development and Research*, **3**(2), 26–33.
- Kulkarni, Bari, Surana, & Pardeshi. (2016). In vitro, ex vivo and in vivo performance of chitosan-based spray-dried nasal mucoadhesive microspheres of diltiazem hydrochloride. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **31**, 108–117.
- Kumar. (2000). A review of chitin and chitosan applications q, **46**, 1–27.
- Kumar, Shen, & Burgess. (2014). Nano-amorphous spray dried powder to improve oral bioavailability of itraconazole. *Journal of Controlled Release*, **192**, 95–102.
- Lai, Wang, & Hanes. (2009). Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**(2), 158–171.
- Lee, Heng, Ng, Chan, & Tan. (2011). Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, **403**(1–2), 192–200.

- Lee, Kwon, Kim, Jo, & Jeong. (1998). Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system, **51**, 213–220.
- Lewis, & Richard. (2015). Challenges in the delivery of peptide drugs: an industry perspective. *Therapeutic Delivery*, **6**(2), 149–163.
- Li, Ai, Yokoyama, ... Zhong. (2013). Properties of chitosan-microencapsulated orange oil prepared by spray-drying and its stability to detergents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(13), 3311–3319.
- Li, Anton, Arpagaus, Belleiteix, & Vandamme. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*, **147**(2), 304–310.
- Li, Wu, & Zhao. (2016). Antibacterial activity and mechanism of chitosan with ultra high molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, **148**, 200–205.
- Liu, Zhang, Zhu, ... Huang. (2016). Efficient mucus permeation and tight junction opening by dissociable “mucus-inert” agent coated trimethyl chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *Journal of Controlled Release*, **222**, 67–77.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D. (2000). *Molecular Cell Biology*. (Freeman, Ed.), 4a edn, Nueva York.
- Lund, & Jönsson. (2013). Charge regulation in biomolecular solution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **46**(3), 265–281.
- M. Ways, Lau, & Khutoryanskiy. (2018). Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers*, **10**(3), 267.
- M.L. Lorenzo-Lamosa, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato. (1998). Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **52**, 109–118.
- Ma, Jian, Chang, & Yu. (2008). Fabrication and Characterization of Citric Acid-Modified Starch Nanoparticles / Plasticized-Starch Composites, 3314–3320.
- Madhumathi, Binulal, Nagahama, Tamura, Shalumon, & Selvamurugan. (2009). International Journal of Biological Macromolecules Preparation and characterization of novel χ -chitin – hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications, **44**, 1–5.
- Maged, Mahmoud, & Ghorab. (2016). Nano spray drying technique as a novel approach to formulate stable econazole nitrate nanosuspension formulations for ocular use. *Molecular Pharmaceutics*, **13**(9), 2951–2965.
- Mahdavinia, & Pourjavadi. (2004). EUROPEAN POLYMER Modified chitosan from poly (acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt- and pH-responsiveness properties, **40**, 1399–1407.
- Malvern-Instruments. (2011). Size Measurement and Molecular Weight Estimation of Globins using Dynamic Light Scattering From Malvern Instruments. Retrieved from M.I. Ltd, Size Measurement and Molecular Weight Estimation of Globins using%0ADynamic Light Scattering From Malvern Instruments, (03.17.2017).
- Mandal, Jana, Ghorai, & Jana. (2018). Functionalized chitosan with self-assembly induced and subcellular localization-dependent fluorescence “switch on” property. *New Journal of Chemistry*, **42**(8). doi:10.1039/c8nj00067k
- Manual de Operación Nano SPRay Dryer Buchi 90. (n.d.).
- Manuscript. (2016). Islam, N., & Ferro, V. (2016). Recent advances in chitosan-based nanoparticulate pulmonary drug delivery. *Nanoscale*, **8**(30), 14341–14358. doi:10.1039/C6NR03256G
- Martínez. (2016). Rol de alfa-sinucleína en la función y dinámica mitocondrial en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson, 82–83.

- Martins, Facchi, Follmann, Pereira, Rubira, & Muniz. (2014). Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**(11), 20800–20832.
- McClements. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*, CRC Press.
- McCLEMENTS. (2005). *Food emulsions: principles, practice and techniques.*, New York: CRC Press.
- Mckenna, & Lyng. (2001). Instrumental techniques in the quality control Rheological measurements of foods.
- McPherson, R. A., Pincus. (2017). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book*, Elsevier Health Sciences.
- Menchicchi, Fuenzalida, Bobbili, Hensel, Swamy, & Goycoolea. (2014). Structure of Chitosan determines its interactions with mucin. *Biomacromolecules*, **15**(10), 3550–3558.
- Merisko-Liversidge, Liversidge, & Cooper. (2003). Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **18**(2), 113–120.
- Miller, Bourassa, & Smith. (2013). FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1828**(10), 2339–2346.
- Minamia, Suzuki, Okamoto, Fujinagab, & Shigemasa. (1998). Carbohydrate Polymers Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway, **8617**(98).
- Minet, Carroll, Rooney, ... Richards. (2013). Chemosphere Slow delivery of a nitrification inhibitor (dicyandiamide) to soil using a biodegradable hydrogel of chitosan. *CHEMOSPHERE*. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.08.043
- Mitragotri, Burke, & Langer. (2014). Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: Formulation and delivery strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, **13**(9), 655–672.
- Mizrahi S., Labuza, T., Karel. (1970). Computer-aided predictions of extend of browning in dehydrated cabbage. *Journal of Food Science*, **35**(7), 799–803.
- Mlalila, Swai, Kalombo, & Hilonga. (2014). Effects of spray-drying on w/o/w multiple emulsions prepared from a stearic acid matrix. *Nanotechnology, Science and Applications*, **7**, 105.
- Mohammed, & Borchers. (2015). An extensive library of surrogate peptides for all human proteins. *Journal of Proteomics*, **129**, 93–97.
- Monserrat Altamirano Pavón. (2016). *Remoción de Pb (II) por medio de adsorción en quitosano*. doi:10.13140/RG.2.2.27395.71200
- Moore, & Cerasoli. (2017). Particle Light Scattering Methods and Applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 543–553.
- Morel, Rosa Gasco, & Cavalli. (1994). Incorporation in lipospheres of [d-Trp-6]LHRH. *International Journal of Pharmaceutics*, **105**(2), 8–10.
- Morlock, Kissel, Li, Koll, & Winter. (1998). Erythropoietin loaded microspheres prepared from biodegradable LPLG – PEO – LPLG triblock copolymers : protein stabilization and in-vitro release properties, **56**, 105–115.
- Moschetti, Sharpe, Fischer, ... Hyvönen. (2016). Engineering Archeal Surrogate Systems for the Development of Protein–Protein Interaction Inhibitors against Human RAD51. *Journal of Molecular Biology*, **428**(23), 4589–4607.
- Mosmann. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**(1–2), 55–63.

- Mozafari. (2006). Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nano therapy. In Mozafari, ed., *NANOCARRIER TECHNOLOGIES*, Springer, pp. 1–16.
- Mukhopadhyay, Chakraborty, Bhattacharya, Mishra, & Kundu. (2015). PH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, **72**, 640–648.
- Mukhopadhyay, Sarkar, Chakraborty, Bhattacharya, Mishra, & Kundu. (2013). Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo studies in diabetic animal model. *Materials Science and Engineering C*, **33**(1), 376–382.
- Muramatsu, Masuda, Yoshihara, & Fujisawa. (2003). In vitro degradation behavior of freeze-dried carboxymethyl-chitin sponges processed by vacuum-heating and gamma irradiation, **81**, 327–332.
- Myrick, Vendra, & Krishnan. (2014). Self-assembled polysaccharide nanostructures for controlled-release applications. *Nanotechnology Reviews*, **3**(4). doi:10.1515/ntrev-2012-0050
- N.G. Schipper, K.M. Vårum. (1996). Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res*, **13**(11).
- Nagahama, Nwe, Jayakumar, Koiwa, Furuike, & Tamura. (2008). Novel biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications, **73**, 295–302.
- NanoZetasizer. Molecular weight measurements with the Zetasizer Nano system (2011), pp. 1–6.
- Nasti, Zaki, de Leonardis, ... Tirelli. (2009). Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. *Pharm Res*, **26**(8), 1918–1930.
- Ngan, Wang, Hiep, ... Dzung. (2014). Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity. *Research on Chemical Intermediates*, **40**(6), 2165–2175.
- Ngo, & Kim. (2014). *Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st edn, Vol. 73, Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0
- O'Toole, Henderson, Soucy, ... Gobin. (2012). Curcumin encapsulation in submicrometer spray-dried chitosan/tween 20 particles. *Biomacromolecules*, **13**(8), 2309–2314.
- Onsøyen, & Skaugrud. (1990). Metal recovery using chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (Oxford, Oxfordshire : 1986)*, **49**(4), 395–404.
- Pan, Li, Zhao, ... Cui. (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm*, **249**(1–2), 139–147.
- Parada, Miranda, & Salvador. (2004). Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **5**(1), 1–16.
- Pareek, V., Bhargava, A., Gupta, R., Jain, N., Panwar. (2017). Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, **9**(7), 527–544.
- Patel, Cholkar, & Mitra. (2014). Recent developments in protein and peptide parenteral delivery approaches. *Therapeutic Delivery*, **5**(3), 337–365.
- Patel, Yamamoto, Ueda, Tabata, & Mikos. (2008). Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomaterialia*, **4**(5), 1126–1138.
- Patil, Chavanke, & Wagh. (2012). A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**(SUPPL. 4),

27-32.

- Peer, Karp, Hong, Farokhzad, Margalit, & Langer. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, **2**(12), 751-760.
- Peña, Izquierdo-barba, Martínez, & Vallet-regí. (2006). New method to obtain chitosan / apatite materials at room temperature, **8**, 513-519.
- Penalva, Esparza, Agüeros, Gonzalez-Navarro, Gonzalez-Ferrero, & Irache. (2015). Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. *Food Hydrocolloids*, **44**, 399-406.
- Pérez, Carrera-Sánchez, Rodríguez-Patino, & Pilosof. (2007). Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, **21**(5-6), 794-803.
- Pérez, Sánchez, Pilosof, & Rodríguez Patino. (2009). Kinetics of adsorption of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, **336**(2), 485-496.
- Pérez, Wargon, & M.R. Pilosof. (2006). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, **20**(7), 966-974.
- Peter, Thodi, Kumar, ... Jayakumar. (2009). Development of novel a -chitin / nanobioactive glass ceramic composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, **78**(4), 926-931.
- Philippova, Volkov, Sitnikova, Khokhlov, Desbrieres, & Rinaudo. (2001). Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative. *Biomacromolecules*, **2**(2), 483-490.
- Prabaharan, & Mano. (2005). Chitosan-Based Particles as Controlled Drug Delivery Systems, 41-57.
- Prudkin Silva, Martínez, Martínez, Farías, Leskow, & Pérez. (2018). Proposed molecular model for electrostatic interactions between insulin and chitosan. Nano-complexation and activity in cultured cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **537**(August 2017), 425-434.
- Prusty, & Sahu. (2013). Development and Evaluation of Insulin Incorporated Nanoparticles for Oral Administration. *ISRN Nanotechnology*, **2013**, 1-6.
- Quellec. (1998). Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization. *Journal of Biomedical Materials Research*, **15**(1), 274-54.
- Ramírez Barragán, Delgado Fornué, & Andrade Ortega. (2016). Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica , FTIR y Raman. *Coloquio de Investigación Multidisciplinaria*, **4**(1), 769-776.
- Ramirez, Plascencia, Huerta, Vásquez, & Shirai. (2002). Obtención y caracterización de quitinas parcialmente desacetiladas mediante tratamiento biológicoquímico. *VIII Simposio Latinoamericano de Polímeros, II Simposio Iberoamericano de Quitina. Libro de Resúmenes.*, 593-594.
- Rampino, Borgogna, Blasi, Bellich, & Cesàro. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, **455**(1-2), 219-228.
- Ramsden. (2016). *What is nanotechnology? Nanotechnology*. doi:10.1016/B978-0-323-39311-9.00007-8
- Rania O. Salama, Daniela Traini, Hak-Kim Chan, Adrian Sung, Alaina J. Ammit. (2009). Preparation and Evaluation of Controlled Release Microparticles for Respiratory Protein Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **98**(9). doi:10.1002/jps
- Rao. (2014). *Flow and Functional Models for Rheological Properties of Fluid Foods*. (Media, Ed.)*International Food Research Journal*, Vol. 17. doi:10.1007/978-1-4614-9230-6

- Razmi, Divsalar, Saboury, Izadi, Haertlé, & Mansuri-Torshizi. (2013). Beta-casein and its complexes with chitosan as nanovehicles for delivery of a platinum anticancer drug. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **112**, 362–367.
- Reads. (2014). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos, (May).
- Reddy, Reddy, & Jiang. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, **33**(6), 362–369.
- Rinaudo. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, **31**(7), 603–632.
- Rojas-aguirre. (2016). Q úmica, 286–291.
- Round, Rigby, Garcia De La Torre, Maclerzanka, Mills, & MacKie. (2012). Lamellar structures of MUC2-rich mucin: A potential role in governing the barrier and lubricating functions of intestinal mucus. *Biomacromolecules*, **13**(10), 3253–3261.
- Rudin, A. Choi. (2012). The elements of polymer science & engineering. In *Mechanical properties of polymer solids and liquids.*, Academic Press.
- Saikia, & Gogoi. (2015). Chitosan: A Promising Biopolymer in Drug Delivery Applications. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, **s4**. doi:10.4172/1747-0862.S4-006
- Sakurai, Maegawa, & Takahashi. (2000). Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan / poly (N -vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer*, **41**, 7051–7056.
- Sampaio, Frota, Magalhães, ... Trevisan. (2015). Chitosan/mangiferin particles for Cr(VI) reduction and removal. *International Journal of Biological Macromolecules*, **78**, 273–279.
- Sánchez-Brenes, A., Sibaja-Ballester, M. D. R., Vega-Baudrit, J., Madrigal-Carballo. (2007). Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (Pleuroncodes planipes) con potenciales aplicaciones biomédicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **8**(4), 241–267.
- Sánchez, Vila-Jato, & Alonso. (1993). Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled release of cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*, **99**(2–3), 263–273.
- Sandoval Aldana, Rodriguez Sandoval, & Fernandez Quintero. (2005). APLICACIÓN DEL ANÁLISIS POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MODIFICACIONES DEL ALMIDÓN, **72**, 45–53.
- Santalices, Gonella, Torres, & Alonso. (2017). Advances on the formulation of proteins using nanotechnologies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **42**, 155–180.
- Sarmiento, Ferreira, Veiga, & Ribeiro. (2006). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers*, **66**(1), 1–7.
- Schmid, Arpagaus, Friess, Schmid, Arpagaus, & Friess. (2011). Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for - pharmaceutical applications, **7450**(May 2010). doi:10.3109/10837450.2010.485320
- Sebastien Guoin. (2004). Micro- encapsulation : industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 330–347.
- Semenova. (2017). Current Opinion in Colloid & Interface Science Protein – polysaccharide associative interactions in the design of tailor-made colloidal particles. *COCIS*, **28**, 15–21.
- Shalumon, Binulal, Selvamurugan, ... Jayakumar. (2009). Electrospinning of carboxymethyl chitin / poly (vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, **77**(4), 863–869.

- Sharma, Haque, & Wilson. (1996). Association tendency of β -lactoglobulin AB purified by gel permeation chromatography as determined by dynamic light scattering under quiescent conditions. *Food Hydrocolloids*, **10**(3), 323–328.
- Sharma, Sharma, Nam, Doss, Lee, & Chakraborty. (2015). Nanoparticle based insulin delivery system: the next generation efficient therapy for Type 1 diabetes. *Journal of Nanobiotechnology*, **13**(1), 74.
- Shi, Xiao, Kamaly, & Farokhzad. (2011). Self-assembled targeted nanoparticles: Evolution of technologies and bench to bedside translation. *Accounts of Chemical Research*, **44**(10), 1123–1134.
- Shigemasa, Saito, Sashiwa, & Saimoto. (1994). Enzymatic degradation of Chitin and Partially Deacetylated Chitins. *International Journal of Biological Macromolecules*, **16**(1), 43–49.
- Silva, Rodrigues, Silva, Reis, & Duarte. (2017). Engineered tubular structures based on chitosan for tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Applications*, **0**(0), 088532821774469.
- Singla, & Chawla. (2001). Chitosan : some pharmaceutical and biological aspects – an update, (Illum 1998), 1047–1067.
- Sinsuebpol, Chatchawalsaisin, & Kulvanich. (2013). Preparation and in vivo absorption evaluation of spray dried powders containing salmon calcitonin loaded chitosan nanoparticles for pulmonary delivery. *Drug Design, Development and Therapy*, **7**, 861–873.
- Sistemas de liberación Bioadhesivos Bioadhesive delivery systems. (2000), 115–128.
- Smith, Wood, & Dornish. (2004). Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions, **21**(1).
- Sogias, Williams, & Khutoryanskiy. (2008). Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, **9**(7), 1837–1842.
- Sou, Forbes, Gray, ... Morton. (2016). Designing a multi-component spray-dried formulation platform for pulmonary delivery of biopharmaceuticals : The use of polyol , disaccharide , polysaccharide and synthetic polymer to modify solid-state properties for glassy stabilisation. *Powder Technology*, **287**, 248–255.
- Sou, Kaminskas, Nguyen, Carlberg, Mcintosh, & Morton. (2013). The effect of amino acid excipients on morphology and solid-state properties of multi-component spray-dried formulations for pulmonary delivery of biomacromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **83**, 234–243.
- Sriamornsak, & Wattanakorn. (2008). Rheological synergy in aqueous mixtures of pectin and mucin. *Carbohydrate Polymers*, **74**(3), 474–481.
- Stetefeld, McKenna, & Patel. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, **8**(4), 409–427.
- Suriñach, Baro, Bordas, Clavaguera, & Clavaguera-Mora. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, **31**, 11–17.
- Teng, Li, Luo, Zhang, & Wang. (2013). Cationic β - Lactoglobulin Nanoparticles as a Bioavailability Enhancer: Protein Characterization and Particle Formation.
- Thevarajah, Bulanadi, Wagner, Gaborieau, & Castignolles. (2016). Towards a less biased dissolution of chitosan. *Analytica Chimica Acta*, **935**, 258–268.
- Tolstoguzov. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein- polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, **4**(6), 429–468.
- Uragami, Saito, & Miyata. (2015). Pervaporative dehydration characteristics of an ethanol / water azeotrope through various chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers*, **120**, 1–6.
- Vanschaik. (n.d.). CC BY-SA 3.0.

- Venkatesham, Ayodhya, Madhusudhan, Veera Babu, & Veerabhadram. (2014). A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*, **4**(1), 113–119.
- Vesterager, Kjems, Yang, ... Perez Quiñones. (2013). Self-assembled nanoparticles of modified-chitosan conjugates for the sustained release of dl - alpha -tocopherol. *Carbohydrate Polymers*, **92**, 856–864.
- Vorburger, Dagata, Wilkening, & Iizuka. (1999). Industrial uses of STM and AFM. *Computer Standards & Interfaces*, **21**(2), 196.
- Wang, Chen, Wang, & Xing. (2014). Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate – chitosan beads. *Process Biochemistry*, **49**(10), 1682–1690.
- Washington, Washington, & Wilson. (2000). *Physiological pharmaceuticals: barriers to drug absorption*, CRC Press.
- Weiss, M., Steiner, D. F., Philipson. (2014). *Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships*.
- Weissig, Pettinger, & Murdock. (2014). Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *International Journal of Nanomedicine*, **9**, 4357–4373.
- Xiao, Gömmel, Davidson, & Zhong. (2011). Intrinsic tween 20 improves release and antilisterial properties of co-encapsulated nisin and thymol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(17), 9572–9580.
- Yamanaka, & Leong. (2008). Engineering strategies to enhance nanoparticle-mediated oral delivery. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **19**(12), 1549–1570.
- Yang, Han, Zheng, Dong, & Liu. (2015a). Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **123**, 53–66.
- Yang, Xu, Qu, & Li. (2015b). The influence of amino acids on aztreonam spray-dried powders for inhalation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **10**(6), 541–548.
- Yao, Ji, Yin, & Wang. (1995). Investigation of pH-Sensitive Drug Delivery System of Chitosan / Gelatin Hybrid Polymer Network, **38**, 77–82.
- Yin, Fei, Cui, Cui, & Chunhua. (2007). Superporous hydrogels containing poly (acrylic acid- co -acrylamide)/ O -carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks. *Biomaterials*, **28**, 1258–1266.
- Yokoyama, Fukushima, Uehara, ... Okano. (1998). Characterization of physically entrapment and chemically conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for in vivo delivery to a solid tumor. *J. Contr. Rel.*, **50**, 79–92.
- Yu, Wu, Shi, & Farokhzad. (2016). Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. *Journal of Controlled Release*, **240**, 24–37.
- Zhang, Huang, Wang, ... Anfusio. (2017). Atomic force microscopy for two-dimensional materials: A tutorial review. *Optics Communications*, (May). doi:10.1016/j.optcom.2017.05.015
- Zhang, Mujeeb, Feng, Li, & Du. (2016). Physically entrapped gelatin in polyethylene glycol scaffolds for three-dimensional chondrocyte culture. doi:10.1177/0883911516633893
- Zhang, Nie, Guo, Wang, Cui, & Xie. (2018). Conformational properties of a bioactive polysaccharide from *Ganoderma atrum* by light scattering and molecular modeling. *Food Hydrocolloids*, **84**, 16–25.
- Zhang, & Zhang. (2002). Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, **61**(1), 1–8.
- Zhang, Zhang, Jiang, & Xia. (2013). The hypolipidemic activity of chitosan nanopowder prepared by ultrafine milling. *Carbohydrate Polymers*. doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.037

Zhang, Zhang, Wu, Wang, Niu, & Li. (2008). Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68**(3), 526-534.

Ziani, Oses, Coma, & Maté. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT - Food Science and Technology*, **41**(10), 2159-2165.

**CAPÍTULO 3: DISEÑO DE
NANOPARTÍCULAS VÍA AUTOENSAMBLAJE
MOLECULAR**

INTRODUCCIÓN

AUTOENSAMBLAJE MOLECULAR

En la literatura científica se describe el autoensamblaje molecular como el arreglo espontáneo de moléculas en estructuras supramoleculares. Estas estructuras quedan estabilizadas por la presencia de uniones no covalentes entre diferentes especies (Sosnik 2016). Es un fenómeno muy extendido en la Naturaleza, y puede observarse en estructuras como péptidos y ADN y también en la constitución entre proteínas de cápsides de virus y membranas celulares (Sosnik 2016).

Los requisitos que deben cumplirse para que este fenómeno tenga lugar son los siguientes:

- 1) Las subunidades se agregan conjuntamente para formar una configuración estable y bien definida.
- 2) Las interacciones entre los componentes suelen ser débiles, no covalentes.
- 3) Para aumentar la estabilidad de la nueva estructura, las conexiones entre componentes deben ser lo suficientemente débiles para que se rompan y se reconfiguren, reajustando de esta manera las posiciones de cada elemento (reversibilidad).
- 4) El entorno en el que se desarrolla un proceso de autoensamblaje es muy importante. Define la manera en que los componentes se mueven e interactúan.
- 5) La movilidad de los componentes es crucial para la formación de agregados.

El proceso puede dividirse en tres pasos básicos secuenciales: reconocimiento molecular (unión selectiva de moléculas elementales), crecimiento (los componentes se ensamblan secuencialmente o jerárquicamente) y culminación (el proceso termina) (Iyer & Paul 2015)

Las interacciones electroestáticas juegan un rol crucial en los sistemas biológicos, al involucrar el reconocimiento molecular específico, estabilizar proteínas y dirigir el autoensamblaje de complejos proteicos. El rol central de estas interacciones se debe a que las proteínas están altamente cargadas, ya que los residuos de aminoácidos –electrolitos débiles- se distribuyen a lo largo de la superficie de la proteína, otorgándoles cargas positivas o negativas según el pH del entorno.

Debido a la heterogeneidad intrínseca de la superficie proteica, los aminoácidos no están equitativamente distribuidos, sino que se concentran en ciertas áreas para formar zonas positivas/negativas. Al combinar el diseño estérico geométrico y las interacciones electroestáticas, es posible obtener estructuras proteicas autoensambladas de morfología variada (Bai *et al.* 2016).

Para sistemas poliméricos binarios, formados por un polisacárido y una proteína por ejemplo, la interacción neta durante el ensamblaje entre las dos especies puede ser asociativa, disociativa o segregativa (repulsiva), dependiendo de las estructuras de cada polímero, del pH, de la fuerza iónica, etc. Cuando los biopolímeros contienen grupos ionizables, predominan las fuerzas electroestáticas y

los complejos así ensamblados pueden emplearse como materiales sensibles a los cambios de pH, entre otros factores (Kurukji *et al.* 2014).

Uno de los mecanismos más empleados a la hora de combinar polímeros y proteínas para generar nanopartículas es la unión por interacción electrostática atractiva. Esto se debe, principalmente, a que los diferentes componentes pueden ser usados en soluciones acuosas y a temperatura ambiente, lo cual es muy conveniente para las proteínas. Además, la carga de estas moléculas puede ajustarse al controlar el pH de la solución (van Rijn 2013).

Dentro de este contexto, la formación de complejos de I-CS puede constituir una alternativa atractiva para el desarrollo de una nuevas formas de administración de péptidos terapéuticos (Pan *et al.* 2002). Las principales ventajas de emplear la bionanotecnología en la entrega de este tipo de sustancias es mejorar la solubilidad de moléculas hidrofóbicas, direccionar la entrega, modificar los perfiles de liberación, aumentar la biodisponibilidad y reducir efectos secundarios indeseados (Habibi *et al.* 2013).

Entre las nanoestructuras poliméricas autoensambladas más empleadas en medicina se pueden nombrar las micelas, los complejos de polielectrolitos, los polimerosomas, las nanopartículas, los nanogeles y los liposomas (Pippa *et al.* 2016).

Con referencia a nanoestructuras autoensambladas que incluyen quitosano o alguno de sus derivados entre sus componentes (Yang *et al.* 2014) pueden citarse: complejos de insulina-dextrano (Sarmiento *et al.* 2006), nanopartículas de HCG (gonadotropina coriónica humana) (Kim *et al.* 2008), liposomas de alginato-BSA (Haidar *et al.* 2008), ciclosporina (De Campos *et al.* 2001), compuestos de curcumina (Das *et al.* 2009), ácido fólico (Gonen & Assaraf 2012), doxorubicina-dextrano (Mitra *et al.* 2001) y Enoxolona (Tian *et al.* 2012), entre otros.

En este capítulo de la Tesis se hará hincapié en dos tipos de autoensamblaje: aquel que da origen a partículas de tipo *core-shell* y nos remitiremos también al fenómeno de floculación por puenteo (*bridging flocculation*).

NANOPARTÍCULAS DE TIPO CORE-SHELL (NÚCLEO-CUBIERTA)

Estas NP se componen de un material que forma un núcleo (*core*), cubierto de otro material que forma una cáscara o caparazón (*shell*). La aplicación biológica de estas NP poseen múltiples ventajas por sobre otro tipo de NP, ya que i) presentan toxicidades menores (Law *et al.* 2008), ii) aumentan la dispersabilidad y la bio y cito-compatibilidad, iii) poseen una mejor conjugación con otras moléculas bioactivas y iv) se incrementa su estabilidad térmica y química (Sounderya *et al.* 2008). Cuando el

material del núcleo es susceptible a cambios químicos o térmicos durante su exposición al entorno, una cubierta de material inerte por ejemplo, podría aumentar la estabilidad del núcleo.

Una representación esquemática de los distintos tipos de NP tipo *core-shell* se muestran en la Fig. 3.1. A) NP *core-shell* de simple cubierta; B) NP multi-capas; C) NP poliédricas; D) NP de cubierta porosa; E) NP de núcleo hueco; F) Núcleo hueco y doble cubierta; G) NP con núcleo móvil; H) NP de núcleo múltiple; I) NP de forma irregular; J) NP de núcleo cilíndrico.

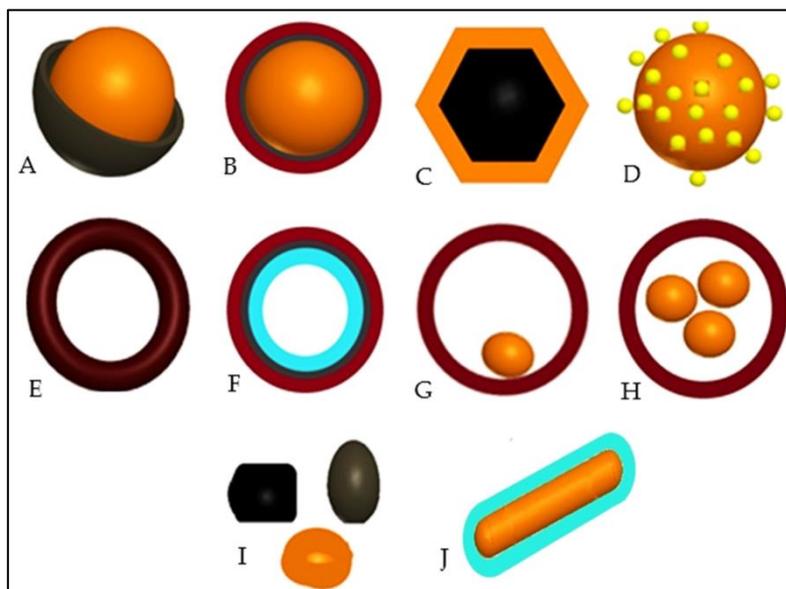


Fig 3.1.: representación esquemática de los distintos tipos de NP core-shell. Adaptada de (Deshpande *et al.* 2017).

Aplicaciones biomédicas

En general, las NP *core-shell* se diseñan para aplicaciones biomédicas en base a la química de superficie, que incrementa su afinidad para ligar drogas, receptores, ligandos, etc (Sahoo & Labhasetwar 2003). Esto ha significado el diseño de NP novedosas, en sincronía con los sistemas biológicos de destino. La biocompatibilidad y la citocompatibilidad aumentan su valor terapéutico, lo que abre la puerta para el diseño de toda una nueva generación de nanovehículos con propiedades mejoradas como tiempos de residencia más largos, mayor biodisponibilidad y reducción de tanto la dosificación como de la frecuencia, al tiempo de una mejor especificidad. A modo de ejemplo, la cobertura bioinspirada de una droga hidrofóbica puede facilitar la correcta liberación en su sitio diana debido a la degradación específica del polímero para las condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica del entorno (Mahmud *et al.* 2007)(Chatterjee *et al.* 2014).

FLOCULACIÓN POR PUENTE

La floculación es el fenómeno por el cual una cadena larga de un polielectrolito con alto peso molecular forma un puente físico entre dos o más partículas, uniéndolas para conformar una estructura tridimensional poco rígida y porosa (Gregory 1988).

Existen dos mecanismos predominantes de floculación para polímeros: puenteo de partículas (*bridging*) por cadenas poliméricas o neutralización de cargas por adsorción de polielectrolitos.

Puenteo polimérico. Luego de adsorbidas, las cadenas poliméricas pueden presentar bucles y colas extendiéndose desde la superficie de la partícula, las cuales podrán formar segmentos y de esta manera adherirse a otras partículas, lo que conectará o generará un “puente” entre dos partículas. La floculación por puenteo sólo puede ocurrir si existen suficientes superficies desocupadas sobre las partículas para permitir que los segmentos de una misma cadena polimérica sean adsorbidos sobre las partículas. Ya que el número de contactos de puenteo entre las partículas depende de la cantidad de polímero adsorbido, una concentración óptima de este último debe existir para lograr la máxima efectividad de puenteo y está relacionada con la máxima cantidad de encuentros exitosos entre partículas (LA Mer 1966).

Neutralización de carga. Suele ocurrir cuando los floculantes poliméricos poseen cargas opuestas a las partículas de una suspensión. El ejemplo más común es el uso de un polielectrolito catiónico para la floculación de partículas cargadas negativamente, como ocurre con el CS y la I, respectivamente (Fig. 3.2).

Para polielectrolitos flexibles, suele suceder que una concentración óptima es aquella que asegura una neutralización casi completa de la carga superficial del *core* en formación, y se manifiesta cuando el potencial ζ tiende a cero (Kleimann J, Gehin-Delval C, Auweter H 2005)(Barany & Szepesszentgy 2004).

Como es de esperarse, la densidad de carga del polielectrolito es de suma importancia: para un floculante de alta densidad la concentración óptima se vuelve más pequeña. En muchos casos, la densidad de carga del polielectrolito es el factor más importante, mientras que el peso molecular ocupa un rol secundario. Para polielectrolitos de alto peso molecular, la floculación puede ocurrir, pero la configuración plana de adsorción puede ser un factor limitante. Para polímeros rígidos como el CS, o para aquellos altamente cargados (Barany *et al.* 2009) no existe una correspondencia entre concentración óptima y punto isoelectrico (Barany & Szepesszentgy 2004) y el puenteo es más probable.

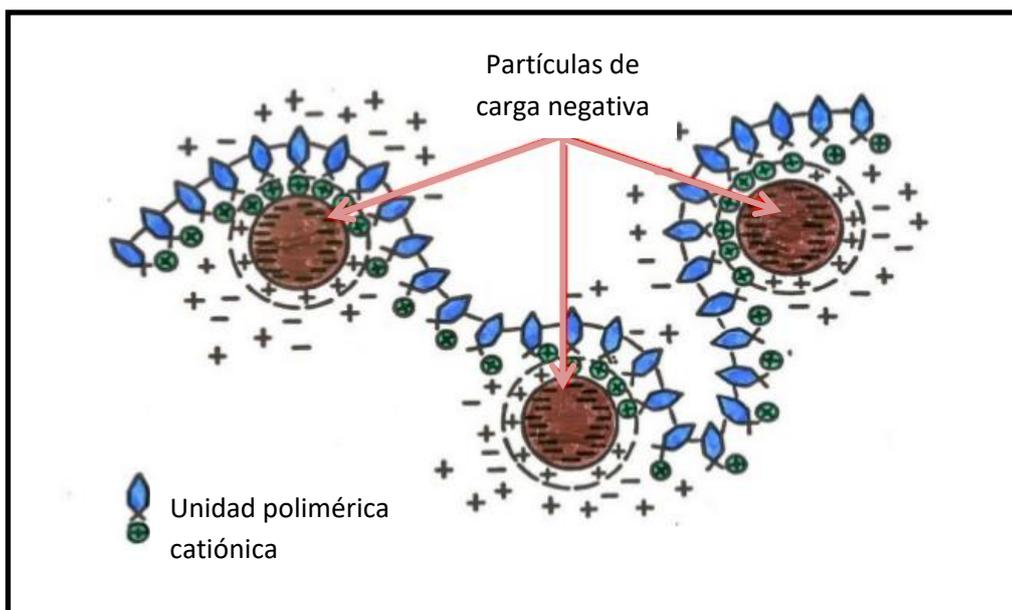


Fig 3.2.: Puenteo entre un polímero catiónico y partículas con carga negativa. Adaptado de [<https://www.slideshare.net/jagadish108/chemical-clarificationcoagulation>].

Un aspecto importante de la neutralización de carga es que suele existir un desfase espacial entre segmentos cargados de la cadena polimérica y los sitios cargados de la superficie molecular, en nuestro caso la insulina o agregados de la misma. Para polielectrolitos catiónicos de alta densidad de carga, el espaciado entre cargas suele ser pequeño, mientras que muchas partículas negativamente cargadas tienen una densidad de carga superficial relativamente baja. De este hecho se desprende que para la adsorción de polielectrolitos catiónicos es importante la existencia de “parches”, es decir de regiones con carga positiva en exceso, rodeadas de áreas de carga negativa neta. No puede descartarse que de existir una ubicación espacial preferencial de ambos componentes, puedan surgir interacciones atractivas adicionales entre estas dos regiones (Gregory & Barany 2011).

LIBERACIÓN CONTROLADA

Uno de los desafíos en el diseño de vehículos para la entrega de drogas es el control de la liberación de dichas drogas. Por esta razón, se ha desarrollado un gran número de NP multifuncionales con gatillos múltiples y una química compleja. Para lograr un efecto terapéutico eficiente maximizado, es deseable contar con un sistema de entrega de drogas dependiente de dicho gatillo y que además sea capaz de ejercer una liberación sostenida.

La terapia farmacológica convencional, si bien es efectiva, suele requerir la administración periódica de drogas en concentraciones más elevadas a las requeridas en el sitio diana, lo cual puede provocar

efectos citotóxicos sistémicos. Además, su efectividad también depende del cumplimiento del tratamiento por parte del paciente (Deshpande *et al.* 2017).

Para disminuir la frecuencia de administración, la dependencia del cumplimiento del paciente y para aumentar la concentración efectiva de la droga en el sitio diana, se ha comenzado a emplear nanovehículos como sistema de entrega (Bao *et al.* 2013)(Kim *et al.* 2009).

Una de las propiedades más deseadas de los nanovehículos es la posibilidad de controlar la cinética de liberación de drogas. La mayoría de los vehículos desarrollados con este fin muestran un perfil de liberación sostenido en el tiempo, donde la liberación está gobernada por la ley de difusión de Fick, lo que proporciona poco control sobre la misma. Los esfuerzos se concentran entonces en los llamados nanovehículos “inteligentes”, para los cuales la liberación puede ser inducida como respuesta a un estímulo endógeno o exógeno. Los estímulos endógenos, como pH (Deng *et al.* 2011)(Hyun *et al.* 2010), hipoxia (Thambi *et al.* 2014) o la presencia de enzimas (Xu *et al.* 2013) tienen origen en el microentorno específico del sitio diana. Debido a que estos estímulos se encuentran presentes de manera permanente, una vez activado el sistema, este presenta una liberación continua. De manera alternativa, los gatillos exógenos, como la temperatura (Rastogi *et al.* 2011), luz (Cheng *et al.* 2014)(Bao *et al.* 2015), campo magnético (Dionigi *et al.* 2013) y corriente eléctrica (Kargina *et al.* 2014) pueden proveer perfiles de liberación avanzados, conocidos como *por requerimiento*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

El CS empleado es el denominado CS_p, o quitosano purificado, descrito en la sección 2.1. Se disuelve en una solución 1% de ácido acético para lograr una concentración de 1%, p/p. Luego se centrifuga durante 20 minutos a 4.500 rpm y se conserva el sobrenadante. La fracción precipitada es rica en impurezas y se descarta.

La insulina recombinante humana, donada en forma de polvo liofilizado ([UE]= 28,6 UI/mg) por Denver Farma, se disuelve en HCl 20 mM inmediatamente antes de ser utilizada.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS I-CS MEDIANTE EL PRINCIPIO DE AUTOENSAMBLAJE MOLECULAR (*CHARGE SCREENING METHOD*)

Para preparar los complejos, se mezclaron los volúmenes de las soluciones doblemente concentradas de CS purificado, según 2.1, e I, a pH 2, de manera de obtener concentraciones finales de 0,2 % p/p para la insulina y de $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ y $1 \cdot 10^{-2}$ % p/p para el CS. La insulina fue vertida gota a gota sobre la solución de CS, bajo agitación magnética suave y a temperatura ambiente (TA). El pH de la mezcla fue llevado hasta 6, con la adición de Na(OH), 4N, también gota a gota. La elección del pH 6 como pH de trabajo se justifica en el aumento de las interacciones electroestáticas entre I y CS tal como se explicó en la sección 3.3 (Smirnova *et al.* 2015).

Luego de alcanzado el pH final, las mezclas presentan en mayor o menor medida material precipitado. A partir de este punto, todos los experimentos y determinaciones se realizaron empleando la fracción soluble de las mezclas.

A continuación se presenta el diagrama de flujo del proceso de generación de nanopartículas (Fig. 3.3).

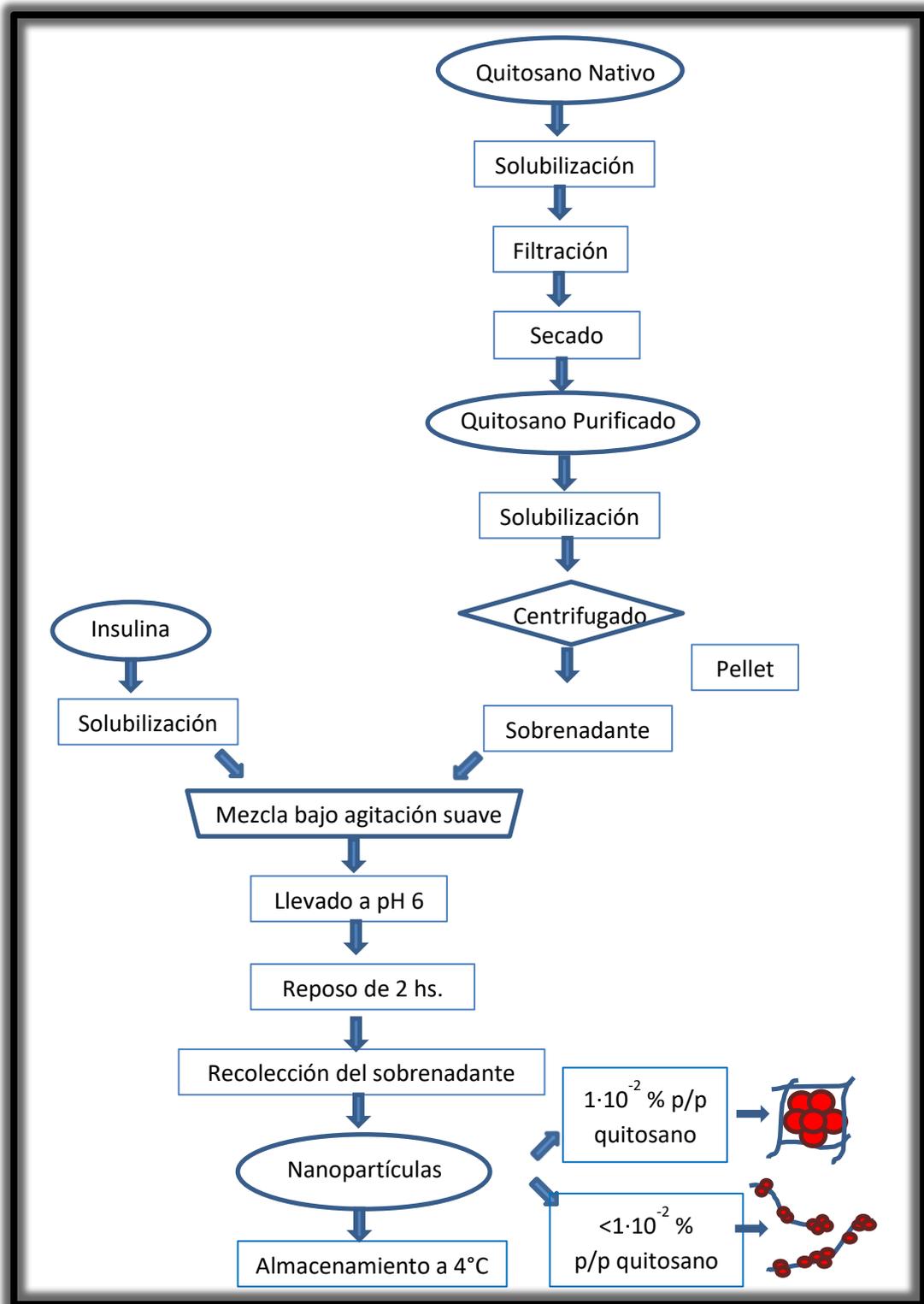


Fig. 3.3: Diagrama de flujo que resume la generación de NP I-CS por el método de autoensamblaje y la configuración de las nanopartículas obtenidas.

3.2.2. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS) Y POTENCIAL Z

La distribución de tamaño de partícula y el potencial ζ , cuyos fundamentos se explicaron en la sección 2.2.2, se obtuvieron con un analizador de partículas Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). La distribución de intensidad se determinó ajustando los datos experimentales con una función multiexponencial (CONTIN). El potencial ζ se obtuvo considerando la movilidad electroforética de las partículas y empleando la ecuación de Henry para su conversión en potencial ζ .

La distribución de tamaño se expresa en Volumen, ya que esta representación permite apreciar con más facilidad la importancia relativa de los diferentes picos (Bhattacharjee 2016). Sin embargo, el valor de cada pico reportado se obtiene de las curvas de Intensidad, que es la representación más precisa de la luz difractada por cada muestra (ver sección 2.2.2).

Por otro lado, se empleó el software del equipo, Zetasizer Software v. 7.02, para obtener un peso molecular (MW) estimado tanto para las nanopartículas como para la insulina libre, para los diferentes pHs considerados. La herramienta *MW & Shape Estimates* calcula el peso basándose en un radio hidrodinámico ingresado por el usuario. El resultado se reporta considerando 4 modelos o casos posibles: proteínas globulares, polisacáridos lineales, dendrímeros y polisacáridos ramificados. El usuario es quien elige cuál de esas configuraciones corresponde a su sistema.

El programa calcula tanto el factor de Perrin, que es una medida de cuánto se aleja una partícula de la forma esférica, como los radios axiales prolato y oblato. El radio prolato es el cociente entre la longitud y el grosor, mientras que el oblato es el cociente del ancho y el grosor, de un objeto con forma de disco. Si bien los valores obtenidos con esta herramienta son de carácter solo orientativo, resultan de gran utilidad para comprender mejor las distintas etapas del proceso de complejamiento.

El índice de polidispersidad (o PI en inglés) es un parámetro adimensional calculado a partir del análisis de cumulantes (sección 2.2.2) y está relacionado con el ancho de la campana Gaussiana que se emplea para modelar los datos experimentales en dicho análisis (Ochnio *et al.* 2018). Puede variar entre 0 y 1, donde 0 indica una muestra completamente monodispersa y 1 una completamente polidispersa. En la práctica no se observan valores menores a 0,05 excepto en estándares monodispersos y para el estudio de proteínas valores menores a 0,2 se consideran un indicio de monodispersidad. En casos donde el $PI > 0,7$ se considera que la muestra es demasiado polidispersa para ser analizada empleando únicamente DLS (Malvern Instruments 2011).

Se emplearon las siguientes constantes para cada medición: índice de refracción 1,333 para agua ultra pura (dispersante), constante dieléctrica 78,5, viscosidad 0,8872 cp, ángulo de 173° , temperatura 25°C . El tiempo de estabilización fue de 180 s y cada medición consistió en 10 lecturas. Se utilizaron cubetas de plástico desechables para medir la distribución de tamaño y celdas descartables para el potencial ζ (DTS1060, Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Las mediciones de distribución de tamaño para I, CS e I-CS, realizadas a 25°C, se informan como el promedio y la desviación estándar de diez lecturas realizadas sobre al menos 3 soluciones independientemente preparadas como réplicas.

3.2.3. CINÉTICA DE AGREGACIÓN

Se registró la absorbancia en función del tiempo, a pH 2 y 6, empleando un lector multiplaca PHERASTAR-FS (BMG LabTech, Ortenberg, Germany). Los datos se adquirieron a $\lambda=500$ nm, ya que esta longitud de onda se encuentra alejada de los picos de intensidad del CS y de la I (Tang *et al.* 2013). Todas las mediciones fueron a 25 °C y para cada una de ellas se depositaron 200 μ l por pocillo. El modelo con el que se ajustaron los datos experimentales y que sirvió para obtener los parámetros cinéticos es el propuesto por Stirpe y col. (Stirpe *et al.* 2011).

Dicho modelo, obtenido por regresión múltiple no lineal, considera que la absorbancia sigue un comportamiento de tipo sigmoideal (Figura 3.4) y que los resultados experimentales pueden ajustarse siguiendo una función del tipo:

$$y = y_0 + ce^{(-\alpha t)^\beta} \quad (3.1)$$

donde y_0 son la absorbancia para un tiempo t y para un tiempo final, mientras que el parámetro α es la velocidad de formación espontánea de agregados y β es el orden de dicha agregación.

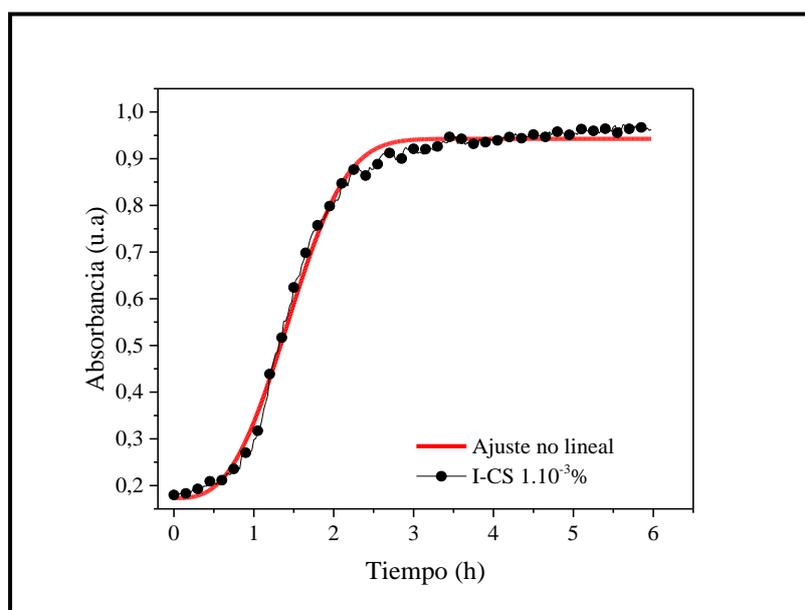


Fig. 3.4; Modelo sigmoideal que describe el comportamiento de la absorbancia en función del tiempo. Ajuste sobre datos de complejos I-CS con 1.10^{-3} % p/p de CS a modo de ejemplo.

3.2.4. REGÍMENES DE FLUJO

El comportamiento de flujo de las dispersiones de I, CS y los complejos I-CS, para las diversas concentraciones del polímero se registró a través de un reómetro de esfuerzo de corte controlado para Physica (MCR 301) (Graz, Austria) con sistema de cono y plato (CP 50) a un gap de 0,099 mm. Se vertieron 570 μl de cada dispersión a pH 3 en el plato del reómetro. La temperatura fue controlada a 25 $^{\circ}\text{C}$ por un sistema Peltier (Viscotherm VT2, para Physica). Se registró la evolución del esfuerzo de corte en función de la velocidad de cizalla creciente linealmente desde 0 a 300 s^{-1} . Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

Se obtuvieron los valores de esfuerzo de corte frente a las velocidades de deformación y a continuación los datos se ajustaron utilizando la ecuación de la ley de potencia (Ecuación 3.2):

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad (3.2)$$

Donde τ es el esfuerzo de corte, $\dot{\gamma}$ la velocidad de deformación, k el índice de consistencia (homologado con la viscosidad) y n el índice de flujo (Alfano *et al.* 2017).

3.2.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscope* o SEM) es un instrumento que utiliza haces de electrones para producir imágenes de especímenes sólidos con gran resolución espacial y una alta profundidad de campo. Estas imágenes proveen información tanto de la topografía como del estado químico, magnético y electrónico de la muestra. En particular, los microscopios electrónicos de barrido por emisión de campo (*Field Emission Scanning Electron Microscope* o FE-SEM) poseen un cañón de electrones (cátodo) de alto vacío que genera una corriente grande y estable confinada en un pequeño haz (Fig. 3.5).

Los electrones energéticos golpean la muestra, interactuando con ella y generando numerosas reacciones, entre las que figuran procesos de *backscattering* y de emisión de electrones secundarios. Los electrones generados en el punto de impacto del haz de electrones primario sobre la muestra son interceptados por un campo eléctrico débil (generado por la lente electrostática) que los acelera y enfoca en el detector que se encuentra en el interior del cañón del haz. Además un detector lateral en la cámara provee información topográfica. Las señales de ambos detectores se mezclan para entregar una imagen de alta calidad.

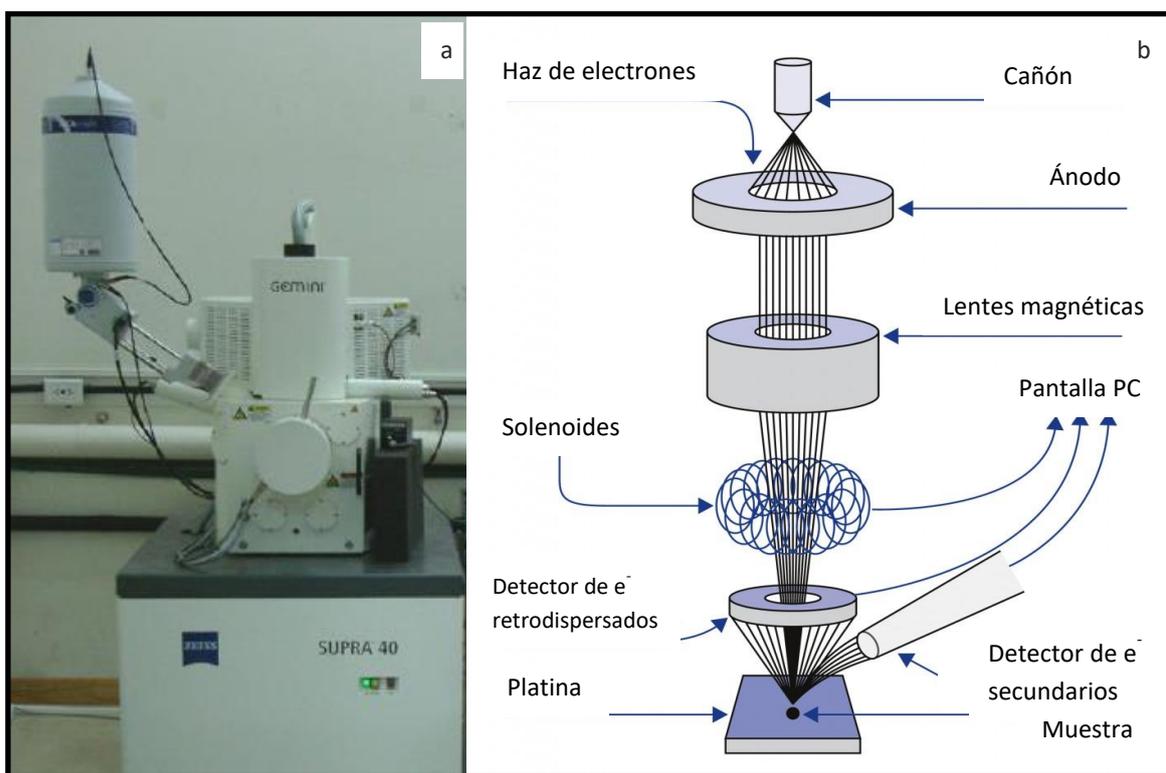


Fig. 3.5: Fotografía del equipo SEM empleado (a). Esquema simplificado del cañón de electrones y los diferentes detectores que conforman el microscopio (b).

En este trabajo se empleó un equipo FEG-SEM Zeiss, SUPRA 40 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) que posee una columna o cañón Gemini. Se empleó un voltaje de aceleración de 2 kV. Las muestras, originalmente en solución, debieron ser liofilizadas. A continuación, unos microgramos de cada una de ellas fueron depositados sobre las cintas de carbono de los tacos correspondientes. No se realizó metalización previa.

3.2.6. MICROSCOPÍA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

Para cada muestra se realizó una dilución 1/5000, a fin de eliminar posibles agregados. Se depositaron 10 μ l de dicha dilución en un sustrato de silicio, se dejó secar a temperatura ambiente y se procedió a adquirir las imágenes.

Las imágenes presentadas se obtuvieron empleando el dispositivo MultivMode-AFM Digital Instruments-Veeco con Controlador NanovScopevIIIa-Quadrex. Las mediciones se realizaron en modo

tapping con un sensor de fuerza de silicio (Silicon Metrology Probes for AFM Imaging, Nano Devices, MPP11100 Application Tapping / Non Contact) con una punta de 10nm de radio, 17μm de altura y 35μm de profundidad (frecuencia de resonancia: (300-100) kHz).

3.2.7. ELECTROFORESIS CAPILAR

La Electroforesis Capilar (EC) es un método de separación y cuantificación de iones, basada en sus movilidades electroforéticas para un dado voltaje. Se emplea rutinariamente en compuestos como ácidos nucleicos, proteínas, moléculas quirales y carbohidratos. Es un método simple, con una gran eficiencia y alta selectividad, y con tiempos de análisis cortos y un volumen de muestra muy pequeño (Ban *et al.* 2001).

Esta técnica ha sido empleada con anterioridad para detectar por ejemplo concentraciones fisiológicas de insulina, identificar sus análogos y monitorear la agregación de esta proteína (Pryor *et al.* 2011).

Un equipo de EC se compone de dos compartimientos, uno de entrada y otro de salida, un capilar, electrodos, una fuente de alto voltaje, un detector y un sistema de recolección de datos (Fig. 3.6a.).

Tanto los viales como el capilar se llenan con una solución *buffer* acuosa y a continuación la muestra se inyecta dentro del capilar. La migración del analito comienza al aplicarse un campo eléctrico entre los viales. Los analitos se separan mientras migran debido a su movilidad electroforética y son detectados al final del capilar. La información es presentada como un electroferograma, que indica la respuesta del detector como función del tiempo.

La electroforesis es el proceso por el cual un ión se mueve debido a la aplicación de una diferencia de voltaje. El ión sufre una fuerza igual al producto de la carga neta y de la intensidad del campo mientras es sometido a una fuerza de arrastre f , proporcional al coeficiente de fricción traslacional y a la velocidad. En la ecuación 3.3 se muestra de qué manera la movilidad electroforética (μ_{EF}) relaciona estos parámetros:

$$\mu_{EF} = qf = q6\pi\eta r \quad (3.3)$$

donde r es el radio del átomo, η es la viscosidad del solvente y f está dada por la ley de Stokes.

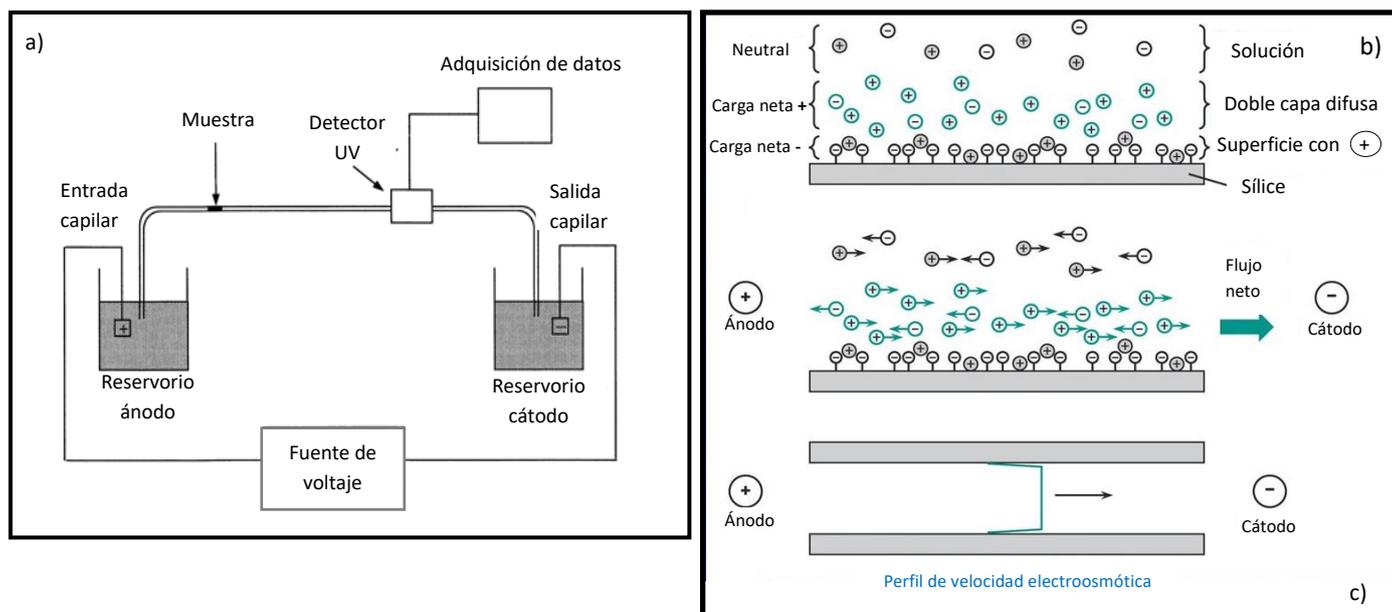


Fig. 3.6: Arreglo experimental para un equipo de electroforesis capilar (a). Esquema que muestra la doble capa de carga dentro del capilar (b, arriba), el flujo neto hacia el cátodo (b, centro) y el perfil de velocidad del flujo electroosmótico (c, abajo) [Jr *et al.* 1998].

La velocidad con la que migran los iones se relaciona con el cociente entre la carga y la masa, si bien la velocidad de los iones es directamente proporcional al campo aplicado.

Al aplicarse un alto voltaje a un capilar relleno con un electrolito, se produce un flujo electro-osmótico (EOF en inglés). Este flujo ocurre cuando el *buffer* que recorre el capilar de sílice tiene un pH mayor a 3, lo que ocasiona que los grupos silanoles (SiOH) pierdan un protón, resultando en grupos SiO^- . Este grupo atrae a su vez cargas positivas. La pared del capilar queda entonces negativamente cargada y desarrolla una doble capa de cationes, de acuerdo con la teoría de la doble capa eléctrica. La capa interna es estacionaria, mientras que la externa es libre de moverse a lo largo del capilar (Fig. 3.6b).

En presencia de un campo eléctrico aplicado, la capa móvil se dirige hacia el electrodo negativo, creando un flujo electroforético que arrastra solvente con él. Los aniones en la solución son atraídos hacia el ánodo pero son llevados hacia el cátodo. Los cationes con la mayor relación carga sobre masa se separan primero, seguidos por los cationes con una relación menor a la primera, luego las especies neutras, los aniones con carga/ masa pequeña y por último los aniones de mayor carga/masa. La velocidad electro-osmótica puede ser modificada alterando el pH, la viscosidad del solvente, la fuerza iónica y el voltaje.

Si bien existen variantes de EC, en este trabajo se aplicó la variante conocida como Electroforesis Capilar Zonal, ya que el *buffer* empleado en ambos electrodos es el mismo. Se empleó un equipo Beckman P/ACE MDQ, con un detector PDA (Detector de arreglo de diodos), operando a una longitud

de onda de 214 nm. El capilar posee una longitud efectiva de 30 cm y sus medidas son 40 cm de largo x 75 μm de diámetro.

El buffer de corrida fue Ácido Bórico 150 mM pH 9,9. Se aplicó un voltaje de 18 kV y una corriente de 71 μA . Todas las determinaciones se realizaron a 25 $^{\circ}\text{C}$. El tiempo de inyección fue de 3,5 segundos a una presión de 0,2 psi. Las muestras se corrieron por duplicado y durante 25 minutos.

3.2.8. ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Las nanopartículas obtenidas mediante autoensamblaje se analizaron con un equipo Nicolet 8700 Smart Orbit, con detector DTGS. Se realizaron 64 barridos espectrales por muestra, entre 4000 y 400 cm^{-1} , con 4 cm^{-1} de resolución. Las muestras se mantuvieron en un desecador con CaCl_2 durante 48 hs. antes de ser analizadas.

3.2.9. SIMULACIONES COMPUTACIONALES

Las simulaciones comienzan considerando la estructura monomérica de insulina humana como un cuerpo rígido, considerando la estructura de rayos X disponible online en PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), cuya nomenclatura es 1APH (<https://goo.gl/8mAUA6>) (Fig. 3.7a). A partir de esa estructura se construyen dímeros, tetrámeros y demás asociaciones necesarias. El radio asignado para la I es de 2,0 Å .

Cabe aclarar que las simulaciones no contemplan el proceso de autoagregado que puede sufrir la insulina, por lo que se elige una estructura de partida (dímero, trímero, etc.) y se mantiene hasta finalizada dicha simulación.

La proteína se mantiene fija en el centro de una celda esférica electroneutral, de radio R_{cell} , determinado por la concentración de la proteína (Barroso da Silva & Mackernan 2017). A esto se lo denomina “modelo de celda” y es un modelo de Grano Grueso (*Coarse Grain*) descrito en detalle por Barroso *et al.* (2009)(da Silva & Jönsson 2009) para explorar el proceso de complejamiento de la proteína haciendo foco en las interacciones electroestáticas (Fig. 3.7a.).

Los polielectrolitos, como es el caso del quitosano, son modelados como una cadena flexible de 21 monómeros (cuentas o esferas) unidos por osciladores armónicos. Cada monómero posee un radio (R_{mon}) de 2 Å . El número de cuentas es el resultado de balancear el realismo de la simulación con la eficacia del método computacional. Dicha cadena es flexible y puede moverse libremente dentro de la celda, interactuando con la proteína y los iones libres monovalentes. Además, se agregan iones y el medio de disolución.

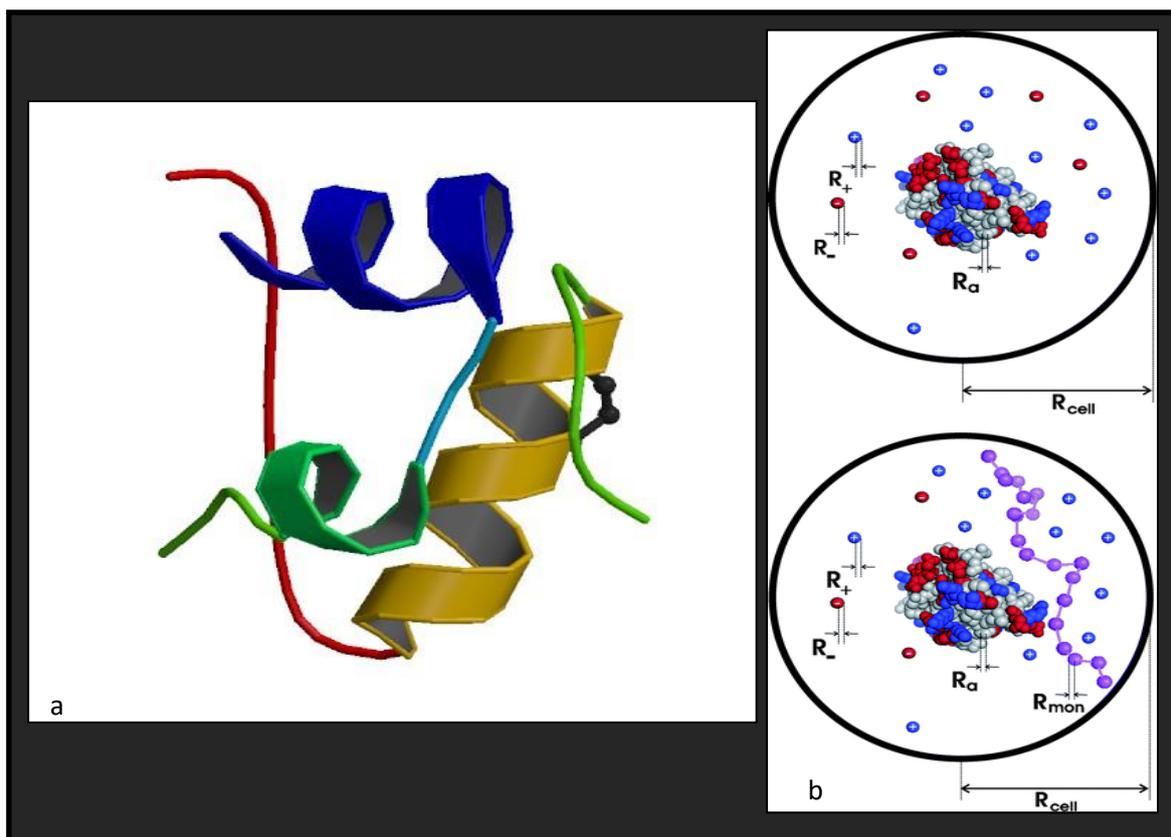


Fig. 3.7: Estructura secundaria modelo para la insulina a pH 6 (a) y representación de sistemas proteicos globulares (centro del círculo) y cadenas poliméricas (esferas púrpuras) (b).

Se definen las cargas parciales iniciales de cada especie de la simulación y se les permite variar durante la misma, de acuerdo al pH de la solución y al equilibrio ácido-base. Luego, se sigue un esquema de titulación protónica con iones explícitos, para convertir el proceso de ionización en un movimiento Monte Carlo (da Silva & Jönsson 2009).

Se realizan simulaciones considerando un ensamble Semi Gran Canónico Monte Carlo, para resolver el modelo Grano Grueso-pH constante. Esto significa que la cantidad de moléculas se mantiene constante mientras que las cargas individuales pueden variar durante la simulación. El método estándar Metrópolis Monte Carlo permite considerar los desplazamientos de todas las especies móviles dentro de la celda y su interacción con la proteína (Montellano Duran *et al.* 2017). Los criterios de aceptación de nuevas configuraciones fueron basados en la energía total del sistema.

Cada ión móvil k , con una carga q_k es considerado como una esfera rígida de radio $R_a = 2.0 \text{ \AA}$ y el solvente como un medio dieléctrico sin estructura y con constante de permitividad dieléctrica ϵ_s .

Las interacciones entre dos partículas cualesquiera vienen dadas por la ecuación 3.4:

$$u(r_{ij}) = \begin{cases} \infty & r_{ij} \leq 2R_a \\ \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_s r_{ij}} & r_{ij} > 2R_a \end{cases} \quad (3.4)$$

Donde ϵ_0 es la permitividad en el vacío, q_i y q_j son las cargas de cada partícula y r_{ij} es su separación.

Si bien se considera que la mayoría de las interacciones entre partículas cargadas están mediadas por fuerzas de Coulomb, existe otra teoría para explicar la interacción atractiva entre partículas de igual carga. Kirkwood y Shumaker (Kirkwood & Shumaker 1952), sugirieron que dicha interacción puede surgir de fluctuaciones en la cantidad de protones, que se originan cuando los grupos cargados de ambas partículas se reordenan. Estos reordenamientos se deben a perturbaciones locales del equilibrio ácido-base en los grupos cargados de macromoléculas. A este fenómeno se lo conoce como “mecanismo de regulación de carga”

A los fines prácticos, esto significa que para una proteína ionizable y un polielectrolito no titulable (de valencia Z_a) la energía electrostática libre $A(R)$ para su complejamiento puede describirse en términos de la teoría de perturbaciones como una función de su separación R (ec. 3.5):

$$\beta A(R) = l_B Z_a \left(\frac{\langle Z \rangle_0}{2R^2} \right) - l_B Z_a^2 \left(\frac{C}{2R^2} + \frac{\langle \mu \rangle_0^2}{6R^4} \right) \quad (3.5)$$

En esta ecuación β equivale a $1/kT$, siendo k la constante de Boltzmann, Z_a es la valencia promedio de la cadena de polielectrolitos, $\langle Z \rangle_0$ es la valencia promedio de la proteína, C es la capacitancia promedio de la proteína (o parámetro de regulación de carga) representando las fluctuaciones de carga y $\langle \mu \rangle_0$ es el momento dipolar promedio para un pH determinado. El primer término es la contribución de Coulomb y el segundo describe los mecanismos que favorecen las interacciones atractivas. El término con la dependencia $1/R^2$ representa la interacción inducida por carga como resultado de las fluctuaciones de protones y aquel con la dependencia $1/R^4$ da cuenta de las contribuciones de las interacciones carga-dipolo (Srivastava *et al.* 2017).

Se calcularon las funciones de distribución radial $g(r)$ entre el centro geométrico de la proteína y los monómeros del polisacárido. Dichas funciones se convirtieron en un potencial de fuerza media, lo que permitió obtener la energía libre de interacción correspondiente.

Además de $g(r)$, se determinaron varias propiedades fisicoquímicas (carga y capacitancia, en función del pH), derivadas de la energía libre (potencial de fuerza media entre los centros de las

macromoléculas) y el correspondiente número de coordinación. Las simulaciones se realizaron a temperatura constante de 298 K (Montellano Duran 2017).

En todos los casos se incluyó la presencia de iones monovalentes para garantizar los efectos de correlación ion – ion. Se estableció un reservorio de protones en la celda para establecer un pH constante en el sistema. Para cada pH, en el rango de estudio $5 < \text{pH} < 8.5$, se consideró un régimen de baja fuerza iónica, fijada en 1,2 mM, mientras que la concentración de Insulina fue de 58,7 μM .

3.2.10. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS NANOPARTÍCULAS IC-CS EN CULTIVOS CELULARES

Cultivo celular

Línea celular murina 3T3-L1 (ATCC® CL-1658™). Se seleccionó esta línea celular para comprobar la actividad de la insulina encapsulada, ya que expresa el receptor de insulina. Ha sido ya empleada para tal fin en nuestro laboratorio (Prudkin Silva *et al.* 2018).

Línea celular humana Calu-3 (ATCC® HTB-55™). Es una línea correspondiente a células epiteliales bronquiales humanas (Ong *et al.* 2013) y se optó por ella como línea modelo para testear *in vitro* la respuesta inflamatoria del epitelio pulmonar ante la presencia de NP de CS.

Ensayo de fosforilación de AKT

El cultivo de 3T3-L1s se realizó sobre placas de 60 mm con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complementado con 10% de FBS (suero fetal bovino) y penicilina/estreptomicina (50 U/ml; 50 mg/ml) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células por placa y se las incubó durante 48 hs.

El cultivo de Calu-3 se realizó también sobre placas de 60 mm con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complementado con 10% de FBS (suero fetal bovino), penicilina/estreptomicina (50 U/ml; 50 mg/ml) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.), Glutamina 2 mM (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) y aminoácidos no esenciales 0,1 mM (Sigma, Estados Unidos). Se sembraron $15 \cdot 10^4$ células por placa y se las incubó durante 120 hs.

Ambas líneas se incubaron en una estufa Thermo Scientific Heraeus (Alemania), con 5% CO_2 y a 37°C, hasta alcanzar el 80% de confluencia. Pasado el tiempo indicado para cada línea, se retiró el medio y se lavó con PBS (Buffer Fosfato Salino) 3 veces. Se reemplazó el medio de cultivo por DMEM y se las incubó durante 6 hs. más (hambreando).

A continuación se procedió a la estimulación de las células con 10 nM de insulina libre o nanopartículas I-CS con una masa equivalente de I, durante 0.5, 2, 10 y 120 minutos. Luego, se las lavó con PBS 2 veces más, y se procedió al lisado celular con el agregado de 80 μ l de cracking buffer por placa (Tris-HCl 200 mM, SDS 8%, azul de bromofenol 0.4%, Glicerol 40% and β -mercaptoetanol 400 mM), al que se agregaron inhibidores de fosfatasa (50 mM NaF, 1 mM ortovanadato de sodio, 10 mM β -glicerolfosfato) y de proteasas (P8340 SIGMA, St Louis, Estados Unidos). Se recogieron las células tras un vigoroso raspado de la placa para favorecer el lisado y se las almacenó en un tubo eppendorf.

Se sometió cada tubo a una agitación en vortex durante 30 s, se lo calentó a 95°C durante 5 min, se agitó nuevamente 30 s y se centrifugó 5 min a 10.000 rpm. Para sembrar, se tomaron 15 μ l de sobrenadante de cada tubo por calle.

Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE y Western blot

La electroforesis en geles de poliacrilamida, 10% p/p, se realizó según el método glicina- SDS-PAGE (Laemmli 1970) en el cual la desnaturalización por calor y el posterior agregado de SDS permite dotar las proteínas de una relación carga/masa prácticamente uniforme y, de este modo, se logra una separación en base al tamaño molecular de los péptidos.

Los geles se armaron en un equipo para celdas MiniProtean III (Bio-Rad). Las muestras se corrieron a un voltaje constante de 90 V en presencia del *buffer* de corrida (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; pH 8,3).

Las proteínas resueltas por el gel de SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana de PVDF (Amersham Hybond GE Healthcare, Life Sciences, Alemania) en una celda inmunoblot para cubas MiniProtean III (Bio-Rad), empleándose un *buffer* de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; 20 % v/v metanol; pH=8,3). Se transfirió 90 min a 90 V, luego de lo cual se realizó una tinción con Rojo Ponceau (Rojo Ponceau S 0,2 %: ácido acético 1 %) para comprobar la eficiencia de la transferencia. La membrana se bloqueó una hora a TA con 5% de BSA en *buffer* TTBS (Tris-Tween-Buffer-Salino) 50 mM (50 mM Tris-HCl pH=7,5, Tween-20 0.1%, 15mM NaCl, pH=7,5)

Posteriormente, la membrana se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (Rabbit anti-P-Akt S473) (Cell Signaling, USA). Al día siguiente se lavó la membrana 5 veces con TTBS y se incubó durante 1 hora a TA con una dilución 1/5000 del anticuerpo secundario Rabbit IgG-HRP (Santa Cruz, CA, USA) conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, Horse Radish Peroxidase). Todas las incubaciones con anticuerpos y lavados se realizaron con agitación. Para el revelado, la membrana se lavó 5 veces con TTBS, se montó en un cassette y se agregó cantidad suficiente de reactivo ECL Prime Western Blotting RPN 2232 (Amersham GE Healthcare, Reino Unido) para cubrir totalmente la superficie de la membrana. Para la detección de la señal de quimioluminiscencia se utilizaron placas radiográficas

(AGFA). La placa revelada se digitalizó y las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando la distribución FIJI (Schindelin et al., 2012) del software libre ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Conformación de monocapa celular Calu-3 y resistencia eléctrica transepitelial

A fin de constatar que la línea celular Calu-3 conforma una monocapa, y por ende que funciona como línea modelo de epitelio pulmonar, se sembraron 3×10^5 células por inserto utilizando el sistema Transwell (Thermo Scientific), que consta de insertos con membrana de policarbonato, con poros de diámetro $0,4 \mu\text{m}$ y área $1,13 \text{ cm}^2$ (Fig. 3.8).

El sistema Transwell permite realizar ensayos *in vitro* para transporte de bioactivos debido a que los compuestos que son absorbidos en la cara apical, son transportados a la cara basolateral por transporte transcelular o transepitelial. Las células se sembraron directamente sobre la membrana de policarbonato, adicionando $200 \mu\text{l}$ del medio de cultivo adecuado a la cara apical y 1 mL a la cara basolateral. Las células se mantuvieron en estufa, como se ya se ha aclarado.

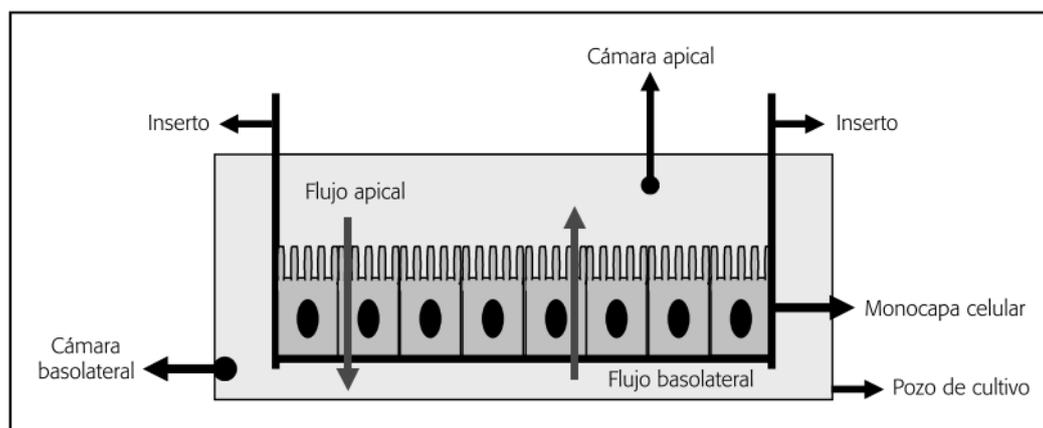


Fig. 3.8: Esquema del sistema Transwell. Adaptado de (Castillo & Chiriboga 2006).

El cultivo de células epiteliales sobre filtros porosos imita las condiciones *in vivo* del epitelio pulmonar debido a la formación de uniones intercelulares estrechas y a la polarización apical y basolateral de las células. La resistencia eléctrica transepitelial (TEER, por sus siglas en inglés *Trans epithelial Electrical Resistance*) se utiliza para evaluar las funciones de barrera de estas células sobre los soportes porosos. Cuando se mide la resistencia eléctrica, una corriente continua pasa a través de las vías transcelular y paracelular. La resistencia transcelular es principalmente consecuencia de la existencia de una membrana apical y una basolateral, mientras que la resistencia paracelular es el resultado del contacto célula-sustrato, así como también del contacto célula-célula. La expresión de proteínas específicas de

las uniones estrechas tiene una gran influencia sobre la resistencia epitelial. De esta forma, los valores de TEER reflejan las estructuras físicas y las propiedades de filtro de los cultivos epiteliales. Además, su medición provee una medida indirecta de la formación de uniones estrechas y por lo tanto se emplea habitualmente como un marcador para la disrupción de la capa epitelial (Stewart *et al.* 2012)

La resistencia eléctrica de la monocapa celular se midió colocando un electrodo en la cara apical y otro en la cara basolateral de cada inserto. El electrodo se conectó a un voltímetro (EVOM 2-TEER, Millipore, USA), que transformó los valores de potencial entre ambos compartimentos a resistencia. Para las mediciones se requirió la calibración previa del equipo sumergiendo el electrodo en medio de cultivo y PBS. Los valores de *TEER* fueron obtenidos mediante (ec. 3.6):

$$Teer = (R_m - R_h) \times A \quad (3.6)$$

Donde R_m es la resistencia de la muestra, R_b es la resistencia del blanco (inserto Transwell sin células, solo medio de cultivo) y A el área superficial del inserto Transwell.

Valores mayores a $150 \Omega \times \text{cm}^2$ (resistencia del transwell) y constantes en el tiempo indican la integridad de la monocapa celular, como se desprende de medir experimentalmente este valor.

Cuantificación de IL-8

La interleuquina 8 (IL-8) es una de las citoquinas más importantes asociadas con los procesos inflamatorios y es fundamental en la modulación de la respuesta inmunológica. Es liberada por macrófagos, monocitos, linfocitos y células endoteliales, y en particular por la línea celular Calu-3 (Aznar-Oroval *et al.* 2010). Por esta razón, se la eligió como marcador de estrés ante la presencia de insulina libre e insulina complejada con CS.

Para la medición de IL-8 se plaquearon 15×10^4 células Calu-3 en placas de cultivo de 6 pocillos con fondo plano (Greiner bio one cat. 655180). Luego del plaqueo, las células se incubaron a 37°C , 4,5% CO_2 , durante 4 días. Cuando las células alcanzaron entre un 70% de confluencia, se removió el sobrenadante y se estimularon con una solución de insulina $10 \mu\text{M}$ o de NP de tipo *core-shell* con una masa equivalente de I, en medio DMEM completo. Los sobrenadantes se recolectaron luego de 2, 10 y 120 min de incubación, y se cuantificó IL-8 humana mediante la técnica ELISA.

Ensayo ELISA (Enzyme -linked immunosorbent assay) de captura o *sandwich*

El anticuerpo de captura específico para la IL-8 (*Purified Mouse Anti-human IL-8 Monoclonal Antibody*, BD Pharmingen, cat n°554716) se diluyó en buffer Na_2PO_4 (0,1M pH=9) (dilución 1/250) y se incubó durante toda una noche en cámara húmeda a 4°C (100µL/pocillo) en placas de ELISA (MaxiSorp Surface NUNC catálogo 439454).

Finalizado el tiempo de pegado del anticuerpo de captura, se lavaron las placas 3 veces con PBS 1x (200µL/pocillo) y se incubaron con DMEM completo durante 3 h a TA (200µL/pocillo). Finalizado este tiempo, se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween 0,5% v/v (PBS-T) y se sembraron los sobrenadantes de las muestras estimuladas con insulina y con las NP, sin diluir o diluidos, en medio DMEM completo (100µL/pocillo). En la misma placa, se sembró una curva patrón (estándar) de IL-8 (IL-8 Recombinante Humana, BD Pharmingen, cat n°554609). Se incubó durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Luego de 5 lavados con PBS-Tween 0,5% v/v (PBS-T) (200µL/pocillo), se incubaron las placas a temperatura ambiente 1 h con 100µL por pocillo del anticuerpo de detección *Biotinylated rat anti-human IL8 Monoclonal Antibody* (BD Pharmingen, cat n°554718), diluido 1/1000 en PBS-T.

Finalizado el tiempo de incubación con el anticuerpo de detección, se lavaron nuevamente las placas 5 veces con PBS-T y se continuó con el agregado de Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SAV-HRP, BD Pharmingen cat 554066), diluida 1/2000 en PBS-T (50µl/pocillo), durante una hora a TA. Finalizado este tiempo, las placas se lavaron y revelaron con una solución de orto-fenildiamina 1mg/mL (OPD Sigma P9029) en buffer Citrato-fosfato (ácido cítrico 0,025M, fosfato dibásico de sodio 0,05M; ph=5) y agua oxigenada 0,1% v/v (100µl/pocillo). Las placas se resguardaron de la luz durante 8-12 minutos y luego se detuvo la reacción con el agregado de H_2SO_4 2N (50µL/pocillo) y se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad).

Inmunocitoquímica

Para este ensayo, se diseñaron las nanopartículas de tipo core-shell pero empleando insulina marcada con tetrasulfoperilendiimida. Este tinte se eligió ya que su espectro de emisión corresponde al rojo cercano (excitación en 550 nm, emisión en 610 nm aprox.), presenta excelente fotoestabilidad y posee alto rendimiento cuántico (Li *et al.* 2009). La marcación se realizó en el laboratorio de **Síntesis de sondas fluorescentes orgánicas para aplicación en estudios de sistemas biológicos y materiales funcionales** del CIHIDECAR, FCEN, UBA. Sucintamente, se preparó una solución 0.46 mM de la sonda tetrasulfoperilendiimida (sulfoPDI) en buffer pH 6,0 (0,1M PBS), el cual se activó con EDC (1 mg) y sulfoNHs (2,8 mg). Se dejó reaccionar 15 min a TA y se llevó a pH 8,5 para luego agregarse una solución

de insulina 1 mg/mL en buffer pH 8,5 (0,1M PBS). Se dejó reaccionar por 2 h y luego se dializó la reacción contra agua milliQ en cámara fría por 72 h, cambiando el agua de lavado hasta que no se detectase sonda fluorescente por espectroscopía de fluorescencia. La solución dializada se liofilizó obteniéndose la insulina marcada.

Se sembraron $8,0 \times 10^4$ células Calu-3 sobre cubreobjetos de 24 mm recubiertos con poly-D-lisina colocados en placas de 12 pocillos con medio de cultivo DMEM y se las dejó crecer como se indica en 3.2.10.1. Pasado ese tiempo se retiró el medio y se lavó con PBS (buffer *fosfato salino*) 3 veces. Se procedió a la estimulación de las células con $10 \mu\text{M}$ de I libre, como control, o nanopartículas I-CS de tipo core-shell con una masa equivalente de I durante 120 minutos en medio DMEM. Luego se descartó el medio de cultivo y se realizaron 2 lavados con PBS ($500 \mu\text{L}$ por pocillo). Posteriormente, se fijaron las células con PFA (paraformaldehído) 4% durante 20 min a TA y se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno. A continuación se permeabilizaron las células con Tritón 0,05% en PBS, 10 min a TA ($400 \mu\text{L}$ por pocillo) para permitir que el anticuerpo primario pueda acceder a su blanco. Se realizaron 2 lavados con PBS de 10 min y un bloqueo con solución de BSA, 3%, en PBS durante 1h a TA. Transcurrido ese tiempo, se descartó la solución y se agregó la dilución del anticuerpo primario (*Anti-Occludin Monoclonal Antibody* (mouse), N° 33-1500, Thermo Fisher Inc, Invitrogen) en BSA 3%. Se incubaron durante 1 h a TA. Se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS. Posteriormente se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (*Anti-mouse IgG-Alexa Fluor 488* (A-11034), Molecular Probes, Invitrogen, OR, USA) durante 1 h a TA. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS. En este caso se realizó co-tinción con TO-PRO 3 (Thermo Fisher Scientific, Inc.), $1 \mu\text{M}$ (1/1000 en BSA 3% en TTBS), para marcar los núcleos de las células. Se incubó con este colorante 10 min a TA en oscuridad y se lavó 3 veces con PBS. Finalmente se realizó el montaje colocando los vidrios sobre una gota de medio de montaje Mowiol (4-88 (Poli-vinil alcohol) N° 81381) ($80 \mu\text{L}$ por vidrio).

Se adquirieron imágenes mediante microscopía confocal de fluorescencia, empleando un módulo confocal Olympus FV1000 con un microscopio invertido Olympus IX81, equipado con diodos láseres de 405, 488, 515, 543 y 635 nm. El objetivo usado fue 60X PlanApo N de apertura numérica 1,42. Las imágenes se procesaron con el Software FluoView v. 1.7c.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta etapa se avanzó con la caracterización de los complejos formados por Insulina (0,2% p/p) y tres concentraciones de CS. Los complejos así formados, se denominan I-CS 10^{-x} % p/p, con $x = -2, -3, -4$. De esta manera, I-CS 10^{-2} % p/p denota el complejo formado con una concentración de 0,2% p/p de insulina y $1 \cdot 10^{-2}$ % p/p de CS.

3.3. DETERMINACIÓN DEL pH ÓPTIMO PARA LA INTERACCIÓN ELECTROSTÁTICA ENTRE I Y CS

El método de autoensamblaje molecular implica la maximización de las interacciones electrostáticas entre dos especies cargadas. En ese sentido, es de suma importancia conocer las condiciones experimentales que favorecen estas interacciones y a nivel de soluciones de biopolímeros, esto puede lograrse definiendo cuidadosamente el rango de pH de que maximicen dichas interacciones (Schmaljohann 2006) (Kocak *et al.* 2017).

Como primer paso se determinó el potencial ζ de las especies libres y se las caracterizó en términos de su carga superficial. Experimentalmente, el potencial ζ se evaluó a partir de la movilidad electroforética de las partículas presentes en cada una de las soluciones. La conversión de movilidad en potencial se logró mediante la ecuación de Henry (Pérez *et al.* 2014)(Sogias *et al.* 2008). Los resultados de potencial ζ para cada especie, en función del pH se muestran comparativamente en la figura 3.9.

Puede observarse que dichos valores varían entre 25 mV a pH 2 y -35 mV a pH 6 para la I, con un punto de carga cero para la proteína de alrededor de pH 5, coincidentemente con el valor de punto isoeléctrico (pI) reportado en literatura (Hoemann & Fong 2017). La carga superficial para el CS se encuentra entre 6 mV a pH<6 y -20 mV a pH>7. El potencial electrocinético correspondiente a cero se situó alrededor de pH 6.5. La superposición de las curvas para ambas especies permitió establecer un rango de pH óptimo para maximizar la ocurrencia de interacciones electrostáticas entre el CS y la I, entre 5,0 y 6,5 (zona sombreada). En consecuencia, pH 6,0 fue elegido para la construcción de los nanocomplejos por la practicidad que implica ajustar este valor de pH.

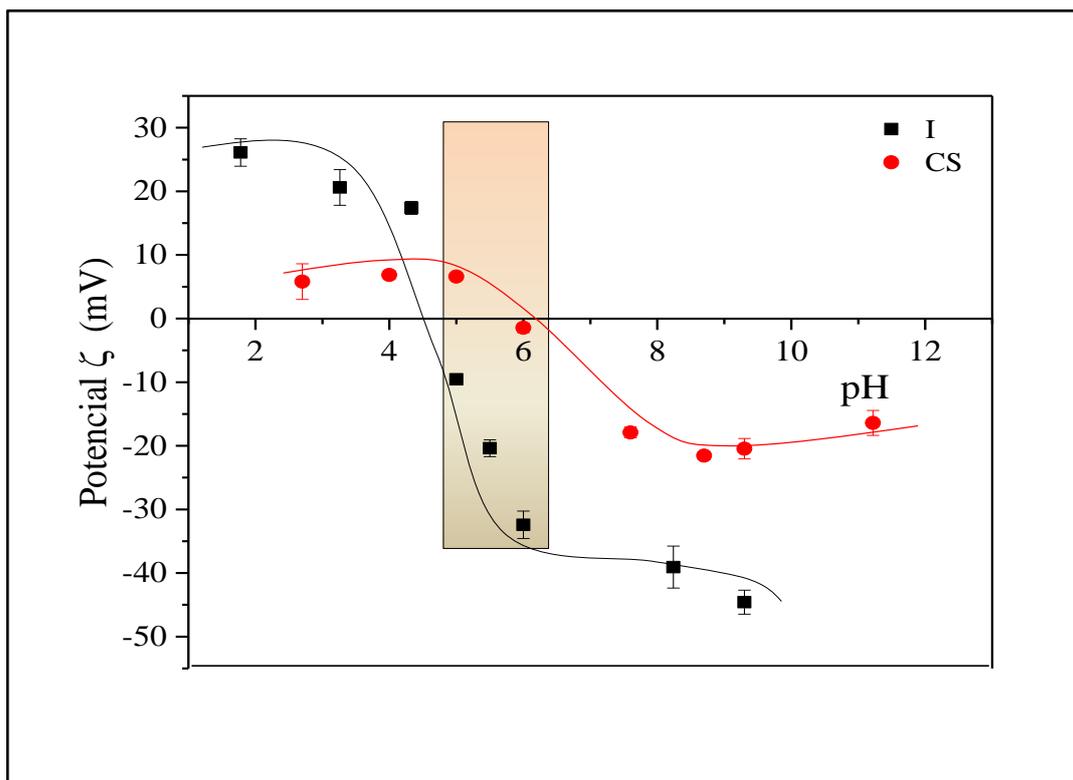


Fig. 3.9: Influencia del pH sobre potencial ζ de soluciones de Insulina 0.2 % p/p y quitosano $1 \cdot 10^{-3}$ %, p/p. La zona sombreada indica la de mayor probabilidad de ocurrencia de interacciones electrostáticas. Temperatura de las mediciones: 25 °C.

A continuación, se procedió a realizar una titulación de cargas a través del potencial ζ a pH 6 para los complejos formados, aumentando la concentración de CS mientras que la de la I se mantuvo constante, en 0.2%, p/p (Fig 3.10). Tanto la insulina como los complejos tienen valores de potencial entre -25 mV para 0% y 20 mV para 0,1 % p/p de CS. En este tipo de gráfico puede observarse el incremento gradual de la carga superficial, que tiende al de la especie encapsulante, al aumentar la concentración de CS.

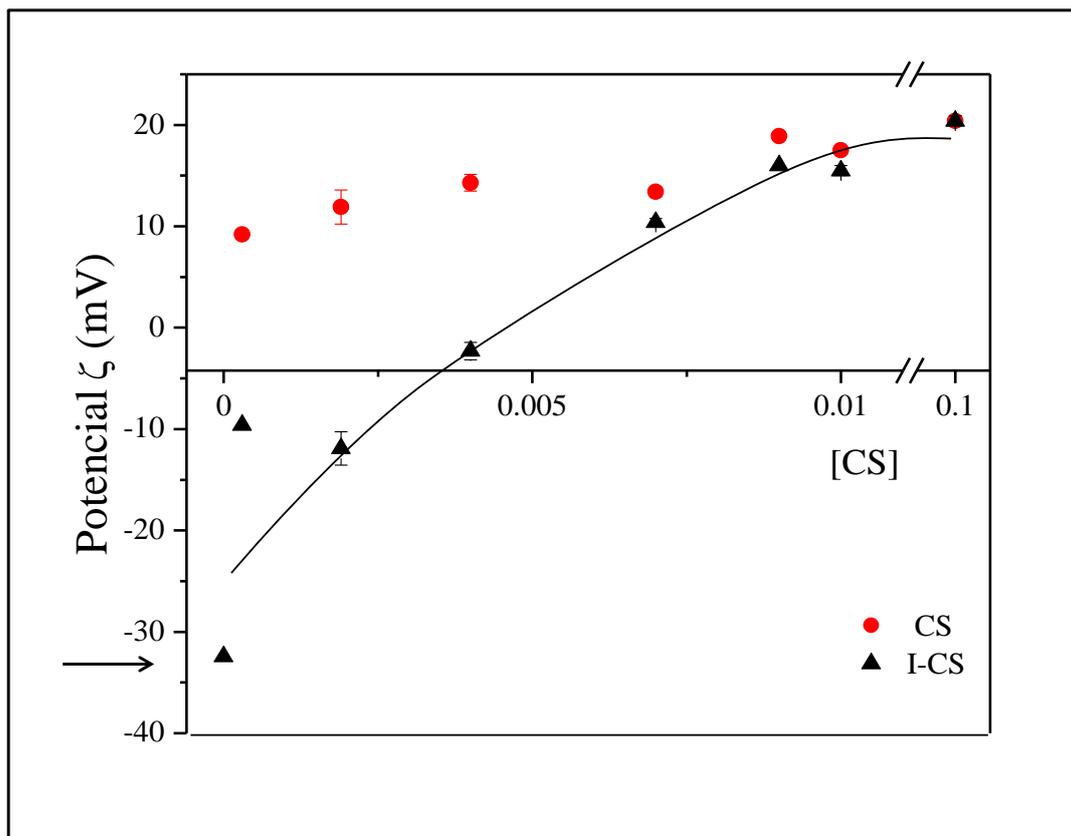


Fig. 3.10. Potencial ζ para Insulina 0.2%, p/p, con concentraciones variables de CS (I-CS), en comparación con soluciones de CS, a pH 6. La flecha negra indica el potencial ζ para la insulina pura. Temperatura de medición: 25 °C.

El potencial ζ también puede emplearse para investigar la estabilidad de los complejos. La literatura indica que los hidrocoloides electrostáticamente estables poseen potenciales ζ que exceden los 40 mV en valor absoluto (Kohn *et al.* 2007). Por lo tanto, la estabilidad física de los complejos I-CS no puede ser explicada solamente en términos de estabilización electrostática, sino que otras fuerzas también contribuirían (Van der Walls, interacciones estéricas, etc) (Sogias *et al.* 2008). Para los complejos con concentraciones de hasta 0,003% p/p de CS, los potenciales fueron significativamente más negativos que para el CS solo. Los complejos manifestaron valores positivos para concentraciones de CS 0,05%, p/p o mayores, acercándose a los valores correspondientes a las soluciones puras de CS. Para una concentración de CS de 0,1%, p/p, el complejo se aproximó a su valor de potencial más alto, muy cercano al correspondiente al CS libre. La carga superficial de saturación para el sistema I-CS se alcanzó para una concentración de polisacárido cercana a $1 \cdot 10^{-3}$ %, p/p. Esta saturación indicaría que los nano-complejos formados presentaron una nano-estructura de tipo *core-shell*, con la insulina formando el centro y el CS formando la capa externa (Karimi *et al.* 2013), respectivamente.

3.4. CINÉTICA DE AGREGACIÓN

En la literatura clínica referida a la insulina existen múltiples reportes sobre la autoagregación y la formación de fibrillas por parte de esta proteína, lo cual ocurre bajo distintas condiciones de concentración, pH y temperatura (Prusty & Sahu 2013)(Xu *et al.* 2011). En este contexto, la autoagregación de las moléculas de I para formar dímeros, hexámeros y agregados moleculares ya ha sido reportada (Dunn 2005). Por otro lado, también existen reportes sobre la autoagregación del CS en función de la concentración, la cual comienza a partir de 0,1% p/p, (mayor a las empleadas en esta Tesis) como han descripto Phillipova y col. (2001) (Philippova *et al.* 2001).

Frente a esta perspectiva se decidió estudiar la cinética de agregación de cada polímero por separado además de la correspondiente a la mezcla, para distintos pHs y concentraciones variables de ambas sustancias, haciendo foco en cómo la presencia del CS puede modificar el perfil de agregación de la insulina (Tang *et al.* 2013)(Weijers *et al.* 2006). Los estudios de turbidimetría aplicados a los sistemas proteína-polisacárido se justifican al considerar que la turbidez o absorbancia, es proporcional tanto al tamaño como a la concentración de las partículas presentes en la solución (Tsuboi *et al.* 1996).

En la Fig. 3.11 se muestra la absorbancia en función del tiempo registrada para tres concentraciones diferentes de CS a pH 2 y pH 6 (Fig. 3.11a), para los complejos I-CS a pH 2 (Fig. 3.11b) y pH 6 (Fig. 3.11c). El polisacárido no registró cambios notorios en la absorbancia para los pHs considerados, lo que indicaría la ausencia de agregación según la turbidez determinada, debido a las bajas concentraciones empleadas (Fig. 3.11a). La Figura 3.11b muestra los resultados para los complejos I-CS al pH de preparación de la mezcla. Ni la insulina libre ni los complejos evidenciaron cambios en la absorbancia, lo que podría interpretarse para estos últimos como un indicio de co-solubilidad, lo que significaría que las interacciones electroestáticas entre ambos biopolímeros se encontrarían minimizadas. Al mismo tiempo se minimizarían las fuerzas repulsivas entre macromoléculas. La proteína tiene carga positiva ya que su punto isoeléctrico se ha reportado con un valor de pI ~ 5,4 (Smirnova *et al.* 2015). Por otro lado, el CS está positivamente cargado a pH<6.5, debido a la protonación de grupos amino (Mukhopadhyay *et al.* 2013).

A pH 6, las condiciones de nano-complejamiento se ven favorecidas mediante interacciones electroestáticas ya que la repulsión electroestática estuvo minimizada. A pH 6 la insulina presenta cargas superficiales negativas mientras que el CS positivas. La absorbancia de la solución de proteína no exhibió cambios en el tiempo, pudiendo atribuir este comportamiento a que el proceso de agregación puede ocurrir a una escala limitada o a muy baja velocidad (Fig 3.11c). Esto indicaría que los agregados proteicos formados no son lo suficientemente grandes como para dispersar luz, ya que la agregación no debería verse impedida pues la I está cerca de su pI y la concentración se encuentra por encima de la concentración crítica de agregación (Sharma *et al.* 1996).

Para el caso de los complejos I-CS a pH 6, éstos mostraron valores iniciales de absorbancia bajos que fueron incrementándose al transcurrir el tiempo. Los cambios en la absorbancia podrían atribuirse a la dispersión ocasionada por el incremento en la turbidez de la solución de proteína (Stirpe *et al.* 2011). La turbidez, entendida como una indicación indirecta del tamaño de los agregados de I inducidos por la presencia del CS, varía de manera inversamente proporcional a la concentración de la solución de CS. Comportamientos similares han sido reportados previamente por Mao *et al.* (Mao *et al.* 2011) quienes estudiaron la influencia que el pH posee en la formación de complejos de polielectrolitos compuestos de insulina y derivados del quitosano, empleando técnicas como DLS y titulación turbidimétrica.

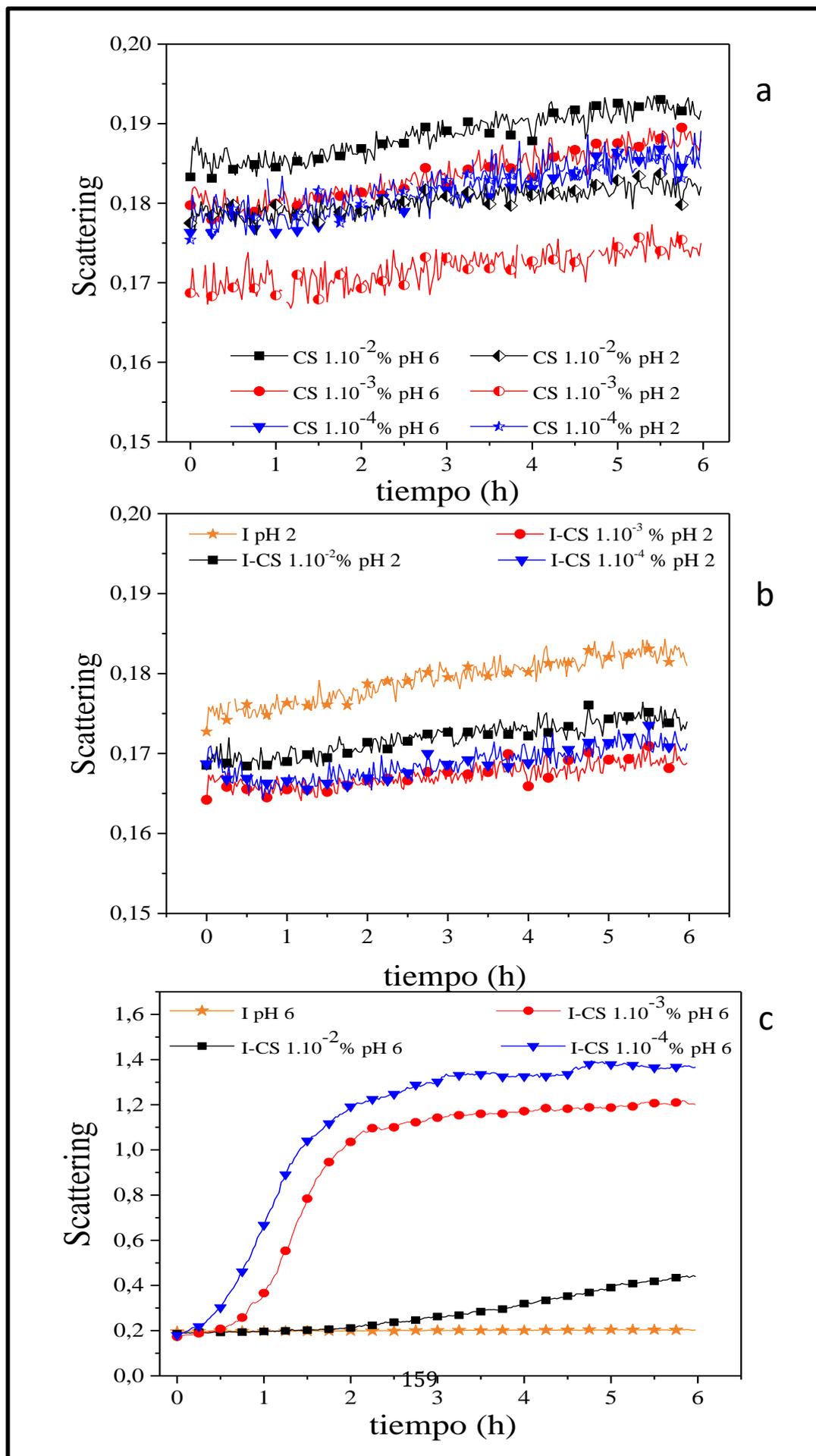


Fig. 3.11: Dependencia temporal de la dispersión múltiple a 500 nm para soluciones de CS a pH 2 y 6 (a), complejos I-CS a pH 2 (b) y pH 6 (c). Se incluyen datos para insulina libre, 0.2 %, p/p, como control. Las concentraciones de CS fueron $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ y $1 \cdot 10^{-2}$ %, p/p. La temperatura de las mediciones fue de 25°C.

El tiempo necesario para el incremento de la turbidez varió dependiendo de la cantidad de CS y por lo tanto dicha concentración influenció el estado de agregación de la proteína en términos de tamaño, forma y la cinética del proceso. La agregación de proteínas requiere que las moléculas en solución posean de un estado termodinámico específico previo a su ocurrencia (Karimi *et al.* 2013). Dicho estado ha sido reportado para mioglobina (Fandrich *et al.* 2003), BSA (Holm *et al.* 2007), β -lactoglobulina (Hamada *et al.* 2014) y para concentrados de proteína de suero lácteo y ovoalbúmina (Perez & Pilosof 2004).

A fin de poder caracterizar de manera cuantitativa la agregación de los nano-complejos I-CS, se aplicó el procedimiento propuesto por Stirpe y col. (2011) (Stirpe *et al.* 2011). La aplicación de un modelo cinético a los datos experimentales de absorbancia en función del tiempo permitió la obtención de los parámetros α (s^{-1}) y β (adimensional), que corresponden a la velocidad y al orden de formación de agregados, respectivamente (Jund *et al.* 2001)(Hamada *et al.* 2014). En estos términos, se observó una mayor velocidad de formación para los sistemas conteniendo las concentraciones más baja de CS ($1 \cdot 10^{-3}$ and $1 \cdot 10^{-4}$ %, p/p), tal como indican los valores de la Tabla 3.1. Por otro lado, para la I y los complejos I-CS $1 \cdot 10^{-2}$ %, p/p, los valores de α fueron menores a los anteriores. Para la I pura, este valor está en línea con la premisa de que en el caso de proteínas puras, la agregación ocurriría a baja velocidad en ausencia de cosolutos.

Tabla 3.1 Parámetros cinéticos que describen el proceso de agregación a partir del ajuste de datos experimentales. El ajuste se realizó a partir de las curvas de absorbancia para insulina pura y para los complejos I-CS. Las muestras se prepararon a pH 2 y pH6; $n=3 \pm SD$.

Muestra	α^*	β^*
I	0.29 ± 0.01	2.2 ± 0.9
I-CS $1 \cdot 10^{-2}$ %	0.24 ± 0.06	4.1 ± 0.9
I-CS $1 \cdot 10^{-3}$ %	0.65 ± 0.09	3.2 ± 0.7
I-CS $1 \cdot 10^{-4}$ %	0.76 ± 0.16	2.1 ± 0.8

Un periodo o fase *lag* para la mayor concentración de CS, sugiere que el polisacárido tuvo impacto en la agregación de la I, lo que se tradujo en la mayor cantidad de tiempo requerida para que el proceso de

agregación comenzase. El largo intervalo observado para este complejo puede atribuirse a la existencia de etapas secuenciales o múltiples durante la agregación de la proteína, fenómeno que depende de la presencia de CS en la solución mezcla.

Si bien la agregación manifestó un comportamiento sigmoideo para todas las mezclas, alcanzando un *plateau* luego de dos horas aproximadamente, el complejo I-CS 1·10⁻²%, p/p exhibió una fase *lag* claramente observable. Esta fase puede atribuirse al tiempo que requieren las moléculas de la proteína para adquirir el estado que favorece la agregación. Dicho tiempo puede variar de acuerdo a la cantidad de CS en el seno de la solución. Para cada par específico proteína-polisacárido, existe una relación óptima para la cual las interacciones electrostáticas alcanzan un equilibrio entre repulsión y asociación, permitiendo la formación de diferentes patrones de agregados a un pH determinado. El polisacárido, siendo un polielectrolito capaz de cubrir la superficie de los agregados de insulina, como por ejemplo en el caso de I-CS 1·10⁻²%, p/p, podría estar aumentando la repulsión electrostática entre agregados y simultáneamente disminuyendo la velocidad de la asociación espontánea.

El parámetro β completa el análisis de la cinética de agregación. El proceso de formación de agregados proteicos se vuelve más cooperativo al involucrar la formación de intermediarios, como sugiere la presencia de valores bajos de β en la Tabla 3.1 (Juarez *et al.* 2009)(Matalanis *et al.* 2011). Los mayores valores indican que se formaron más intermediarios al avanzar la agregación de la I, para I-CS 1·10⁻²%, p/p. por lo tanto, puede concluirse que el CS modula la asociación de moléculas de proteína.

Pudo observarse que la velocidad de incremento de absorbancia fue inversamente proporcional a la concentración de CS. Este resultado pone de manifiesto la disminución del fenómeno de floculación por puenteo, en analogía al proceso de floculación que ocurre entre gotas de aceite de una emulsión O/W cuando existe un polisacárido con actividad interfacial como agente surfactante (Dickinson 2009). Dicho fenómeno puede explicarse en los siguientes términos: las largas cadenas de polisacárido pueden unir más de un agregado proteico, formando *clusters* moleculares, debido a la neutralización de la carga y a efectos del puenteo (Fig. 3.12). Este fenómeno es más pronunciado a bajas concentraciones de polisacárido, donde la superficie de los agregados se encuentra sólo parcialmente cubierta. Similares resultados han sido ya publicados en el informe pionero de Mao *et al.* (Mao *et al.* 2006) y en el más actual de Sogias *et al.* (Sogias *et al.* 2008), quien atribuyó los cambios en la absorbancia de soluciones de mucina a la formación de *clusters* a bajas concentraciones de CS. Por otra parte, nano-complejos más pequeños se formaron para una relación de masa I/CS baja.

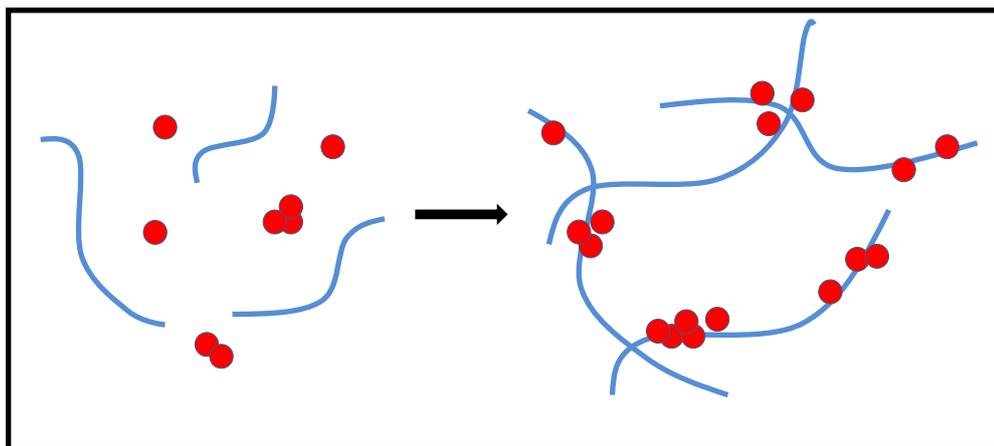


Fig. 3.12: Fenómeno de floculación por puenteo. Las cadenas de polisacárido (azul) se unen a agregados proteicos (rojo), formando complejos.

Por lo tanto, los resultados presentados a partir de este punto en lo concerniente a complejos I-CS corresponden a soluciones medidas luego de 6 horas de ocurrida la mezcla y el respectivo ajuste a pH 6: este tiempo se consideró suficiente para trabajar en condiciones en las cuales el proceso de agregación de la proteína hubo alcanzado el equilibrio (*plateau*).

3.5. TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS I-CS

La Fig. 3.13 muestra la distribución de tamaño para la insulina expresada en Volumen a los pHs 2 y 6. La proteína exhibe un comportamiento monomodal para ambos pHs. A pH 2 el pico máximo, en 1,8 nm, posee un ancho de 0,6 nm. El área bajo ese pico incluye monómeros y también estructuras mayores a un dímero. A pH 6, el comportamiento monomodal se mantiene pero el máximo se localiza en 2,6 nm centrado entre 2 y 5 nm. Al respecto, puede comentarse que el estado de auto asociación de la proteína puede verse influenciado por propiedades intrínsecas de la solución, tales como la concentración de la proteína, el pH y la fuerza iónica, o extrínsecas como la temperatura, las radiaciones y la potencia de un campo eléctrico, en caso de aplicarse (van der Linden & Venema 2007)(Wu *et al.* 2016).

Para los complejos I-CS, a pH 2, la distribución fue también monomodal (Fig. 3.13b) pero a medida que la concentración de CS se incrementó, el pico máximo decrece simultáneamente con el índice de polidispersidad (PI). De esta manera, los diámetros medidos para 1.10^{-20} p/p de CS, son consistentes con una estructura monomérica/dimérica de la insulina. Se supone entonces que el CS modificaría la estructura nativa de la I a través de interacciones moleculares no sólo de carácter electrostático sino también mediante interacciones hidrofóbicas (Matalanis *et al.* 2011). Las regiones no polares de la

superficie proteica podrían interactuar con las regiones menos polares del polisacárido, modulando la posibilidad de asociación proteica o disociación oligomérica.

A pH 6, los complejos mostraron un comportamiento multimodal (Fig. 3.13c) y la distribución en su totalidad se desplazó hacia tamaños menores al aumentar la concentración de CS. La distribución de tamaño para el complejo I-CS $1.10^{-4}\%$, p/p, manifestó dos picos, en 196 y 328 nm (Tabla 3.2). Para I-CS $1.10^{-3}\%$, p/p, los picos se encontraron en 92, 130 y 188 nm. En el caso de I-CS $1.10^{-2}\%$, p/p se manifestó un pico en 130 nm con un hombro en 96 nm. El notable cambio para este sistema mixto a pH 2 y a pH 6 se debería a que para el último pH, los polímeros presentan cargas superficiales opuestas y las interacciones electroestáticas se ven favorecidas. Otra posible explicación se relaciona con la concentración relativa de cada polímero. De manera general, puede decirse que el tamaño de partícula decrece al incrementarse la concentración de CS. Dicho efecto puede explicarse con una disminución de la “floculación por puenteo” antes explicada. Estos resultados son compatibles con los cambios observados en la absorbancia de los distintos sistemas en la sección 3.4.

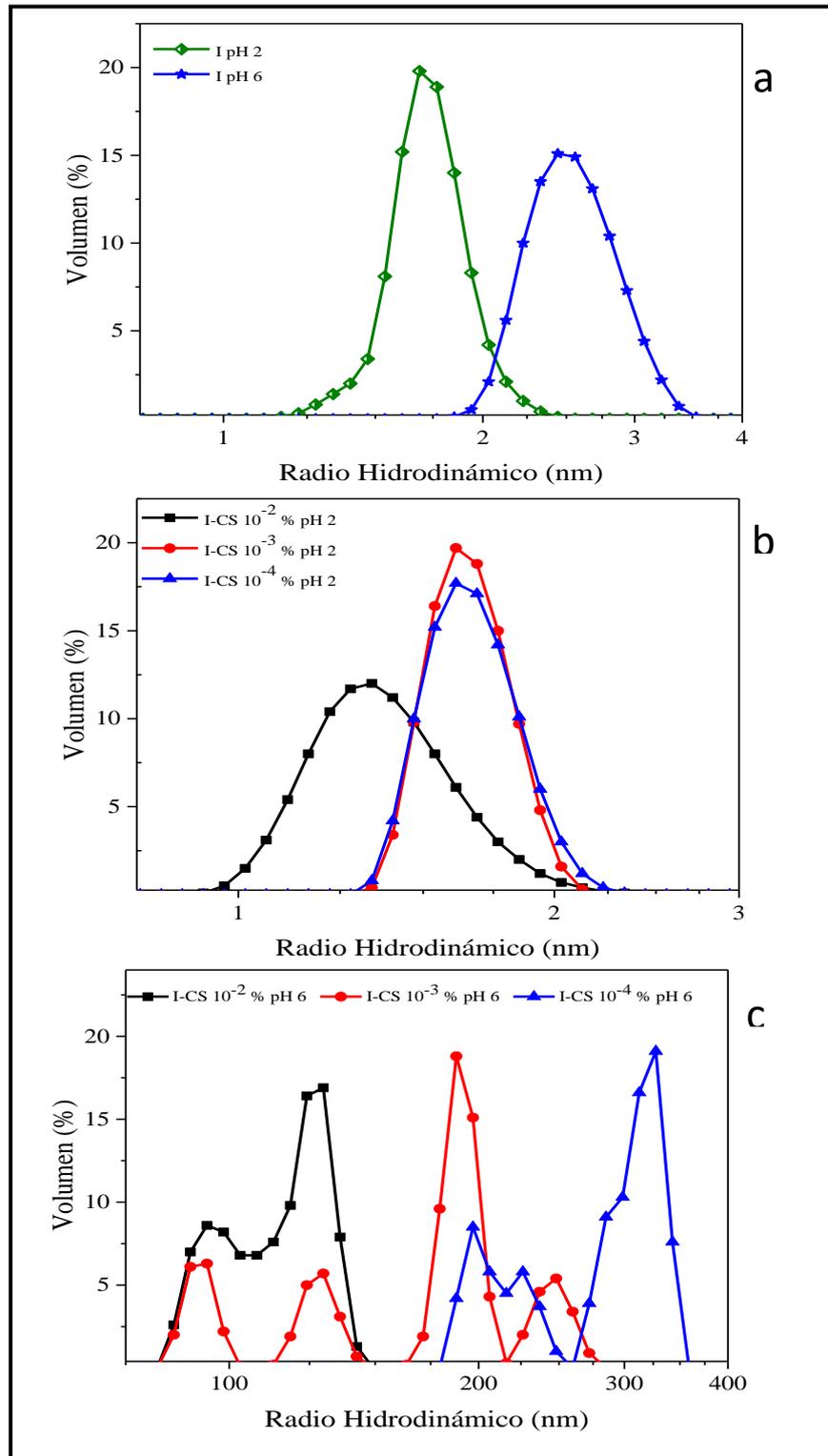


Fig. 3.13: Distribución de tamaño de partícula (obtenidos del análisis de DLS) para Insulina a pH 2 y 6 (a) Curvas obtenidas para complejos I-CS a pH 2 (b) y pH 6 (c). La proteína pura, 0,2 %, p/p, se muestra como control. La concentración de CS en las mezclas fue de $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ y $1 \cdot 10^{-2}$ %, p/p. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

La Tabla 3.2 resume los parámetros derivados del análisis de distribución de tamaño de partícula. A pH 2 los diámetros medidos coinciden con estructuras cuaternarias diméricas mientras que para pH 6 los diámetros son consistentes con la forma hexamérica de la proteína, en concordancia con la literatura (Dunn 2005). El peso molecular MW fue estimado empleando la herramienta de cálculo *MW & Shape Estimates*, incluida en el software del equipo y comentada en la sección 3.2.2; para su empleo se consideró a la insulina como una proteína globular.

Tabla 3.2 Parámetros derivados del análisis de tamaño de partícula, obtenidos mediante DLS, para la insulina pura y los complejos I-CS, a pH 2 y 6. $n=3\pm SD$; 25°C.

pH 2				pH 6	
DISTRIBUCIÓN MONOMODAL				DISTRIBUCIÓN MULTIMODAL	
Muestra	Pico (nm)	MW (kDa)	PI	Muestra	Picos (nm)
I	2.00 ± 0.09	13 ± 1.5	0.33 ± 0.09	I	2.6 ± 0.02
I-CS 10 ⁻² %	1.50 ± 0.04	8.5 ± 0.6	0.48 ± 0.11	I-CS 10 ⁻² %	95, 129
I-CS 10 ⁻³ %	1.70 ± 0.03	11 ± 0.6	0.47 ± 0.15	I-CS 10 ⁻³ %	92, 130, 188
I-CS 10 ⁻⁴ %	1.70 ± 0.06	12 ± 1.0	0.61 ± 0.18	I-CS 10 ⁻⁴ %	196, 328

Por otro lado, se exploró el comportamiento de la distribución de tamaño para $pH \geq 6$, ya que si bien el pH de trabajo es 6, el pH del espacio extravascular pulmonar oscila entre 6 y 7, por lo que resulta de sumo interés el tamaño de las nanopartículas en el rango indicado (Effros & Chinard 1969).

Con respecto a los complejos I-CS 1.10⁻² % p/p, a pH 6 se obtuvieron picos en 34 y 229 nm y otro en 412 nm para pH 7. Para los complejos I-CS 1.10⁻⁴ % p/p, a pH 6 se obtuvo un solo pico en 307 nm y dos para pH 7, en 95 y 412 nm (Fig. 3.14).

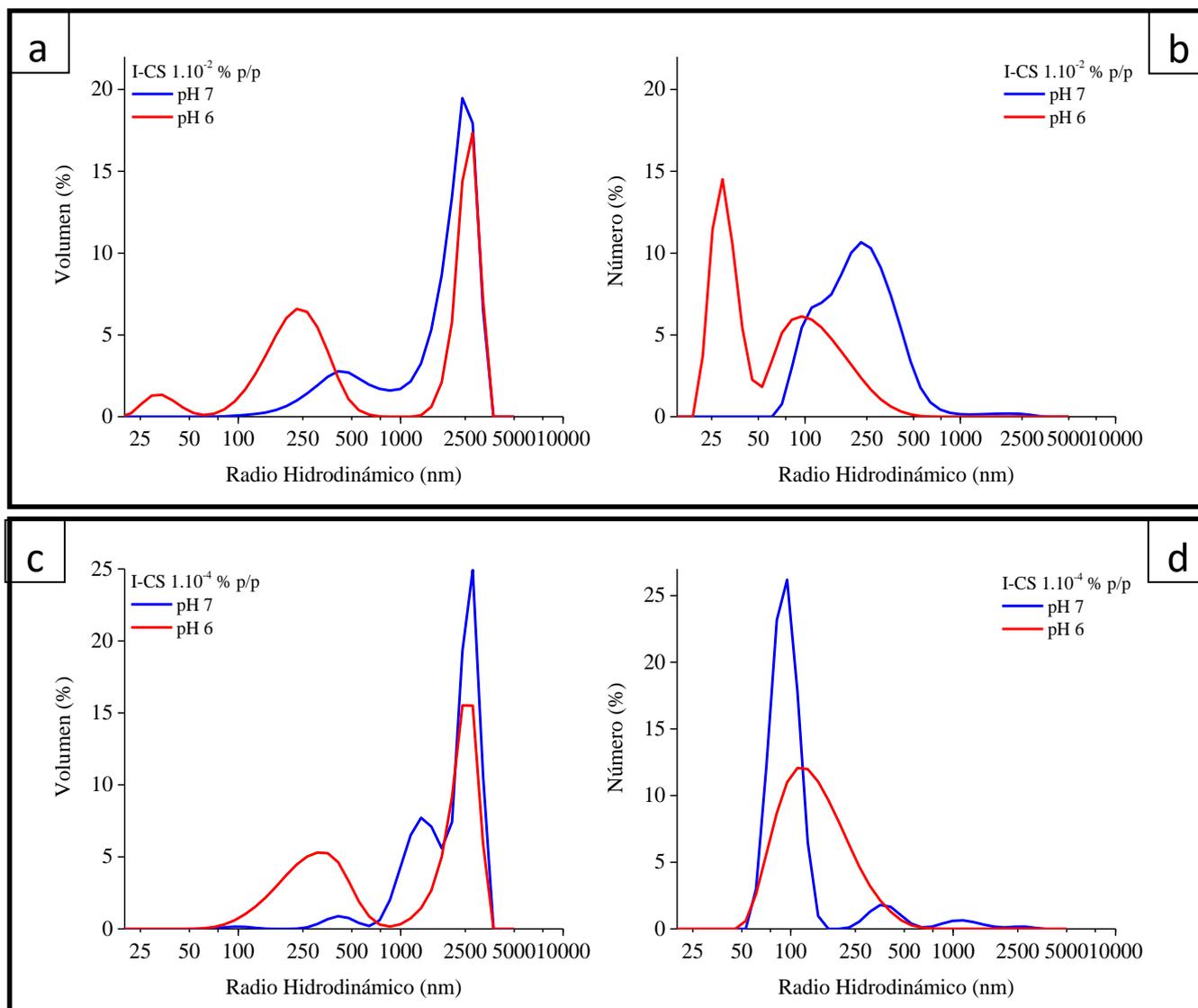


Fig. 3.14. Distribución de tamaño de partícula expresado volumen y en número para complejos I-CS 1.10⁻² % p/p (a-b) y I-CS 1.10⁻⁴ % p/p (c-d) para pH 6 y 7. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

Es notable que para ambos complejos, al aumentar el pH la distribución se desplaza hacia tamaños de partícula mayores. De hecho, para pH mayores a 8, los tamaños resultaron demasiado grandes, cayendo fuera del rango de medición del equipo.

Este resultado refuerza la elección del pH 6 como pH de trabajo a la hora de ensamblar las nanopartículas.

3.6. ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES REOLÓGICAS DE LAS SOLUCIONES ICS

En la Figura 3.15a se muestran las curvas de flujo para los complejos y para la insulina, a pH 6. Puede notarse que el esfuerzo de corte aumentó con la velocidad de deformación (*sheer rate*), para todos los casos (al menos en las regiones estudiadas). La Figura 3.15b muestra la variación de la viscosidad dinámica con la velocidad de deformación. Puede observarse tanto para la I como para el complejo I-CS 1.10⁻²⁰%, p/p, un comportamiento no Newtoniano, exhibiendo mayores viscosidades que el resto de los complejos para velocidades mayores a 200 s⁻¹. Esto indicaría que la proteína es la que definió el comportamiento reológico de las mezclas con la más alta concentración de CS. Para los complejos con concentraciones intermedias, los comportamientos fueron muy similares entre sí (Fig 3.15 b).

Se empleó el modelo de Ley de Potencia para obtener parámetros cuantitativos a partir de las curvas de flujo. Dichos parámetros se muestran en la Tabla 3.3. Los altos coeficientes de correlación obtenidos ($0.988 < R^2 < 0.998$) indican que el modelo ajustó de manera apropiada los datos experimentales.

Un incremento en la concentración de CS provocó una disminución en la viscosidad aparente K, en comparación con la I pura. De esta manera, la I pura y el complejo I-CS 1.10⁻²⁰%, p/p presentaron los mayores valores de K mientras que para I-CS 1.10⁻³⁰%, p/p e I-CS 1.10⁻⁴⁰%, p/p, éste parámetro fue menor. Valores menores que los de la solución de I indicarían un aumento en la co-solubilidad de los biopolímeros y la formación de un arreglo molecular poco entrelazado en el seno de la solución mezcla. Este fenómeno ha sido atribuido con anterioridad a un efecto de dilución (Martínez-Padilla *et al.* 2015). Las moléculas de CS interferirían con la formación de hexámeros de I a pH 6, disminuyendo el efecto de floculación. Cabe recordar que el comportamiento de flujo asociado a $n=1$ indica comportamiento Newtoniano mientras que $n < 1$ representa un fluido pseudoplástico ya que la pendiente de la curva decrece a medida que la velocidad de deformación se incrementa (Le *et al.* 2017).

Dos tendencias pueden entonces observarse: para la I pura con comportamiento pseudoplástico y para los complejos - con valores de n entre 0.8 y 1- denotando claramente la tendencia de éstos hacia un carácter Newtoniano, relacionado con un efecto de dilución previamente reportado, a medida que la concentración de CS decrece. De esta manera, tres etapas pueden caracterizarse a partir de los datos reológicos, en concordancia con el tamaño de partícula, el potencial ζ y las mediciones de absorbancia. La primera, relativa a la I pura, con los valores más altos de K y n , presenta una carga superficial negativa, haciendo a la proteína altamente estable debido a la repulsión electrostática molecular. En términos generales, la disminución de la viscosidad que se observó para los complejos se debió a la influencia del CS. La disminución fue mayor para concentraciones crecientes de CS, con la tendencia simultánea hacia un comportamiento Newtoniano.

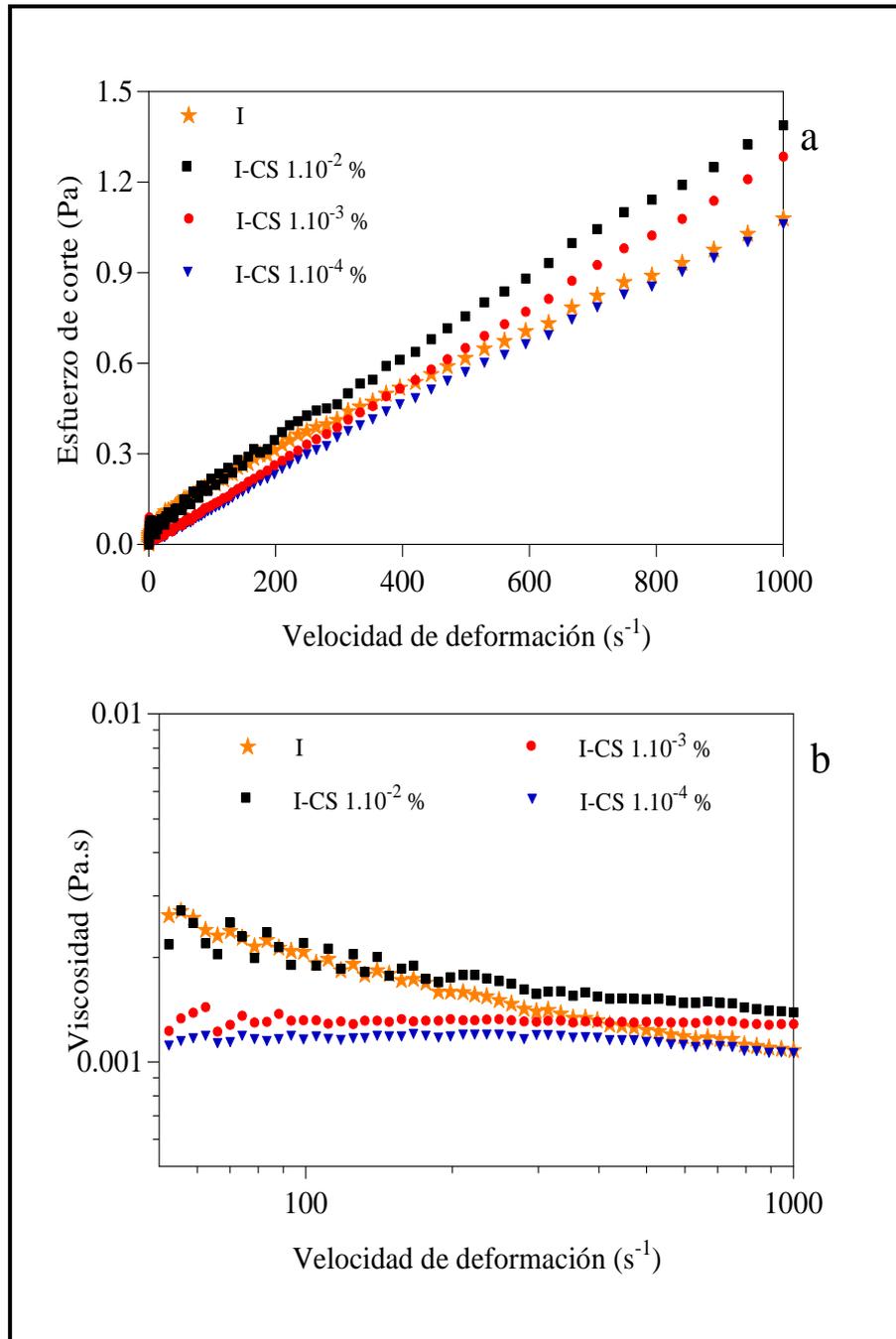


Fig. 3.15: Curvas de flujo para los complejos I-CS (a) y viscosidad (b), registrados a pH 6. Temperatura de medición: 25 °C.

Tabla 3.3 Índices de Consistencia (κ) y de comportamiento de flujo (n) para insulina pura y los complejos I-CS, derivados del ajuste con una ley de potencia. Las muestras se analizaron a pH 6. $n=3\pm SD$.

Muestra	Parámetros Ley de Potencia		
	$K \cdot 10^3$ (mPa.s ⁿ)	n	R ²
I	8.451 ± 0.505 ^a	0.695 ± 0.007 ^c	0.994
I-CS 10 ⁻² %	4.940 ± 0.495 ^b	0.813 ± 0.012 ^b	0.988
I-CS 10 ⁻³ %	1.590 ± 0.289 ^c	0.969 ± 0.028 ^a	0.992
I-CS 10 ⁻⁴ %	1.764 ± 0.096 ^c	0.928 ± 0.006 ^a	0.998

*promedio \pm SD, n=3. Datos obtenidos a 25°C. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, a $p < 0.05$.

Esta disminución puede ser explicada por la adsorción de CS catiónico en la superficie de I cargada negativamente. A pH 6, ambas especies poseen cargas opuestas y el proceso de complejamiento ocurrió de manera particular. Cuando la concentración de CS es baja, el CS disponible fue insuficiente para cubrir los agregados aniónicos y la floculación se activa, dando lugar a nano-complejos de mayor tamaño y la viscosidad decreció levemente. Para concentraciones de CS mayores a 0,01 %, p/p se forman complejos de tipo *core-shell*, completamente rodeados de una capa de CS. Las fuerzas atractivas entre la I y el CS catiónico promueven la formación de una interfase I-CS y aumentan la viscosidad del sistema (Malvern-Instruments 2011)(Bohidar *et al.* 2005).

Como conclusión ante estos hallazgos, se propone el modelo de interacción de la Fig. 3.16, que resume los eventos y posibles resultantes para la insulina a medida que la concentración de CS aumenta. Este modelo de asociación molecular surge en base a los datos experimentales obtenidos para la distribución de tamaño de partícula, potencial ζ , absorbancia y propiedades de flujo. Las tres etapas mencionadas anteriormente para pH 6 se resaltan en la imagen.

Para CS 1·10⁻²%, no existen interacciones entre dímeros de I y CS, para pH < pI de la I; se formaron nanoestructuras tipo core-shell para pH > pI (Fig 3.16a). Para concentraciones de CS menores a 1·10⁻²%, se formaron nano-complejos de diferentes estructuras por medio de enlaces intermoleculares, para pH > pI (Fig 3.16b).

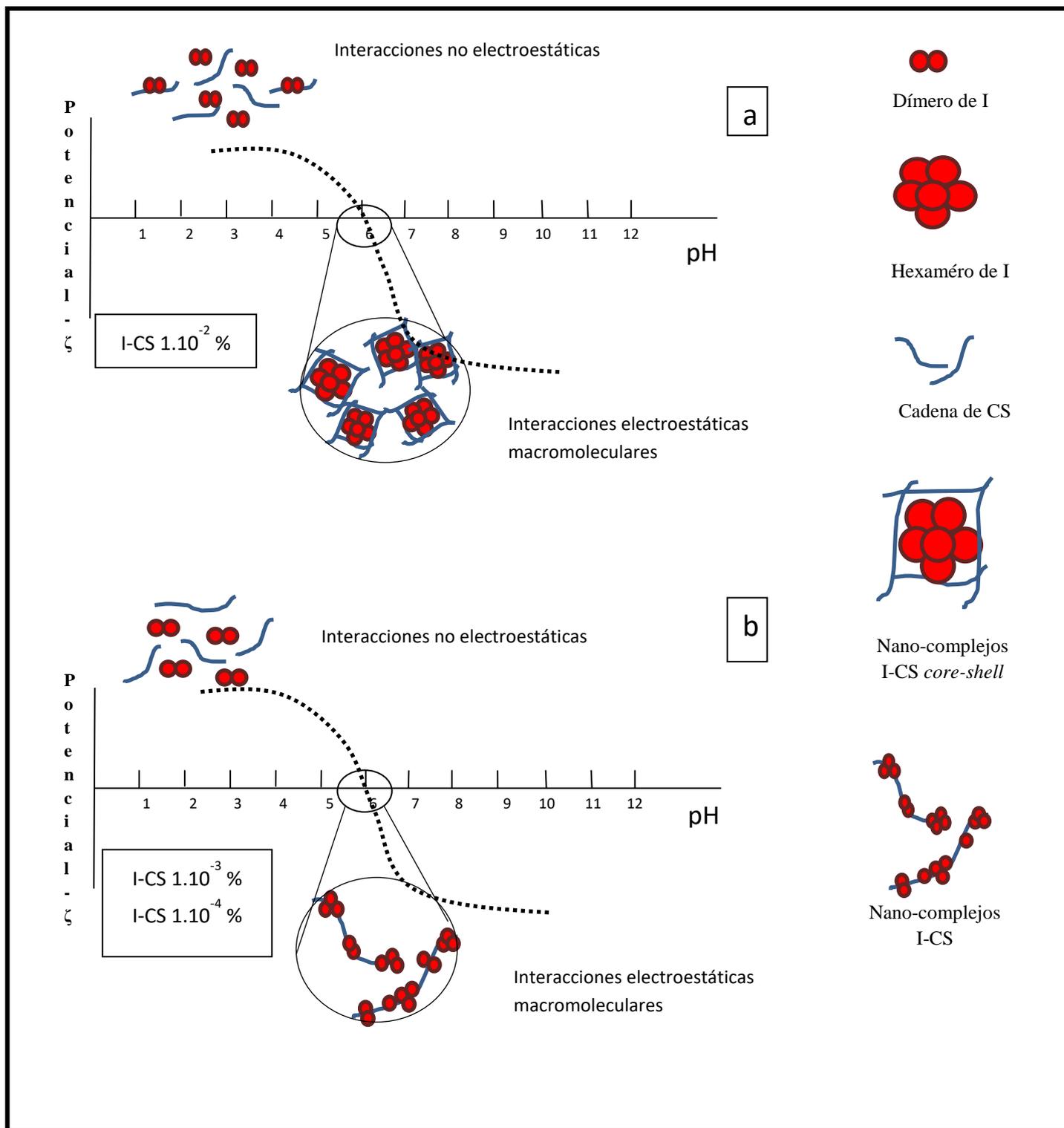


Fig. 3.16: Esquema que muestra las diferentes etapas del nano-complejamiento de las soluciones I-CS, moduladas por el pH y la concentración de CS.

3.7. MODELO DE ASOCIACIÓN

Integrando todos los resultados de secciones anteriores, estamos en condiciones de proponer un modelo configuracional para el ensamblado de insulina y CS mediante interacciones moleculares. Gráficamente, este modelo se representa en la Fig. 3.16: los fenómenos que experimentan las moléculas de I para concentraciones crecientes de CS a pH6 pueden dividirse en tres áreas.

El pI de la Insulina determina la existencia de un punto de inflexión. Para aquellos pH menores a 5,5, se observó la formación de dímeros de I, independientemente de la concentración de CS, tal como se determinó tras conocer los resultados de la distribución de tamaño (Malvern-Instruments 2011) , potencial ζ y absorbancia. Este fenómeno ocurrió a baja velocidad y fue menos cooperativo que en los sistemas constituidos con mayores concentraciones de CS, como se desprende de los parámetros obtenidos tras el ajuste de los datos de turbidez.

Para pHs mayores a 5,5, cuando la proteína posee una carga superficial negativa, se presentaron dos escenarios posibles. Por un lado, se formaron complejos *core-shell* para la mayor concentración de CS ($1 \cdot 10^{-2}\%$, p/p) (Fig. 3.16a). Esta solución presentó un comportamiento no Newtoniano con la viscosidad aparente más alta de las tres mezclas. Por otro lado, para las concentraciones más bajas de CS ($1 \cdot 10^{-4}$ y $1 \cdot 10^{-3}\%$, p/p), ocurrió el proceso de floculación, resultando en estructuras de gran tamaño, como lo indican los datos de DLS (Fig. 3.16b). Este proceso presentó velocidades más altas con menor cantidad de estructuras intermediarias, como se desprende al considerar los valores α y β obtenidos tras el ajuste de los datos de absorbancia en función del tiempo. Menores valores de viscosidad aparente indicarían además, la formación de estructuras moleculares débilmente entramadas (Wool 1993)(Cross 1970).

3.8. ULTRAESTRUCTURA

La estructura física de la I, CS y los complejos I-CS, previamente liofilizados, fue caracterizada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (Fig. 3.17). El quitosano control exhibió una naturaleza grumosa con superficies relativamente ásperas y pequeñas, características que pueden ser atribuidas a fuertes interacciones CS-CS (Korchagina & Philippova 2010)(Franca *et al.* 2008). A su vez, para los complejos I-CS puede observarse una forma semi-esférica. Las imágenes SEM revelaron entonces que la morfología superficial de la insulina se vio alterada luego del ensamblado con el polisacárido. La aglomeración de las muestras podría deberse al proceso de liofilización.

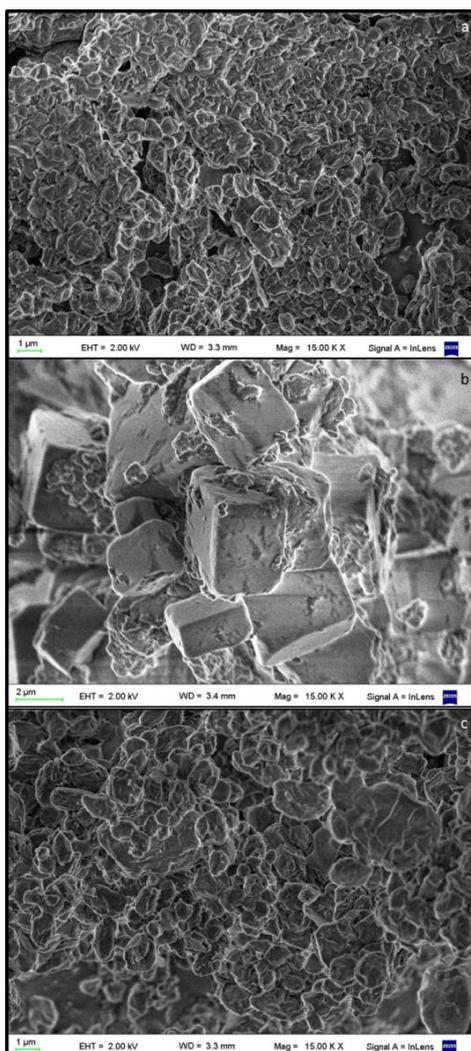


Fig. 3.17: Micrografías SEM de quitosano (a, $1 \cdot 10^{-3}$ % p/p), insulina (b, 0,2 % p/p) y complejos I-CS (c). La barra de escala y la magnificación se encuentran en cada imagen.

3.9. CARACTERIZACIÓN TOPOGRÁFICA

A su vez, también se caracterizaron las mezclas mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). La presencia de extensos agregados de nanocomplejos indicó que la concentración de éstos en las soluciones finales es alta. La formación de tales agregados podría deberse a la distribución espacial que adopta el CS para el pH de trabajo (Assis *et al.* 2002). A pH 2, se sabe que el CS se encuentra en su máxima extensión debido a la repulsión electrostática entre cadenas adyacentes (Kurukji *et al.* 2014). A pH 6, sin embargo, se encuentra complejado con la insulina y formando estructuras con cierto grado de esfericidad.

A modo de ejemplo, en la Figura 3.18 se observan estas estructuras para el caso de los complejos I-CS 10^{-2} , p/p. Para reducir la presencia de estos agregados, antes de cada medición se realizaron diluciones 1/5000 y se sometieron a sonicación en baño durante 5 minutos. De esta manera, se obtuvieron

resultados como el de la Figura 3.19, correspondiente a 1.10^{-3} % p/p de CS y el de la Figura 3.20, correspondiente a 1.10^{-4} % p/p de CS.

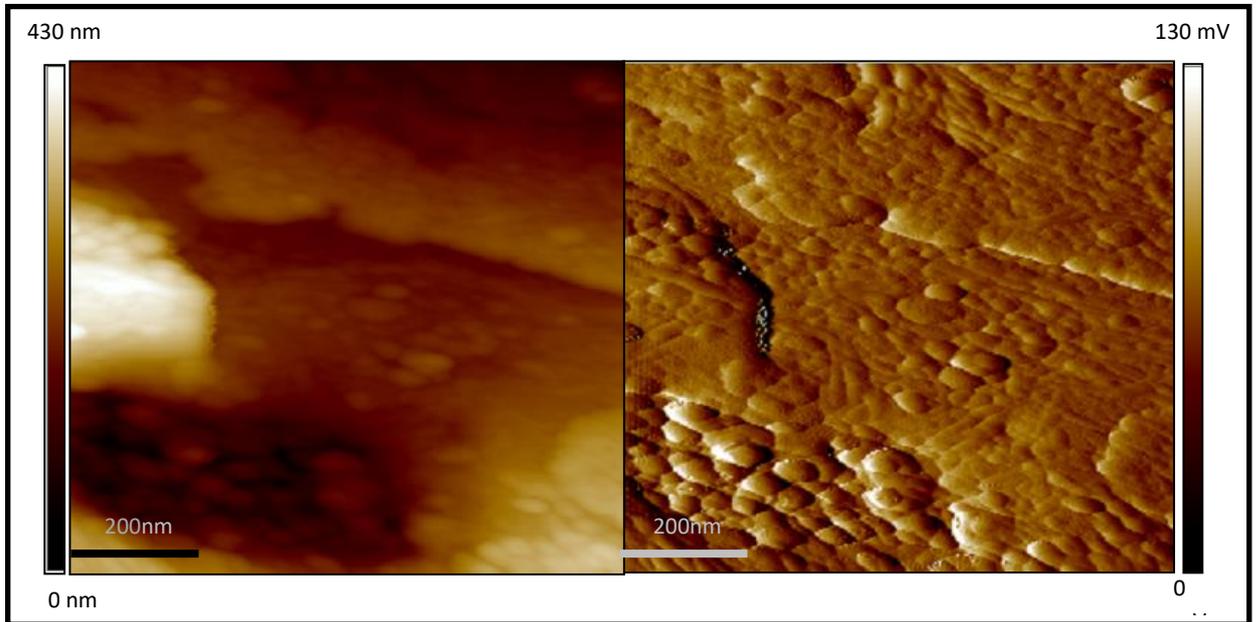


Fig. 3.18: Topografía superficial del sistema I-CS 10^{-2} p/p. Se detalla la presencia de gran cantidad de *clusters*. Se agrega la información de la amplitud para mayor claridad.

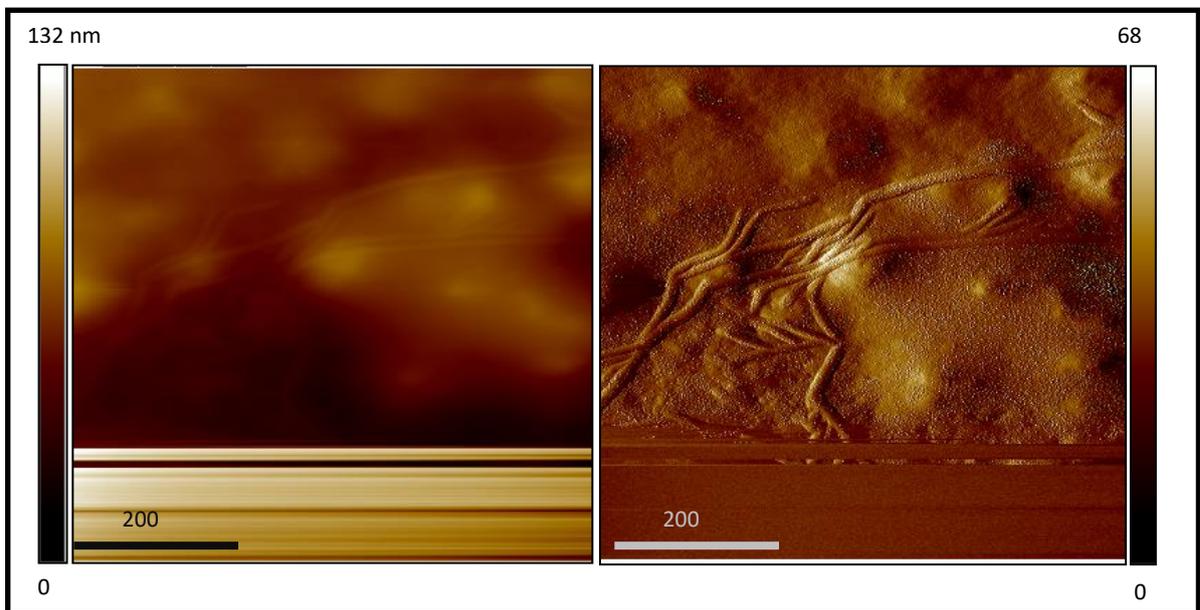


Fig. 3.19: Imágenes obtenidas mediante AFM de la morfología superficial de I-CS 10^{-3} p/p. Se muestra la presencia de fibras atribuidas al polisacárido libre. Se agrega la información de la amplitud para mayor claridad.

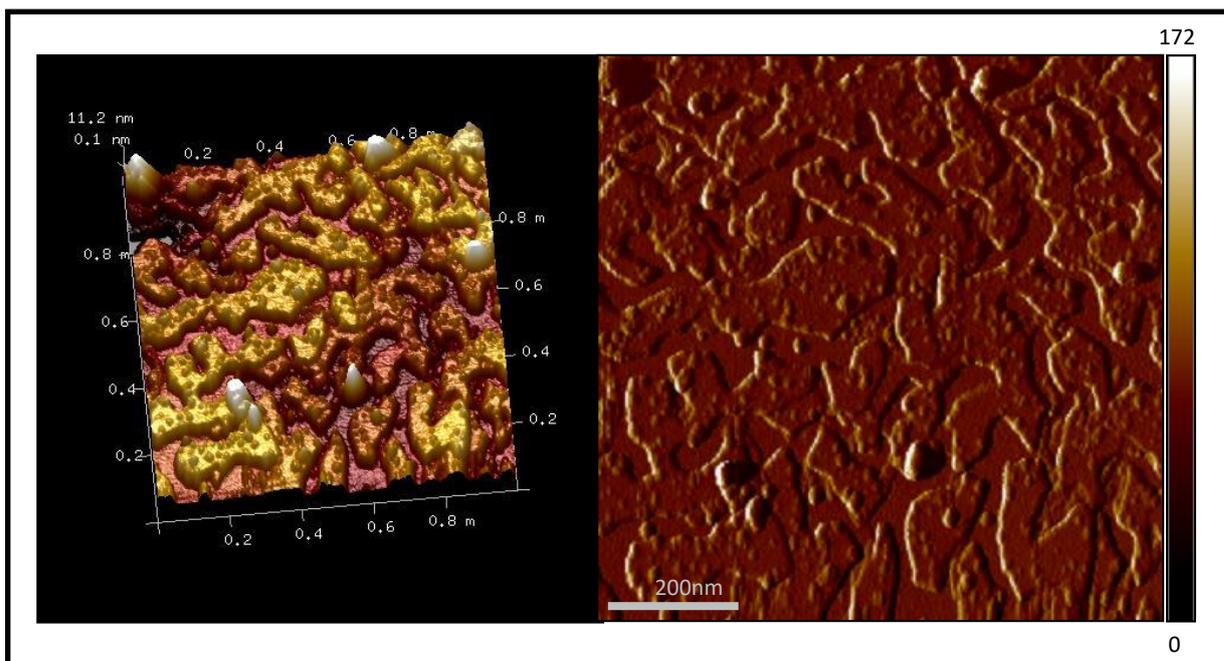


Fig. 3.20: Reconstrucción 3D de I-CS 10^{-4} p/p, obtenida mediante AFM. Los complejos, de forma semiesférica se sitúan sobre grandes espacios de consistencia homogénea. Se agrega la información de la amplitud para mayor claridad.

Cabe destacar que tanto las imágenes SEM como AFM son concordantes con respecto a la distribución de tamaño obtenidas de los datos de DLS presentados en la sección 3.5. La morfología también fue similar, aunque en un caso se trate de muestras liofilizadas y en el otro de material deshidratado de soluciones sobre el sustrato respectivo, lo cual indicaría que el proceso de liofilización tuvo poca incidencia en la estructura observada.

3.10. ELECTROFORESIS CAPILAR

Tradicionalmente, las mezclas de proteínas complejas o los sistemas combinados de proteínas con otras especies, con distintos pesos moleculares se resuelven con electroforesis en geles bidimensionales (2-D) (Righetti *et al.* 2003) seguida de espectrometría de masas (MS) (Olivares *et al.* 1987). La electroforesis 2-D es conveniente en la separación de proteínas con alta resolución, pero es desventajosa por la gran cantidad de tiempo y debido a que el procedimiento es tedioso. Desde que Jorgenson y Lukacs introdujeron la electroforesis capilar (CE) en la década de 1980 (Lukacs & Jorgenson 1983), se ha demostrado que es un método efectivo para la separación de sistemas conteniendo proteínas debido al breve tiempo inherente, bajo consumo de reactivos y alto nivel de automatización. La separación se basa en las diferencias de las movilidades electroforéticas de los

solutos iónicos, que provocarán que los analitos migren a través del capilar y lleguen al detector a tiempos diferentes. Los distintos tiempos de elución se relacionan con la relación carga/masa de las muestras.

En este sentido, y a fin de complementar los estudios de DLS y dilucidar la diferencia de tamaños y carga entre las especies libres y las nanopartículas, se aplicó la técnica de Electroforesis Capilar.

Inicialmente las muestras se encontraban a pH 6. El buffer de corrida (Ácido Bórico 150 mM) presenta un pH de 9,9 y ya que el volumen de muestra inyectado fue del orden de los microlitros, se asumió que fue ése el pH final durante cada medición.

La elección del pH de trabajo es importante, ya que reportes previos (Ban *et al.* 2001) indican que para condiciones fisiológicas, el CS tiende a adherirse a las paredes de las columnas. Un pH básico ayudaría a disminuir estos efectos. Por otra parte, dicho pH es habitualmente utilizado para la detección de proteínas en determinaciones del área de la clínica médica.

Como puede verse en la Fig. 3.21, el tiempo promedio de elución para la insulina control fue de 7,12 minutos y resulta menor que el correspondiente a los nano-complejos I-CS 1.10^{-2} p/p (*core-shell*), que es de 10,39 minutos. Este resultado podría deberse a que entre los componentes que influyen la movilidad electroforética, el tamaño predomina sobre la carga. Recordemos que las partículas de tipo *core-shell* presentarían carga superficial negativa, por la cubierta global de CS, según lo obtenido en las curvas de interacción de cargas para estos sistemas mixtos y que definen a este tipo de NP (Fig. 3.10).

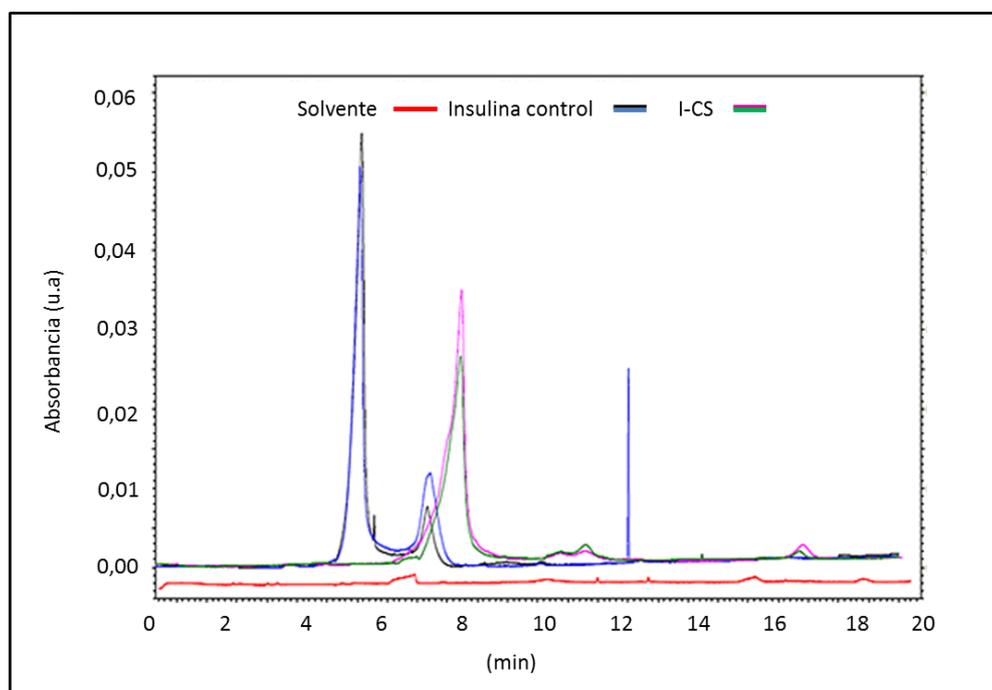


Fig. 3.21: Electroferograma que muestra los tiempos de elución para insulina (0.2 %, p/p, azul/negro) y I-CS 10^{-2} p/p (magenta/verde).

Aunque la carga de estas NP indicaría que debiera correr más rápidamente, el electroferograma muestra un tiempo mayor de elución, es decir una migración dentro de la columna más lenta. A los fines de clarificar, se incluye la Fig 3.22 (Doroteo 2012).

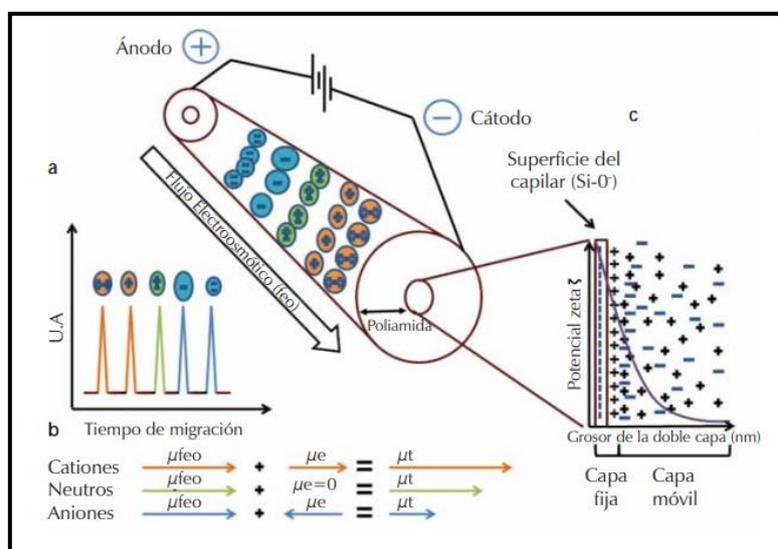


Fig. 3.22: a) Separación basada en la relación carga-masa, b) Movilidad total de los analitos μ_t , c) representación de la doble capa eléctrica. Adaptada de (Doroteo 2012).

En las condiciones del buffer de corrida, la I presentó un potencial ζ de aproximadamente -30 mV, con lo cual su migración dentro del capilar de sílice fundida debiera ser más lenta, con mayores tiempos de elución, si sólo se considerase la carga superficial del conjunto proteína-capa de hidratación. Al pH de trabajo tanto el CS como la I poseen carga superficial negativa (Fig. 3.9), pero el polisacárido se presenta formando parte de una estructura mayor que migra en conjunto. En conclusión, si bien dicha carga es mayor en valor absoluto para la I, el balance de masa-carga entre ésta y las NP (Fig. 3.13) ocasiona que el tiempo de elución de las NP sea mayor (Baharifar *et al.* 2013). Similares tendencias fueron informadas previamente por Zhu y col 2018 (Zhu *et al.* 2018), quienes encontraron tiempos de elución gobernados por tamaño en mezclas de proteínas.

En la Fig. 3.23 se presenta el electroferograma para las NP de tipo *cluster* (I-CS 1.10^{-4} p/p) y la insulina libre. El área comprendida por el pico correspondiente a las NP contiene al pico de la insulina. El comportamiento observado en estos sistemas resulta claramente diferente del informado para partículas de tipo *core-shell*. Aunque en estos casos también hay carga superficial negativa para ambas estructuras, I y *clusters*, se presenta una diferencia de tamaños en términos de volumen hidrodinámico. Aún más, existe una notoria diferencia en cuanto a la geometría configuracional de los *clusters* que

debiera generar diferencias en el patrón de migración en términos de flujo electroosmótico. Sin embargo la elución coincidente de I y *clusters* estaría indicando que es la carga de la insulina libre y la de la I adsorbida sobre las cadenas de CS la que gobierna la migración. Recordemos que los *clusters* están formados por hebras de CS, con moléculas de insulina adsorbidas, donde sitios o residuos locales de la I con carga negativa quedarían expuestos y en contacto con la capa de silenoles presentes en el tapizado interno del capilar. La amplitud que presenta el pico de las NP puede relacionarse con la polidispersidad en la distribución de tamaño de las poblaciones de flóculos que conforman los *clusters* y de la polidispersidad del polisacárido que tendría distintas cantidades de I acoplada. El área del pico, mayor que el de la I sola, sería una indicación de la polidispersidad mencionada.

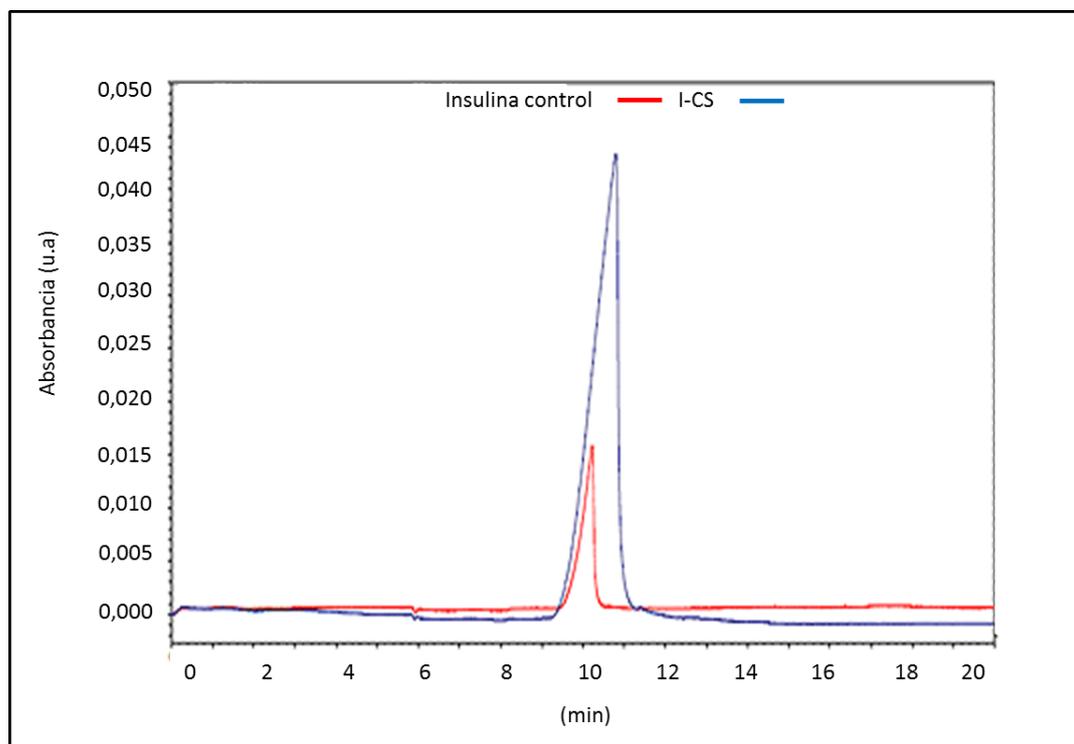


Fig. 3.23: Electroferograma que muestra los tiempos de elución para insulina (0.2 %, p/p, rojo) y I-CS 10^{-4} p/p (azul).

3.11. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES. ESPECTROSCOPÍA FTIR

Las muestras de insulina, quitosano $1 \cdot 10^{-4}$ %, p/p y las nanopartículas I-CS fueron liofilizadas y posteriormente mantenidas en un desecador con CaCl_2 , como agente desecante, durante 48 horas antes de la obtención de los espectros (Fig. 3.24).

La insulina posee un pico en 1650 cm^{-1} , correspondiente al alargamiento C=O de la amida I y otro pico en 1540 cm^{-1} por las interacciones C-N y N-H de la amida II (Mukhopadhyay *et al.* 2013). Por otro lado, el pico en 1650 cm^{-1} también puede relacionarse con la estructura secundaria de esta proteína, ya que las hélices α son la estructura secundaria mayoritaria en la insulina y dan origen a una banda de absorción centrada en 1655 cm^{-1} (Barth 2007).

El quitosano posee picos característicos en 3409 y 3283 cm^{-1} (alargamientos O-H y N-H), en 2998 cm^{-1} (alargamiento C-H), en 1567 cm^{-1} (tensión C=O en amida I), en 1404 cm^{-1} (deformación C-H y O-H en amida II), en 1013 cm^{-1} (tensión C-O/C-H) y en 808 cm^{-1} gracias a la contribución de las unidades de glucosamina monoméricas (Guo *et al.* 2010)(Alhosseini *et al.* 2012)(Venkatesham *et al.* 2014)(Heuser & Cárdenas 2014). Los complejos I-CS por su parte, presentan dos picos de interés, el primero en 1569 cm^{-1} y el segundo en 1405 cm^{-1} . El primero podría asignarse a una combinación de las señales de la amida I del CS y de la amida II de la insulina. Al ser un pico tan ancho, podría estar ocultando la señal de la amida I de la proteína. El segundo pico corresponde al CS, pudiendo suponerse que el pequeño desplazamiento observado es debido a la interacción entre ambas especies.

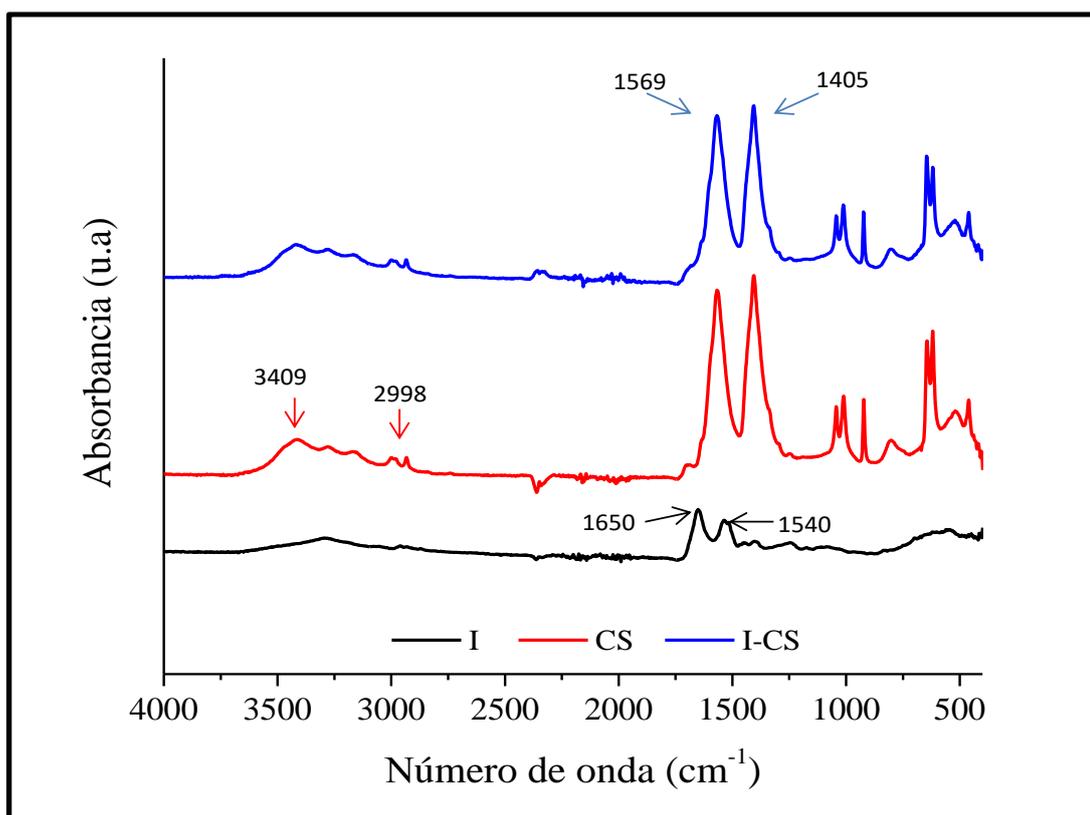


Fig. 3.24: Espectros de FT-IR para insulina (I, negro), quitosano (CS, rojo) y nanopartículas I-CS autoensambladas (I-CS, azul).

3.12. SIMULACIÓN DE MECANISMOS ELECTROESTÁTICOS PARA LA CONFORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

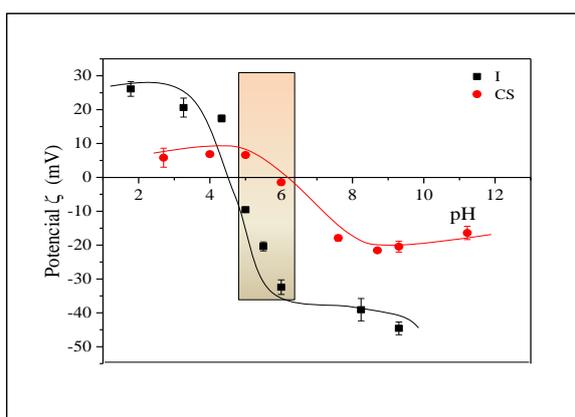
Para sistemas de especies con cargas opuestas la interacción que prima durante la formación de complejos proteína-poliectrolito es la atracción coulombica, mientras que para especies con cargas iguales lo hace la repulsión. Para especies de cargas iguales, sin embargo, puede ocurrir la formación de complejos solubles, aun cuando la proteína y el polielectrolito poseen cargas netas de igual signo. Para que esto suceda, deben existir reordenamientos mutuos de las distribuciones de los grupos cargados de cada especie, como consecuencia de perturbaciones en el equilibrio ácido-base del sistema (Montellano Duran *et al.* 2017). Estas fluctuaciones de protones resultan en una fuerza electroestática atractiva y dan lugar al mecanismo de regulación de carga, que bajo ciertas condiciones es capaz de superar la repulsión electroestática y permitir la formación de complejos. Este fenómeno de regulación es particularmente relevante en condiciones de baja fuerza iónica y pH del sistema próximo al pI de la proteína (Barroso da Silva & Mackernan 2017).

Para comprender los mecanismos de formación de complejos I-CS, se ensayaron simulaciones considerando diferentes pHs para distintas combinaciones de I-CS. Se consideró insulina monomérica (I)+CS, dímero (2I)+CS, tetrámero (4I)+CS, etc. De esta manera, es posible obtener las combinaciones de pH y número de unidades de insulina que favorecerían la formación de complejos y contrastarlas con los datos obtenidos a través de variadas técnicas experimentales (da Silva & Jönsson 2009).

Dichas simulaciones indicaron que los mecanismos inducidos por pH se traducen en fuerzas atractivas debidas a interacciones electroestáticas, fuerzas repulsivas debido a cargas de la misma naturaleza e interacciones atribuibles a la regulación de carga.

A continuación se presentan los gráficos correspondientes a $g(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{r}^2$ en función de la distancia de separación \mathbf{r} interatómica, para los distintos escenarios simulados. Cabe recordar que se conoce a $g(\mathbf{r})$ como la función de distribución y representa de qué manera se distribuyen las cuentas del polímero respecto al centro de la proteína (da Silva & Jönsson 2009).

En las gráficas, cuanto más alto sea el pico para distancias de separaciones cortas, mayor es la atracción. De manera similar, un pico elevado a gran distancia indica una repulsión significativa. En las Figuras 3.25-3.37 la línea continua indica complejamiento, la de puntos y trazos señala regulación de carga y la de trazos indica repulsión dominante.



Vale la pena recordar a los fines de integrar los resultados aquí obtenidos, la Fig. 3.9, sección 3.3, que representa el potencial ζ de cada especie libre en función del pH. Para $\text{pH} < 5.5$ ambas especies

poseen cargas superficiales positivas, mientras que para $\text{pH} > 6.5$ ambas cargas son negativas. El pH de interacción electrostática se establece para $5.5 < \text{pH} < 6.5$.

a) Configuraciones obtenidas según las distintas situaciones evaluadas:

I (monómero)+policación. El complejamiento (de baja intensidad) ocurrió para pHs básicos ($7.5 < \text{pH} < 8$) y existe una región de regulación de carga amplia ($6 < \text{pH} < 7$).

Esta situación se corresponde con una etapa inicial experimental en donde las dos especies estuvieron cargadas positivamente y sin interacción electrostática, a pHs

ácidos. A medida que aumentó el pH se establece una región de regulación de carga, en donde puede interpretarse el surgimiento de una interacción incipiente, para luego llegar a la región de interacción/complejamiento para pHs básicos.

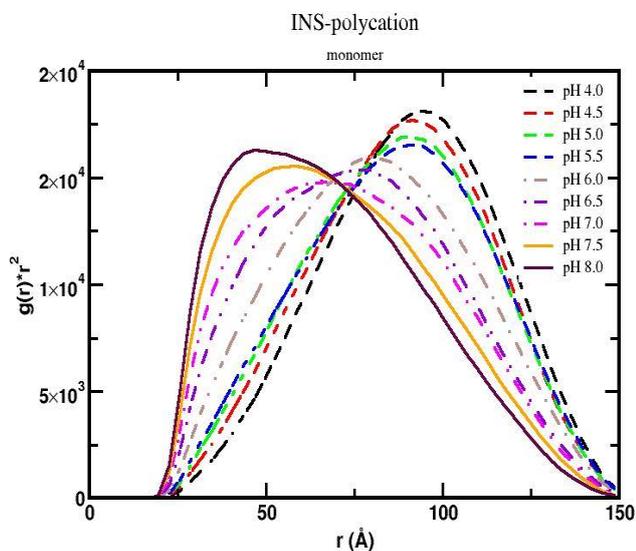


Fig. 3.25. Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de I y un policación.

b) 2I + policación. A comparación con la insulina en forma monomérica, aquí la región de complejamiento se extendió ($6.5 < \text{pH} < 8$) mientras que la correspondiente al a regulación de carga se redujo (pH 6). Esto puede interpretarse como una transición entre complejos y formación de supraestructuras diferentes a complejos. Por otro lado, no se observó complejamiento a pHs ácidos ($\text{pH} < 5.5$).

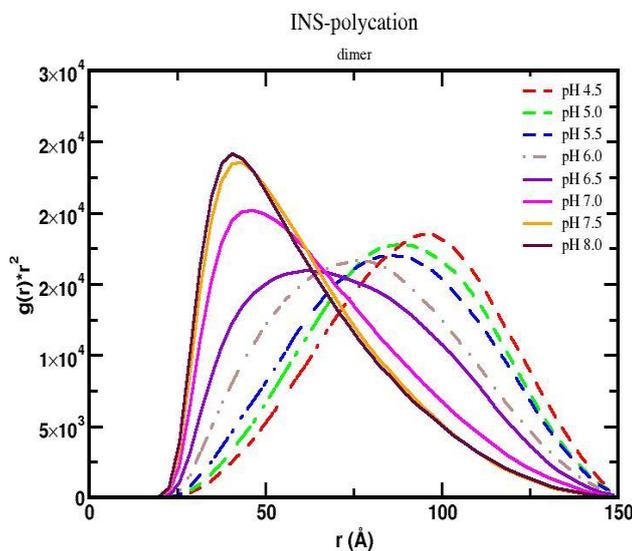


Fig. 3.26. Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de 2I y un policación.

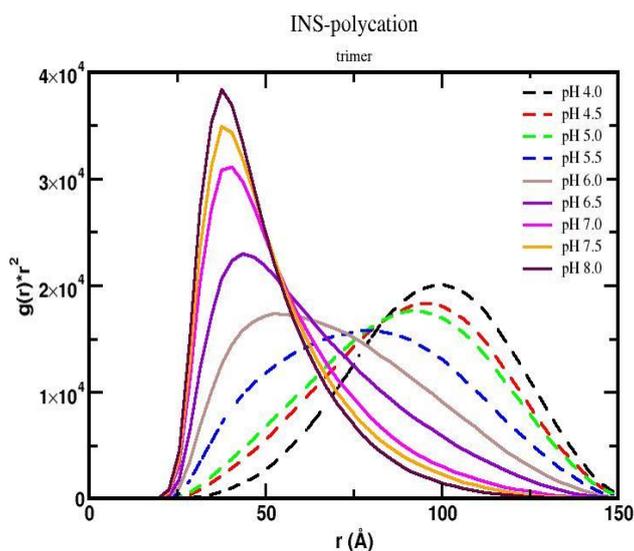


Fig. 3.27: Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de 3I y un policitación.

c) 3I +policitación. Al aumentar el número de unidades de insulina, la intensidad del complejamiento (aumento de magnitud de $g(r)*r^2$) aumenta para la región $6 < \text{pH} < 8$, ganando intensidad a medida que el medio aumenta su naturaleza básica. La regulación de carga desaparece para esta configuración.

d) 4I +policitación. Al aumentar el número de unidades de proteína en la simulación, el complejamiento no sólo se hace más intenso sino que se extiende su rango de aparición en términos de pH ($5.5 < \text{pH} < 8$). El mecanismo de regulación de carga parece ser la más probable forma de interacción a pH 5.

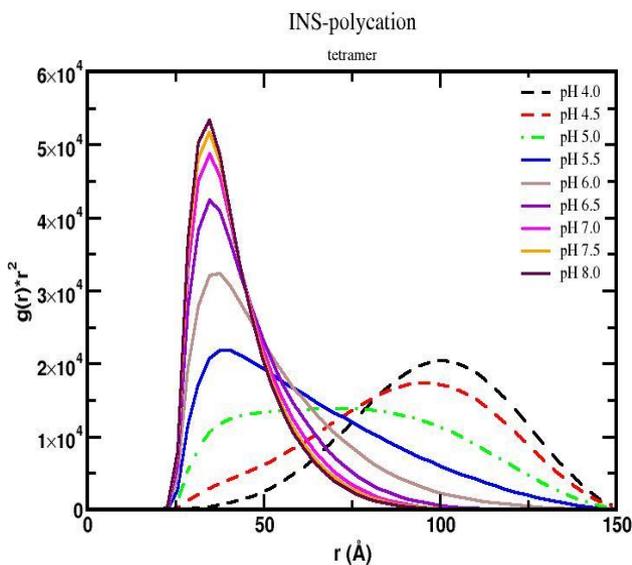


Fig. 3.28: Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de 4I y un policitación.

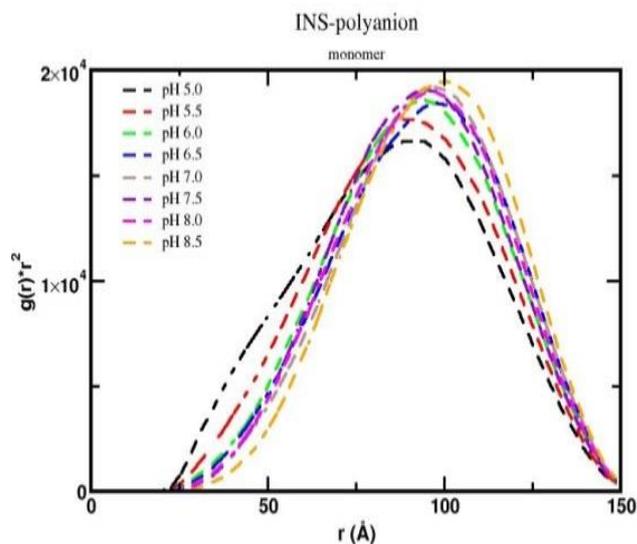


Fig. 3.29: Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de I y un polianión.

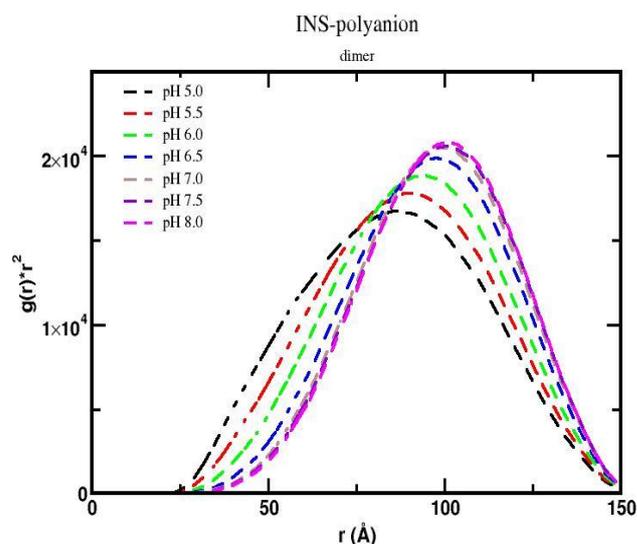


Fig. 3.30: Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de 2I y un polianión.

e) I (monómero)+ polianión. No hay asociación, ni por interacción electrostática ni por el mecanismo de regulación de carga para ningún pH evaluado. El monómero no puede interactuar con el polímero cargado negativamente. Este comportamiento se asemeja al evidenciado en las curvas de titulación experimentales (Fig. 5.1) para $\text{pH} > 6.5$. Si ambas especies poseen alta solubilidad y cargas iguales, las interacciones electrostáticas entre ambas no estarían favorecidas (da Silva & Jönsson 2009),

f) 2I+polianión. La situación es similar al caso e). No existe complejamiento ni regulación de carga y la repulsión es más intensa que en el caso anterior.

g) 3I + polianión. El pico de la función $g(r)$ se desplaza hacia distancias menores a medida que el pH se acidifica. A pH 5, muy próximo al pI de la insulina (5.4), el CS posee carga negativa y la I positiva, escenario propicio para la aparición del mecanismo de regulación de carga, lo que podría explicar esta tendencia incipiente al complejamiento.

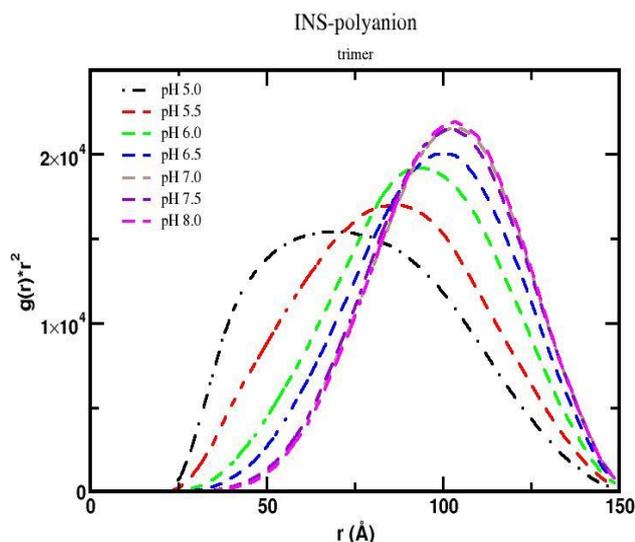


Fig. 3.31: Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de 3I y un polianión.

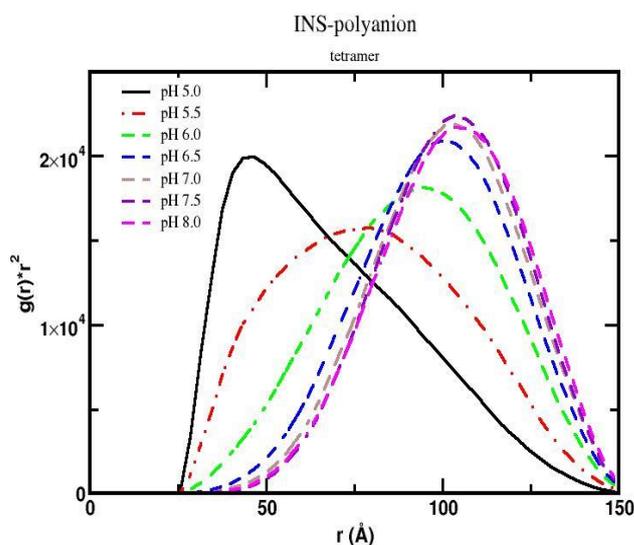


Fig. 3.32: Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de 4I y un polianión.

preparación de ICS, lo que indica la formación de complejos insolubles. Para pHs básicos, por otra parte, no hay asociación por ninguna vía.

h) 4I + polianión. Se produce un claro complejamiento a pH 5 mientras que la regulación de carga actúa a pH 5.5 o superior. La asociación que ocurre a pHs en los cuales ambas especies poseen igual carga o para pHs muy cercanos al pI de las proteínas es lo que ha motivado en primera instancia el estudio del mecanismo de regulación de carga. Esta interacción incipiente puede deberse a que varios de los aminoácidos que conforman la proteína, poseen pIs de entre 5 y 6 ("Amino Acids pI" n.d.). A nivel macroscópico para estos pHs se observa precipitación durante la

Este conjunto de simulaciones confirma que el pH de trabajo es fundamental a la hora de promover el complejamiento.

- i) I + CS (pKa 6.5). Se obtiene una interacción incipiente para pH 6.5 por el mecanismo de regulación de carga. Para el resto de los pHs no existió interacción.

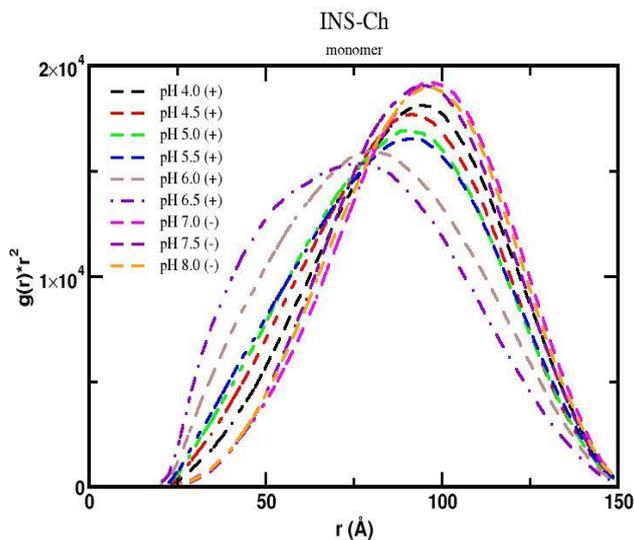


Fig. 3.33: Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de I y CS.

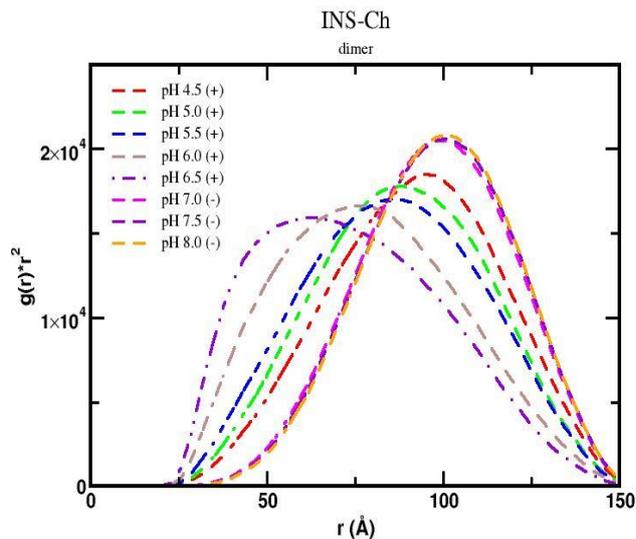


Fig. 3.34: Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de 2I

- j) 2I + CS (pKa 6.5). Considerando dos unidades de Insulina, se mantiene la regulación de carga para un pH de 6.5

k) 3I + CS (pKa 6.5). Para $6 < \text{pH} < 6.5$ existe complejamiento, de intensidad considerable, mientras que la regulación de carga se establece a pH 5. Para pHs ácidos y básicos, no se visualiza interacción. Este comportamiento se asemeja a las condiciones de trabajo experimental, ya que a pH 5 se detectó el inicio de la agregación, para pH 6 existió complejamiento y a pHs ácidos no se registró interacción (sección 5.2).

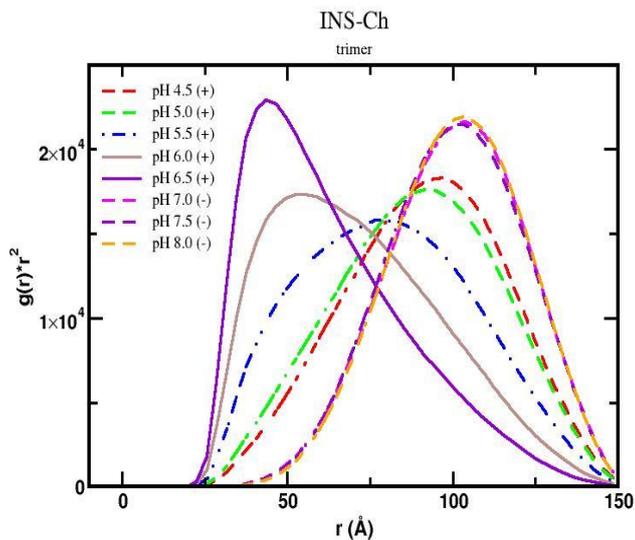


Fig. 3.35: Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de 3I y CS.

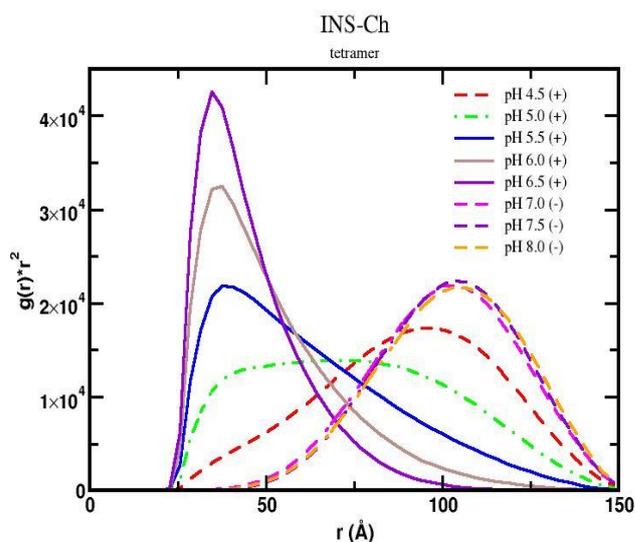


Fig. 3.36: Función de distribución $g(r)*r^2$ vs. distancia de separación r entre los centros de 3I y CS.

l)

4I (tetramero) + CS (pKa 6.5). El complejamiento se dio para $5.5 < \text{pH} < 6.5$, alcanzando un máximo de intensidad en 6.5. La regulación de carga, es decir una interacción incipiente se desplaza hasta pH 5, mientras que para pHs más ácidos no hubo interacción.

De este conjunto de simulaciones puede concluirse que la interacción depende en cierta manera del número de monómeros de insulina involucrados. De hecho, la Fig. 3.37 muestra que al aumentar el número de unidades de insulina, no sólo se propicia el complejamiento sino que además éste crece en intensidad.

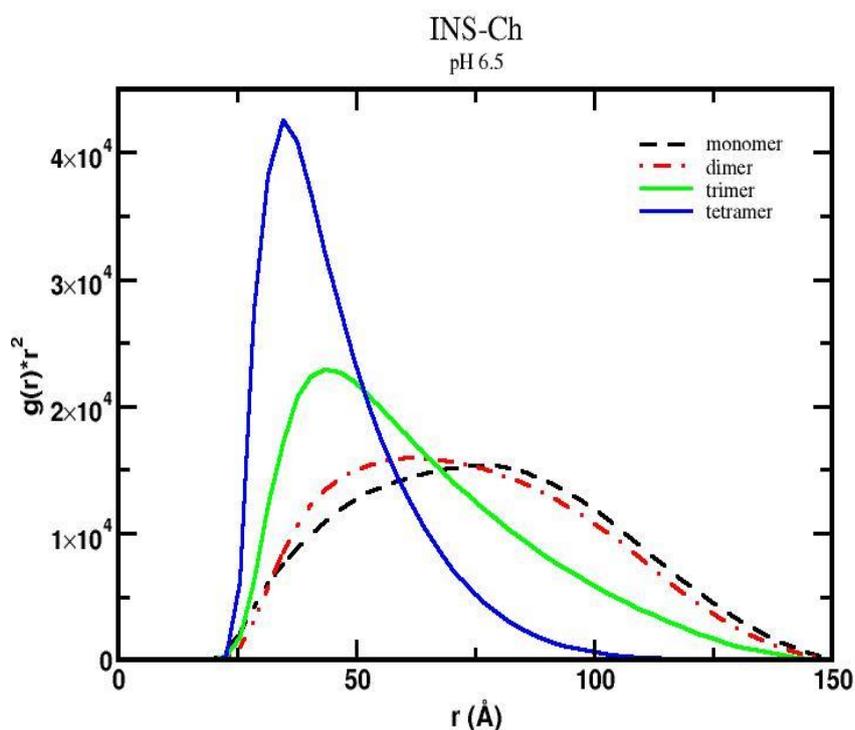


Fig. 3.37: Función de distribución $g(r)*r^2$ en función de la distancia de separación r entre los centros de I y CS, para números crecientes de unidades de insulina.

Es importante destacar que las simulaciones se plantean con una cantidad de unidades de insulina fijas, cantidad que es mantenida durante toda la simulación. Experimentalmente, sin embargo, este número puede variar a medida que se modifica el pH. El hecho que el número de unidades cambie a medida que lo hace el pH, ocasiona que el rango de complejamiento se desplace. Por otro lado, cabe recordar que tanto la proteína como el polisacárido utilizados son simplificaciones de un modelo real el cual presenta alta complejidad, por lo que es posible que alguna de las simplificaciones empleadas ocasionen entre otros fenómenos que los pHs de interacción obtenidos difieran de los experimentales (Montellano Duran *et al.* 2017).

La sucesión de imágenes 3.25-3.37 sugiere que la cadena de CS interactúa de manera más eficiente con agregados mayores de insulina. Esta tendencia, resultado de considerar una sola cadena polimérica y una o varias unidades de insulina, resulta difícil de extrapolar a los resultados experimentales. Los experimentos se realizan con múltiples unidades tanto del polímero como de la proteína y cada especie por separado posee cinéticas/dinámicas de autoagregación. La determinación de la influencia que la presencia de la otra especie y/o que el proceso de autoensamblaje tienen en la generación de las nanopartículas es uno de los desafíos de este trabajo.

Bajo estas consideraciones, es posible suponer que existirá una tendencia similar a la presentada al considerar una configuración en la cual interactuen la proteína en su forma hexamérica y la cadena de biopolímero, a pH 6.

De manera general, las simulaciones muestran que existen dos factores que deben combinarse para lograr la formación de complejos. Por un lado, a medida que el número de subunidades de insulina aumenta, la probabilidad de complejamiento crece; cabe remarcar que en el torrente sanguíneo la I viaja como hexámero (Dunn 2005). Por otro lado, el pH debe ser mayor a 5.5, lo que concuerda con las curvas de potencial ζ que señalan un margen para el pH de trabajo de $5.5 < \text{pH} < 6.5$. En este contexto, el mecanismo de regulación de carga puede considerarse como un estadio previo al complejamiento, un complejamiento incipiente ocasionado por interacciones débiles diferentes a la electrostática.

Estos resultados guardan implicancias importantes, ya que el pH y en consecuencia el número de unidades monoméricas que constituyen los agregados de insulina (nI) deben ser cuidadosamente considerados: es necesario elegir un pH de trabajo que optimice la formación de complejos y a su vez es importante considerar la estructura/configuración final de la proteína que se está encapsulando.

3.13. ACTIVIDAD DE LA INSULINA COMPLEJADA Y VEHICULIZADA CON CS EN CULTIVOS CELULARES

3.13.1. ENSAYO DE FOSFORILACIÓN DE AKT

A fin de evaluar la actividad biológica de los nano-complejos I-CS de tipo *core-shell*, se emplearon fibroblastos 3T3, ya que son un modelo celular de preadipocitos bien establecido con una respuesta a la I ya conocida en nuestro laboratorio.

Para cuantificar esta actividad, se empleó un Western Blot para medir los cambios en los niveles de AKT fosforilado, un conocido efector corriente abajo de insulina y frecuentemente usado para describir su respuesta metabólica (Giudice *et al.* 2013). La Figura 3.38a ejemplifica que la estimulación con el complejo I-CS retardó y mantuvo en el tiempo la activación de AKT en comparación con los efectos de la insulina libre. Este resultado experimental confirma la estabilidad funcional y estructural de la insulina y su liberación desde los nano-complejos en la línea 3T3.

La cobertura de la insulina con una capa externa de CS explicaría la activación retardada de la respuesta celular, sin acceso instantáneo a los receptores celulares. Las moléculas de I libre se unen al receptor y el complejo ligando-receptor activado se internaliza completamente en 120 minutos (Giudice *et al.* 2013). Por otro lado, la activación sostenida en el tiempo lograda por los complejos I-CS

indica que la insulina fue liberada de dichas estructuras con una dinámica diferente. La Figura 5.30b representa la cuantificación de la activación de AKT en función del tiempo lograda mediante la estimulación con I o I-CS. Se observó una clara diferencia en los perfiles de activación. Mientras que la activación con insulina llegó a un máximo y posterior disminución luego de 10 minutos, la activación con los complejos mostró una actividad sostenida luego de 120 minutos. Se muestra una transferencia a modo de ejemplo. El patrón se verificó cada vez que se repitió en experimento. Este hallazgo posee un impacto de importancia práctica en la industria farmacéutica ya que esta propiedad podría ser aprovechada para ejercer la liberación controlada de insulina en formulaciones terapéuticas empleando los nano-complejos I-CS.

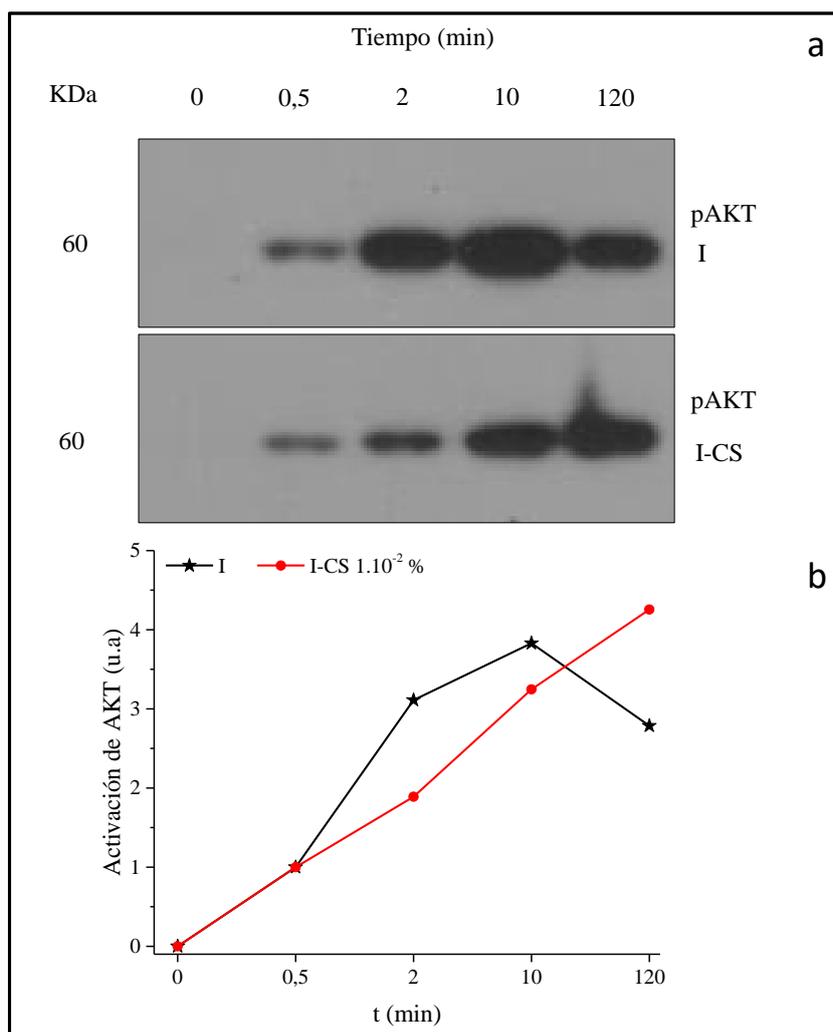


Fig. 3.38: (a) Western blot que muestra los cambios en los niveles de AKT fosforilado luego de la estimulación con insulina o con los complejos *core-shell* I-CS, en fibroblastos 3T3, en función del tiempo. (b) La cuantificación de la activación de AKT en función del tiempo muestra un incremento sostenido para la activación con I-CS luego de dos horas de estimulación.

También se midieron los cambios en los niveles de AKT fosforilado para los complejos I-CS de tipo *cluster*, siguiendo la misma metodología que la empleada para los *core-shell*. La Fig. 3.39 a muestra que

esta vez, la estimulación con el complejo no retardó la activación de AKT en mayor medida que la insulina libre, aunque al haberse registrado activación, se comprueba para estos complejos la estabilidad funcional y estructural de la insulina encapsulada.

En la Figura 3.39b puede observarse que en ambos casos, la activación posee un máximo luego de 10 minutos de estimulación y que ésta se mantiene durante las 2 horas que dura el experimento. Sin embargo, a diferencia de los complejos *core-shell*, los *clusters* no poseen un perfil de liberación de tipo controlado, sino más bien cuasi espontáneo.

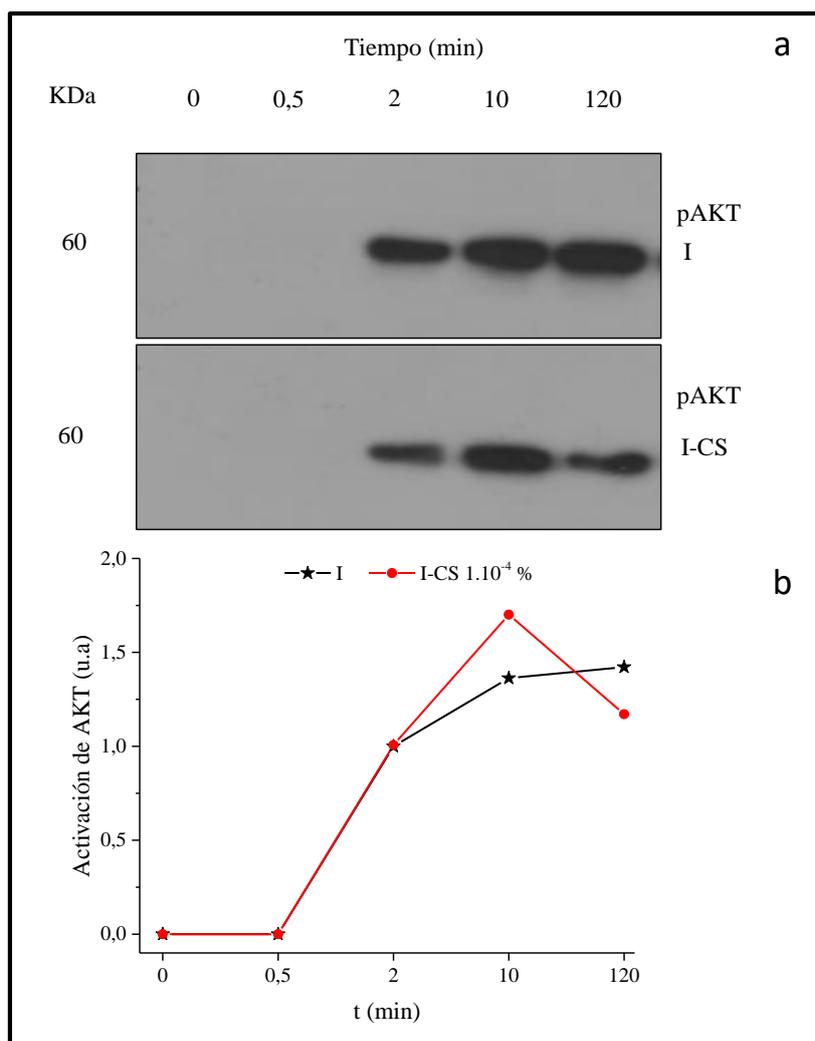


Fig. 3.39: (a) Western blot que muestra los cambios en los niveles de AKT fosforilado luego de la estimulación con insulina o con los complejos *clusters* I-CS, en fibroblastos 3T3, en función del tiempo. (b) La cuantificación de la activación de AKT en función del tiempo muestra un incremento sostenido para la activación con I-CS luego de dos horas de estimulación.

Si bien uno de los objetivos generales de los procesos de encapsulado suele ser controlar el perfil de liberación del compuesto de interés, la estabilidad y bioactividad de la insulina encapsulada con este método hace pensar en una posible combinación (*core-shell+clusters*) a fin de lograr el perfil deseado.

El ensayo de fosforilación de AKT también se realizó con la línea celular Calu-3, con un procedimiento igual al empleado con la línea 3T3-L1. Lamentablemente, a pesar de haberlo repetido numerosas veces ($n=3$), luego del revelado de los Western Blots no se registró señal de la proteína fosforilada. Para descartar posibles fuentes de error se emplearon anticuerpos nuevos, se constató la transferencia de proteína a la membrana, se emplearon reactivos en buen estado para el revelado, etc. Por último, se empleó un lisado de células 3T3 que había producido una señal intensa en su Western Blot correspondiente y se sembró junto a los lisados de Calu-3. Para dicha muestra sí se registró señal de proteína fosforilada, lo cual hace pensar que la fosforilación para el sistema Calu-3 es muy lábil y no resiste todo el ensayo.

3.13.2. CONFORMACIÓN DE MONOCAPA CELULAR CALU-3 Y RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL

En la Fig. 3.40 se muestra la evolución de la resistencia transepitelial con el transcurso de los días. Puede notarse que a partir del sexto día de sembrado de las células, la resistencia comienza a elevarse de manera abrupta para alcanzar un máximo luego de 9 días de crecimiento. Luego de este período, la resistencia comienza a bajar y se estabiliza por varios días.

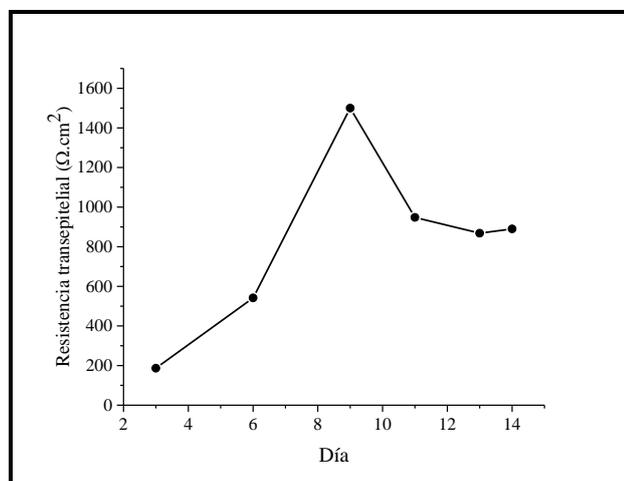


Fig. 3.40: Resistencia transepitelial de un cultivo de Calu-3 en función de los días tras el sembrado.

En la literatura especializada se recomienda una resistencia de al menos $700 \Omega \cdot \text{cm}^2$ para asegurar la integridad de la monocapa (Meindl *et al.* 2015), por lo que a partir de los 7 días el cultivo se encontró en condiciones para realizar diversos ensayos considerando un modelo *in vitro* de epitelio pulmonar.

3.13.3. CUANTIFICACIÓN DE IL-8

En este ensayo se trató de dilucidar la respuesta inflamatoria de la línea celular Calu-3 ante la presencia de insulina (**I**) y de NP de tipo *core-shell* (**NP**). Es importante cuantificar un indicador de inflamación en células del epitelio pulmonar teniendo en cuenta que se pretende administrar estas nanopartículas por vía pulmonar. La concentración de IL-8 liberada, medida para distintos tiempos de estimulación, se presenta en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Concentración de IL-8 medida como respuesta ante la presencia de I o NP I-CS. n=4±SD.

[IL-8] (ng/ml)				
t (min)	0	2	10	120
I	4,5±0,7	7,6±0,7	24,4*±1,0	0,24*±0,02
NP	4,95±1,03	5,1±1,5	2,3*±1,2	30,8*±4,9

* p<0.05 por el test de Mann-Whitney U

Cabe remarcar, que la cinética de liberación de IL-8 varía según el estímulo y puede seguir un modo lento y continuo o uno de tipo masivo (Oz-Arslan *et al.* 2006). A su vez, habría que descartar que esta citoquina no estuviera involucrada en algún proceso celular que ocurriese durante el período de estimulación.

Al inicio del experimento (t=0) la concentración es similar para ambas muestras (I y NP) y se considera como una liberación endógena de IL-8.

Luego de 10 min, puede notarse que la presencia de insulina provocó una liberación de IL-8 casi 20 veces mayor que la provocada por la presencia de las NP y mientras la concentración aumenta con el tiempo para los cultivos estimulados solamente con insulina, aquellos que han recibido NP mantienen una concentración cercana a la endógena. Este resultado es de suma importancia práctica porque enfatiza la inocuidad del CS y por ende de las NP, y pone de manifiesto la utilidad de las estructuras nanoencapsuladas en el ámbito biotecnológico/farmacéutico.

El comportamiento de ambas muestras luego de 120 min de estimulación no es posible de explicar sin realizar ensayos complementarios ya que podrían estar relacionados con la desorganización transiente de las uniones estrechas del epitelio. Por ejemplo, Rodrigues y col. (2015) diseñaron NP de CS con condroitín sulfato para encapsular insulina (Rodrigues *et al.* 2015). En este trabajo se encontró que la biocompatibilidad de las NP en la línea Calu-3 fue estudiada mediante un ensayo de actividad metabólica (MTT), uno de integridad de membrana, liberación de LDH (lactato deshidrogenasa) y la

cuantificación de la respuesta inflamatoria (liberación de IL-8). Luego de constatar niveles basales de liberación de IL-8 y de cuantificar el aumento de la citoquina ante la presencia de las NP, se constató que dicha liberación aumento un 20% respecto del nivel basal para un período de 24 hs. Los resultados de los 3 ensayos confirmaron la inocuidad de las NP.

Otra posible explicación para el aumento en la concentración de IL-8 luego de 120min de exposición a las NP es que existe un retraso en la aparición de la respuesta inflamatoria. Este retraso podría deberse a que la liberación de la Insulina y su posterior contacto con las células depende de la hinchazón del quitosano, proceso que no es inmediato y que modula dicha liberación (Azarudeen *et al.* 2017) (Souza, *et al.* 2017).

3.13.4. INMUNOCITOQUÍMICA

En la Fig. 3.41 pude observarse la internalización de la marca correspondiente a la I, en este ensayo la proteína fue un vehículo para una sonda fluorescente. Las imágenes situadas en la parte inferior del panel (c y d) exhiben la marca de la I, esta vez contenida en las NP de tipo *core-shell*. Las imágenes corresponden a la línea celular Calu-3.

En la Fig. 3.41a se distinguen cúmulos de I, de gran intensidad. Dicha intensidad es aún apreciable mediante la técnica de contraste de interferencia diferencial (Samaniego Lopez *et al.* 2018), que brinda más información sobre la disposición tridimensional de las células y permite distinguir la integridad de la monocapa (Fig. 3.41b).

La intensidad y el número de los cúmulos de insulina observados en las muestras estimuladas con NP son francamente menores al caso anterior (Fig. 3.41c y d), si bien la razón de este fenómeno es aún desconocida. Una posible explicación sería la fagocitosis *vía* balsa lipídica como mecanismo de endocitosis de las NP (Jiang *et al.* 2016), disparado por el CS que envuelve el *core* proteico. Este mecanismo de entrada de sustancias a la célula fue mencionado anteriormente en esta Tesis.

De hecho, los mecanismos de transporte de la I en células bronquiales humanas no han sido del todo dilucidados. En su trabajo del 2006, Hussain y col. estudiaron mediante microscopía confocal, la absorción (*uptake*) de I para monocapas de dos líneas celulares de epitelio bronquial humano: 16HBE14o y Calu-3 (Hussain & Ahsan 2006). Los autores de esta contribución concluyeron que existen tres procesos de transporte principales para la insulina, la endocitosis mediada por receptores, la formación de invaginaciones de la membrana y la difusión pasiva. En la primera, la interacción de la insulina con su receptor y la posterior translocación de éste harían ingresar la proteína a la célula. Más aún, el transporte de insulina podría deberse a interacciones entre esta proteína y la cara apical de la membrana celular, como indican Pezron y col. (2002) (Pezron *et al.* 2002).

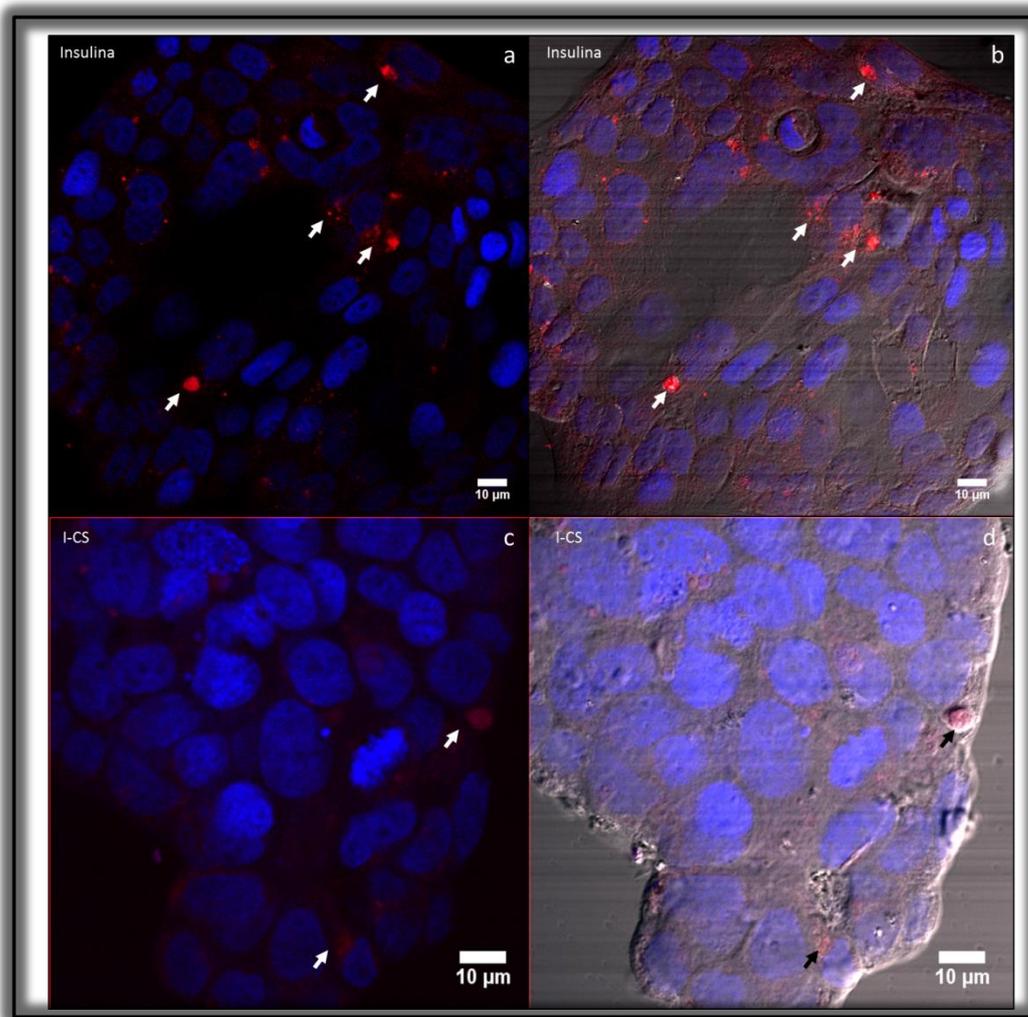


Fig. 3.41: Sección horizontal de una monocapa de células Calu-3 estimuladas con insulina (en rojo) (a y b) y con nanopartículas construidas con insulina marcada (c y d). Los núcleos celulares se muestran en azul. La barra de escala indica 10 μm .

Debido a que el complejamiento de la I con el CS, para formar una partícula de tipo *core-shell*, disminuye la probabilidad de interacción insulina-receptor y modifica la interacción proteína-membrana, el proceso de transporte para la insulina complejada debe ser estudiado en mayor profundidad.

De todos modos, el hecho de haber podido constatar la internalización de insulina complejada con CS en una línea epitelial pulmonar es de gran importancia, ya que la interacción de las NP con estas estructuras biológicas constituye una de las etapas más cruciales en la ruta de entrega de proteínas por la vía pulmonar.

CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados mostrados en este capítulo permiten concluir que se ha logrado diseñar nanocomplejos formados por Insulina y Quitosano empleando el principio de interacción electrostática. Se encontró la concentración requerida para cubrir completamente la superficie de los dímeros de insulina al pH de trabajo. Esta concentración resultó igual a $1 \cdot 10^{-2}\%$, w/w, constituyendo las denominadas nanoestructuras de tipo *core-shell*. En este sentido, se podría asegurar que la I quedó encapsulada dentro de una cubierta de quitosano, ya que la encapsulación se refiere a una tecnología en la cual los componentes bioactivos están completamente envueltos, cubiertos y protegidos por una barrera física, sin ninguna protrusión de los componentes bioactivos (Paul de Vos, Marijke M. Faas, Milica Spasojevic 2010).

La mayor parte de los materiales utilizados para la encapsulación en el sector farmacéutico, nutracéutico, alimentario y cosmético son biomoléculas, las cuales además de tener un origen natural, proporcionan la máxima protección de los bioactivos contra las condiciones ambientales, para mantenerlos activos dentro de la estructura de las cápsulas durante el procesamiento o almacenamiento bajo diversas condiciones, para no reaccionar con el material encapsulado, para tener un comportamiento reológico adecuado y generar una cinética de liberación y/o una forma de administración deseada. Bajo estos criterios, el CS empleado en esta tesis constituye un material adecuado para encapsular I. Es imposible enumerar todos los criterios para seleccionar un material adecuado para la encapsulación. Por supuesto depende del tipo de bioactivo, sus características, y de la aplicación donde se usarán los encapsulados. Con excepción del tipo de bioactivo a emplear, la restricción de costos sigue siendo un factor clave para elegir los materiales más apropiados. Por este motivo, es un requisito previo en el diseño de un proceso de encapsulación, estudiar y analizar todas las propiedades del posible material de la cápsula con el fin de concluir y predecir su comportamiento en las condiciones presentes en las formulaciones de farmacéuticas, lo cual se ha realizado en el Capítulo 2 de esta Tesis.

En este trabajo las dimensiones y la morfología de las partículas obtenidas pudieron controlarse con las concentraciones relativas de I y CS y las condiciones usadas para el ensamblaje. Dependiendo de estas condiciones, las dimensiones de estas partículas variaron en tamaño, pero siempre se mantuvieron en la nanoescala.

El pH de la solución mixta moduló la interacción entre ambos biopolímeros. De esta forma, las interacciones coloidales y los tamaños hidrodinámicos fueron evaluados empleando dispersión dinámica de luz. Las dimensiones de las poblaciones de partículas dentro de una suspensión coloidal se han cuantificado como una distribución del tamaño de partícula y un índice de polidispersidad. Las determinaciones del potencial ζ hicieron posible establecer la zona o rango de pHs de interacción entre las macromoléculas.

Con respecto a la ultraestructura, las imágenes obtenidas por SEM para los nanocomplejos revelaron una morfología muy similar a la del polisacárido luego del ensamblado con el mismo. Este hecho guardaría correspondencia con la existencia de una cubierta formada íntegramente por CS. La

topografía de los sistemas estudiados refleja lo manifestado por dispersión dinámica de luz, aunque los principios de las técnicas son reconocidamente diferentes. Las estructuras *core-shell* se correspondieron con nanoestructuras donde el polisacárido cubre completamente formas esféricas. Por otra parte, a menores concentraciones de CS la topografía manifestó estructuras más consistentes con los *clusters* descriptos a partir de datos cinéticos, reológicos y de distribución de tamaño y carga de partícula. En conclusión, controlando las concentraciones relativas de biopolímeros y el pH utilizados se formaron nanopartículas con diferentes aspectos, por ejemplo, esféricas, *clusters* o racimos.

Los nanocomplejos manifiestan su mayor tamaño también según el orden de elución obtenidos por electroforesis capilar. Los grupos químicos más probablemente involucrados en la interacción I-CS fueron identificados a través de espectroscopía IR. Se encontró que las regiones amidas de ambos biopolímeros tendrían un papel protagónico en tal interacción.

Las simulaciones a través del sistema Monte Carlo permitieron echar luz sobre las combinaciones de pH y número de monómeros de insulina que gobiernan la formación de complejos. Los resultados de dichas simulaciones fueron contrastados con los datos obtenidos experimentalmente, siendo consistentes con el modelo de asociación intermolecular propuesto.

Las simulaciones mostraron ser una interesante herramienta para dilucidar los mecanismos inducidos por pH que se traducen en fuerzas atractivas debidas a interacciones electrostáticas y en fuerzas repulsivas debido a cargas de la misma naturaleza. Se determinó cuali-cuantitativamente la importancia relativa de las interacciones atribuibles a la regulación de carga, la cual cobra fuerza a pHs en los cuales ambas especies poseen igual carga o para pHs muy cercanos al pI de las proteínas.

Las estrategias experimentales empleadas en esta parte del trabajo resultaron útiles para confirmar la constitución de una cubierta externa o *Shell* para una dada concentración de CS. Las propiedades de las curvas de flujo reflejaron también la asociación entre biopolímeros y la forma de los nanocomplejos.

Fue posible proponer un modelo matemático a los datos experimentales y obtener los parámetros cinéticos que describen el proceso de nanocomplejamiento bajo las condiciones de trabajo.

Considerando un contexto más aplicado, los nanocomplejos generados de acuerdo a esta configuración podría ser el punto de partida para el diseño de nuevas drogas que a su vez podrían ser aplicadas por nuevas rutas de administración, tal como la pulmonar, especialmente relevante en pacientes pediátricos.

En este sentido, los nanocomplejos I-CS aquí son una alternativa para el desarrollo de una nueva generación de fármacos para la protección de esta proteína con actividad hormonal de condiciones hostiles del cuerpo, ejerciendo la liberación controlada de la misma e incrementando su absorción, tal como se demuestra en el ensayo biológico realizado en un sistema *in-vitro* con fibroblastos de la línea 3T3-L1. Los resultados obtenidos con los nanocomplejos de tipo *core-shell* se destacaron por su perfil de liberación sostenido en el tiempo con respecto a la insulina sin encapsular. Este resultado no fue

reproducido por los nanocomplejos de tipo *cluster*. Evidentemente, la configuración espacial y la presencia de una cubierta de quitosano contribuyeron sinérgicamente para la activación prolongada del receptor y del efector AKT fosforilado en estudio. La inocuidad y la internalización de las NP en cultivos de células específicos fueron determinados, abriendo la investigación en modelos más complejos, tanto in-vitro como in-vivo para su paso previo a su aplicación en formulaciones farmacéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfano, Crosta, Martinez, Pérez, & Farías. (2017). Submicron O/W emulsions embedded into modified waxy maize starch based matrix: Rheological and microstructural characterization. *Food Hydrocolloids*, **67**, 120–129.
- Alhosseini, Moztarzadeh, Mozafari, ... Jalali. (2012). Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 25–34.
- Amino Acids pl. (n.d.).
- Assis, Bernardes-Filho, Vieira, & Filho. (2002). AFM characterization of chitosan self-assembled films. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **51**(7), 633–638.
- Azarudeen, Thirumarimurugan, Athmiya, Monisha & Prashanthini. (2017). Antibacterial chitosan-copolymer membranes for drug delivery: synthesis, characterization, drug release profile and kinetics. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **92**(7), 1659-1666.
- Aznar-Oroval, Sanchez-Yepes, Lorente-Alegre, Maiquez-Richart. (2010). Valor diagnostico de la procalcitonina, la interleucina 8, la interleucina 6 y la proteina C reactiva en la deteccion de bacteriemia y fungemia en pacientes con cancer. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, **28**(5), 273–277.
- Baharifar, Fakhari, Ziyadi, Oghabian, Amani, & Faridi-Majidi. (2013). Influence of polymeric coating on capillary electrophoresis of iron oxide nanoparticles. *Journal Iranian Chemical Society*. doi:10.1007/s13738-013-0298-1
- Bai, Luo, & Liu. (2016). Protein self-assembly via supramolecular strategies. *Chem. Soc. Rev.*, **45**(10), 2756–2767.
- Ban, Choi, Ryu, & Yoo. (2001). Capillary electrophoresis of high-molecular chitosan: The natural carbohydrate biopolymer. *Electrophoresis*, **22**(11), 2217–2221.
- Bao, Liu, Liu, Liu, & Zhao. (2015). Near-infrared light-responsive inorganic nanomaterials for photothermal therapy Abstract :, (2016). doi:10.1016/j.ajps.2015.11.123
- Bao, Mitragotri, & Tong. (2013). Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging, (April). doi:10.1146/annurev-bioeng-071812-152409
- Barany, Meszaros, Kozakova, & Skvarla. (2009). Kinetics and Mechanism of Flocculation of Bentonite and Kaolin Suspensions with Polyelectrolytes and the Strength of Floccs, **71**(3), 291–298.
- Barany, & Szepesszentgy. (2004). Flocculation of cellular suspensions by polyelectrolytes, **111**, 117–129.
- Barroso da Silva, & Mackernan. (2017). Benchmarking a Fast Proton Titration Scheme in Implicit Solvent for Biomolecular Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **13**(6), 2915–2929.
- Barth. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1767**(9), 1073–1101.
- Bhattacharjee. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, **235**, 337–351.
- Bohidar, Dubin, Majhi, Tribet, & Jaeger. (2005). Effects of protein-polyelectrolyte affinity and polyelectrolyte molecular weight on dynamic properties of bovine serum albumin-poly(diallyldimethylammonium chloride) coacervates. *Biomacromolecules*, **6**(3), 1573–1585.
- Castillo, & Chiriboga. (2006). Estandarización de un modelo basado en monocapas de células Caco-2 con aplicación en estudios de absorción de fármacos. *Revista Colombiana De Ciencias Quimicas Y Farmaceuticas*, **35**(2), 177–191.

- Chatterjee, Sarkar, Rao, & Paria. (2014). Core / shell nanoparticles in biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, **209**, 8–39.
- Cheng, Doane, Chuang, & Ziady. (2014). Near Infrared Light-Triggered Drug Generation and Release from Gold Nanoparticle Carriers for Photodynamic Therapy, 1–6.
- Cross. (1970). Viscosity, molecular weight and chain entanglement. *Polymer*, **11**(5), 238–244.
- da Silva, & Jönsson. (2009). Polyelectrolyte–protein complexation driven by charge regulation. *Soft Matter*, **5**(15), 2862.
- Das, Kasoju, & Bora. (2009). Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **6**(1), e153–e160.
- De Campos, Sanchez, & Alonso. (2001). Chitosan nanoparticles : a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface . Application to cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*, **224**, 159–168.
- Deng, Zhen, Hu, Wu, Xu, & Chu. (2011). Biomaterials Hollow chitosan e silica nanospheres as pH-sensitive targeted delivery carriers in breast cancer therapy. *Biomaterials*, **32**(21), 4976–4986.
- Deshpande, Sharma, Koul, & Singh. (2017). Core – Shell Nanoparticles as an Efficient, Sustained, and Triggered Drug-Delivery System. doi:10.1021/acsomega.7b01016
- Dickinson. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, **23**(6), 1473–1482.
- Dionigi, Piñeiro, Riminucci, Bañobre, Rivas, & Dediu. (2013). Regulating the thermal response of PNIPAM hydrogels by controlling the adsorption of magnetite nanoparticles. doi:10.1007/s00339-013-7620-8
- Doroteo. (2012). Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Investigacion En Discapacidad*, **1**(2), 86–89.
- Dunn. (2005). Zinc – ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer – a review, **2**, 295–303.
- Effros, & Chinard. (1969). The in vivo pH of the extravascular space of the lung. *The Journal of Clinical Investigation*, **48**(11), 1983–1996.
- Fandrich, Forge, Buder, Kittler, Dobson, & Diekmann. (2003). Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(26), 15463–15468.
- Franca, Lins, Freitas, & Straatsma. (2008). Characterization of chitin and chitosan molecular structure in aqueous solution. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **4**(12), 2141–2149.
- Giudice, Jares-erijman, & Leskow. (2013). Endocytosis and Intracellular Dissociation Rates of Human Insulin – Insulin Receptor Complexes by Quantum Dots in Living Cells.
- Gonen, & Assaraf. (2012). Antifolates in cancer therapy : Structure , activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resistance Updates*, **15**(4), 183–210.
- Gregory. (1988). Polymer Adsorption and flocculation in Sheared Suspensions. *Colloids and Surfaces*, **31**, 231–253.
- Gregory, & Barany. (2011). Adsorption and flocculation by polymers and polymer mixtures. *Advances in Colloid and Interface Science*, **169**(1), 1–12.
- Guo, Liu, Hong, & Li. (2010). Preparation and characterization of chitosan poly(acrylic acid) magnetic microspheres. *Marine Drugs*, **8**(7), 2212–2222.

- Habibi, Pastorino, Sandoval, & Ruggiero. (2013). Polyelectrolyte based molecular carriers: The role of self-assembled proteins in permeability properties. *Journal of Biomaterials Applications*, **28**(2), 262–269.
- Haidar, Hamdy, & Tabrizian. (2008). Protein release kinetics for core - shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes. *Biomaterials*, **29**, 1207–1215.
- Hamada, Dobson, Healy, ... Newson. (2014). A kinetic study of β -lactoglobulin amyloid fibril formation promoted by urea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **11**(8), 595–606.
- Heuser, & Cárdenas. (2014). Chitosan-copper paint types as antifouling. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **59**(2), 2415–2419.
- Hoemann, & Fong. (2017). *Immunological responses to chitosan for biomedical applications. Chitosan Based Biomaterials Volume 1*, Vol. 1, Elsevier. doi:10.1016/B978-0-08-100230-8.00003-0
- Holm, Jespersen, Thomassen, ... Otzen. (2007). Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, **1774**(9), 1128–1138.
- Hussain, & Ahsan. (2006). Indication of transcytotic movement of insulin across human bronchial epithelial cells. *Journal of Drug Targeting*, **14**(4), 181–190.
- Hyun, Kim, Mun, ... Sung. (2010). Tumoral acidic pH-responsive MPEG-poly (β -amino ester) polymeric micelles for cancer targeting therapy. *Journal of Controlled Release*, **144**(2), 259–266.
- Iyer, & Paul. (2015). Self-assembly : a review of scope and applications, **9**(August 2014), 122–135.
- Jiang, Guo, Chen, Yu, Wang, & Wu. (2016). In Situ Visualization of Lipid Raft Domains by Fluorescent Glycol Chitosan Derivatives. *Langmuir*, **32**(26), 6739–6745.
- Jr, Belongia, Arnold, Ogden, & Baygents. (1998). Capillary Electrophoresis Measurements of Electrophoretic Mobility for Colloidal Particles of Biological Interest Capillary Electrophoresis Measurements of Electrophoretic Mobility for Colloidal Particles of Biological Interest. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(7), 2572.
- Juarez, Lopez, Cambon, Taboada, & Mosquera. (2009). Influence of Electrostatic Interactions on the Fibrillation Process of Human Serum Albumin. *The Journal of Physical Chemistry B*, **113**(30), 10521–10529.
- Jund, Jullien, & Campbell. (2001). Random walks on fractals and stretched exponential relaxation. *Physical Review E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, **63**(3 Pt 2), 036131.
- Kargina, Gongalsky, Ryabchikov, ... Timoshenko. (2014). Radio frequency radiation-induced hyperthermia using Si. doi:10.1038/srep07034
- Karimi, Avci, Mobasseri, Hamblin, & Naderi-Manesh. (2013). The novel albumin-chitosan core-shell nanoparticles for gene delivery: Preparation, optimization and cell uptake investigation. *Journal of Nanoparticle Research*, **15**(5). doi:10.1007/s11051-013-1651-0
- Kim, Ghosh, & Rotello. (2009). Multimodal drug delivery using gold nanoparticles, (Scheme 2), 61–67.
- Kim, Kim, Park, ... Kwon. (2008). Self-assembled glycol chitosan nanoparticles for the sustained and prolonged delivery of antiangiogenic small peptide drugs in cancer therapy. *Biomaterials*, **29**, 1920–1930.
- Kirkwood, & Shumaker. (1952). Forces between Protein Molecules in Solution Arising from Fluctuations in Proton Charge and Configuration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **38**(10), 863–71.
- Kleimann J, Gehin-Delval C, Auweter H. (2005). Super-Stoichiometric Charge Neutralization in Particle - Polyelectrolyte Systems, (20), 3688–3698.
- Kocak, Tuncer, & Bütün. (2017). pH-Responsive polymers. *Polym. Chem.*, **8**(1), 144–176.

- Kohn, Micanovic, Myers, ... DiMarchi. (2007). pI-shifted insulin analogs with extended in vivo time action and favorable receptor selectivity. *Peptides*, **28**(4), 935–948.
- Korchagina, & Philippova. (2010). Multichain aggregates in dilute solutions of associating polyelectrolyte keeping a constant size at the increase in the chain length of individual macromolecules. *Biomacromolecules*, **11**(12), 3457–3466.
- Kurukji, Norton, & Spyropoulos. (2014). Fabrication of sub-micron protein-chitosan electrostatic complexes for encapsulation and pH-Modulated delivery of model hydrophilic active compounds. *Food Hydrocolloids*, **53**, 249–260.
- LA Mer. (1966). Filtration of Colloidal Dispersions Flocculated by Anionic and Cationic Polyelectrolytes, 248–254.
- Laemmli. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **222**, 680–685.
- Law, Yong, Roy, ... Prasad. (2008). Optically and Magnetically Doped Organically Modified Silica Nanoparticles as Efficient Magnetically Guided Biomarkers for Two-Photon Imaging of Live Cancer Cells †, 7972–7977.
- Le, Rioux, & Turgeon. (2017). Formation and functional properties of protein – polysaccharide electrostatic hydrogels in comparison to protein or polysaccharide hydrogels. *Advances in Colloid and Interface Science*, **239**, 127–135.
- Li, Schöneboom, Liu, ... Müllen. (2009). Rainbow perylene monoimides: Easy control of optical properties. *Chemistry - A European Journal*, **15**(4), 878–884.
- Lukacs, & Jorgenson. (1983). Capillary Zone Electrophoresis Author (s): JSource : Science , New Series , Vol . 222 , No . 4621 (Oct . 21 , 1983), pp . 266-272 Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1691606>. *Science*, **222**(4621), 266–272.
- Mahmud, Xiong, & Aliabadi. (2007). Polymeric micelles for drug targeting, **15**(November), 553–584.
- Malvern-Instruments. (2011). Size Measurement and Molecular Weight Estimation of Globins using Dynamic Light Scattering From Malvern Instruments. Retrieved from M.I. Ltd, Size Measurement and Molecular Weight Estimation of Globins using%0ADynamic Light Scattering From Malvern Instruments, (03.17.2017).
- Malvern Instruments. (2011). Inform White Paper Dynamic Light Scattering. *Malvern Guides*, 1–6.
- Mao, Bakowsky, Anchalee, & Kissel. (2006). Self-Assembled Polyelectrolyte Nanocomplexes between Chitosan Derivatives and Insulin. *International Journal of Drug Development and Research*, **3**(2), 26–33.
- Martínez-Padilla, García-Rivera, Romero-Arreola, & Casas-Alencáster. (2015). Effects of xanthan gum rheology on the foaming properties of whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, **156**, 22–30.
- Matalanis, Jones, & McClements. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, **25**(8), 1865–1880.
- Meindl, Stranzinger, Dzidic, ... Fröhlich. (2015). Permeation of Therapeutic Drugs in Different Formulations across the Airway Epithelium In Vitro. *Plos ONE*, **10**(8), 1–19.
- Mitra, Gaur, Ghosh, & Maitra. (2001). Tumour targeted delivery of encapsulated dextran – doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *Journal of Controlled Release*, **74**, 317–323.
- Montellano Duran. (2017). PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DE Chenopodium quinoa Y SUS HIDROLIZADOS. *Universidad Nacional de Rosario*, 1–11.
- Montellano Duran, Spelzini, Wayllace, Boeris, & Barroso da Silva. (2017). A combined experimental and molecular simulation study of factors influencing interaction of quinoa proteins-carrageenan. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.09.076

- Mukhopadhyay, Sarkar, Chakraborty, Bhattacharya, Mishra, & Kundu. (2013). Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo studies in diabetic animal model. *Materials Science and Engineering C*, **33**(1), 376–382.
- Ochnio, Martínez, Allievi, Palavecino, Martínez, & Pérez. (2018). Proteins as Nano-Carriers for Bioactive Compounds. The Case of 7S and 11S Soy Globulins and Folic Acid. María Emilia Ochnio 1,†, Jimena H Martínez 2,†, Mariana C Allievi 2, Marcos Palavecino 2, Karina D. Martínez 3,* and Oscar E. Pérez 1,* . *Polymers*, **10**(2), 149.
- Olivares, Nguyen, Yonker, & Smith. (1987). On-Line Mass Spectrometric Detection for Capillary Zone Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, **59**(89), 1230–1232.
- Ong, Traini, & Young. (2013). Pharmaceutical applications of the Calu-3 lung epithelia cell line. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **10**(9), 1287–1302.
- Oz-Arslan, Rüscher, Myrtek, ... Maghazachi. (2006). IL-6 and IL-8 release is mediated via multiple signaling pathways after stimulating dendritic cells with lysophospholipids. *Journal of Leukocyte Biology*, **80**(2), 287–297.
- Pan, Li, Zhao, ... Cui. (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm*, **249**(1–2), 139–147.
- Paul de Vos, Marijke M. Faas, Milica Spasojevic. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, **20**, 292–302.
- Pérez, David-Birman, Kesselman, Levi-Tal, & Lesmes. (2014). Milk protein–vitamin interactions: Formation of beta-lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on in vitro gastro-duodenal proteolysis. *Food Hydrocolloids*, **38**, 40–47.
- Perez, & Pilosof. (2004). Pulsed electric fields effects on the molecular structure and gelation of β -lactoglobulin concentrate and egg white. *Food Research International*, **37**(1), 102–110.
- Pezron, Mitra, Pal, & Mitra. (2002). Insulin aggregation and asymmetric transport across human bronchial epithelial cell monolayers (Calu-3). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **91**(4), 1135–1146.
- Philippova, Volkov, Sitnikova, Khokhlov, Desbrieres, & Rinaudo. (2001). Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative. *Biomacromolecules*, **2**(2), 483–490.
- Pippa, Pispas, & Demetzos. (2016). Polymer Self-Assembled Nanostructures as Innovative Drug Nanocarrier Platforms.
- Prudkin Silva, Martínez, Martínez, Farías, Leskow, & Pérez. (2018). Proposed molecular model for electrostatic interactions between insulin and chitosan. Nano-complexation and activity in cultured cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **537**(August 2017), 425–434.
- Prusty, & Sahu. (2013). Development and Evaluation of Insulin Incorporated Nanoparticles for Oral Administration. *ISRN Nanotechnology*, **2013**, 1–6.
- Pryor, Kotarek, Moss, & Hestekin. (2011). Monitoring insulin aggregation via capillary electrophoresis. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**(12), 9369–9388.
- Rastogi, Gulati, Kotnala, Sharma, Jayasundar, & Koul. (2011). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Evaluation of folate conjugated pegylated thermosensitive magnetic nanocomposites for tumor imaging and therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **82**(1), 160–167.
- Righetti, Castagna, Herbert, Reymond, & Rossier. (2003). Review Prefractionation techniques in proteome analysis. *Proteomics*, **3**, 1397–1407.
- Rodrigues, Cardoso, da Costa, & Grenha. (2015). Biocompatibility and stability of polysaccharide polyelectrolyte complexes aimed at respiratory delivery. *Materials*, **8**(9), 5647–5670.

- Sahoo, & Labhassetwar. (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging, **8**(24), 1112–1120.
- Samaniego Lopez, Martínez, Uhrig, Coluccio Leskow, & Spagnuolo. (2018). A Highly Sensitive Fluorogenic Probe for Imaging Glycoproteins and Mucine Activity in Live Cells in the Near-Infrared Region. *Chemistry - A European Journal*, **24**(24), 6344–6348.
- Sarmiento, Ribeiro, Veiga, & Ferreira. (2006). Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **53**(2), 193–202.
- Schmaljohann. (2006). Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**(15), 1655–1670.
- Sharma, Haque, & Wilson. (1996). Association tendency of β -lactoglobulin AB purified by gel permeation chromatography as determined by dynamic light scattering under quiescent conditions. *Food Hydrocolloids*, **10**(3), 323–328.
- Smirnova, Safenkova, Stein-Margolina, Shubin, Polshakov, & Gurvits. (2015). PH-responsive modulation of insulin aggregation and structural transformation of the aggregates. *Biochimie*, **109**(December), 49–59.
- Sogias, Williams, & Khutoryanskiy. (2008). Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, **9**(7), 1837–1842.
- Sosnik. (2016). Drug self-assembly: A phenomenon at the nanometer scale with major impact in the structure-biological properties relationship and the treatment of disease. *Progress in Materials Science*, **82**(May), 39–82.
- Sounderya, Zhang, & Shell. (2008). Use of Core / Shell Structured Nanoparticles for Biomedical Applications, 34–42.
- Souza, Fernando, Pires, Rodrigues, Lopes, & Fernandes. (2017). Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. *Industrial Crops and Products*, **107**, 565–572.
- Srivastava, Santiso, Gubbins, & Barroso Da Silva. (2017). Computationally Mapping pKaShifts Due to the Presence of a Polyelectrolyte Chain around Whey Proteins. *Langmuir*, **33**(42), 11417–11428.
- Stewart, Torr, Mohd Jamili, Bosquillon, & Sayers. (2012). Evaluation of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cell Culture Systems for Asthma Research. *Journal of Allergy*, **2012**(di), 1–11.
- Stirpe, Pantusa, Rizzuti, Sportelli, Bartucci, & Guzzi. (2011). Early stage aggregation of human serum albumin in the presence of metal ions. *International Journal of Biological Macromolecules*, **49**(3), 337–342.
- Tang, Yu, Ho, ... Mi. (2013). Characterization of tea catechins-loaded nanoparticles prepared from chitosan and an edible polypeptide. *Food Hydrocolloids*, **30**(1), 33–41.
- Thambi, Deepagan, Yeol, ... Hyung. (2014). Biomaterials Hypoxia-responsive polymeric nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials*, **35**(5), 1735–1743.
- Tian, Wang, Wang, Zhang, Wang, & Yuan. (2012). Self-assembly and liver targeting of sulfated chitosan nanoparticles functionalized with glycyrrhetic acid. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **8**(6), 870–879.
- Tsuboi, Izumi, Hirata, & Xia. (1996). Complexation of Proteins with a Strong Polyanion in an Aqueous Salt-free System, **7463**(23), 6295–6303.
- van der Linden, & Venema. (2007). Self-assembly and aggregation of proteins. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **12**(4–5), 158–165.
- van Rijn. (2013). Polymer directed protein assemblies. *Polymers*, **5**(2), 576–599.
- Venkatesham, Ayodhya, Madhusudhan, Veera Babu, & Veerabhadram. (2014). A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*, **4**(1),

113-119.

Weijers, Van De Velde, Stijnman, Van De Pijpekamp, & Visschers. (2006). Structure and rheological properties of acid-induced egg white protein gels. *Food Hydrocolloids*, **20**(2-3 SPEC. ISS.), 146-159.

Wool. (1993). Polymer Entanglements. *Macromolecules*, **26**(7), 1564-1569.

Wu, Zhao, Yang, Yan, & Sun. (2016). Aggregation of egg white proteins with pulsed electric fields and thermal processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **96**(10), 3334-3341.

Xu, Gao, Li, ... Wang. (2013). Microporous and Mesoporous Materials Gelatin - mesoporous silica nanoparticles as matrix metalloproteinases-degradable drug delivery systems in vivo, **182**, 165-172.

Xu, Yan, Seeman, Sun, & Dubin. (2011). Multimerization and Aggregation of Native State Insulin: Effect of Zinc. *Langmuir*, 579-586.

Yang, Wang, Wang, Wang, Wang, & Chen. (2014). Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery. *Biotechnology Advances*, **32**(7), 1301-1316.

Zhu, Li, Wang, Shen, Zhang, & Yamaguchi. (2018). Factors affecting the separation performance of proteins in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, **1083**, 63-67.

CAPÍTULO 4: DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS OBTENIDAS POR DESHIDRATACIÓN VÍA TECNOLOGÍA *NANOSPRAY*

INTRODUCCIÓN

MICROENCAPSULACIÓN POR DESHIDRATACIÓN

La técnica de deshidratación (*Spry Drying*) comenzó a utilizarse en la década del '50 en el ámbito de la industria alimentaria, cuando se la aplicaba para proteger las esencias responsables de aromas y sabores de la degradación y la oxidación. Actualmente, se emplea con moléculas bioactivas y probióticos (Sebastien Gouin 2004)(Jianing Pu , J. David Bankston n.d.).

Es una técnica relativamente económica, rápida, cuyos resultados son reproducibles y permite una fácil variación de la matriz encapsulante, pudiendo obtenerse partículas del orden del micrón. Por otro lado, los mejores resultados se obtienen para sustancias con un alto grado de solubilidad en agua. Uno de los usos más emblemáticos de la deshidratación es la producción de leche en polvo: una capa de lactosa y proteínas de la leche protegen de la oxidación a las moléculas de grasa entrampadas. En sistemas ricos en polisacáridos contribuyen con la estructura y en aquellos ricos en proteínas facilita la emulsificación (Gharsallaoui *et al.* 2007).

Además de la industria alimentaria, la deshidratación se encuentra presente en las industrias farmacéutica y cosmética, en donde se la usa para obtener polvos secos de formulaciones originalmente en fase líquida. Así, ha sido empleada para preparar proteínas para administración por vía pulmonar (Chan, H.K., Clark, A., Gonda, I., Mumenthaler, M., Hsu 1997)(Rania O. Salama, Daniela Traini, Hak-Kim Chan, Adrian Sung, Alaina J. Ammit 2009), nasal (Kaye *et al.* 2009) y oral (Coppi *et al.* 2002). Esta técnica ofrece la ventaja de combinar la formación de partículas y su secado en un único paso, en un proceso escalable y adaptable a múltiples formulaciones.

De manera general, la deshidratación se produce cuando una fase líquida (solución, emulsión, suspensión) se atomiza en una corriente de aire caliente que la seca rápidamente. La atomización se logra al hacer circular la fase líquida a través de un atomizador, que puede ser neumático, una rejilla presurizada, un disco giratorio, etc. Cuanto mayor es la energía provista, menor es el tamaño de las gotas obtenidas. A su vez, el tamaño de partícula aumenta al hacerlo la velocidad de alimentación. La viscosidad y la tensión superficial también regulan el tamaño de partícula (Estevinho *et al.* 2013).

El tiempo de exposición a altas temperaturas suele ser demasiado pequeño como para producir daños estructurales o pérdida de actividad de los compuestos de interés, haciendo apropiada esta técnica para sustancias termosensibles como la vitamina C, cuya deshidratación y encapsulado en una matriz de quitosano se explica en detalle en el trabajo de Gharsallaoui y col. (2007) (Gharsallaoui *et al.* 2007). Las propiedades de este polisacárido tienen una gran influencia en el resultado de la deshidratación. Condicionan el tamaño, la forma, el tiempo de liberación y la eficiencia del proceso de secado. Por ejemplo, si el peso molecular se incrementa la viscosidad también lo hace, dificultando el proceso y dando origen a partículas irregulares(M.L. Lorenzo-Lamosa, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato 1998). El grado de desacetilación, controla el grado de cristalinidad y la hidrofobicidad, debido a que las

variaciones en las interacciones hidrofóbicas controlan las características de la liberación de estas partículas (Berger *et al.* 2004).

NANODESHIDRATACIÓN (NANOSPRAY DRYING)

Esta técnica se enmarca dentro de las estrategias *Top-bottom* (1.3) y es un ejemplo de entrapamiento físico. El entrapamiento físico es un método para introducir biomoléculas dentro de materiales (matrices) con propiedades bien definidas, y no hay intervención de ningún proceso químico (Zhang *et al.* 2016). En particular, este proceso se vale de interacciones hidrofóbicas y por lo tanto puede aplicarse en una gran variedad de drogas, siempre y cuando éstas posean dominios hidrofóbicos en sus estructuras químicas (Yokoyama *et al.* 1998).

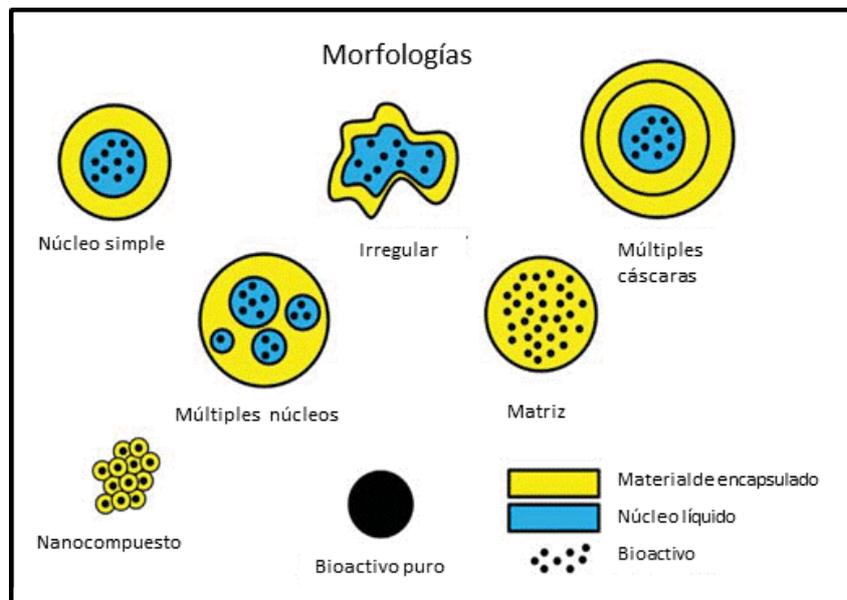


Fig. 4.1: Morfologías de diferentes tipos de partículas preparadas mediante encapsulamiento y *nano spray drying*.
Adaptado de (Arpagaus *et al.* 2017).

Tradicionalmente, la eficiencia de recolección de los equipos de deshidratación ha sido menor al 70%, ya que el sistema de filtros elimina la mayoría de las partículas menores al micrón. La introducción del modelo B-90 de la compañía BUCHI Labortechnik AG, en el año 2011, ha permitido aumentar la eficiencia de recolección hasta un 90%, logrando cantidades recolectadas del orden de los miligramos con el agregado de un nuevo sistema de colección electrostática (sección 4.2.1) (Büchi Labortechnik 2011). Además, el rango del tamaño de partícula obtenido se encuentra en la actualidad entre 300 nm

y 5 μm , ya que se ha implementado un sistema atomizador compuesto de una membrana vibratoria impulsada por un sistema piezoeléctrico con tamaños de poros de entre 4 y 7 μm .

Lee et al. (2011) han empleado BSA (*seroalbúmina bovina*) como proteína modelo para generar partículas nano-deshidratadas y desentrañar la influencia que factores como el tamaño de rejilla, la temperatura de secado o el uso de surfactantes (Tween 80) tienen en el resultado final (Lee et al. 2011). En cuanto a la morfología de las partículas, pudieron distinguirse cuatro tipos: esféricas lisas, arrugadas, de forma toroidal y de tipo corpuscular/granular. La esfericidad se asoció con un aumento en la concentración de la proteína si no se emplea un surfactante y en caso contrario, con un aumento en la concentración de Tween 80. El tamaño de partícula obtenido se ubicó entre los 500 y los 2000 nm.

Múltiples materiales han sido sometidos al proceso de nano-deshidratación. Este proceso se completa con el agregado de sustancias que contribuyen a mejorar el proceso propiamente dicho o mejoran propiedades del producto deshidratado obtenido. Por ejemplo, la trehalosa se emplea para estabilizar ingredientes activos farmacológicos y para aumentar su vida útil (Schmid et al. 2011)(Feng et al. 2011). El manitol es un excipiente farmacéutico(Schmid et al. 2011) al igual que el quitosano, que además es un polímero biorreabsorbible (Gautier S., C. Arpagaus, N. Schafroth, M. Meuri 2010). La goma arábica, las proteínas de suero de leche, el alcohol polivinílico, el almidón y la maltodextrina constituyen diferentes materiales para la encapsulación (Li et al. 2010). El alginato de sodio se emplea como emulsificante y agente inmovilizador (Blasi, P., A. Schoubben, S. Giovagnoli 2010).

De los biocompuestos activos encapsulados por nano deshidratación pueden nombrarse la griseofulvina (antifúngico) (Schmid et al. 2011), el salbutamol encapsulado en lactosa para combatir el asma (Arpagaus 2010), L-leucina como agente dispersante y aditivo alimentario (Feng et al. 2011) y la BSA como proteína modelo (Bürki et al. 2011).

AUGE CIENTÍFICO

En la Fig. 4.2 se muestra el crecimiento en la cantidad de publicaciones con los términos “*nanospray drying*” en los últimos 20 años.

El costo de preparar nanovehículos para transportar bioactivos puede reducirse si se minimiza la cantidad de pasos y el tiempo que lleva producir estas formulaciones. Además, es altamente deseable poseer un método que sea versátil en cuanto a permitir el uso de una gran variedad de polímeros, lípidos y surfactantes en un solo paso, con un solo equipo, sin involucrar sustancias corrosivas o procedimientos deletéreos para encapsulante y encapsulado. Este método de nanodeshidratación permite producir micro y nanoesferas, liposomas, arqueosomas (vesículas preparadas en base a lípidos extraídos de arqueobacterias (arqueolípidos)) y micelas en menos de una hora, sin usar solventes tóxicos (Mozafari 2006).

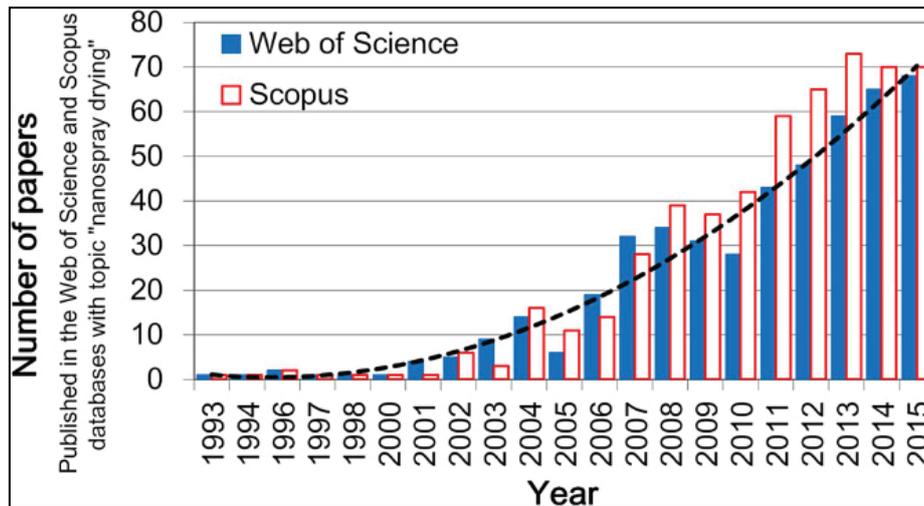


Fig. 4.2: Actividad creciente en la búsqueda bibliográfica de los términos “nanospray drying”. Número de artículos publicados con esos términos desde 1993 hasta 2015. Adaptada de (Arpagaus *et al.* 2017).

La encapsulación mediante nano-deshidratación protege, estabiliza y aumenta la solubilidad y la liberación controlada posterior de los compuestos bioactivos cuya entrega es en forma de polvo. Además, esta técnica asegura la estabilidad microbiológica de los productos, reduce los costos de almacenamiento y transporte y minimiza el riesgo de degradaciones químicas o biológicas al disminuir el contenido de agua final (Drosou *et al.* 2017). Por otro lado, la eficiencia de encapsulamiento puede llegar al 90%, asegurándose partículas de tamaños y características reproducibles (Đorđević *et al.* 2014).

El mayor desafío que presenta esta técnica duda lo constituyen las condiciones de temperatura y fuerzas cortantes a las que son sometidas las suspensiones a deshidratar. Así, las temperaturas alcanzadas en el receptáculo de deshidratación durante el procesamiento, pueden provocar situaciones no deseadas en proteínas y péptidos sensibles, inestabilidades químicas y físicas como la agregación, la desnaturalización, la oxidación y hasta hidrólisis. Las proteínas, por ejemplo, son expuestas a diferentes tipos de esfuerzos como la agitación, el bombeo, la atomización y la deshidratación. Por otro lado, la adsorción de estas especies en diferentes superficies puede ocasionar el desplegamiento de sus estructuras nativas en sistemas proteicos, lo que conlleva finalmente a la agregación y a una posible pérdida de actividad biológica, efecto especialmente indeseado cuando se nanoencapsulan enzimas.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

El CS empleado fue el denominado CS_p, o quitosano purificado, descrito en la sección 4.2.1. Se disolvió en una solución 0.5 % de ácido acético para lograr una concentración de 0.2 %, p/p y se lo dejó en agitación magnética suave durante 12 horas. A continuación se lo sometió a un baño ultrasónico durante 30 min, con una potencia de 100W.

La insulina recombinante humana, se disolvió en HCl 20 mM. La solución generada se dejó reposar a TA (Temperatura Ambiente) durante 2 hs. a los fines de lograr su completa hidratación.

4.2. MÉTODOS

A continuación se presenta el diagrama de flujo del proceso de generación de *nanocarriers* vía tecnología de *spray drying* (Figura 4.3).

Hasta la etapa de mezcla de ambos compuestos, insulina y CS_p, el proceso es idéntico al descrito en el capítulo 3 correspondiente a estructuras nanoensambladas.

El proceso propiamente dicho de nanodeshidratación se describe a continuación, incluyendo los componentes del equipo y las variables de operación ensayadas.

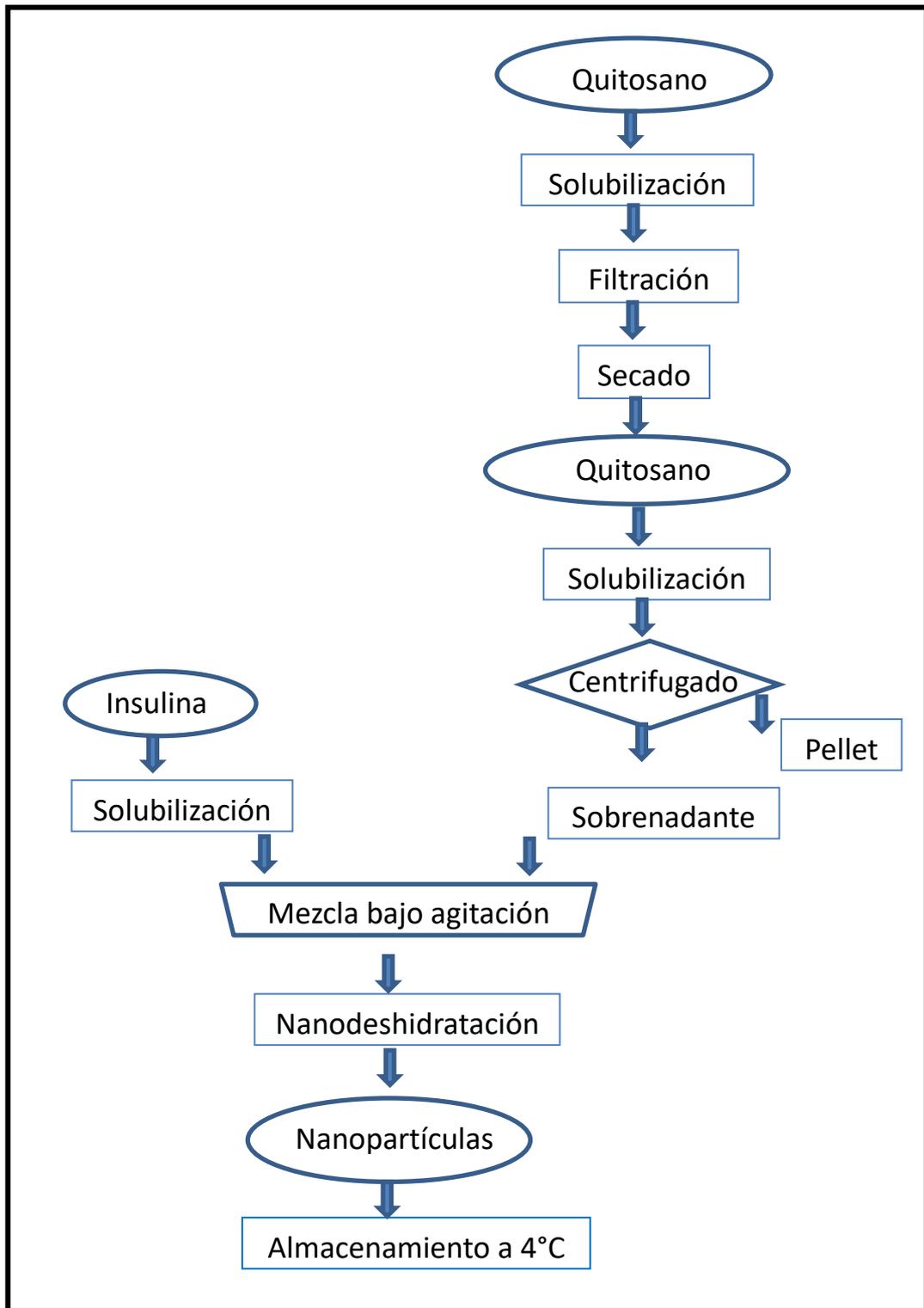


Fig. 4.4: Diagrama de flujo que resume la generación de nanopartículas I-CS por el método de nanodeshidratación.

4.2.1. PREPARACIÓN DE COMPLEJOS MEDIANTE EL PRINCIPIO DE NANODESHIDRATACIÓN (*NANO SPRAY DRYING*)

La nanodeshidratación es considerada dentro de los procedimientos denominados top-down, ya que se parte de un sistema macroscópico y se lo reduce a la escala micro o nanométrica, modificando de esta manera sus propiedades y características (Kumar *et al.* 2014).

Consiste en la transformación de una muestra líquida en un polvo seco, con un tamaño de partícula determinado. Consta de tres etapas: 1) la atomización de la muestra líquida; 2) las gotas pulverizadas impactan con una corriente de aire para evaporar la fase líquida y 3) por último la separación y colección de las partículas ya secas (Demir & Degim 2013)(Kulkarni *et al.* 2016).

La atomización (primera etapa) se logra con una bomba peristáltica que impulsa la muestra a circular a través del cabezal de pulverización, el cual contiene una rejilla vibratoria con un tamaño de poro determinado (Fig. 4.4b). El movimiento arriba-abajo de la rejilla – vibrando a una frecuencia ultrasónica de por ej. 60 kHz- provoca entonces la formación de millones de pequeñas gotas, generando un aerosol que será secado por la corriente de aire descendiente, desplazándose hacia el sector de colección (“jet”) (Lee *et al.* 2011).

La separación de las partículas (tercera etapa) hace necesario el uso de un precipitador electroestático en el cual el mecanismo de colección es independiente de la masa. Este mecanismo se compone de un electrodo estrellado (Fig. 4.4.a) conectado a tierra (cátodo) y un electrodo colector cilíndrico (ánodo). La presencia de alto voltaje alrededor del colector genera un campo electroestático que acelera la deposición de las partículas con carga negativa sobre la pared interna del cilindro(Lee *et al.* 2011).

Las partículas adheridas se retiran del cilindro empleando una espátula de plástico blando, para evitar rayar el electrodo. En la figura 4.4.c se muestran el cátodo con su forma estrellada (centro) y el ánodo recubierto de partículas deshidratadas (secciones blancas).

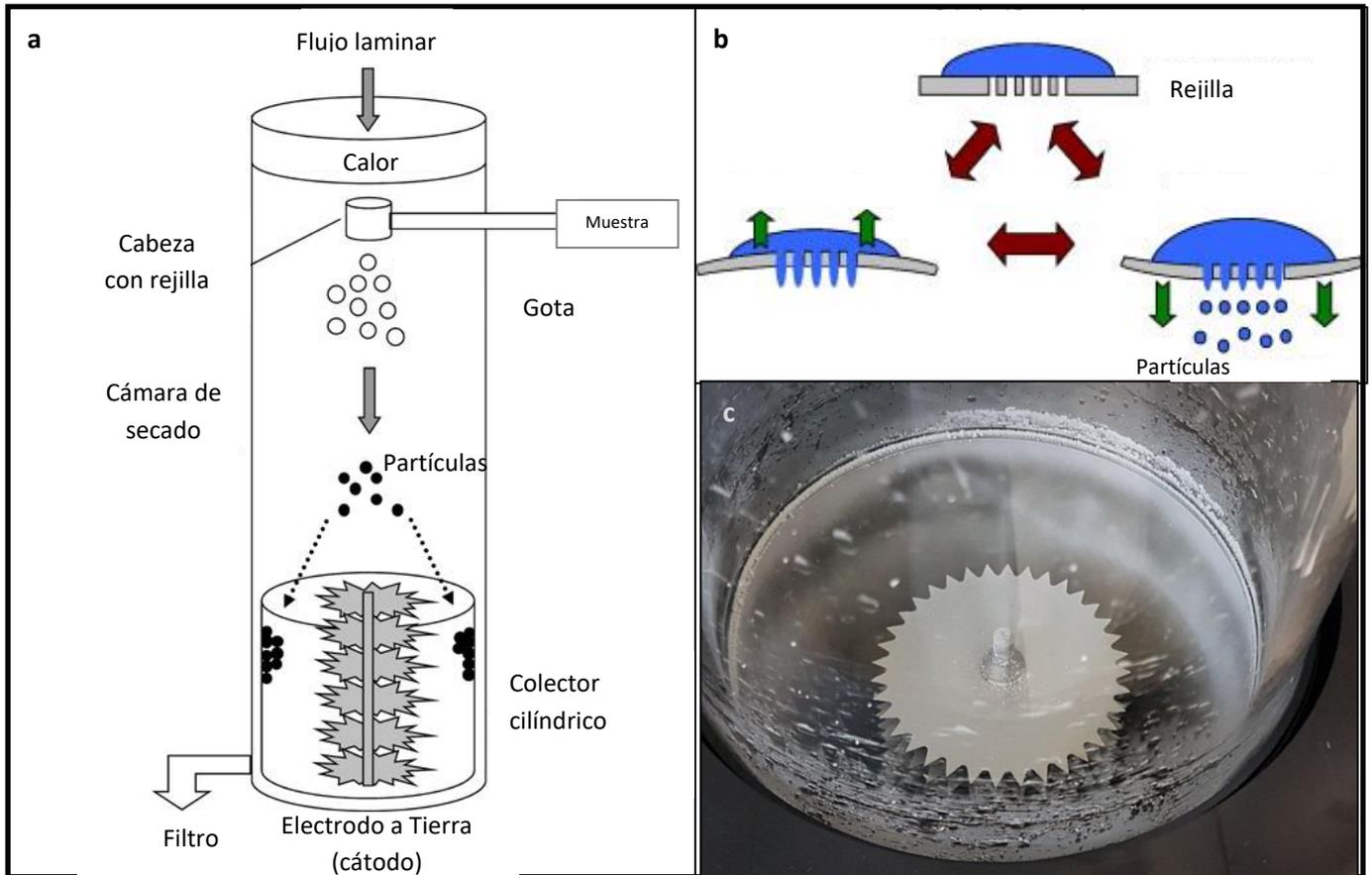


Fig. 4.4: Arreglo experimental del equipo de nanodeshidratación (a). Rejilla vibratoria, cuya función es la de atomizar la muestra (b). Cátodo estrellado y ánodo colector recubierto de partículas secas (c). (a y b adaptados de (Lee *et al.* 2011)).

El equipo de nanodeshidratación empleado es un modelo Buchi (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Los parámetros de operación se ajustaron para cada solución empleada y se muestran en la Tabla 4.1 de la sección 4.2.2.

4.2.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Todas las muestras se prepararon vertiendo una determinada solución (surfactante, glicina, insulina) sobre la solución de CS, bajo agitación magnética leve. Se midió el pH final antes de introducirla en el equipo de nanodeshidratación, corroborando que no fuese menor a 2.

Preparación de soluciones de CS. La técnica de secado vía *nanospray* posee variables cruciales que definen el éxito o el fracaso de su aplicación, además del tamaño de la rejilla, la presión de la bomba o las temperaturas de entrada y salida de la corriente de aire de secado.

De vital importancia resulta la masa total de solución y la fracción de sólidos que se inyecta, ya que de resultar insuficiente también lo será el material colectado. También es relevante la viscosidad de la muestra, debiendo ajustarse el flujo o el porcentaje de apertura del cabezal pulverizador a fin de que el tiempo de secado sea el adecuado para la correcta deposición de la muestra (Krzysztof & Krzysztof 2011) sin afectar la integridad físico química del material atrapado y por ende su funcionalidad.

Con la finalidad de poner en marcha el proceso y establecer la masa total de solución a inyectar, se ensayaron múltiples proporciones de quitosano y otras especies de masa molecular menor a la I, cada uno en el medio de disolución apropiado. El objetivo fue obtener partículas en la escala submicrónica, por las ventajas que presenta la materia particulada en estos tamaños, según se explica en esta sección. Las proporciones de cada componente y otros parámetros se muestran en la Tabla 4.1. Las variables consideradas fueron: presencia de surfactante, la masa de nanopartículas a colectar, el tiempo de inyección y el volumen de solución inyectado.

En relación a la masa total inyectada, la concentración de cada especie se torna relevante. En la literatura, las concentraciones de quitosano empleadas son muy variables, desde 10% (Demir & Degim 2013) hasta 0.025% p/v (Ngan *et al.* 2014), reportándose siempre diámetros de partícula menores a 500 nm. Si bien en principio cualquier concentración dentro de este rango sería aceptable, nuestra experiencia con concentraciones mayores a 1% p/v indicaron que la viscosidad del quitosano argentino aquí empleado, resultó demasiado alta para trabajar con soluciones de concentraciones mayores, ya que la fluidez de la solución se ve comprometida. Por esta razón, se eligieron concentraciones iniciales menores para comenzar la puesta a punto.

Tabla 4.1. Combinaciones de parámetros considerados para la generación de nanopartículas de quitosano mediante *nanospraying*.

Muestra	CS (%)	Surfactante (%)	Tiempo inyección (min)	Volumen (ml)	Masa colectada
CS_p	0.1	no	23	50	<10 mg
CS_p	0.05	no	20	50	no
CS_comercial	0.05	no	30	50	>10 mg
CS+Tween 20	0.05	si	42	100	<10 mg
CS+Tween 80	0.05	si	47	100	>10 mg
CS+Tritón	0.05	si	40	100	>10 mg
CS+Glicina 0.2 %	0.05	no	60	100	>10 mg
CS+Glicina 0.2 %	0.2	no	48	100	>10 mg
CS+Glicina 0.2 %	0.2	no	257	300	>50 mg

Soluciones con quitosano comercial y CS_p. Como primer paso se emplearon soluciones 0,1% p/p de CS_p y de quitosano comercial (Sigma, CAS 9012-76-4, 448869-250GR), en 0,5% p/v de soluciones de ácido acético. Ambos tipos de CS se disolvieron bajo agitación leve durante 24 horas a TA (Barnstead/ThermoLyneCimarec®, ThermoScientific, USA) y se los sometió a agitación ultrasónica, con 100W de potencia, durante 25 minutos. Se verificó por medición directa que el pH no fuese menor a 2, ya que hay partes del equipo que pueden dañarse (pH CS_p: 2,93 y pH CS comercial: 4,15).

La cantidad de muestra colectada para el caso del CS_p fue insuficiente para los análisis requeridos, del orden de los microgramos. La misma se depositó formando una fina capa de polvo sobre el cilindro metálico y no fue posible separarla del mismo. El material que sí lo hizo se desprendió formando pequeñas fibras, similar a los residuos al emplear una goma de borrar, para dar una descripción gráfica. Esto es un indicio de que la cantidad de masa de solución inyectada es muy baja y/o que las nanopartículas generadas se estarían agregando, debido probablemente a un comportamiento altamente adhesivo del polisacárido, como se reporta en Jiang y colaboradores (2017) (Jiang *et al.*

2017). En dicho trabajo, se asocia el peso molecular del CS con la cantidad de material adherido al electrodo. Los autores atribuyen la ocurrencia de este fenómeno al tipo de CS empleado, tratándose de un CS de alta viscosidad y para formulaciones con una proporción de CS menor al 50% con respecto a los sólidos totales.

A continuación se decidió entonces emplear diferentes surfactantes y evaluar si éstos contribuirían a minimizar la agregación macromolecular del CS.

Soluciones con CS_p y surfactantes. Se prepararon 100 ml de soluciones 0,025% p/p de Tween 20 y Tween80 (ambos de Merck) en 0,5% p/v de ácido acético. Esta es una estrategia empleada en caso de CS de alto peso molecular o muy polidisperso, la cual genera soluciones viscosas cuando se solubiliza (Ngan *et al.* 2014). A dichas soluciones se les agregó CS_p para alcanzar una concentración de 0,1% p/v. Las soluciones reposaron 4 días antes de su uso, a temperatura ambiente. Se sonicaron 20 minutos, entregando una potencia de 100W, y se midió el pH de las soluciones, los cuales fueron de 3,5 (CS+Tween 20) y 4 (CS+Tween 80). El producto obtenido se depositó hasta alcanzar la mitad del cilindro colector, lo que podría ser un indicio de la polidispersidad de las nanopartículas obtenidas (Li *et al.* 2010).

En el caso de CS+Tween 20, la recolección fue muy escasa, similar a la del CS_p solo. Para la muestra de CS+Tween 80, la recolección fue abundante, en el orden de los miligramos. Las imágenes SEM de ambas combinaciones mostraron gran polidispersidad y agregación del producto particulado, como se mostrará en la sección correspondiente, lo que motivó el empleo de un surfactante con menos grupos OH para reducir su interacción con el CS y disminuir la agregación, brindándole a las NP mayor estabilidad coloidal (Li *et al.* 2013)(Maged *et al.* 2016).

Se decidió emplear Tritón 0,5 % p/v (CAS 9036-19-5, Merck) en 0,5 % v/v de ácido acético, para preparar una solución de CS_p 0,1 % p/v, con pH 3,26. Pequeñas gotas se formaron en la rejilla durante el funcionamiento del equipo y el chorro aerolizado no se conformó de manera inmediata. Posteriormente, se observaron gotas en el cilindro metálico y el electrodo. Esto puede deberse a la baja viscosidad de la solución inyectada, lo que determina que el flujo sea excesivo y el tiempo de residencia de la gota pulverizada insuficiente, ocasionando que el secado no ocurra dentro del equipo y que gotas micro o macroscópicas puedan alcanzar el cilindro metálico y perjudicar la deposición (“Manual de Operación Nano Spray Dryer Buchi 90” n.d.).

Se probó también aumentar el volumen de solución de alimentación, inyectando 100 ml de una solución de CS_p 0,05% a fin de considerar la cantidad de masa colectada, pero ésta resultó insuficiente, ya que en casi su totalidad se adhirió al cilindro metálico y no pudo recuperarse. En este punto, resultó evidente que la masa total de CS_p inyectada fue insuficiente y que el tamaño de partícula obtenido era demasiado grande.

Soluciones con quitosano y glicina (CS+Gly). Ya que la cantidad de insulina disponible para los experimentos era limitada, se decidió entonces emplear la glicina (Gly) como sustancia subrogante. Este aminoácido aunque de pequeña masa molecular, es reportado en publicaciones referentes a la puesta a punto de las condiciones de operación de los equipos de nanodeshidratación. Este reemplazo constituyó un punto de partida que permitió identificar y optimizar muchas variables críticas del proceso de nanodeshidratación (Mohammed & Borchers 2015)(Moschetti *et al.* 2016). A una solución 0,02% de CS_p bajo agitación magnética leve, se le adicionó una solución 0,4% p/v de glicina, disuelta en agua desionizada. La mezcla permaneció a temperatura ambiente durante 24 hs y su pH final fue de 3,4. Luego de ese tiempo se la agitó durante 3 horas antes de su inyección en el equipo. Nuevamente, se observó el depósito de gotas en el cilindro metálico, por lo que el porcentaje de apertura del cabezal de pulverización se redujo al 70%. Si bien la cantidad de muestra colectada fue escasa, se recolectó lo suficiente para realizar los estudios de distribución de tamaño de partícula y potencial ζ llevados a cabo con DLS (sección 2.2.2).

A continuación se preparó una mezcla 1:1 de CS_p y Gly con concentraciones finales de 0.1% y pH 3,8. Esta vez el porcentaje de apertura de cabezal fue del 50% para evitar la generación de gotas. Inicialmente el volumen inyectado fue de 100 ml y ya que la cantidad de muestra colectada fue significativa y el tamaño de partícula resultó menor al micrón, se procedió a inyectar 300 ml de dicha mezcla. La masa colectada fue del orden de los miligramos lo cual permitió proseguir con las determinaciones planificadas.

Soluciones con quitosano e insulina (ICS). A continuación, se prepararon 150 ml de una solución 1:1 compuesta por 0,2% de CS_p y 0,2% de insulina, ésta última disuelta en HCl 20 mM. El pH de mezcla resultó igual a 2,4 y se llevó a 3,0 antes de la inyección en el equipo. El producto obtenido, correspondiente a las nanopartículas generadas se presentó en forma de un polvo blanco muy volátil, que se adhiere ligeramente a las paredes del cilindro colector. Se pudo colectar gran cantidad de masa, unos 50 miligramos. Las NP, con gran polidispersidad, presentaron tamaños desde los cientos de nanómetros hasta la decena de micrones.

Por último, se preparó nuevamente una mezcla 1:1 de CS_p e I 0,2% (en ácido acético 0,05% y HCl 20mM respectivamente) pero esta vez se la sumergió en un baño ultrasónico y se suministró una potencia de 100W, durante 20 minutos. Se recogieron dos fracciones diferenciadas del material depositado. La primera se colectó en el borde del cilindro (aprox. 1 cm de longitud) y la segunda del resto del cilindro. En total se colectaron 0,187 gramos a partir de 02 gramos inyectados.

En la Fig. 4.5 se muestran los diferentes polvos obtenidos para CS_p (a), CS+Gly (b) e ICS (c).

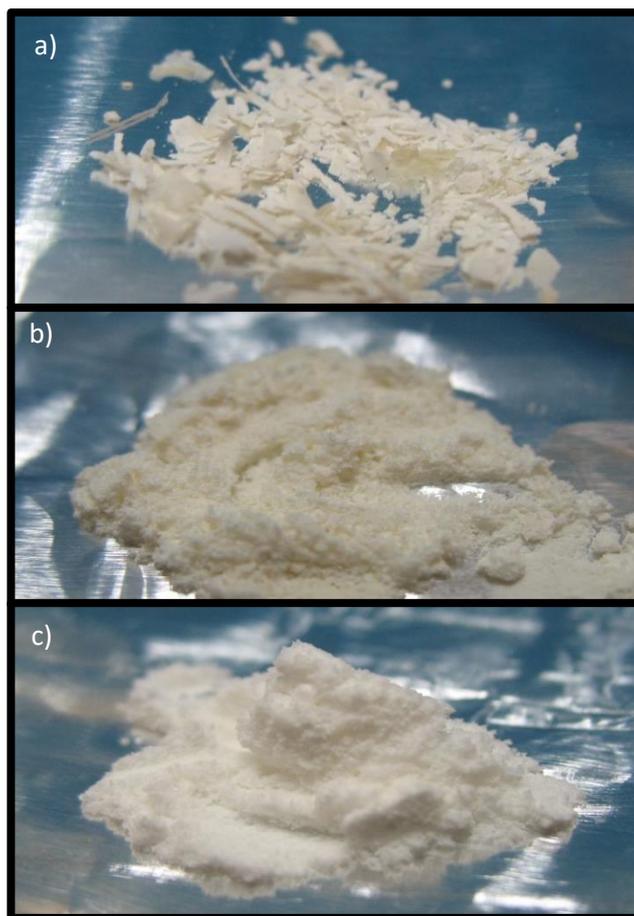


Fig. 4.5. Aspectos macroscópicos de las distintas muestras nanodeshidratadas: CS_p (a), CS+Gly (b) e ICS (c).

4.2.3. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL Z OBTENIDOS POR DLS

Los fundamentos de cómo se obtienen la distribución de tamaño de partícula y el potencial ζ , fueron expuestos en la sección 2.2.2. En el presente Capítulo sin embargo, se consideró la representación en número además de la representación en volumen. Brevemente, si se toman dos partículas de 5 y 50 μm de diámetro por ejemplo, la representación en volumen expresará los volúmenes relativos que ocupa cada población de partículas (en porcentaje) dentro del volumen total. A su vez, la representación en número (en porcentaje) indicará la cantidad de partículas que compone cada uno de esos volúmenes. De esta manera, si bien una población de 5 μm puede parecer minoritaria en volumen, su número puede ser grande al tratarse de partículas pequeñas (Fig. 2.7), mientras que a unas pocas partículas de 50 μm se les puede atribuir un volumen grande (Horiba 2016). Como ya se comentó con anterioridad, debido a que cada representación se logra por medio de diferentes cálculos, los valores de las representaciones no son tenidos en cuenta, considerándose solo como una indicación general sobre la composición en tamaño de las diferentes poblaciones de partículas. Nuevamente, el equipo empleado y las condiciones de medición son las descriptas en la sección 2.2.2.

4.2.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Las micrográficas de las nanopartículas generadas con la técnica de nanodeshidratación se adquirieron con un equipo JSM- 6390LV (JEOL, Japón), con un voltaje de aceleración de 20 kV y una distancia de trabajo de 10 mm. Las muestras fueron depositadas sobre cintas de carbono, previa metalización con oro (Desk IV, Denton vacuum, Estados Unidos) (Alvarado-Palacios *et al.* 2015).

4.2.5. ESPECTROMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Los fundamentos de esta técnica se describieron en la sección 2.2.5. Las nanopartículas se analizaron con un equipo FTIR Agilent Cary 630 (Agilent Technologies, Estados Unidos). Se realizaron 64 barridos espectrales por muestra, entre 4000 y 400 cm^{-1} , con 4 cm^{-1} de resolución. Las muestras se mantuvieron en un desecador con sílica antes de ser analizadas.

4.2.6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Esta técnica se emplea para separar e identificar compuestos en solución, en concentraciones tan bajas como “ppb”. Los componentes principales de un sistema HPLC son: un recipiente para el solvente (fase móvil), una bomba de alta presión, una columna (fase estacionaria), un sistema de inyección y un detector (Fig. 4.6).

Si la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, la separación se denomina fase normal. Si en cambio la fase estacionaria es menos polar que el solvente, la separación es de fase reversa. En este último caso, el tiempo de retención de un compuesto aumenta al disminuir la polaridad de la especie de interés. La fase reversa se utiliza para separar por ejemplo azúcares, péptidos y proteínas (“HPLC 2” n.d.).

El tiempo de retención varía dependiendo de las interacciones entre la fase estacionaria, la muestra y el solvente. Al circular a través de la columna, la muestra interactúa con ambas fases de manera diferente y con velocidades distintas, debido a las diferentes polaridades del analito. Aquellos analitos con la menor interacción con la fase estacionaria o con la mayor interacción con la fase móvil serán los primeros en abandonar la columna o los primeros en eluir.

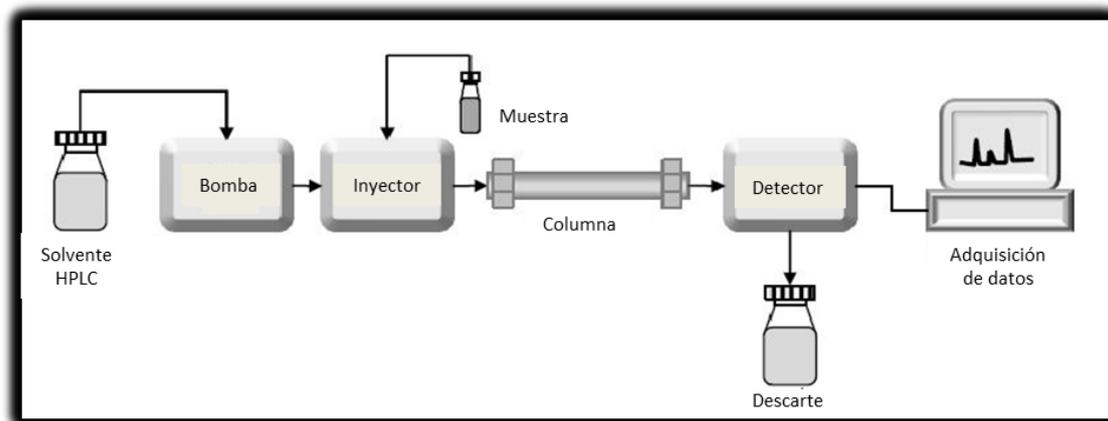


Fig. 4.6: Esquema representativo de un equipo de cromatografía HPLC.

Adaptado de (Ngan *et al.* 2014).

La bomba de presión para generó una corriente continua de solvente, en la que el sistema de inyección introduce la muestra. La columna posee el material empaquetado necesario para lograr una separación efectiva. A continuación, el detector separó las señales de los distintos componentes a medida que éstos eluyeron fuera de la columna de alta presión. El programa Agilent Chem Station Rev. B04.01 2009 permitió obtener el cromatograma correspondiente (“HPLC1” n.d.).

Se empleó esta técnica para evaluar el contenido de la insulina atrapada en las nanopartículas, adaptando el protocolo empleado por Pan y col. (2002) (Pan *et al.* 2002). Con este fin, se prepararon soluciones 2 mg/ml de I, CS e ICS en sus respectivos solventes y se ajustó el pH a 3. Todas las soluciones, y los medios de disolución, fueron pasados por un filtro de tamaño de poro de 0,45 μm (hydrophilic Milipore Millex HV) antes de ser inyectadas en el equipo (Agilent Technologies, 1200 series, Quaternary pump G 1315C). Se empleó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C18, 4,6x100 mm, 3,5 μm , que operó a 35 °C. Como fase móvil se empleó una mezcla de acetonitrilo: 0, M NaH_2PO_4 : 0,05 M Na_2SO_4 /30:35:35, ajustando el pH a 3,03 con el agregado de Ácido Fosfórico. El flujo se mantuvo en 0,7 ml/min y se inyectó un volumen de 5 μl por muestra.

4.2.7. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica experimental dinámica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante en un determinado intervalo de temperaturas (Suriñach *et al.* 1992). Gracias a ella se pueden determinar transiciones de primer orden como las temperaturas de fusión, cristalización, evaporación y

condensación y de segundo orden como la temperatura de transición vítrea (T_g) y de manera general entalpías de transición o de reacción (Fig. 4.7) (Sandoval Aldana *et al.* 2005).

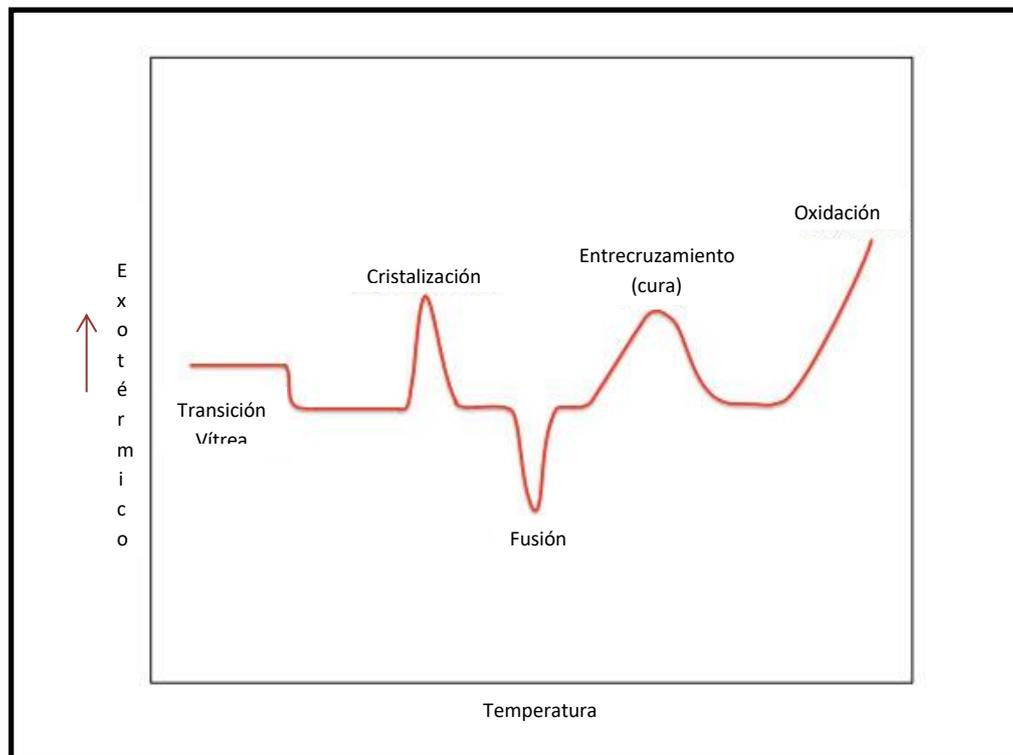


Fig. 4.7: Curva ideal de DSC mostrando las formas asociadas a las principales transiciones de fase al incrementarse la temperatura. Adaptada de [8].

El principio básico de funcionamiento es que, cuando la muestra sufre una transformación física –por ejemplo una transición de fase- necesitará una cantidad mayor o menor de calor que la referencia, para que ambas tengan la misma temperatura. Según el requerimiento de mayor o menor calor, el proceso será endotérmico o exotérmico.

Al comparar la diferencia en los flujos de calor entre la muestra y la referencia, es posible medir la cantidad de calor absorbida o liberada durante una determinada transición (Pérez *et al.* 2006).

Para la obtención de los termogramas, se colocaron 3,86 mg de Insulina y 4,3 mg de NP, secadas previamente durante 24 hs a 55°C, en cápsulas de 100 μ l de capacidad, usándose una cápsula vacía como referencia. Las mediciones fueron hechas en un equipo DSC-910 acoplado a un sistema TGA-2100 (ambos de TA Instruments, USA). La velocidad de corrida fue de 10 °C/min en atmósfera de Nitrógeno. Los termogramas se evaluaron empleando el programa Mettler Stare.

4.2.8. ELECTROFORESIS CAPILAR

Los fundamentos de esta técnica fueron descritos en detalle en la sección 3.2.7.

Se empleó un equipo Beckman P/ACE MDQ, con un detector PDA (Detector de arreglo de diodos), operando a una longitud de onda de 214 nm. El buffer de corrida fue Ácido Bórico 150 mM pH 9,9. Se aplicó un voltaje de 18 kV y una corriente de 71 μ A. Todas las determinaciones se realizaron a 25 °C. El tiempo de inyección fue de 3,5 segundos a una presión de 0,2 psi.

La solución de insulina empleada como control se preparó de tal manera que tuviese la misma concentración que la insulina entrampada en la solución de nanopartículas (1,24 mg/ml) y para ambas soluciones se determinó un pH de 2,5. Las muestras se corrieron por duplicado y durante 20 minutos.

4.2.9. ACTIVIDAD DE LA INSULINA COMPLEJADA Y VEHICULIZADA CON CS EN CULTIVOS CELULARES

Cultivo celular

Las líneas celulares empleadas, así como su cultivo se detallaron en la sección 3.2.10

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Western blot

El procedimiento se describió en detalle en la sección 3.2.10

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta etapa se innovó con el método de secado por nanodispersión/nanodeshidratación (*nanospraying*) con miras a generar nanopartículas, lo cual requirió la puesta a punto del método. Una vez obtenidos las NP con esta tecnología, se procedió a su caracterización físico-química y morfológica. Esta estrategia consiste en el atrapamiento físico de la insulina en una matriz de quitosano.

4.3. PUESTA A PUNTO DE LAS CONDICIONES DE SECADO MEDIANTE NANOSPRAVY

Las condiciones para la generación de nanopartículas por medio de esta técnica varían ligeramente para cada solución a inyectar. Las variables que influirán en el producto obtenido son la velocidad de la bomba, la temperatura del aire de secado, el tamaño de rejilla, el porcentaje de apertura del cabezal de pulverización (o simplemente “apertura”) y el volumen inyectado.

El equipo empleado en este trabajo, no permitía cambiar ni la rejilla (4 μm) ni la velocidad de la bomba ya que ésta opera a velocidad fija, por lo que se trabajó variando el volumen de muestra y el porcentaje de apertura. La siguiente tabla (Tabla 4.2) muestra las diferentes condiciones para las diferentes soluciones inyectadas.

Tabla 4.2. Condiciones de operación del equipo de secado ensayadas para distintas soluciones de CS_p.

Muestra	T sec. (C)	Presión (bar)	Apertura (%)	Vol (ml)	Rejilla (μm)
CS	120	38	100	100	4
CS+surfactante	120	36	100	100	4
CS+Glicina	120	35	50/70	100	4
CS+Insulina	120	38	50	150	4

Finalmente, la configuración a emplear para generar las nanopartículas ICS fue: rejilla de 4 μm , presión 38 bar, volumen inyectado 150 ml, bomba en posición “1”, temperatura superior 120°C y apertura del 50%. Esta combinación incluyó las mejores condiciones experimentales, las cuales permitieron obtener una alta eficiencia de encapsulamiento y lograr nanopartículas de tamaño reproducible.

4.4. CARACTERIZACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

CS_p con Glicina. Se evaluó la distribución de tamaño de partícula para la solución CS_p+Gly 0,1%, para un pH de trabajo de 4,0, antes y después de su inyección en el equipo NanoDryer (Fig 4.8). Dicha distribución resultó polimodal, obteniéndose picos menores y mayores al micrón, al analizar la distribución expresada en volumen (Fig. 4.8a). La población de partículas con un radio hidrodinámico menor a 500 nm fue mayoritaria (Fig. 4.8b) según puede concluirse de la distribución expresada en número. La mezcla inicialmente presentó un pico alrededor de 478 nm, mientras que para las NP resuspendidas en una solución 1:1 de ácido acético 0,05% y HCl 20mM a pH 4,0, el pico se desplazó hasta 356nm, aunque su distribución resultó menos dispersa.

El valor del potencial ζ para el CS antes de la deshidratación resultó de (67,1±2,4) mV, mientras que dicho valor para las nanopartículas antes y después del proceso fue de (58,8±3,1) y (43,2±2,1) mV, respectivamente. Estas diferencias podrían atribuirse al proceso de nanodeshidratación y a la adición de Gly. En la literatura, no se reportaron valores de potencial ζ para sistemas similares. Estos valores de potencial ζ , resultaron altos en valor absoluto lo cual es importante como indicador de su estabilidad coloidal ya que aseguran alta repulsión electrostática en suspensión.

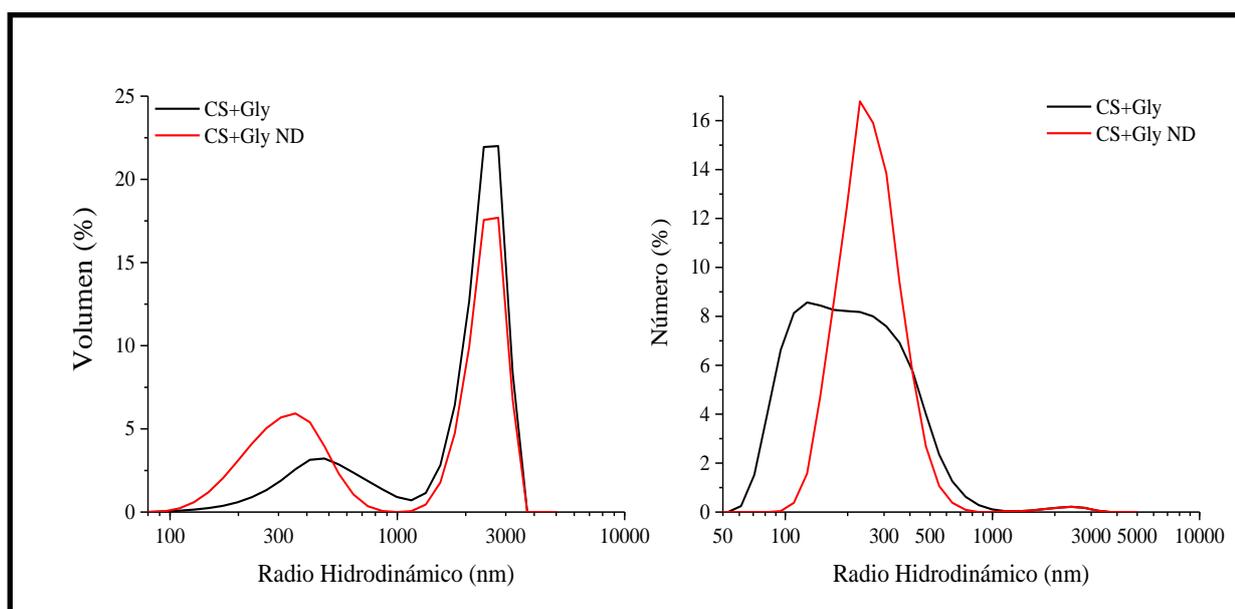


Fig. 4.8: Distribución de tamaño de partícula, expresado en volumen (a) y en número (b) para nanopartículas de quitosano-glicina antes (—) y después (—) del proceso de deshidratación, a pH 4. La concentración final tanto de CS_p como de Gly fue de 0,1% p/v. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

Si bien en la literatura no se han descrito resultados que involucren nanovehículos compuestos solamente de glicina y quitosano, si se han empleado este y otros aminoácidos como Histidina,

Leucina, Arginina entre otros, como excipientes en la nanodeshidratación del fármaco aztreonam (AZT), ya que la presencia de estas especies modifica la morfología, la densidad, el contenido de humedad y la deposición en los pulmones de las nanopartículas de esta droga (Yang *et al.* 2015b). También se han agregado aminoácidos como lisina y arginina en polvos obtenidos por deshidratación a los fines de estabilizar el material deshidratado constituido por nanopartículas obtenido y aumentar su vida útil durante el almacenamiento. Ejemplo de esto es la obtención de nanopartículas de caseína diseñadas como vehículos para ácido fólico (Penalva *et al.* 2015).

Otra molécula pequeña utilizada en sistemas nanodeshidratados es la curcumina, con un PM de 368,38 g/mol (O'Toole *et al.* 2012). En el trabajo citado se consideraron condiciones de proceso tales como tamaño de rejilla, concentración de CS, uso de surfactante y temperatura del aire de secado entre otros, con el fin de evaluar el efecto que cada uno tenía en el tamaño de partícula logrado (O'Toole *et al.* 2012). Los resultados indicaron que las nanopartículas de menor tamaño $-(285 \pm 30)$ nm- se obtuvieron para una concentración de CS de 0,025 p/v%, una temperatura del aire de secado máxima de 120 °C y sin la inclusión de ningún tipo de surfactante. Para otras combinaciones de variables de proceso, las partículas de menor tamaño y distribución monomodal y con apariencia más esférica, se obtuvieron con la menor concentración de CS (0,025 p/v%). Por lo tanto este parámetro resulta clave para lograr NP a través de esta técnica.

Sistemas nanodeshidratados ICS

De manera similar a lo ocurrido con las NP conteniendo Gly, la distribución de tamaño de partícula resultó polidispersa al emplearse Insulina. Los picos menores al micrón se localizaron en 955 nm para la mezcla original y en 31,7 y 412,5 nm para las nanopartículas luego del proceso de nanodeshidratación, expresada en volumen (Fig. 4.9a). La distribución de tamaño expresada en número (Fig. 4.9b), indica que la población mayoritaria luego de la deshidratación, es la que posee radios hidrodinámicos menores a 100 nm. Con este resultado podemos advertir que el proceso fue adecuado para el objetivo perseguido, trabajando bajo las condiciones operacionales detalladas.

Los potenciales ζ fueron de $(59,3 \pm 2,2)$ y $(62,8 \pm 0,7)$ mV respectivamente, valores altamente influenciados por el potencial del CS. Lo mismo vale decir con respecto a los valores de potencial η y la estabilidad coloidal de las nanopartículas.

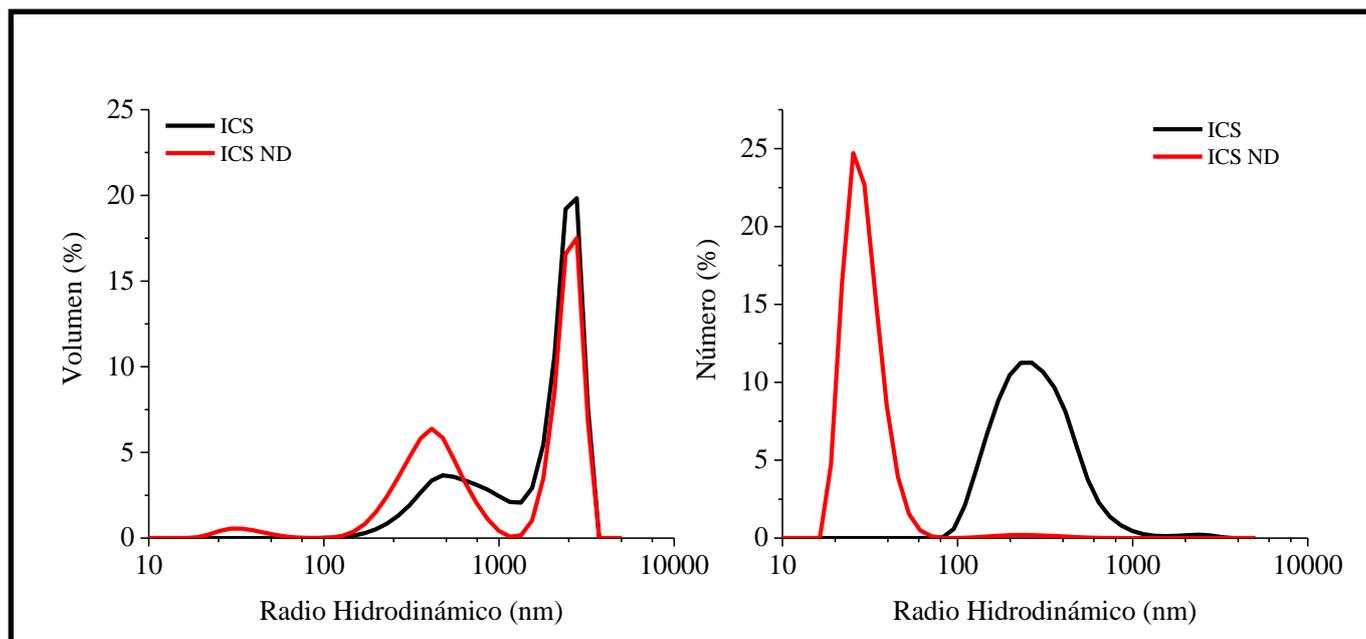


Fig. 4.9. Distribución de tamaño de partícula, expresado volumen (izq.) y en número (der.) para nanopartículas de quitosano-insulina antes (ICS, —) y después (ICS ND, —) del proceso de deshidratación, a pH 3. La concentración final tanto de CS como de I fue de 0,1% p/v. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

Sistemas nanodeshidratados ICS sonicados

En la literatura se describe que los complejos se distribuyen a lo largo del electrodo cilíndrico según su tamaño. En este sentido, Li y col. (2010) caracterizaron mediante DLS las partículas colectadas en la mitad inferior y en la mitad superior del electrodo (Fig. 4.10), las cuales habían sido obtenidas a partir de muestras conteniendo distinto material encapsulante: almidón modificado, maltodextrina, goma arábiga, polivinil-alcohol, etc (Li *et al.* 2010). Al estudiar las diferentes distribuciones de tamaño se encontró que para las especies cargadas, tanto los valores medios de los picos como su ancho pueden diferir notablemente (150 nm o más), entre ambas secciones, ubicándose los mayores en la sección superior. Para las especies de polisacáridos no cargados en cambio, dichos valores sólo difirieron en una decena de nanómetros.

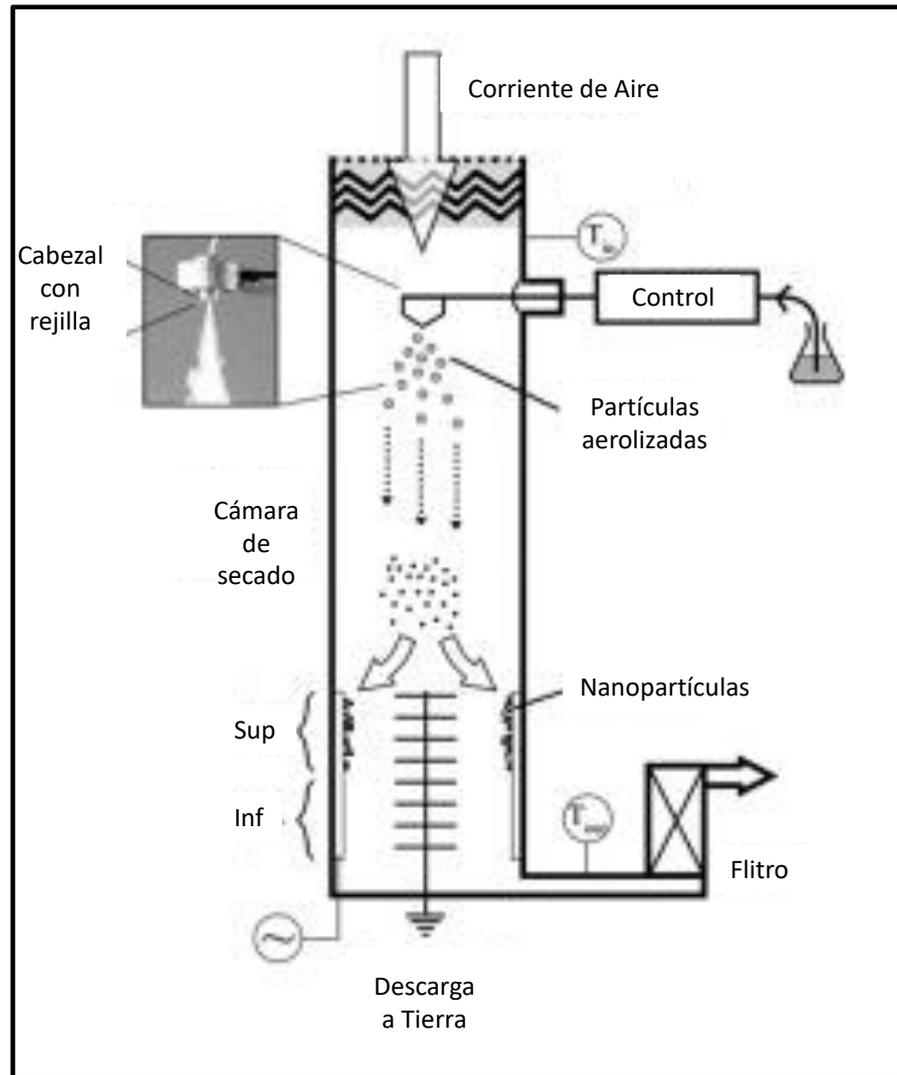


Fig. 4.10: Esquema de un equipo de nanodeshidratación. Se identifican dos secciones equivalentes en el electrodo de colección (superior/inferior). (Adaptado de (Li *et al.* 2010)).

Estos resultados indicarían que las partículas de mayor tamaño son atrapadas rápidamente por el sistema de colección, generándose de esa manera una separación por tamaño a lo largo del cilindro, fenómeno que se intensificaría para soluciones con moléculas cargadas.

En el caso de los nanovehículos, también se recuperaron dos fracciones pero el criterio de colección fue otro, considerando que en el centímetro superior del electrodo se depositó la mayor cantidad de masa. Por otro lado, en experimentos previos llevados a cabo para optimizar la metodología (no mostrados), el material depositado en las secciones inferiores resultó de muy difícil recolección. Con estos antecedentes, se decidió que las dos secciones fueran el centímetro superior ("borde") y el resto del cilindro ("cil"). En ninguna experiencia se depositó material a menos de 15 cm del borde inferior del electrodo.

En la Fig. 4.11 se muestra la distribución de tamaño expresada en volumen para ambas secciones. La primera posee un pico en 13,5 nm mientras que la segunda posee dos: en 10,4 y en 32,7 nm., respectivamente. Este resultado guarda correlato con el hecho que las secciones no difieren significativamente, como sí se reportó en el trabajo de Li (2010).

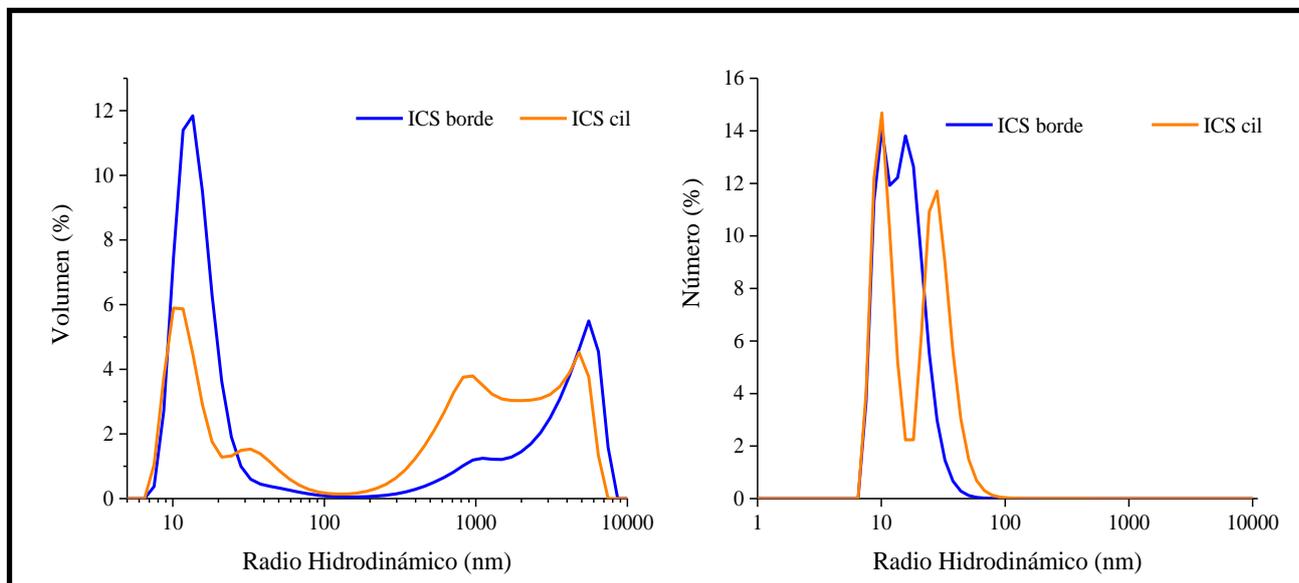


Fig. 4.11: Distribución de tamaño de partícula, expresado en volumen para nanopartículas de quitosano-insulina ubicadas en el borde del cilindro colector (—) y en el resto del cilindro (—), a pH 2,4. La concentración final tanto de CS_p como de I fue de 0,1% p/v. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

En términos generales, las figuras 4.9 y 4.11 correspondientes a los complejos ICS, nos muestran que con este método se obtienen poblaciones, cuyos picos evaluados como radio hidrodinámico, se sitúan tanto alrededor del micrón como en valores menores a los 100 nm. Este hecho indujo a la decisión de filtrar las soluciones de NP a los fines de retener la población micrométrica.

Se procedió entonces a la ultrafiltración de 1 mg de ICS colectadas del cilindro en 50 ml de una solución 1:1 de ácido acético 0,05% v/v y HCl 20 mM. Para tal fin se empleó un cassettePellicon XL Durapore, con poros de 0,45µm de tamaño. El dispositivo se muestra en la Fig. 4.12 y consta de una bomba peristáltica, un manómetro y el cassette, más los vasos de precipitado que contienen a la muestra y a los volúmenes retenido (Ret) y permeado (Per).

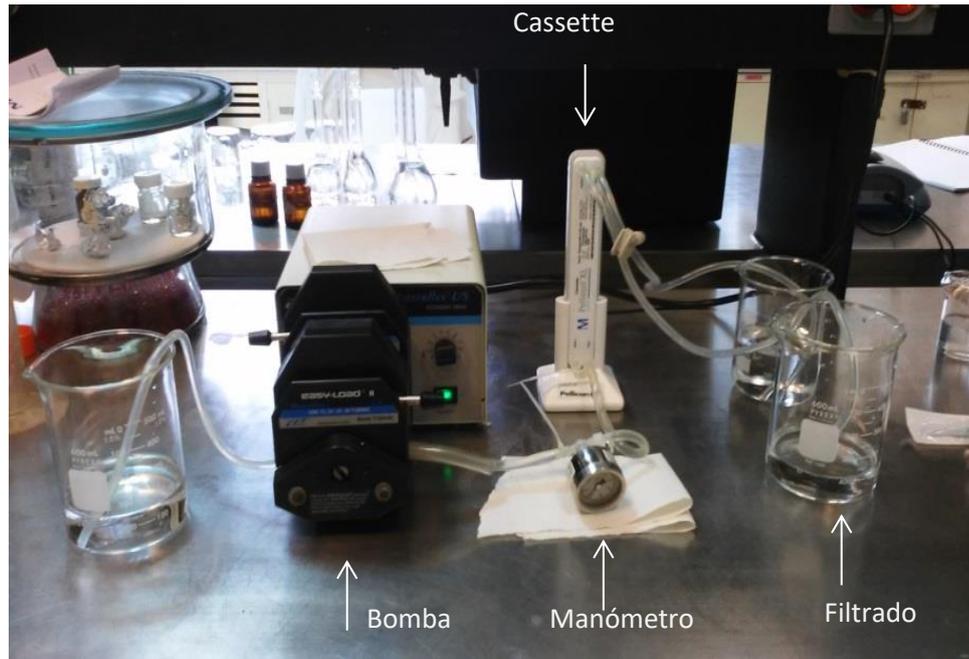


Fig. 4.12: Dispositivo para ultrafiltración, compuesto de una bomba, un manómetro y el cassette de ultrafiltrado.

La distribución de tamaño de ambas fracciones, expresada en volumen y en número, se muestra en la Fig. 4.13. La fracción permeada mostró un único pico en 3,42 nm mientras que la retenida, de carácter polimodal, posee picos destacados en 10,87 y 346 nm. Como en el caso de las nanopartículas sin sonicar, el porcentaje mayoritario lo presentaron las partículas con radios hidrodinámicos menores a 100 nm. La generación de NP por este método resultó equivalente con o sin ultrasonido. Debido a este resultado, se decidió mantener el protocolo de generación sin sonicación para la no inclusión de un paso más en el proceso general.

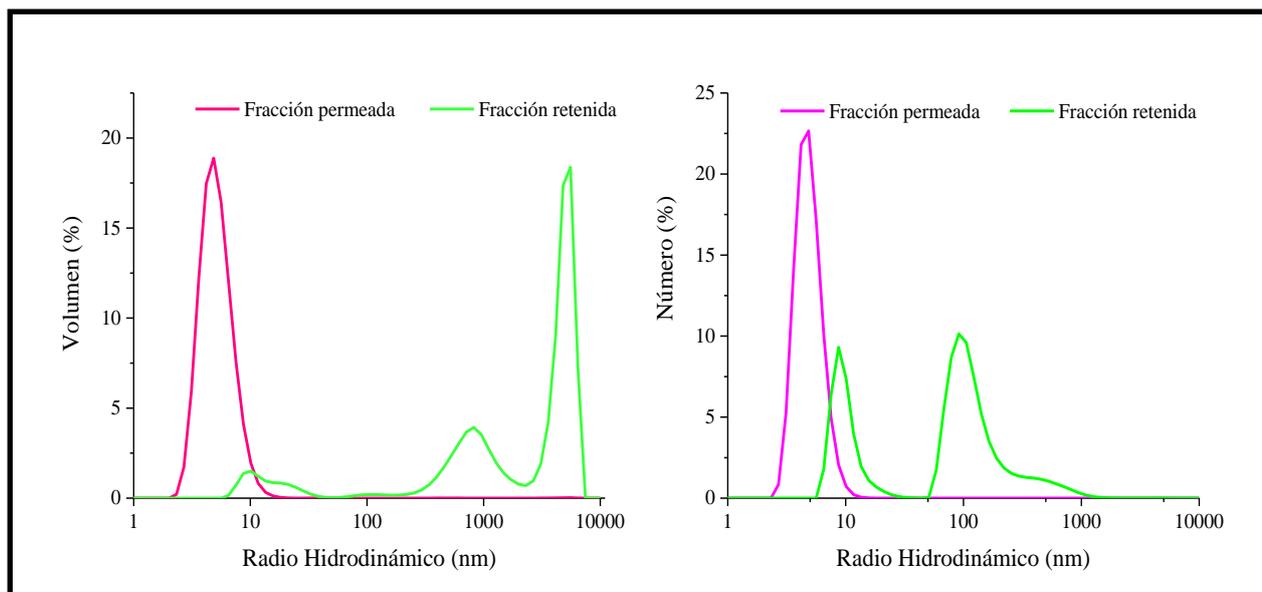


Fig. 4.13: Distribución de tamaño de partícula para las fracciones permeada (—) y retenida (—) de nanopartículas de quitosano-insulina ultrafiltradas. Distribución expresada en volumen (izq.) y en número (der.), a pH 2,4.

4.5. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA Y DE POTENCIAL Z EN FUNCIÓN DEL PH

Se disolvieron 0,016 gr de nanopartículas ICS en 50 ml de una mezcla 1:1 de ácido acético 0,5% v/v y HCl 20 mM y se agitó la solución durante media hora. Se le agregó 0,01% NaN₃ y se la mantuvo refrigerada una noche a 4°C para evitar crecimiento microbiano. A continuación se determinó la distribución de tamaño de partícula y el potencial ζ para distintos pHs. La información obtenida se resume en la Figura 4.14.

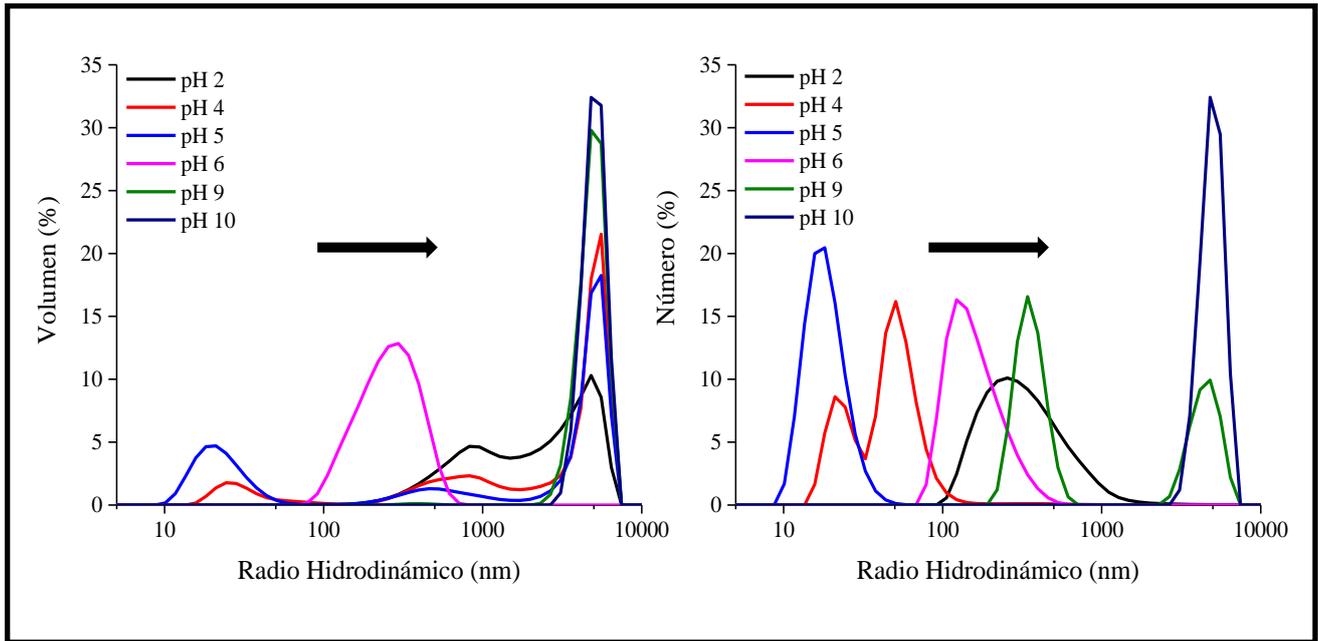


Fig 4.14: Distribución de tamaño de partícula para ICS en función del pH, expresado tanto en volumen (izq.) como en número (der.). La flecha indica desplazamiento hacia mayores tamaños.

La distribución de tamaño y su comportamiento frente a los cambios de pH, son consistentes con el rango de pH en el cual las interacciones electrostáticas entre las especies están favorecidas, incluso aquí con las nanopartículas obtenidas mediante nanodeshidratación. Para pHs ácidos, las ICS tienden a ser más pequeñas y poseen mayor carga eléctrica, mientras que a pHs básicos dicha carga decrece a medida que el tamaño aumenta. Por otro lado, es sabido que el CS tiende a hacerse insoluble a pHs básicos (Teng *et al.* 2013).

Este comportamiento se justifica también al observar que los valores de potencial ζ fueron mayores a 30 mV para $\text{pH} > 2$ pero disminuyeron o no pudieron ser medidos en condiciones básicas (Fig. 4.15).

Se preparó nuevamente una solución de ICS en 50 ml de una mezcla 1:1 de ácido acético 0,5% v/v y HCl 20 mM (0,04 gr), con 0,01% NaN_3 y se la dejó reposar refrigerada una noche y nuevamente se evaluó su distribución de tamaño de partícula y el potencial ζ para distintos pHs.

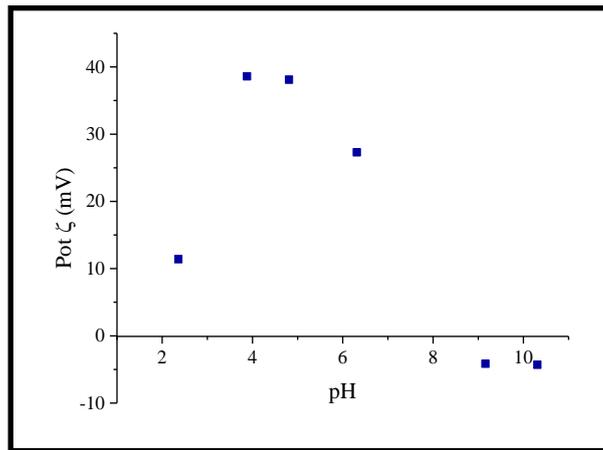


Fig. 4.15: Variación de potencial ζ para ICS en función del pH del medio. Temperatura de medición: 25 °C.

En la Fig. 4.16a puede apreciarse que para ese tiempo de solubilización, si bien existe una población de partículas de tamaño en torno al micrón, la población mayoritaria se sitúa cerca de los 100 nm para la mayoría de los pHs, según se desprende del análisis de la distribución de tamaños en número (Fig. 4.16b).

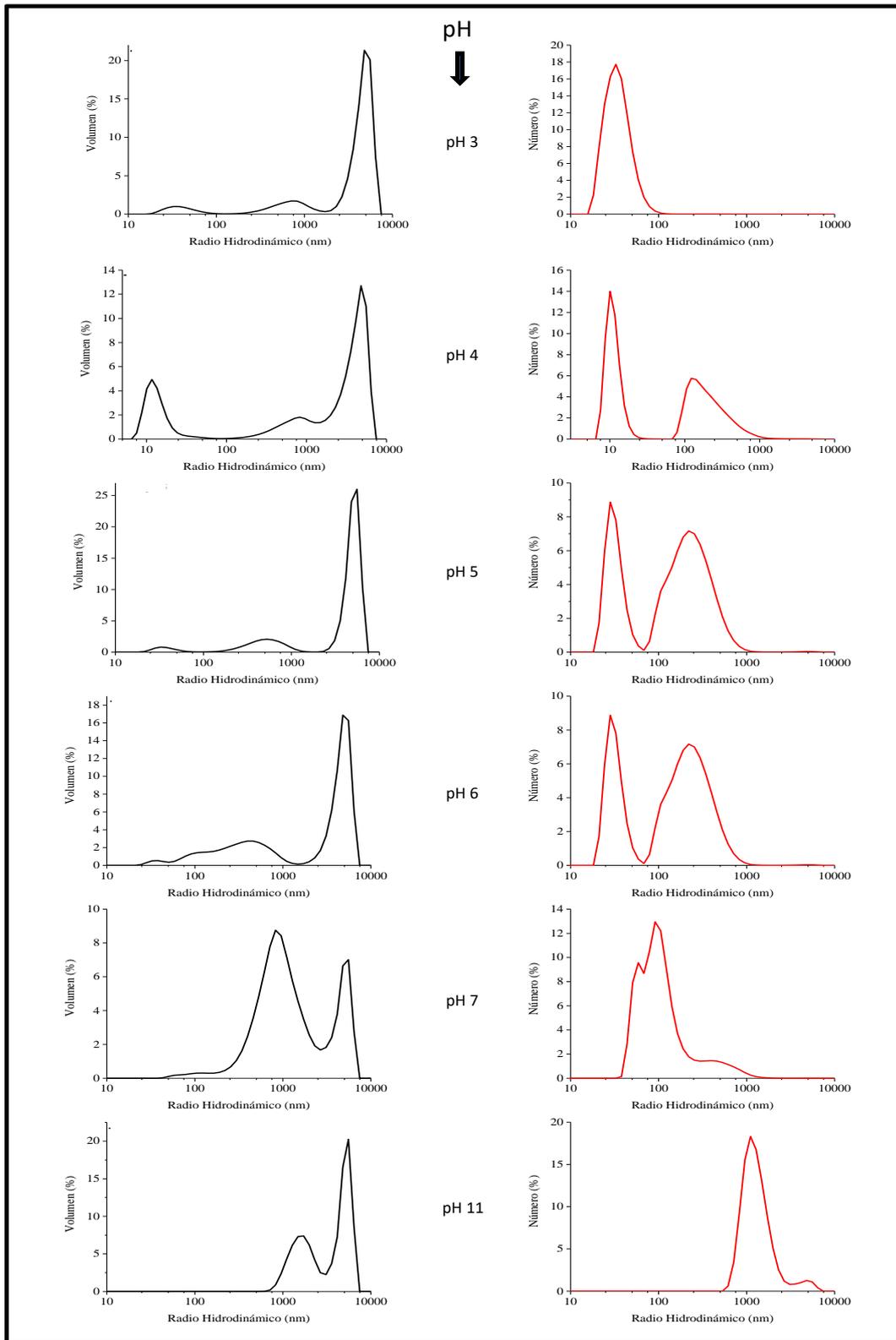


Fig. 4.16: Distribución de tamaño de partícula para ICS en función del pH. Las soluciones fueron reposadas durante 24 hs antes de las determinaciones. Las distribuciones se expresan en volumen (izq.) y en número (der.) para pH crecientes.

En cuanto al potencial ζ (Fig 4.17), pueden distinguirse tres zonas: a $\text{pH} < 5$, el valor de potencial ζ es alto. Estas NP tendrían la mayor estabilidad coloidal en el medio en el que se encuentran (McClements 2015). A $\text{pHs } 5 < \text{pH} < 8$, el potencial manifiesta leves variaciones, aunque siempre resultó menor que en condiciones de acidez del medio y a $\text{pH} > 8$ la determinación de potencial ζ no fue posible. Nuevamente la insolubilidad del CS a pHs básicos tendría su impacto en estos resultados.

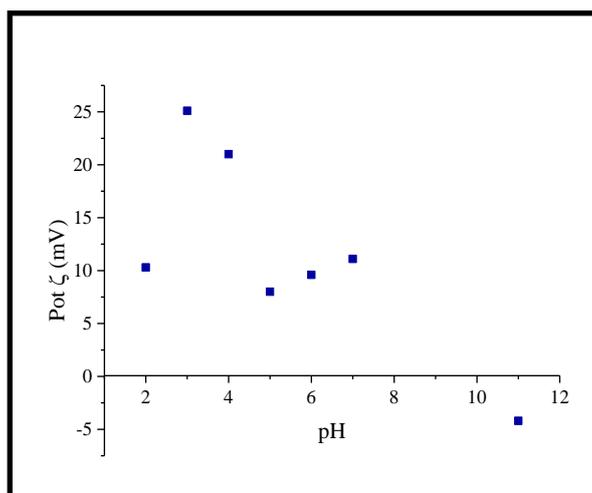


Fig. 4.17: Potencial ζ determinado para ICS en función del pH. Se distinguen claramente tres zonas en cuanto a los valores de potencial ζ . Temperatura de medición: 25 °C.

4.6. ESPECTROSCOPÍA FTIR DE SOLUCIONES

A los fines de evaluar la influencia que el pH del entorno ejerció sobre las ICS, se obtuvieron espectros FTIR de la solución de ICS a distintos pHs. Como primer análisis, se eligió una longitud de onda representativa de la interacción entre I y CS (1635,87 nm), longitud de onda en la que se observó interacción entre los biopolímeros. Dicha longitud de onda es cercana a la conocida región amida I en proteínas, dada por el estrechamiento de grupos carbonilos ($\text{C}=\text{O}$). Luego se graficó la absorbancia de ese pico obtenido para las ICS a los distintos pHs evaluados. Como puede notarse en la Fig. 4.18, la absorbancia decrece a medida que el pH aumenta, excepto para pH 11. Una posible explicación para este comportamiento puede obtenerse al considerar las concentraciones de H^+ y OH^- en cada etapa.

A pH 3, la concentración de $[\text{H}^+]$ es alta, y el grupo amino del CS se encuentra protonado. Puede contribuir al espectro ya sea considerando la interacción C-N o las N-H. El grupo carboxilo presente en la I mientras tanto, también está protonado y podría no contribuir en demasía a la absorbancia total, lo

cual implicaría nula o escasa interacción entre ambas especies ya que ambos biopolímeros serían sólo miscibles en solución, sin interacción, principalmente por vía electrostática (Pérez *et al.* 2007)(Chang *et al.* 2017).

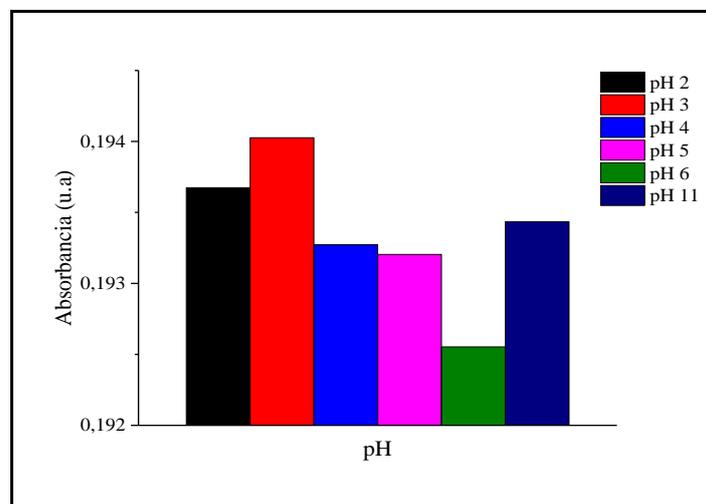


Fig. 4.18: Absorbancias obtenidas de espectros de FT-IR para I-CS a distintos pHs.

Número de onda =1635.87 cm⁻¹.

A pH>5, hay presencia de enlaces iónicos entre NH₃⁺ del CS y COO⁻ de la insulina, lo que reduce la posibilidad de éstos de vibrar y la absorbancia decrece. Sería razonable que al pH de máxima interacción I-CS, pH 6, la absorbancia sea mínima. En reportes previos (Choi & Han 2018) en los que se estudió la interacción de caseinato de sodio y pectina, dos biopolímeros habitualmente empleado en alimentos, se menciona que a pHs donde las interacciones electrostáticas se ven favorecidas y son la fuerza impulsora de la unión entre ambos biopolímeros, las intensidades de los picos en esta región disminuyeron. En otras palabras, se reflejan las interacciones entre grupos amida de la caseína y carboxilo del CS.

A pH 11, la concentración de [OH⁻] es alta, el grupo NH₂ se encuentra neutralizado y la contribución vibracional mayoritaria proviene del COO⁻, generando un nuevo aumento de la absorbancia. Choi y Han (2018) también indicaron en su trabajo que los incrementos de intensidad en este pico se debe a la contribución de COO⁻. La reducción en intensidad cuando se trabaja en estas condiciones de pH, son observadas a mayores longitudes de onda en regiones entre 3000 y 3500 cm⁻¹, fenómeno relacionado con la interacción entre grupos amino de proteínas y grupos carbonilos (Hamdani *et al.* 2018).

4.7. ULTRAESTRUCTURA Y TOPOGRAFÍA DE NANOPARTÍCULAS NANODESHIDRATADAS

En general, las nanopartículas compuestas exclusivamente por CS_p y aún aquellas que poseen algún surfactante, presentaron una superficie lisa, con textura suave y sin irregularidades superficiales apreciables. Las nanopartículas de CS combinadas con otra sustancia tales como surfactantes, glicina o insulina, sin embargo, exhibieron superficies más complejas y se muestran a continuación.

CS comercial y CS_p

La masa de CS comercial colectado fue suficiente para estudios de microscopía y distribución de tamaño, mientras que en el caso del CS_p fueron producidos sólo unos cuantos microgramos. Posiblemente este hecho tendría relación con la diferencia de pesos moleculares promedio del CS comercial (120 kDa) con el CS_p (356 kDa) y la polidispersidad de ambos tipos de CS (Fig. 4.19).

El CS comercial exhibió una apariencia macroscópica filiforme. Las nanopartículas se presentaron agregadas, polidispersas y mostraron tamaños que van desde los 500 nm hasta los 5 µm. En el caso de las nanopartículas generadas con CS_p, presentaron mayor polidispersidad, con valores que van desde cientos de nanómetros hasta varios micrones.

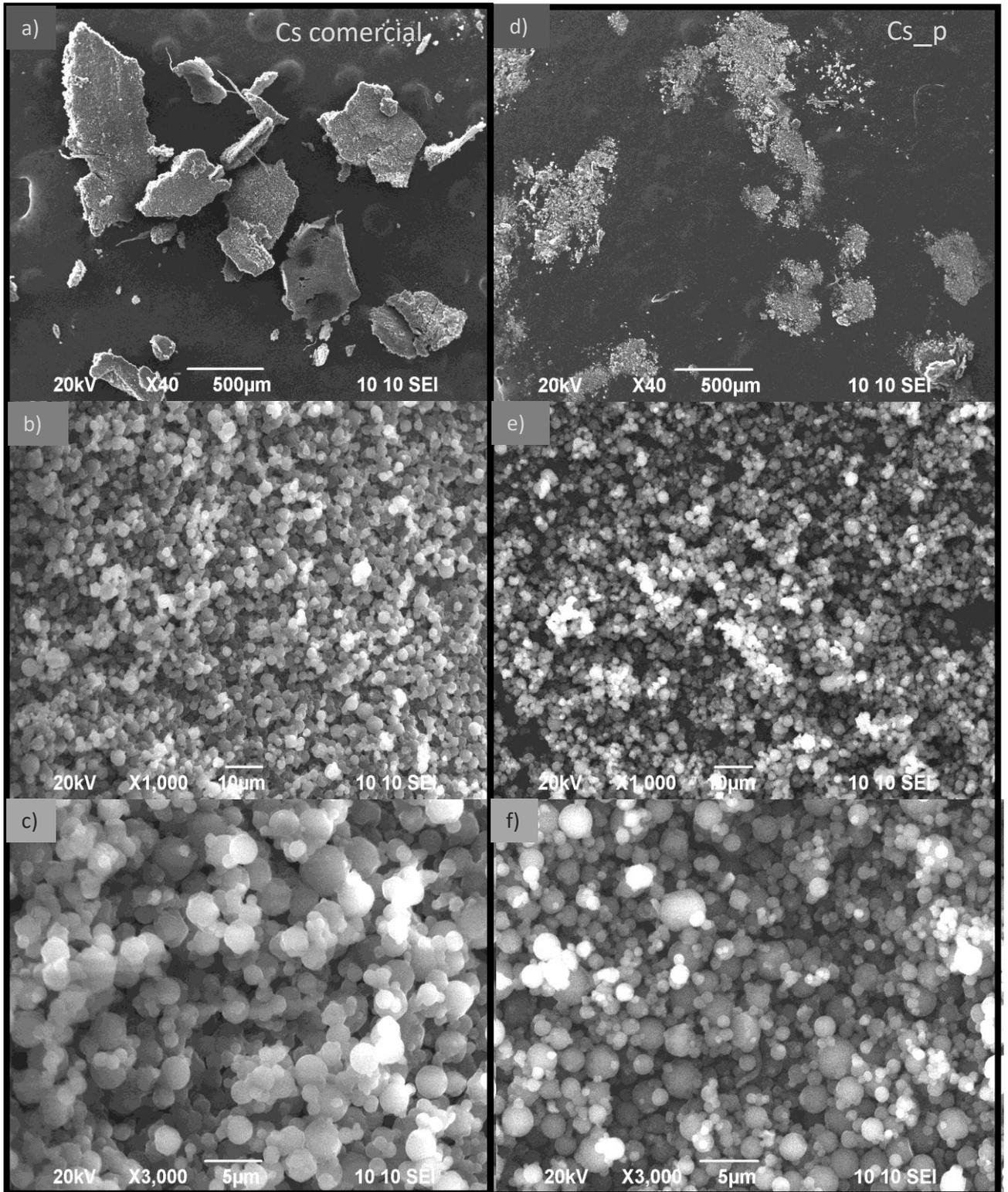


Figura 4.19: Micrografías SEM deCS comercial (a-c.) y CS_p (d-f) para distintas magnificaciones. La barra de escala y la magnificación se encuentran en cada imagen.

CS_p 0.1 % con Tween 20 o Tween 80

En trabajos previos se reportó el uso de surfactantes de bajo peso molecular, no iónicos, como el Tween 20 o Tween 80 para ejercer control en la cinética de liberación de sustancias encapsuladas como antimicrobianos por sus propiedades anfífilas (Xiao *et al.* 2011). Se postula que debido a tales propiedades, el control de las interacciones entre el biopolímero encapsulante y el material encapsulado podría ejercerse en mayor magnitud. Desde el punto de vista microestructural, la presencia de pequeñas moléculas en la mezcla sometida a deshidratación por aspersion mejoró la encapsulación. Ejemplo de esto es que el tween 20 aumentó la solubilización de curcumina, sustancia bioactiva y de escasa solubilidad en medios acuosos. Además, este detergente se incluyó en experimentos de deshidratación ya que no afecta el tamaño particular obtenido ($<1 \mu\text{m}$) y produjo nanosferas de superficies más suaves y relieves más regulares. Aún más, se sabe que el detergente se acumula alrededor de la capa exterior de CS y permaneció unido a éste por interacciones de tipo puentes hidrógeno (Ziani *et al.* 2008).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican la formación de semi-esferas de tamaños micrométricos, a las cuales se adhieren esferas más pequeñas (Fig 4.20). Este comportamiento de agregación durante el proceso de formación ya ha sido descrito previamente en la literatura (O'Toole *et al.* 2012), y se lo atribuye a una concentración insuficiente de surfactante para la correcta solubilización del CS. En otras palabras, el empleo de surfactantes no disminuyó el grado de agregación observado anteriormente para el CS.

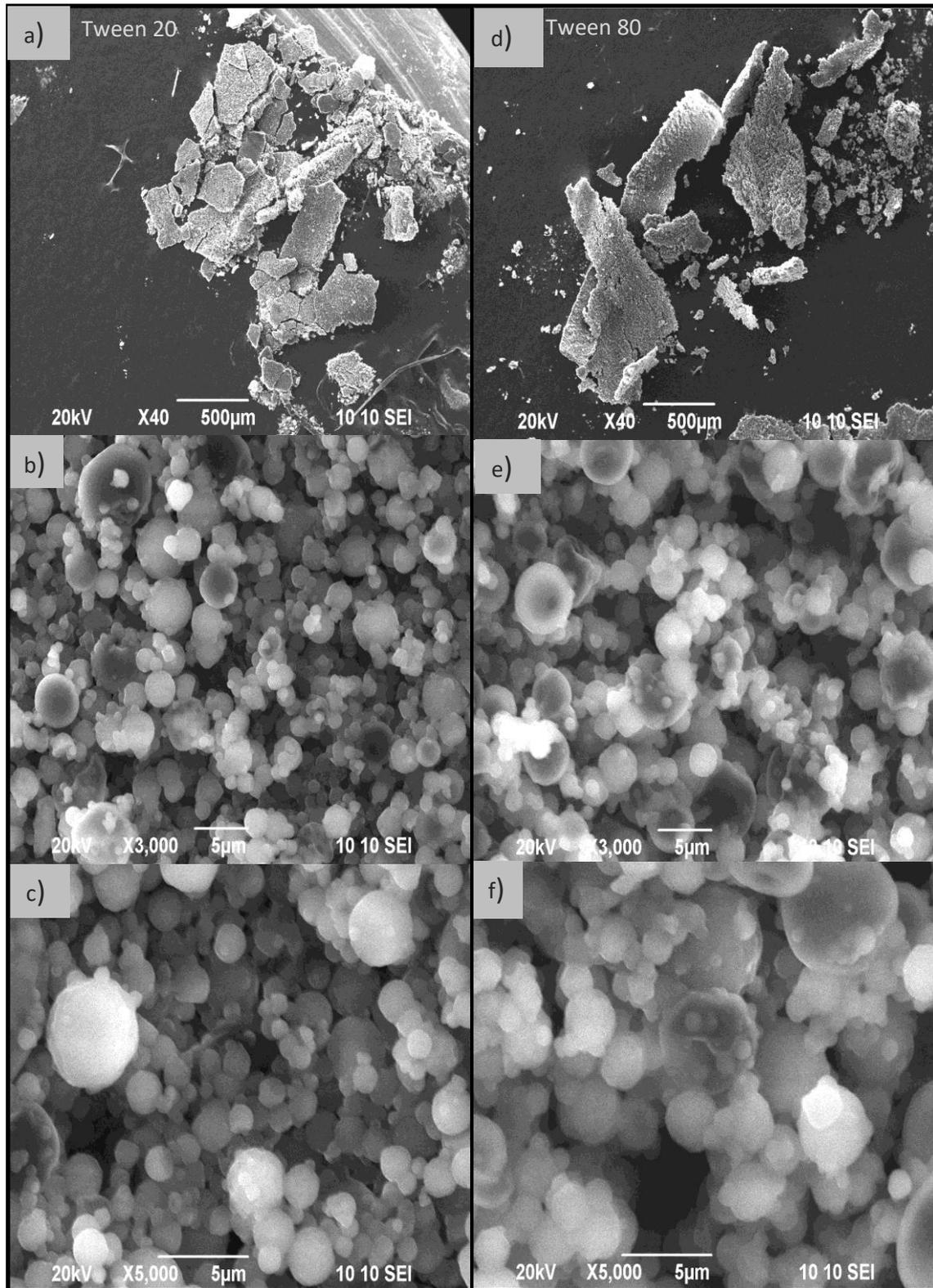


Figura 4.20: Micrografías SEM de CS_p combinado con Tween 20 (a-c) y con Tween 80 (d-f) para diferentes magnificaciones. La barra de escala y la magnificación se encuentran en cada imagen.

Una posible razón para este resultado sería lo reportado en literatura, donde se menciona que para una correcta disolución y el simultáneo incremento de la eficiencia del método empleado para

encapsular, se debe utilizar la menor cantidad posible de surfactante para lograr la solubilización (Gowthamarajan & Singh 2010). La adición de pequeñas cantidades de surfactante forma inmediatamente monocapas estables (micelas), debido a las características moleculares de estos compuestos (vesículas lipídicas). Mayores concentraciones determinan la formación de bicapas.

CS_p con Glicina

Las NP presentan un aspecto cristalizado y se ordenan en pequeños cúmulos, ya que la agregación es considerable, en coincidencia con lo reportado a la adición de glicina que no inhibió la cristalización de manitol después de su secado simultáneo (Sou *et al.* 2013). No se observan las estructuras esféricas lisas características del CS (Fig. 4.21).

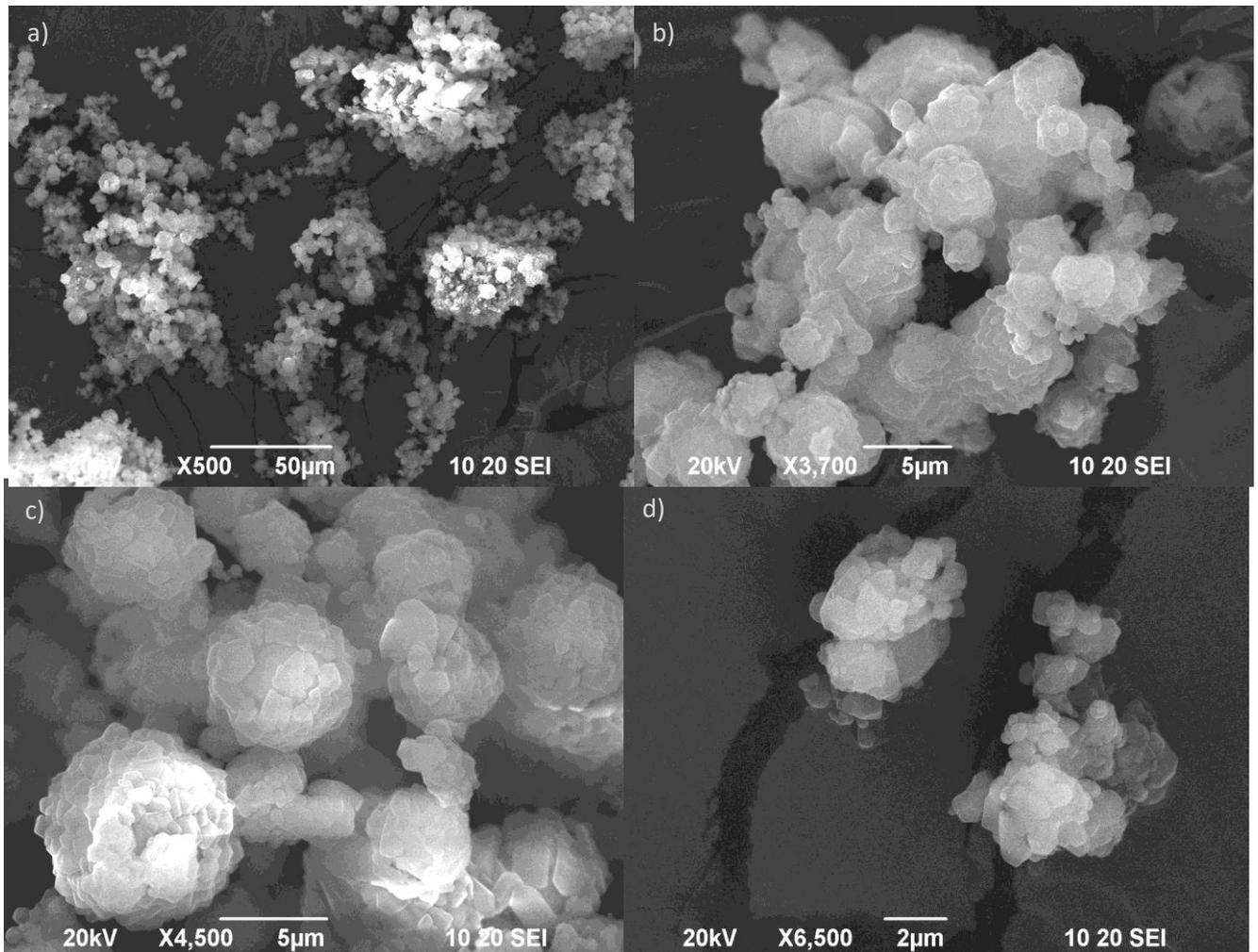


Figura 4.21: Micrografías SEM de CS_p combinado con Glicina, con concentraciones finales 0,1% p/p para ambos. Se muestran imágenes para magnificaciones crecientes (a-d). La barra de escala y la magnificación se encuentran en cada imagen.

Evidentemente la glicina, aunque de bajo PM, interfiere en el patrón que describe el CS durante la deshidratación. Se ha reportado que los polvos secados por aspersión que contienen manitol y glicina, esta última empleada como un modificador morfológico para la corrugación y mejorar el flujo de la superficie, se han utilizado con éxito para producir polvos amorfos en formulaciones para estabilizar la insulina e IgG en estado sólido seco a temperatura ambiente (Sou *et al.* 2016).

Sistemas nanodeshidratados ICS

La estructura se asemejó a las esferas generadas por los sistemas conteniendo sólo CS y se observó la unión de varias de ellas (Fig. 4.22b). La superficie de estas estructuras presenta una textura que asemeja a *cuentas de collar*, esféricas, en contacto unas con otras. Estos detalles se observan en la Fig. 4.22c. Muchas de las NP resultaron huecas y experimentaron explosión o colapso durante el proceso de deshidratación (Fig. 4.22d).

La agregación de las nanopartículas luego del secado ha sido reportada con anterioridad por otros autores y respaldada con las correspondientes imágenes SEM (Jiang *et al.* 2017)(Rampino *et al.* 2013). Los trabajos citados describen que el proceso de nanodeshidratación genera la fusión de las nanopartículas, dando lugar a la aparición de micropartículas. Además, al emplearse sustancias crioprotectoras como hidrocloreto de bencidamina, trehalosa, manitol y PEG para evaluar el incremento de tamaño en nanopartículas generadas vía nanodeshidratación y vía liofilización, se encontró que dicho incremento resultó similar entre los polvos obtenidos por ambos procesos, aunque el tamaño se mantuvo dentro de la escala nanométrica. Los autores optaron por la nanodeshidratación por ser un método más rápido y con mejor relación costo/rendimiento. Por otro lado, las micrográficas muestran que las nano/microesferas compuestas solamente por CS presentaron superficies lisas, mientras que las que combinan el polímero con los crioprotectores pierden esta apariencia y adoptan conformaciones más rugosas.

Las NP se muestran en general con su superficie estriada, producto de la deshidratación (Fig 6.23a). Esta característica, sin embargo, puede resultar de utilidad en ciertos casos. La superficie estriada de las nanopartículas, diseñadas para actuar como nano-vehículos, incrementa la rugosidad superficial, lo que a su vez aumenta la capacidad de dispersión de la partícula (Jiang *et al.* 2017). Se cree que esta característica disminuye la posibilidad de interacción con otras partículas, reduciendo las fuerzas de interacción y por lo tanto aumentando la dispersión y la capacidad de flujo (Chan 2006).

También se encontró un gran número de estructuras de difícil descripción. Podrían tratarse de nanopartículas que han colapsado durante la deshidratación o resultaron defectuosas (Fig.4.24b) por alguna variable no adecuadamente evaluada en el proceso. Podrían corresponderse también a cúmulos mixtos de proteína y Cs, pero donde la insulina fuera mayoritaria, ya que la apariencia de ésta luego de la deshidratación (Fig. 4.24c y 4.24d), no se asemeja a la de estas estructuras.

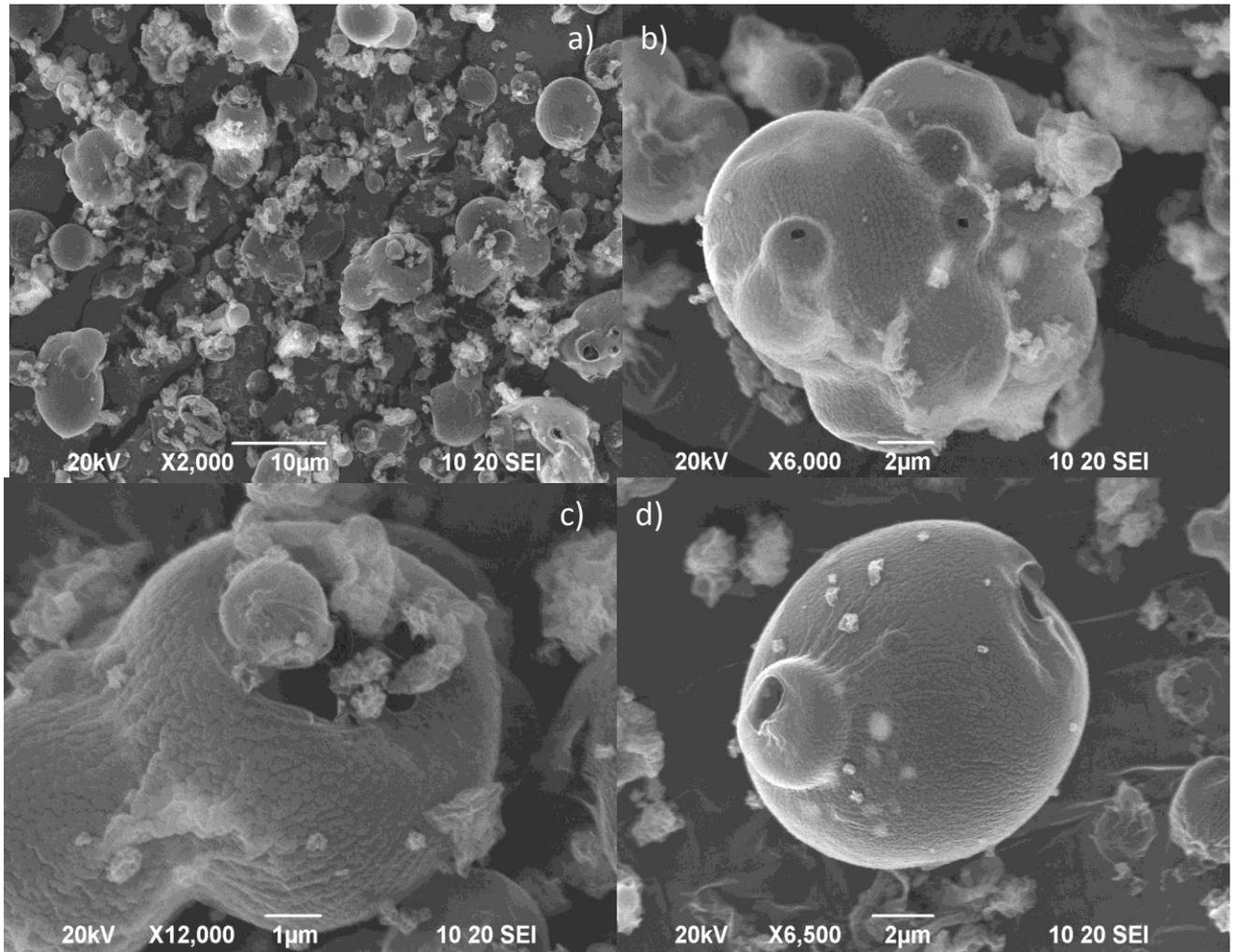


Figura 4.22: Micrográficas SEM de CS_p combinado con Insulina, con concentraciones finales 0,1% para ambos, para magnificaciones crecientes (a-d). La barra de escala y la magnificación se encuentran en cada imagen.

Durante el proceso de nanodeshidratación, un conjunto de factores son los que contribuyen a la formación de superficies amorfas: la cinética de evaporación del solvente, los componentes de la solución inyectada, la temperatura del aire de secado y la velocidad de flujo, entre otros. Una alternativa para evitar la plastificación de estructuras es el uso de sustancias que eviten o enlentescan este proceso. La plastificación de estructuras es una consecuencia de la transición vítrea de sólidos amorfos. Es un tipo de transición de segundo orden, la que a su vez, con el transcurso del tiempo llevaría a la desnaturalización de la proteína cargada por la partícula secada (Mlalila *et al.* 2014).

Una consecuencia de la plastificación de un material polimérico es la pegajosidad, la cual resulta en un apelmazamiento y aglomeración del material. Esta propiedad de los polvos se relaciona con la cohesión (pegajosidad partícula-partícula) y la adhesión (pegajosidad partícula-superficie). La cohesión es una propiedad interna de un polvo y es una medida de las fuerzas que mantienen unidas a las partículas,

mientras que adhesión es una propiedad interfásica y es una medida de las fuerzas que mantienen a las partículas en la superficie de contacto de otro material (Boonyai *et al.* 2004).

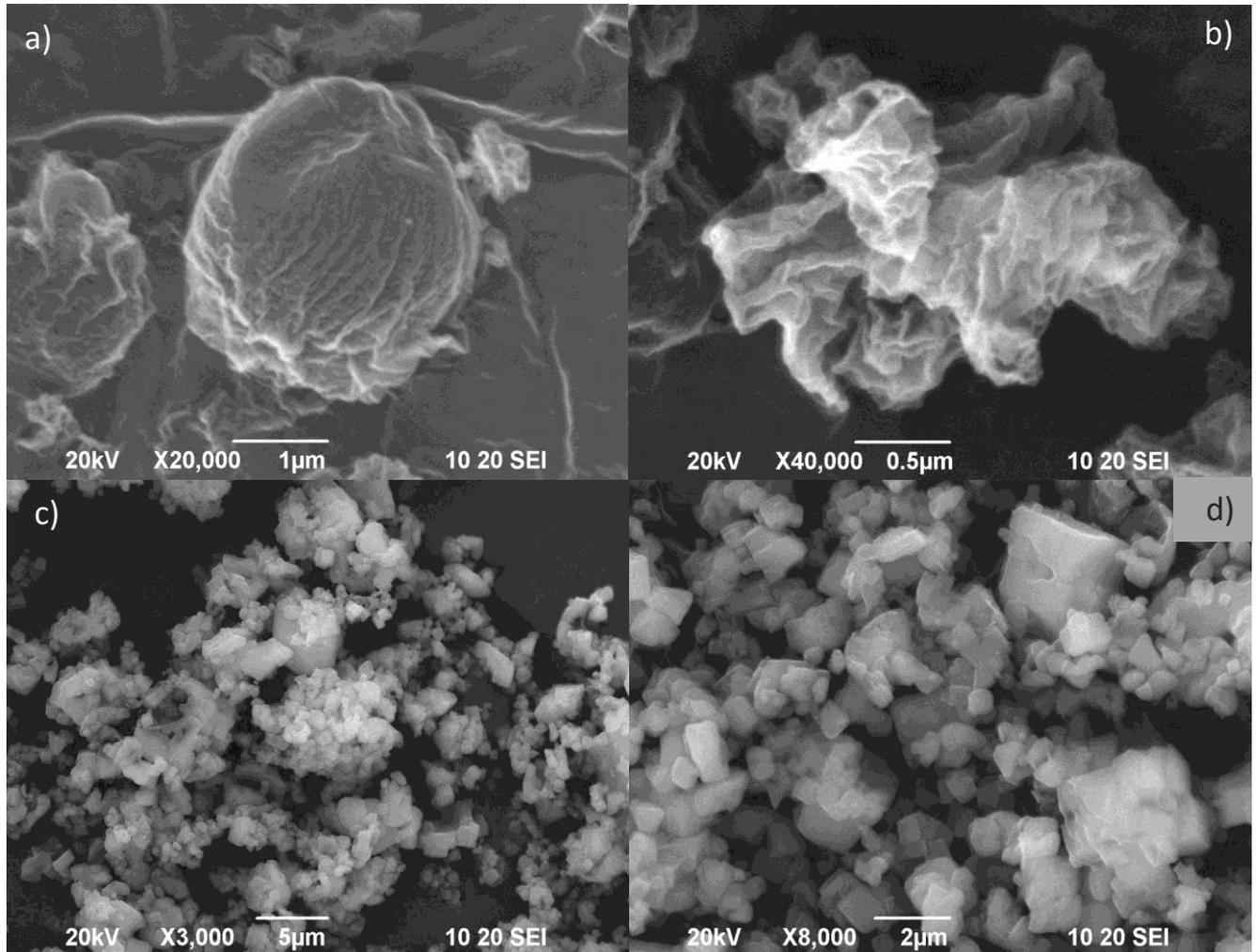


Figura 4.24: Micrografías SEM de CS_p combinado con Insulina, con concentraciones finales 0,1% p/v para ambos (a-b). Micrografías de Insulina 0.1% p/v luego de la nanodeshidratación (c-d). La barra de escala y la magnificación se encuentran en cada imagen.

ICS sonicadas

Se obtuvieron micrografías de muestras depositadas en las dos secciones del cilindro colector (sección 4.4, Fig. 4.8), ya que según reportes previos (Li y col. (2010)) cabe la posibilidad de obtener partículas de diferentes tamaños según la sección del cilindro de la cual se recolecten, como se ha comentado en la sección 4.2.1. En las figura 4.25 se muestran las nanopartículas colectadas en el borde del cilindro (a y c) y en el resto del mismo (b y d) para distintas magnificaciones.

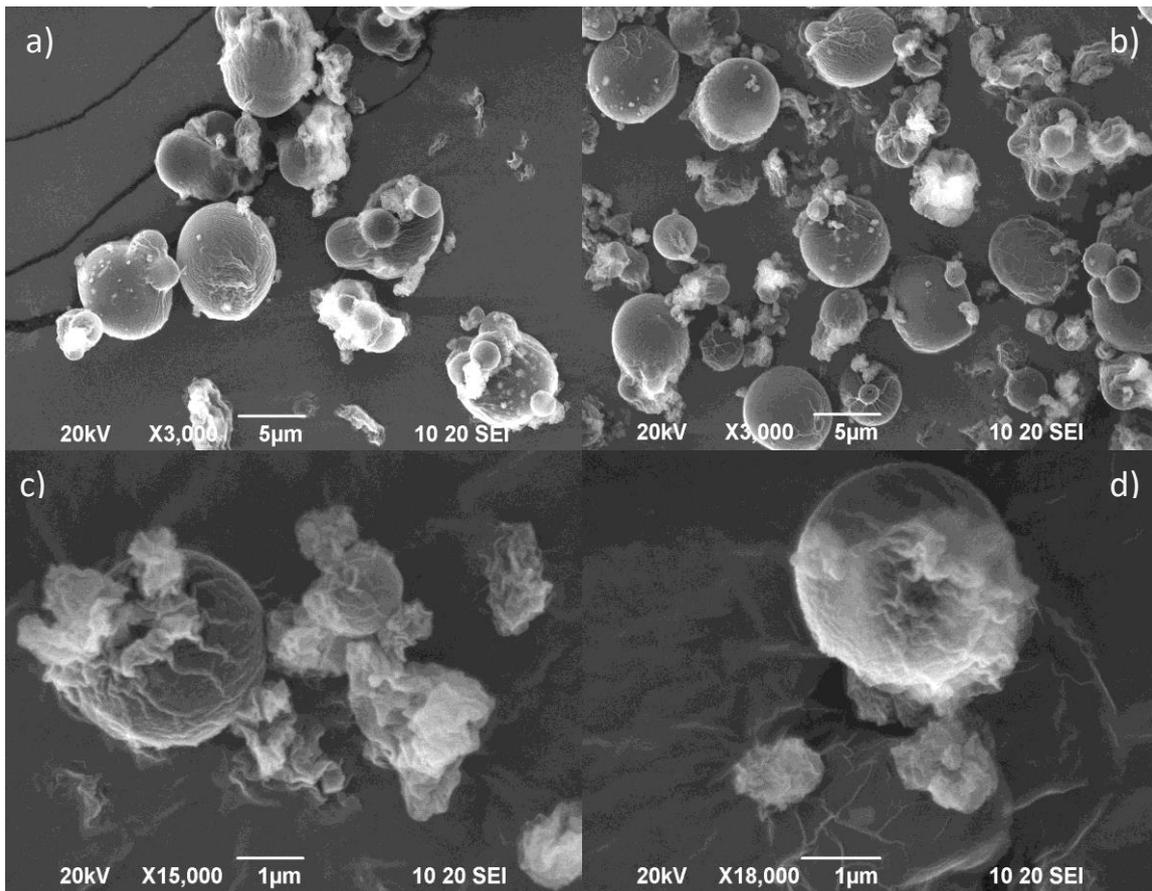


Figura 4.25: Micrografías SEM de ICS. Se muestran la fracción colectada en el borde del cilindro (a y c.) y en el resto del mismo (b y d). La barra de escala y la magnificación se encuentran en cada imagen.

4.8. ESPECTROSCOPIA FTIR DE LOS SISTEMAS ICS EN POLVO

La insulina, luego de ser nanodeshidratada, conserva sus picos característicos en 1647 y 1537 cm^{-1} , correspondientes al alargamiento del grupo $\text{C}=\text{O}$ de la amida I y las señales $\text{C}-\text{N}$ y $\text{N}-\text{H}$ de la amida II respectivamente (Mukhopadhyay *et al.* 2013). Además, en la literatura se detalla de qué manera el pico en 1647 cm^{-1} puede ser asignado al contenido de α hélices de la insulina (Barth 2007) (Fig. 4.26).

El quitosano posee picos característicos en 3359 y 3284 cm^{-1} , correspondientes a alargamientos de $\text{O}-\text{H}$ y $\text{N}-\text{H}$, en 2875 cm^{-1} asociado alargamiento del enlace $\text{C}-\text{H}$, en 1644 cm^{-1} , asignado al enlace $\text{C}=\text{O}$ con el grupo amida (banda de amida I). El pico en 1562 cm^{-1} se asocia a la flexión del grupo amina $\text{NH}-\text{R}$ (amida II), en 1383 y 1321 cm^{-1} (deformación del grupo metilo), 1411 cm^{-1} (deformación $\text{C}-\text{H}$ y $\text{O}-\text{H}$ en amida II) y en 1070 y 1027 cm^{-1} correspondientes a la vibración del enlace glicosídico ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) (Guo *et al.* 2010) (Alhosseini *et al.* 2012) (Venkatesham *et al.* 2014) (Heuser & Cárdenas 2014) (Ramírez Barragán *et al.* 2016).

Los complejos I-CS por su parte, presentaron tres picos de interés en sus espectros: en 1653, 1534 y 1068 cm^{-1} . El primero podría asignarse a una combinación de las señales de la amida I del CS y de la amida II de la insulina ($\text{C}=\text{O}$). El segundo pico presenta la combinación de señales de la amida II para ambas especies. El tercer pico corresponde al enlace glicosídico del CS. La interacción I-CS provocó la disminución de la señal correspondiente a los metilos del CS. Además, la señal asignada a la deformación de los grupos C-H y O-H (amida II del CS) también disminuyó.

Los espectros para las nanopartículas I-CS y de sus especies constituyentes se muestran superpuestos en la Figura 4.24. Estos resultados indican interacción entre las especies que constituyen las NP, aunque la naturaleza de dichas interacciones resulta poco precisa. Las nanopartículas reportadas en la literatura suelen estar compuestas de 3 o más especies, por ejemplo CS-Tripolifosfato-Vitamina C (Desai & Park 2005), CS-Tween 80-Mangiferina (Sampaio *et al.* 2015), CS-Manitol-Calcitonina (Sinsuebpol *et al.* 2013), etc., por lo que resulta complicado y arriesgado comparar los espectros obtenidos para estos sistemas con los obtenidos para la mezcla binaria presentada en este trabajo.

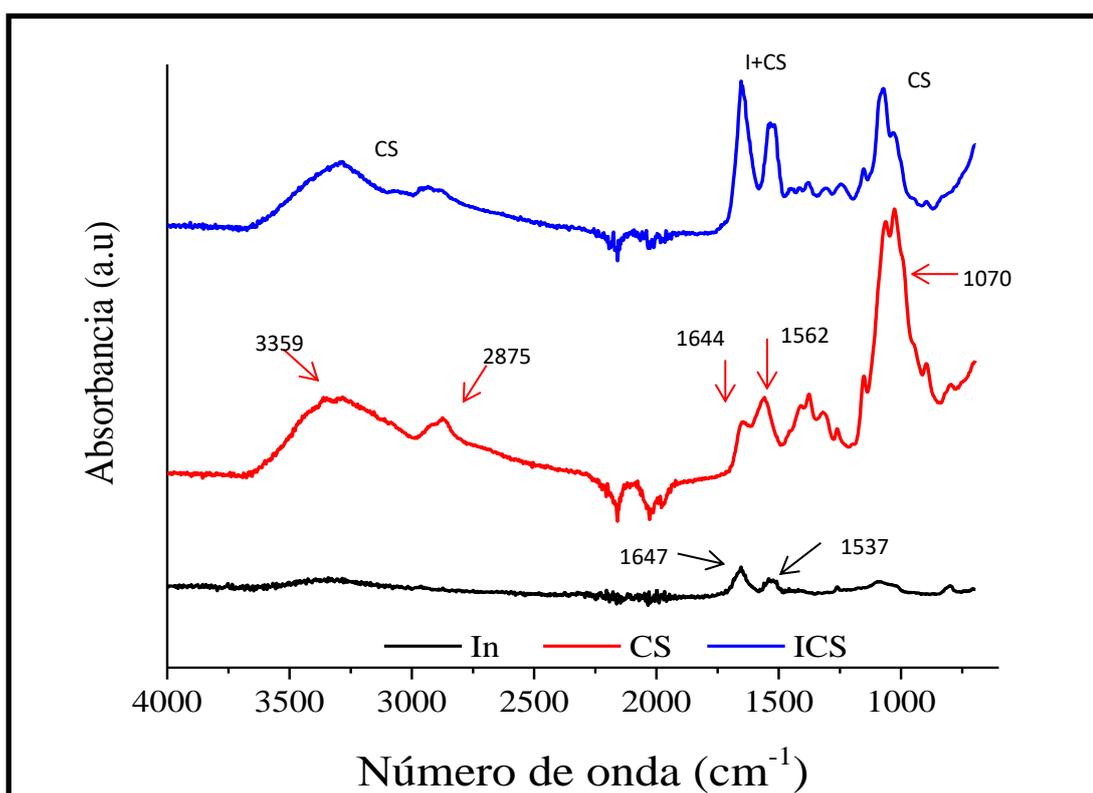


Fig. 4.26: Espectros de FT-IR para insulina (I, negro), quitosano (CS, rojo) y nanopartículas ICS (ICS, azul), luego del nanosecado.

Resulta complicado también comparar los efectos que la nanodeshidratación tiene en la interacción de las especies, ya que en muchos de los casos mencionados existe un paso previo de entrelazamiento en

el seno de la solución mixta, o por lo menos de contacto local entre grupos químicos de cada una de las especies antes de inyectarlas en el equipo de secado.

4.9. CUANTIFICACIÓN DE I ENTRAMPADA

Elección de la longitud de onda. Se obtuvieron los espectros UV de todas las especies, I, CS e ICS, para determinar las longitudes de onda de interés para cada una de ellas. Para la insulina se seleccionaron 229 y 276 nm, para el CS 215nm y para ICS 212 y 276 nm respectivamente. Los cromatogramas de lastres especies se adquirieron para estas cinco longitudes de onda, considerando cuidadosamente para cuál de ellas se obtenía la señal más intensa para la insulina, cuál eliminaba señales espúreas del solvente y que no existiese solapamiento de señales provenientes del polímero y de la proteína en simultáneo. De este análisis se determinó que la longitud de onda seleccionada fuese 229 nm y como puede observarse en la Fig. 4.27, los cromatogramas para esta longitud de onda cumplían todos los requisitos operativos antes mencionados.

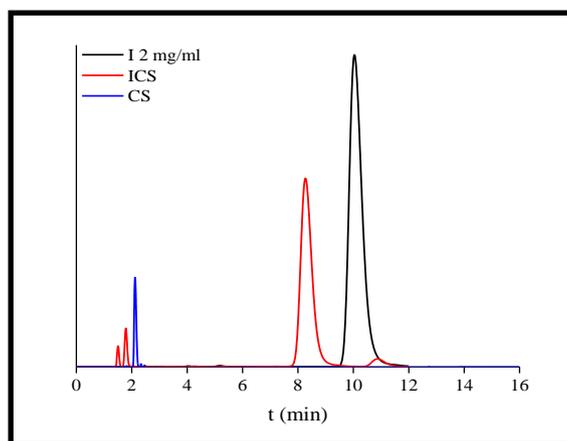


Fig. 4.27. Cromatograma que muestra los tiempos de elución para I, CS y las nanopartículas ICS para una longitud de onda de 229 nm.

A continuación, se obtuvieron los cromatogramas para las especies libres y para las nanopartículas ICS a distintas longitudes de onda, con el objetivo de identificar qué picos pertenecían a cada especie y cuáles de ellos podrían permitir la cuantificación posterior de la insulina. Para ello se empleó el criterio de “estándar interno”. Brevemente, se preparó una solución de I a pH 3 y se la mezcló con soluciones de concentraciones crecientes de CS al mismo pH. La figura 4.28 muestra los cromatogramas para diferentes concentraciones de I y para ICS (en verde).

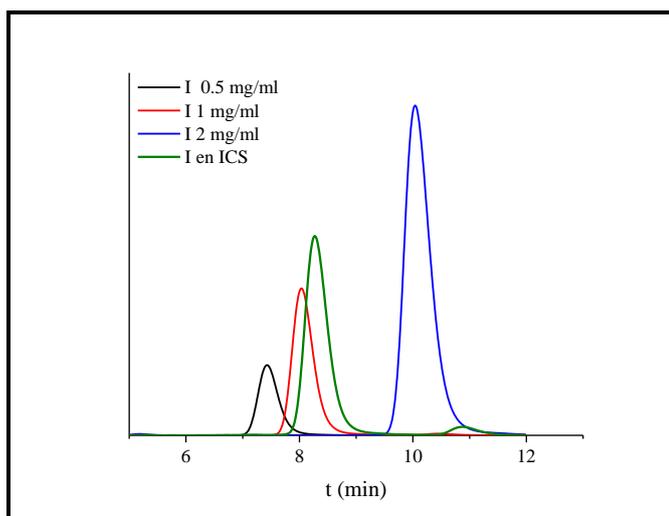


Fig. 4.28. Cromatograma que muestra los tiempos de elución para diferentes concentraciones de insulina (I) y para las nanopartículas (ICS).

A fin de conocer la concentración de insulina entrampada, se realizó una curva de calibración que relaciona el área bajo la curva del cromatograma con la concentración de la muestra inyectada. La tabla 4.3 muestra las concentraciones y las áreas correspondientes.

Tabla 4.3 Concentraciones de insulina y áreas correspondientes en sus respectivos cromatogramas.

C (mg/ml)	Área (u.a)
0	0
0,25	745,9
0,5	1608,1
1	3509,3
1,5	4982,2
2	9646,1

En base a esta curva, se obtuvo la ecuación 4.1 que relaciona concentración C y área A.

$$A = 4491.84842xC - 515.1007 \quad (4.1)$$

De esta manera, para una concentración de 2 mg/ml de nanopartículas ICS inyectadas, el contenido de I fue de 1,2425 mg/ml, lo que brinda una eficiencia de entrapamiento del 62,27 %.

4.10. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Con la finalidad de determinar el efecto de las temperaturas sobre la I y el sistema I-CS, durante el proceso de nanodeshidratación, las cuales fueron del orden de 140°C, se procedió con el ensayo de calorimetría diferencial de barrido. En la figura 4.29 se muestran los termogramas para la insulina y las nanopartículas nanodeshidratadas.

En estos resultados se observó una aguda transición, lo cual correspondería a la desnaturalización de la I a los 180 °C. El pico registrado fue pronunciado y agudo, lo cual se debería a la alta pureza de la I, la cual es recombinante de grado medicamentoso y de calidad analítica desde el punto de vista químico. Este tipo de termogramas se asocia a la existencia en el sistema de una conformación dominante de unidades de insulina asociada. En este sentido y relacionando los resultados derivados de la distribución de tamaño de partículas, la solución de entrada a pH 2.3 presentó un radio hidrodinámico de 12 nm, lo que se correlaciona con un peso molecular de 1120 kDa, indicando un alto grado de agregación. Además, altas temperaturas de desnaturalización fueron reportadas anteriormente para la I con bajos contenidos de humedad en termogramas obtenidos en condiciones de examinación similar (Sarmiento *et al.* 2006). Es necesario puntualizar que después del secado, la muestra se mantuvo en un desecador antes del análisis. En resumen, una transición a una temperatura en este orden es la suma de dos fenómenos: la existencia de un estado agregado y dominante, más la baja humedad del sistema.

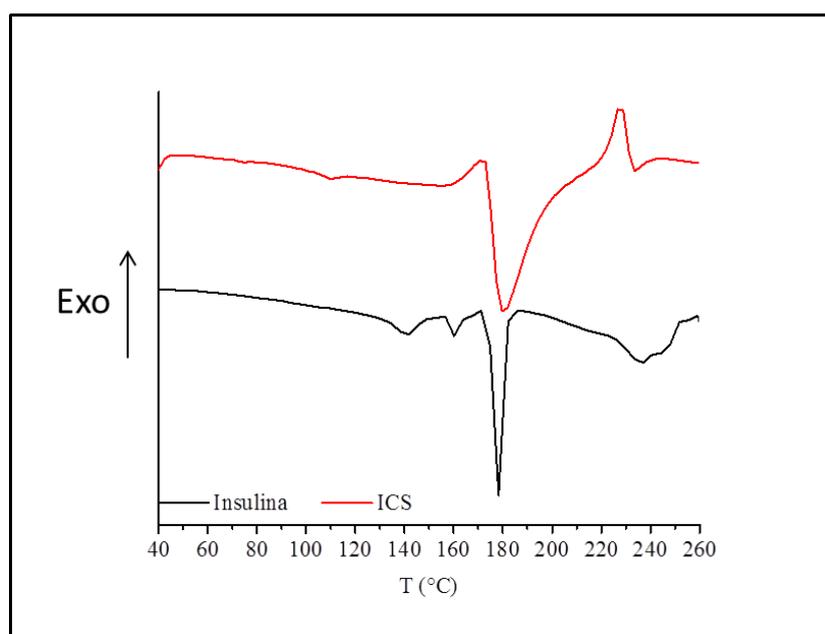


Fig. 4.29: Termogramas correspondiente a muestras de insulina (negro) y nanopartículas ICS (rojo).

Una transición en el mismo orden de temperaturas se obtuvo para las NP, aunque el pico es cualitativamente mucho más ancho. A este pico también contribuiría el CS. Es decir que este comportamiento estaría asociado a la presencia del entramado o red de CS, que entrapa a la I, protegiendo a la proteína de la desnaturalización durante la corrida dinámica del DSC y haciéndola más termorresistente.

La Tabla 4.4 muestra la variación de la Entalpía (ΔH) calculada para las regiones en torno a 180 °C tanto para la I como para las NP, luego del nanosecado. Esta magnitud termodinámica da una idea de la energía absorbida durante el proceso en cuestión y ya que ΔH es casi 10 veces mayor para las NP, se refuerza la hipótesis del efecto termoprotector del CS para con la Insulina, al ser necesaria mucha más energía para la desnaturalización de la proteína.

Tabla 4.4 Variación de la Entalpía para I e I-CS luego del nanosecado y temperatura máxima asociada.

	ΔH (J/g)	T_p (°C)
I	9,89	175,6
I-CS	85,42	180,3

En este sentido, el pico exotérmico cercano a 230 °C en el termograma de las NP podría ser atribuido a la desnaturalización de la I, la que luego se uniría covalentemente al CS, dando como resultado una red mixta con propiedades químicas diferentes. El-Hefian y col. (2010)(El-Hefian *et al.* 2010), examinaron películas de CS y reportaron que exhibieron un pico endotérmico amplio, atribuido a la pérdida de agua asociada a los grupos hidrofílicos del polisacárido. Los autores sugieren que las temperaturas de pico informadas en este trabajo indicarían que las muestras no eran completamente anhidras y que contenía parte del agua unida luego de su secado en el desecador. Las temperaturas registradas para este trabajo de tesis fueron superiores, indicando menor contenido de agua en el sistema. El pico exotérmico, que aparece en el rango de temperatura entre aproximadamente 220 y 240 °C, correspondería a la descomposición del CS, como así lo informaron Sakurai y col. (2000)(Sakurai *et al.* 2000). También se informó en estos trabajos pioneros que la degradación térmica del quitosano comienza a aproximadamente 250 °C, incluyendo la deshidratación de anillos de glucosa, despolimerización y la descomposición de las unidades de quitosano desacetiladas y acetiladas (Bagre *et al.* 2013).

4.11. ELECTROFORESIS CAPILAR

En la Fig. 4.30 se presenta el electroferograma para las NP y la insulina libre. El electroferograma es muy similar al correspondiente a los *clusters* obtenidos mediante autoensamblaje (Sección 3.10), tanto en el tiempo de elución como en la forma de los picos. Nuevamente, puede considerarse que la carga superficial de la insulina entrampada en la red de CS es similar a aquella de la insulina libre y es este parámetro el que gobierna la migración.

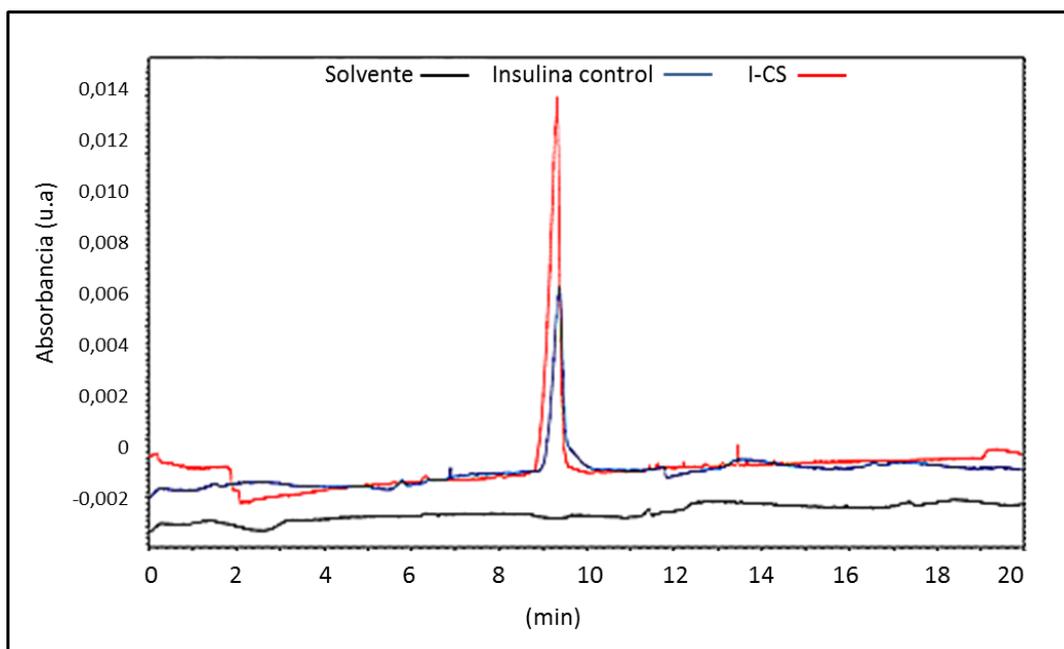


Fig. 4.30: Electroferograma que muestra los tiempos de elución para insulina (azul) e I-CS (rojo).

Un ancho de pico para las NP levemente más ancho que para la proteína indica que a diferencia de los *clusters*, estas NP poseen una menor polidispersidad en sus tamaños.

4.12. ACTIVIDAD DE LA INSULINA COMPLEJADA Y VEHICULIZADA CON CS EN CULTIVOS CELULARES

A fin de evaluar la actividad biológica de los nano-complejos ICS se emplearon fibroblastos 3T3. Para cuantificar esta actividad, se empleó un Western Blot para medir los cambios en los niveles de AKT fosforilado, como se ha comentado en la sección 3.2.10.

La Figura 6.31a ejemplifica que la estimulación con el complejo ICS creció con el tiempo, a diferencia de la insulina, que demostró un comportamiento modulado a partir de los 10 min. Esto puede deberse a que el entrampado físico que se forma durante la nanodeshidratación requiere de cierto tiempo para

desarmarse y de esa manera liberar la insulina. Este resultado experimental confirma la estabilidad funcional y estructural de la insulina y su liberación desde las NP en la línea 3T3.

La Figura 6.31b representa la cuantificación de la activación de AKT en función del tiempo lograda mediante la estimulación con ICS. Se observó claramente como la intensidad de activación provocada por la presencia de NP aumenta con el tiempo.

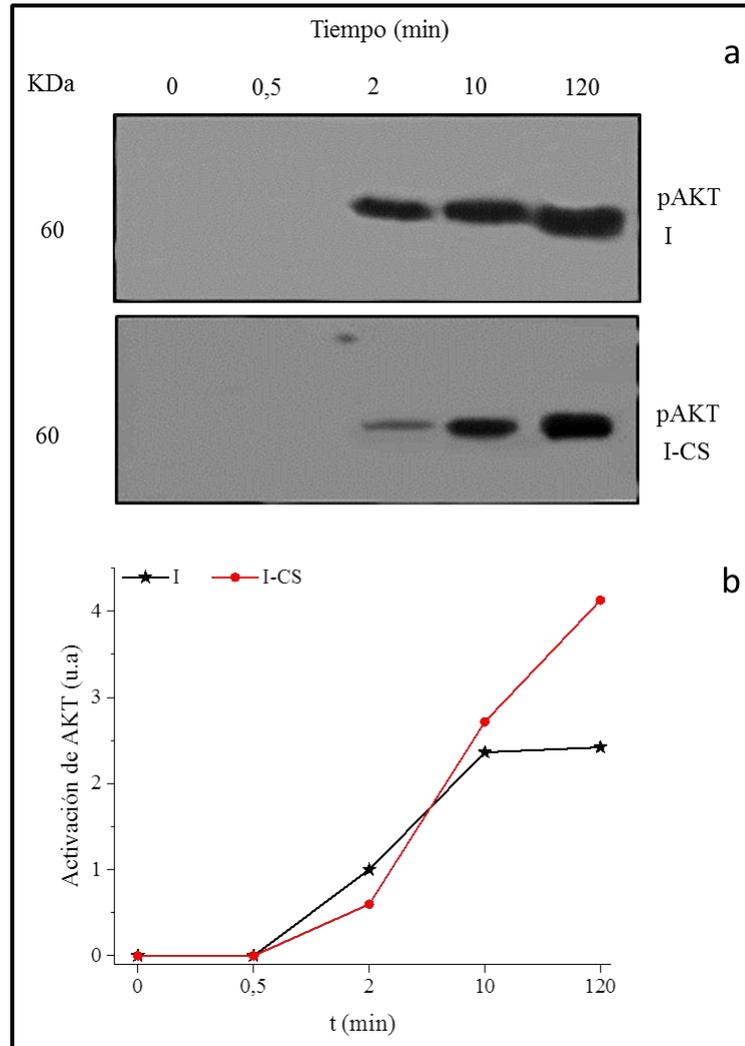


Fig. 6.31: (a) Western blot que muestra los cambios en los niveles de AKT fosforilado luego de la estimulación con insulina o con los complejos *clusters* I-CS, en fibroblastos 3T3, en función del tiempo. (b) La cuantificación de la activación de AKT en función del tiempo muestra un incremento sostenido para la activación con I-CS luego de dos horas de estimulación.

CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo se ha logrado entrapar insulina en una matriz de quitosano a través de la tecnología *nanospraying*. La tecnología de deshidratación por nanodeshidratación es relativamente nueva y su uso se está propagando en el mundo. Este procedimiento exigió la puesta a punto del método, lo que a su vez requirió el ajuste de variables de proceso: volumen de muestra y porcentaje de apertura del cabezal, uso de surfactantes, etc.

En los reportes científicos se la describe como un sistema que opera en forma versátil, con la posibilidad de modificar variables en forma simple, que puede trabajar continuamente y es relativamente económica. Genera materiales en la nanoescala de características nobles y elegibles, con propiedades reproducibles desde el inicio al final del proceso.

Independientemente de las bondades de la tecnología *nanospray*, existen desventajas prácticas para la aplicación más directa de la técnica; por su complejidad en cuanto al equipamiento, las condiciones no son uniformes a lo largo del receptáculo de secado, por lo cual no siempre resulta fácil controlar estrictamente el tamaño de partícula.

Se caracterizó el producto obtenido desde el punto de vista morfológico y físico-químico. También se ha analizado la influencia de la presencia de un aminoácido de bajo peso molecular y de surfactantes en la deshidratación de CS. Así se ha obtenido un polvo cuyas partículas resultaron <500 nm. Es de destacar que este tipo de estrategias se emplea en la industria farmacéutica a los fines de asegurar la estabilidad estructural del polvo obtenido.

Las nanopartículas presentaron alto valor de potencial ζ , lo que se correlaciona con alta estabilidad coloidal. Las nanopartículas conteniendo I entrapada exhibieron un comportamiento similar al obtenido con el sistema CS-Gly. Se obtuvieron partículas de tamaño < a 100 nm y de alta estabilidad coloidal.

El examen de tamaño de partícula realizado al producto recolectado de distintas regiones de cilindro no arrojó valores significativamente distintos. No se observaron diferencias en este sentido. Tampoco la inclusión de un paso de sonicación implicó una variación sustancial de los tamaños de partícula obtenidos.

Aunque el principio empleado para generar este tipo de partículas es de naturaleza física, con transferencia simultánea de masa y energía, el pH de la solución sigue teniendo un papel rector en cuanto al tamaño de las partículas generadas. A modo general puede concluirse que a pHs ácidos, las ICS tienden a ser más pequeñas y poseen mayor carga superficial con la concomitante estabilidad coloidal.

La técnica de FTIR aplicada en los sistemas de nanopartículas ICS en solución manifestó el papel ejercido por cada grupo químico en la interacción, aun cuando el sistema se constituyó físicamente.

En cuanto al análisis ultraestructural realizado con SEM, el empleo de aditivos como surfactantes y Gly generó partículas con distinto grado de agregación. El surfactante no disminuyó el grado de agregación observado para el CS y la Gly lo incrementó. Las imágenes obtenidas para las nanopartículas de interés en esta Tesis, mostraron una superficie estriada, rugosa, lo cual aumentaría la dispersabilidad de las partículas, según se reporta en trabajos anteriores.

Los espectros IR para las nanopartículas I-CS y de sus especies indican interacción entre las especies, aunque su naturaleza resulta poco precisa. Dicha interacción puede ocurrir en dos instancias, durante el entrelazamiento de las macromoléculas en el seno de la solución mixta antes de ser inyectadas en el equipo de secado o por el contacto local durante el proceso de deshidratación.

Se determinó la eficiencia de encapsulación de insulina entrampada vía *nanospray* a través de cromatografía, arrojando un resultado de 62% aproximadamente.

El ensayo biológico realizado en un sistema *in-vitro* con fibroblastos de la línea 3T3-L1 permitió comprobar que la insulina entrampada mediante esta técnica no pierde la capacidad de activar el receptor correspondiente y desencadenar la cascada de reacciones que culmina con la fosforilación del efector AKT.

El estudio mostrado en esta Tesis indica que la tecnología de nanodeshidratación pudo ser usada con los objetivos planteados para esta sección y se constituye en un método prometedor a extenderse a otras áreas de la tecnología como nutracéutica y cosmética. Las nanopartículas obtenidas presentaron morfologías variables, altamente dependientes de las condiciones de proceso y eventualmente de la presencia de aditivos.

La gran ventaja de esta forma de obtener nanopartículas de ICS es que el proceso no requirió el uso de agentes orgánicos, los cuales pueden impactar en el material encapsulado que justamente se desea proteger, causando toxicidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Agilent Technologies. (2011). Technical Overview: Polymer Molecular Weight Distribution and Definitions of MW Averages. *Agilent Technologies Technical Data*, **1**, 1–4.
- Ahmed, & Aljaeid. (2016). Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Design, Development and Therapy*, **10**, 483–507.
- Aiba. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, **14**(4), 225–228.
- Al-Qadi, Grenha, Carrión-Recio, Seijo, & Remuñán-López. (2012). Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations. *Journal of Controlled Release*, **157**(3), 383–390.
- Alai, Lin, & Pingale. (2015). Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. *Journal of Food and Drug Analysis*, **23**(3), 351–358.
- Alaimo, Gorojod, & Kotler. (2011). Neurochemistry International The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are involved in manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. *Neurochemistry International*, **59**(2), 297–308.
- Alhosseini, Moztafzadeh, Mozafari, ... Jalali. (2012). Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 25–34.
- Alvarado-Palacios, San Martin-Martinez, Gomez-García, Estanislao-Gomez, & Casañas-Pimentel. (2015). Nanoencapsulation of the Aranto (*Kalanchoe daigremontiana*) aquoethanolic extract by nanospray dryer and its selective effect on breast cancer cell line. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **7**(5), 888–895.
- Alvarenga. (2011). Characterization and Properties of Chitosan. *Biotechnology of Biopolymers*, 91–108.
- Amidi, Mastrobattista, Jiskoot, & Hennink. (2010). Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv Drug Deliv Rev*, **62**(1), 59–82.
- Anitha, Rani, Krishna, ... Jayakumar. (2009). Synthesis , characterization , cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan , O -carboxymethyl and N , O -carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, **78**(4), 672–677.
- Aranaz, Mengíbar, Harris, ... Heras. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, **3**, 203–230.
- Argenis Caicedo, & Perilla. (2015). Effect of pH on the rheological response of reconstituted gastric mucin | Efecto del pH en la respuesta reológica de mucina gástrica reconstituida. *Ingeniería e Investigación*, **35**(2), 1–6.
- Arpagaus. (2010). Laboratory Scale Spray Drying of Inhalable Particles : A Review, (February 2017).
- Arpagaus, John, Collenberg, & Rütli. (2017). *Nanocapsules formation by nano spray drying. Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. doi:10.1016/B978-0-12-809436-5.00010-0
- Asenjo, Muzzo, Perez, Ugarte P, & Willshaw. (2007). Consenso en el diagnóstico y tratamiento de la diabetes tipo 1 del niño y del adolescente. *Revista Chilena de Pediatría*, **78**(5), 534–541.
- Assis, Bernardes-Filho, Vieira, & Filho. (2002). AFM characterization of chitosan self-assembled films. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **51**(7), 633–638.
- Atitar, & Belhadj. (n.d.). World ' s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher The Relevance of ATR-FTIR Spectroscopy in Semiconductor Photocatalysis.
- Bagre, Jain, & Jain. (2013). Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: In vitro and in vivo assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, **456**(1), 31–40.
- Barth. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*,

- 1767**(9), 1073–1101.
- Barua, & Mitragotri. (2014). Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today*, **9**(2), 223–243.
- Berger, Reist, Mayer, Felt, Peppas, & Gurny. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, **57**, 19–34.
- Bhaskar, K. R., Gong, D. H., Bansil, R. A. M. A., Pajevic, S. I. N. I. S. A., Hamilton, J. A., Turner, B. S., LaMont. (1991). Profound increase in viscosity and aggregation of pig gastric mucin at low pH. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **261**(5), G827–G832.
- Bhattacharjee. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, **235**, 337–351.
- Birrenbach, & Speiser. (1976). Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **65**(12), 1763–1766.
- Blasi, P., A. Schoubben, S. Giovagnoli. (2010). Alginate micro- and nanoparticle production by spray drying. In Products, ed., *Meeting on lactose as a carrier for inhalation products*, Parma: Meeting on lactose as a carrier for inhalation products, pp. 137–138.
- Boateng, Matthews, Stevens, & Eccleston. (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems : A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(8), 2892–2923.
- Boonyai, Bhandari, & Howes. (2004). Stickiness measurement techniques for food powders: A review. *Powder Technology*, **145**(1), 34–46.
- Büchi Labortechnik. (2011). *Nano Spray Dryer B-90, literature review and applications en*.
- Builders, Kunle, Okpaku, Builders, Attama, & Adikwu. (2008). Preparation and evaluation of mucinated sodium alginate microparticles for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **70**(3), 777–783.
- Bürki, Jeon, Arpagaus, & Betz. (2011). New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer, **408**, 248–256.
- Calvo. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, **63**, 125–132.
- Catalunya. (n.d.). ANEXO A : MATERIALES Y MÉTODOS.
- Celli, Gregor, Turner, Afdhal, Bansil, & Erramilli. (2005). Viscoelastic properties and dynamics of porcine gastric mucin. *Biomacromolecules*, **6**(3), 1329–1333.
- Chan, H.K., Clark, A., Gonda, I., Mumenthaler, M., Hsu. (1997). Spray dried powders and powder blends of recombinant human deoxyribonuclease (rhDNase) for aerosol delivery. *Pharmaceutical Research*, **14**(4).
- Chan. (2006). Dry powder aerosol drug delivery-Opportunities for colloid and surface scientists. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **284–285**, 50–55.
- Chang, Wang, Hu, Zhou, Xue, & Luo. (2017). Pectin coating improves physicochemical properties of caseinate/zein nanoparticles as oral delivery vehicles for curcumin. *Food Hydrocolloids*, **70**, 143–151.
- Chantarasataporn, Tepkasikul, Kingcha, ... Chirachanchai. (2014). Water-based oligochitosan and nanowhisler chitosan as potential food preservatives for shelf-life extension of minced pork. *FOOD CHEMISTRY*. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.019
- Chellat, Tabrizian, Dumitriu, ... Yahia. (1999). In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex, (X).
- Chen, Hu, & Huang. (2009). Talanta Chitosan modified ordered mesoporous silica as micro-column packing materials for on-line flow injection-inductively coupled plasma optical emission spectrometry determination of trace heavy metals in environmental water samples, **78**, 491–497.
- Chen, Mi, Liao, ... Sung. (2013). Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev*, **65**(6), 865–879.
- Cheung, Ng, Wong, & Chan. (2015). *Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications*. *Marine Drugs*, Vol. 13. doi:10.3390/md13085156

- Choi, & Han. (2018). Food Hydrocolloids Development of a novel on e off type carbon dioxide indicator based on interactions between sodium caseinate and pectin. *Food Hydrocolloids*, **80**, 15–23.
- Choudhury, Pandey, Kui, ... Kesharwani. (2017). Journal of Traditional and Complementary Medicine An update on natural compounds in the remedy of diabetes mellitus : A systematic review. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*. doi:10.1016/j.jtcme.2017.08.012
- Christopeit, Lenz, Forstpointner, ... Schalhorn. (2008). Nine months to progression using fourth-line liposomally encapsulated paclitaxel against hepatocellular carcinoma. *Chemotherapy*, **54**(4), 309–314.
- Colina, Ayala, Rincón, ... Montilla. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangejos escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **15**(1), 21–43.
- Cooper. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. (Associates, Ed.), 2a edn, Sunderland (MA), Estados Unidos.
- Coppi, Iannuccelli, Bernabei, & Cameroni. (2002). Alginate microparticles for enzyme peroral administration, **242**, 263–266.
- Cremer, Gutierrez, Martinez, ... Lozano. (2018). Development of antimicrobial chitosan based nanofiber dressings for wound healing applications, **5**(1), 6–14.
- CYTED. (2000). *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. (Pilosof, A. M., & Bartholomai, Ed.), Eudeba.
- Czechowska-biskup, Jarosińska, Rokita, Ulański, & Rosiak. (2012). Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparison of Methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives*, **17**, 5–20.
- Damge, Michel, Aprahamian, & Couvreur. (1988). New Approach for Oral Administration of Insulin With Polyalkylcyanoacrylate Nanocapsules as Drug Carrier, **37**(July 1987).
- de Alvarenga, Pereira de Oliveira, & Roberto Bellato. (2010). An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **80**(4), 1155–1160.
- Dean, Rzhetsky, & Allikmets. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, **11**(7), 1156–66.
- Demir, & Degim. (2013). Preparation of chitosan nanoparticles by nano spray drying technology. *Fabard Journal of Pharmaceutical Sciences*, **38**(3), 127–133.
- Desai, & Park. (2005). Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, **22**(2), 179–192.
- Devi, Sarmah, Khatun, & Maji. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide – protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, **239**, 136–145.
- Dombu, & Betbeder. (2013a). Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials*, **34**(2), 516–525.
- Dombu, & Betbeder. (2013b). Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials*, **34**(2), 516–525.
- Doncaster, C. P., Davey. (2007). *Analysis of variance and covariance: how to choose and construct models for the life sciences*, Cambridge University Press.
- Đorđević, Balanč, Belščak-Cvitanović, ... Nedović. (2014). Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews*, Vol. 7. doi:10.1007/s12393-014-9106-7
- Drosou, Krokida, & Biliaderis. (2017). Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying Technology*, **35**(2), 139–162.
- Duan, & Mao. (2010). New strategies to improve the intranasal absorption of insulin. *Drug Discovery Today*, **15**(11–12), 416–427.
- Duan, & Xu. (2005). Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. *Gen Comp Endocrinol*, **142**, 44–52.

- Duncan. (2006). Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature Reviews Cancer*, **6**(9), 688–701.
- Dutta, Dutta, & Tripathi. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **63**(01), 20–31.
- Edwards, Hanes, Caponetti, ... Langer. (2016). Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2893421> REFERENCES Linked references are available on JSTOR for this article : You may need to l, **276**(5320), 1868–1871.
- El-Hefian, Elgannoudi, Mainal, & Yahaya. (2010). Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turkish Journal of Chemistry*, **34**(1), 47–56.
- Ensign, Hoen, Maisel, Cone, & Hanes. (2013). Enhanced vaginal drug delivery through the use of hypotonic formulations that induce fluid uptake. *Biomaterials*, **34**(28), 6922–6929.
- Estevinho, Rocha, Santos, & Alves. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. *Trends in Food Science and Technology*, **31**(2), 138–155.
- Eyzaguirre, & Codner. (2006). Análogos de insulina: en búsqueda del reemplazo fisiológico, 239–250.
- Ezrin. (1971). Polymer Molecular Weight Methods.
- Fabián Vigliocco, Sergio Rillo, Julieta Heba. (2014). Caracterización De Quitosano Para La Industria Alimentaria Por Resonancia Magnética Nuclear De Protón, (1), 1–5.
- Felt, Buri, & Gurny. (1998). Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **24**(11), 979–993.
- Feng, Boraey, Gwin, Finlay, Kuehl, & Vehring. (2011). Mechanistic models facilitate efficient development of leucine containing microparticles for pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **409**(1–2), 156–163.
- Fernández-Tresguerres, Ruiz, Cachofeiro, ... Tamargo Menéndez. (1999). *Fisiología humana, 4e.*, Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Fonte, Araújo, Silva, ... Sarmento. (2015). Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.010
- Franzen, Singh, & Okos. (1990). Kinetics of Nonenzymatic Browning in Dired Skim Milk. *Journal of Food Engineering*, **11**, 225–239.
- Gagliardino, Costa, Faingold, Litwak, & Fuente. (2013). Insulina y control de la diabetes en la Argentina, **73**, 520–528.
- Galley, & Webster. (2004). Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia*, **93**(1), 105–113.
- Gan, & Wang. (2007). Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier--systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **59**(1), 24–34.
- García-fuentes, & Alonso. (2012). Chitosan-based drug nanocarriers : Where do we stand ? *Journal of Controlled Release*, **161**(2), 496–504.
- García-Fuentes, Torres, & Alonso. (2005). New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. *International Journal of Pharmaceutics*, **296**(1–2), 122–132.
- Gautier S., C. Arpagaus, N. Schafroth, M. Meuri. (2010). Very fine chitosan microparticles with narrow & controlled size distribution using spray-drying technologies. *Drug Delivery Technology*, **10**(8), 30–37.
- Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, **40**(9), 1107–1121.
- Gomaa, El-khordagui, Boraiei, & Darwish. (2010). Chitosan microparticles incorporating a hydrophilic sunscreen agent. *Carbohydrate Polymers*, **81**(2), 234–242.
- Gonz, Vald, & Mojena. (2000). Características Clínicas De La Diabetes Mellitus En Un Área De Salud. *Rev Cubana Med Gen Integr 2000;16(2):144-9*, **16**(2), 144–149.
- Gozelanny, Pöppelmann, Pappelbaum, Moerschbacher, & Schneider. (2010). Biomaterials Human

- macrophage activation triggered by chitotriosidase-mediated chitin and chitosan degradation. *Biomaterials*, **31**(33), 8556–8563.
- Gowthamarajan, & Singh. (2010). Dissolution testing for poorly soluble drugs: A continuing perspective. *Dissolution Technologies*, **17**(3), 24–32.
- Gradishar, Tjulandin, Davidson, ... O'Shaughnessy. (2005). Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **23**(31), 7794–7803.
- Gref, Minamitake, Peracchia, Trubetskoy, Torchilin, & Langerll. (1994). Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres. *Science*, **263**(March).
- Gregoriadis, & Ryman. (1972). Fate of Protein-Containing Liposomes Injected into Rats: An Approach to the Treatment of Storage Diseases. *European Journal of Biochemistry*, **24**(3), 485–491.
- Guo, Liu, Hong, & Li. (2010). Preparation and characterization of chitosan poly(acrylic acid) magnetic microspheres. *Marine Drugs*, **8**(7), 2212–2222.
- H Hernández, E Águila, O Flores, E L Viveros, & E Ramos. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, **22**(3), 57–60.
- Hamdani, Wani, Bhat, & Siddiqi. (2018). Effect of guar gum conjugation on functional, antioxidant and antimicrobial activity of egg white lysozyme. *Food Chemistry*, **240**, 1201–1209.
- Han, Kimura, & Okuda. (1999). Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity*, **23**(2), 174–9.
- Han, Lee, Gao, & Park. (2001). Preparation and evaluation of poly(L-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, **75**(3), 259–69.
- Hartel, Shastry, Hartel, & Shastry. (1991). Sugar crystallization in food products Sugar Crystallization in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **30**(1), 37–41.
- Heinemann, Kalies, Schomaker, ... Ripken. (2014). Delivery of proteins to mammalian cells via gold nanoparticle mediated laser transfection. *Nanotechnology*, **25**(24). doi:10.1088/0957-4484/25/24/245101
- Hendrik Lemmer. (2013). Paracellular drug absorption enhancement through tight junction modulation. *Expert Opin. Drug Deliv*, **10**(1), 103–114.
- Hermans, & Bernard. (1999). State of the Art Lung Epithelium – specific Proteins Characteristics and Potential Applications as Markers. *Am J Respir Crit Care Med*, **159**(2), 646–78.
- Heuser, & Cárdenas. (2014). Chitosan-copper paint types as antifouling. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **59**(2), 2415–2419.
- Horiba. (2016). a Guidebook To Particle Size Analysis.
- Hou, Yu, Shen, Shi, Su, & Zhao. (2017). Triphenyl Phosphine-Functionalized Chitosan Nanoparticles Enhanced Antitumor Efficiency Through Targeted Delivery of Doxorubicin to Mitochondria. *Nanoscale Research Letters*, **12**(1), 1–9.
- HPLC 2. (n.d.).
- HPLC1. (n.d.).
- Huang, Khor, & Lim. (2004). Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, **21**(2), 344–353.
- Hudson, & Margaritis. (2014). Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals. *Crit Rev Biotechnol*, **34**(2), 161–179.
- Ichikawa, Iwamoto, & Watanabe. (2005). Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of enzymatic hydrolysates of chitosan and carboxymethyl cellulose. *Biosci Biotechnol Biochem*, **69**(9), 1637–1642.
- Irache, Huici, Konecny, Espuelas, Campanero, & Arbos. (2005). Bioadhesive properties of Gantrez nanoparticles. *Molecules*, **10**(1), 126–145.
- Iyer, Hsia, & Nguyen. (2015). Nano-Therapeutics for the Lung: State-of-the-Art and Future

- Perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, **21**(36), 5233–44.
- J W Lee, J H Park. (2000). Bioadhesive dosage forms: the next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **89**(7), 850–866.
- Jain, Chalasani, Khar, Ahmed, & Diwan. (2007). Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. *Journal of Drug Targeting*, **15**(6), 417–427.
- Jayakumar, Prabakaran, Reis, & Mano. (2005). Graft copolymerized chitosan — present status and applications, **62**, 142–158.
- Jeon, Kim, Choi, ... Kim. (2013). Designed Nanocage Displaying Ligand-Specific Peptide Bunches for High Affinity and Biological Activity. *Acsnano*, **7**(9), 7462–7471.
- Jiang, Cai, & Li. (2017). Chitosan-based spray-dried mucoadhesive microspheres for sustained oromucosal drug delivery. *Powder Technology*, **312**, 124–132.
- Jianing Pu, J. David Bankston. (n.d.). Production of Microencapsulated Crawfish (*Procambarus clarkii*) Astaxanthin in Oil by Spray Drying Technology, (August 2014), 37–41.
- Jones, Decker, & McClements. (2010). Comparison of protein-polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer complexation before or after particle formation. *Journal of Colloid and Interface Science*, **344**(1), 21–29.
- Joye, & McClements. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **19**(5), 417–427.
- Kamaly, Xiao, Valencia, Radovic-Moreno, & Farokhzad. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, **41**(7), 2971.
- Karagozlu, & Kim. (2014). *Anticancer effects of chitin and chitosan derivatives*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st edn, Vol. 72, Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800269-8.00012-9
- Kasaai. (2007). Calculation of Mark – Houwink – Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent – temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, **68**, 477–488.
- Kasaai. (2009). Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(5), 1667–1676.
- Kaye, Purewal, & Alpar. (2009). Development and testing of particulate formulations for the nasal delivery of antibodies. *Journal of Controlled Release*, **135**(2), 127–135.
- Kean, & Thanou. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **62**(1), 3–11.
- Kesharwani, Gorain, Low, ... Pandey. (2018). Nanotechnology based approaches for anti-diabetic drugs delivery. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **136**, 52–77.
- Khafagy, Morishita, Isowa, Imai, & Takayama. (2009). Effect of cell-penetrating peptides on the nasal absorption of insulin. *Journal of Controlled Release*, **133**(2), 103–108.
- Khan, Peh, & Ch'ng. (2000). Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*, **33**, 303–311.
- Khor. (2001). *Chitin: fulfilling a biomaterials promise*, Amsterdam: Elsevier.
- Krzysztof, & Krzysztof. (2011). Spray Drying Technique. I: Hardware and Process. *International Journal of Drug Development and Research*, **3**(2), 26–33.
- Kulkarni, Bari, Surana, & Pardeshi. (2016). In vitro, ex vivo and in vivo performance of chitosan-based spray-dried nasal mucoadhesive microspheres of diltiazem hydrochloride. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **31**, 108–117.
- Kumar. (2000). A review of chitin and chitosan applications q, **46**, 1–27.
- Kumar, Shen, & Burgess. (2014). Nano-amorphous spray dried powder to improve oral bioavailability of itraconazole. *Journal of Controlled Release*, **192**, 95–102.
- Lai, Wang, & Hanes. (2009). Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal

- tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**(2), 158–171.
- Lee, Heng, Ng, Chan, & Tan. (2011). Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, **403**(1–2), 192–200.
- Lee, Kwon, Kim, Jo, & Jeong. (1998). Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system, **51**, 213–220.
- Lewis, & Richard. (2015). Challenges in the delivery of peptide drugs: an industry perspective. *Therapeutic Delivery*, **6**(2), 149–163.
- Li, Ai, Yokoyama, ... Zhong. (2013). Properties of chitosan-microencapsulated orange oil prepared by spray-drying and its stability to detergents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(13), 3311–3319.
- Li, Anton, Arpagaus, Belleteix, & Vandamme. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*, **147**(2), 304–310.
- Li, Wu, & Zhao. (2016). Antibacterial activity and mechanism of chitosan with ultra high molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, **148**, 200–205.
- Liu, Zhang, Zhu, ... Huang. (2016). Efficient mucus permeation and tight junction opening by dissociable “mucus-inert” agent coated trimethyl chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *Journal of Controlled Release*, **222**, 67–77.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D. (2000). *Molecular Cell Biology*. (Freeman, Ed.), 4a edn, Nueva York.
- Lund, & Jönsson. (2013). Charge regulation in biomolecular solution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **46**(3), 265–281.
- M. Ways, Lau, & Khutoryanskiy. (2018). Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers*, **10**(3), 267.
- M.L. Lorenzo-Lamosa, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato. (1998). Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **52**, 109–118.
- Ma, Jian, Chang, & Yu. (2008). Fabrication and Characterization of Citric Acid-Modified Starch Nanoparticles / Plasticized-Starch Composites, 3314–3320.
- Madhumathi, Binulal, Nagahama, Tamura, Shalumon, & Selvamurugan. (2009). International Journal of Biological Macromolecules Preparation and characterization of novel χ -chitin – hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications, **44**, 1–5.
- Maged, Mahmoud, & Ghorab. (2016). Nano spray drying technique as a novel approach to formulate stable econazole nitrate nanosuspension formulations for ocular use. *Molecular Pharmaceutics*, **13**(9), 2951–2965.
- Mahdavinia, & Pourjavadi. (2004). EUROPEAN POLYMER Modified chitosan from poly (acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt- and pH-responsiveness properties, **40**, 1399–1407.
- Malvern-Instruments. (2011). Size Measurement and Molecular Weight Estimation of Globins using Dynamic Light Scattering From Malvern Instruments. Retrieved from M.I. Ltd, Size Measurement and Molecular Weight Estimation of Globins using%0ADynamic Light Scattering From Malvern Instruments, (03.17.2017).
- Mandal, Jana, Ghorai, & Jana. (2018). Functionalized chitosan with self-assembly induced and subcellular localization-dependent fluorescence “switch on” property. *New Journal of Chemistry*, **42**(8). doi:10.1039/c8nj00067k
- Manual de Operación Nano SPRay Dryer Buchi 90. (n.d.).
- Manuscript. (2016). Islam, N., & Ferro, V. (2016). Recent advances in chitosan-based nanoparticulate pulmonary drug delivery. *Nanoscale*, **8**(30), 14341–14358. doi:10.1039/C6NR03256G
- Martínez. (2016). Rol de alfa-sinucleína en la función y dinámica mitocondrial en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson, 82–83.
- Martins, Facchi, Follmann, Pereira, Rubira, & Muniz. (2014). Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone: A review. *International Journal of*

- Molecular Sciences*, **15**(11), 20800–20832.
- McClements. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*, CRC Press.
- McCLEMENTS. (2005). *Food emulsions: principles, practice and techniques.*, New York: CRC Press.
- Mckenna, & Lyng. (2001). Instrumental techniques in the quality control Rheological measurements of foods.
- McPherson, R. A., Pincus. (2017). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book*, Elsevier Health Sciences.
- Menchicchi, Fuenzalida, Bobbili, Hensel, Swamy, & Goycoolea. (2014). Structure of Chitosan determines its interactions with mucin. *Biomacromolecules*, **15**(10), 3550–3558.
- Merisko-Liversidge, Liversidge, & Cooper. (2003). Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **18**(2), 113–120.
- Miller, Bourassa, & Smith. (2013). FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1828**(10), 2339–2346.
- Minamia, Suzuki, Okamoto, Fujinagab, & Shigemasa. (1998). Carbohydrate Polymers Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway, **8617**(98).
- Minet, Carroll, Rooney, ... Richards. (2013). Chemosphere Slow delivery of a nitrification inhibitor (dicyandiamide) to soil using a biodegradable hydrogel of chitosan. *CHEMOSPHERE*. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.08.043
- Mitragotri, Burke, & Langer. (2014). Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: Formulation and delivery strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, **13**(9), 655–672.
- Mizrahi S., Labuza, T., Karel. (1970). Computer-aided predictions of extend of browning in dehydrated cabbage. *Journal of Food Science*, **35**(7), 799–803.
- Mlalila, Swai, Kalombo, & Hilonga. (2014). Effects of spray-drying on w/o/w multiple emulsions prepared from a stearic acid matrix. *Nanotechnology, Science and Applications*, **7**, 105.
- Mohammed, & Borchers. (2015). An extensive library of surrogate peptides for all human proteins. *Journal of Proteomics*, **129**, 93–97.
- Monserrat Altamirano Pavón. (2016). *Remoción de Pb (II) por medio de adsorción en quitosano*. doi:10.13140/RG.2.2.27395.71200
- Moore, & Cerasoli. (2017). Particle Light Scattering Methods and Applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 543–553.
- Morel, Rosa Gasco, & Cavalli. (1994). Incorporation in lipospheres of [d-Trp-6]LHRH. *International Journal of Pharmaceutics*, **105**(2), 8–10.
- Morlock, Kissel, Li, Koll, & Winter. (1998). Erythropoietin loaded microspheres prepared from biodegradable LPLG – PEO – LPLG triblock copolymers : protein stabilization and in-vitro release properties, **56**, 105–115.
- Moschetti, Sharpe, Fischer, ... Hyvönen. (2016). Engineering Archeal Surrogate Systems for the Development of Protein–Protein Interaction Inhibitors against Human RAD51. *Journal of Molecular Biology*, **428**(23), 4589–4607.
- Mosmann. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**(1–2), 55–63.
- Mozafari. (2006). Nanocarrier Technologies : Frontiers of Nano therapy. In Mozafari, ed., *NANOCARRIER TECHNOLOGIES*, Springer, pp. 1–16.
- Mukhopadhyay, Chakraborty, Bhattacharya, Mishra, & Kundu. (2015). PH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, **72**, 640–648.
- Mukhopadhyay, Sarkar, Chakraborty, Bhattacharya, Mishra, & Kundu. (2013). Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo studies in diabetic animal model. *Materials Science and Engineering C*, **33**(1), 376–382.
- Muramatsu, Masuda, Yoshihara, & Fujisawa. (2003). In vitro degradation behavior of freeze-dried carboxymethyl-chitin sponges processed by vacuum-heating and gamma irradiation, **81**, 327–

- 332.
- Myrick, Vendra, & Krishnan. (2014). Self-assembled polysaccharide nanostructures for controlled-release applications. *Nanotechnology Reviews*, **3**(4). doi:10.1515/ntrev-2012-0050
- N.G. Schipper, K.M. Vårum. (1996). Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res*, **13**(11).
- Nagahama, Nwe, Jayakumar, Koiwa, Furuike, & Tamura. (2008). Novel biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications, **73**, 295–302.
- NanoZetasizer. Molecular weight measurements with the Zetasizer Nano system (2011), pp. 1–6.
- Nasti, Zaki, de Leonardis, ... Tirelli. (2009). Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. *Pharm Res*, **26**(8), 1918–1930.
- Ngan, Wang, Hiep, ... Dzung. (2014). Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity. *Research on Chemical Intermediates*, **40**(6), 2165–2175.
- Ngo, & Kim. (2014). *Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives*. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st edn, Vol. 73, Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0
- O'Toole, Henderson, Soucy, ... Gobin. (2012). Curcumin encapsulation in submicrometer spray-dried chitosan/tween 20 particles. *Biomacromolecules*, **13**(8), 2309–2314.
- Onsøyen, & Skaugrud. (1990). Metal recovery using chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (Oxford, Oxfordshire : 1986)*, **49**(4), 395–404.
- Pan, Li, Zhao, ... Cui. (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm*, **249**(1–2), 139–147.
- Parada, Miranda, & Salvador. (2004). Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **5**(1), 1–16.
- Pareek, V., Bhargava, A., Gupta, R., Jain, N., Panwar. (2017). Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, **9**(7), 527–544.
- Patel, Cholkar, & Mitra. (2014). Recent developments in protein and peptide parenteral delivery approaches. *Therapeutic Delivery*, **5**(3), 337–365.
- Patel, Yamamoto, Ueda, Tabata, & Mikos. (2008). Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomaterialia*, **4**(5), 1126–1138.
- Patil, Chavanke, & Wagh. (2012). A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4**(SUPPL. 4), 27–32.
- Peer, Karp, Hong, Farokhzad, Margalit, & Langer. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, **2**(12), 751–760.
- Peña, Izquierdo-barba, Martínez, & Vallet-regí. (2006). New method to obtain chitosan / apatite materials at room temperature, **8**, 513–519.
- Penalva, Esparza, Agüeros, Gonzalez-Navarro, Gonzalez-Ferrero, & Irache. (2015). Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. *Food Hydrocolloids*, **44**, 399–406.
- Pérez, Carrera-Sánchez, Rodríguez-Patino, & Pilosof. (2007). Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, **21**(5–6), 794–803.
- Pérez, Sánchez, Pilosof, & Rodríguez Patino. (2009). Kinetics of adsorption of whey proteins and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixtures at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, **336**(2), 485–496.
- Pérez, Wargon, & M.R. Pilosof. (2006). Gelation and structural characteristics of incompatible whey proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, **20**(7), 966–974.
- Peter, Thodi, Kumar, ... Jayakumar. (2009). Development of novel a -chitin / nanobioactive glass

- ceramic composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, **78**(4), 926–931.
- Philippova, Volkov, Sitnikova, Khokhlov, Desbrieres, & Rinaudo. (2001). Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative. *Biomacromolecules*, **2**(2), 483–490.
- Prabaharan, & Mano. (2005). Chitosan-Based Particles as Controlled Drug Delivery Systems, 41–57.
- Prudkin Silva, Martínez, Martínez, Farías, Leskow, & Pérez. (2018). Proposed molecular model for electrostatic interactions between insulin and chitosan. Nano-complexation and activity in cultured cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **537**(August 2017), 425–434.
- Prusty, & Sahu. (2013). Development and Evaluation of Insulin Incorporated Nanoparticles for Oral Administration. *ISRN Nanotechnology*, **2013**, 1–6.
- Quellec. (1998). Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization. *Journal of Biomedical Materials Research*, **15**(1), 274–54.
- Ramírez Barragán, Delgado Fornué, & Andrade Ortega. (2016). Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *Coloquio de Investigación Multidisciplinaria*, **4**(1), 769–776.
- Ramirez, Plascencia, Huerta, Vásquez, & Shirai. (2002). Obtención y caracterización de quitinas parcialmente desacetiladas mediante tratamiento biológicoquímico. *VIII Simposio Latinoamericano de Polímeros, II Simposio Iberoamericano de Quitina. Libro de Resúmenes.*, 593–594.
- Rampino, Borgogna, Blasi, Bellich, & Cesàro. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, **455**(1–2), 219–228.
- Ramsden. (2016). *What is nanotechnology?* *Nanotechnology*. doi:10.1016/B978-0-323-39311-9.00007-8
- Rania O. Salama, Daniela Traini, Hak-Kim Chan, Adrian Sung, Alaina J. Ammit. (2009). Preparation and Evaluation of Controlled Release Microparticles for Respiratory Protein Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **98**(9). doi:10.1002/jps
- Rao. (2014). *Flow and Functional Models for Rheological Properties of Fluid Foods*. (Media, Ed.) *International Food Research Journal*, Vol. 17. doi:10.1007/978-1-4614-9230-6
- Razmi, Divsalar, Saboury, Izadi, Haertlé, & Mansuri-Torshizi. (2013). Beta-casein and its complexes with chitosan as nanovehicles for delivery of a platinum anticancer drug. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **112**, 362–367.
- Reads. (2014). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos, (May).
- Reddy, Reddy, & Jiang. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, **33**(6), 362–369.
- Rinaudo. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, **31**(7), 603–632.
- Rojas-aguirre. (2016). Q uímica, 286–291.
- Round, Rigby, Garcia De La Torre, Maclerzanka, Mills, & MacKie. (2012). Lamellar structures of MUC2-rich mucin: A potential role in governing the barrier and lubricating functions of intestinal mucus. *Biomacromolecules*, **13**(10), 3253–3261.
- Rudin, A. Choi. (2012). The elements of polymer science & engineering. In *Mechanical properties of polymer solids and liquids.*, Academic Press.
- Saikia, & Gogoi. (2015). Chitosan: A Promising Biopolymer in Drug Delivery Applications. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, **s4**. doi:10.4172/1747-0862.S4-006
- Sakurai, Maegawa, & Takahashi. (2000). Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan / poly (N -vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer*, **41**, 7051–7056.
- Sampaio, Frota, Magalhães, ... Trevisan. (2015). Chitosan/mangiferin particles for Cr(VI) reduction and removal. *International Journal of Biological Macromolecules*, **78**, 273–279.

- Sánchez-Brenes, A., Sibaja-Ballester, M. D. R., Vega-Baudrit, J., Madrigal-Carballo. (2007). Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (Pleuroncodes planipes) con potenciales aplicaciones biomédicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **8**(4), 241–267.
- Sánchez, Vila-Jato, & Alonso. (1993). Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled release of cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*, **99**(2–3), 263–273.
- Sandoval Aldana, Rodríguez Sandoval, & Fernández Quintero. (2005). APLICACIÓN DEL ANÁLISIS POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS MODIFICACIONES DEL ALMIDÓN, **72**, 45–53.
- Santalices, Gonella, Torres, & Alonso. (2017). Advances on the formulation of proteins using nanotechnologies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **42**, 155–180.
- Sarmento, Ferreira, Veiga, & Ribeiro. (2006). Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers*, **66**(1), 1–7.
- Schmid, Arpagaus, Friess, Schmid, Arpagaus, & Friess. (2011). Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for - pharmaceutical applications, **7450**(May 2010). doi:10.3109/10837450.2010.485320
- Sebastien Gouin. (2004). Micro-encapsulation : industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 330–347.
- Semenova. (2017). Current Opinion in Colloid & Interface Science Protein – polysaccharide associative interactions in the design of tailor-made colloidal particles. *COCIS*, **28**, 15–21.
- Shalumon, Binulal, Selvamurugan, ... Jayakumar. (2009). Electrospinning of carboxymethyl chitin / poly (vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, **77**(4), 863–869.
- Sharma, Haque, & Wilson. (1996). Association tendency of β -lactoglobulin AB purified by gel permeation chromatography as determined by dynamic light scattering under quiescent conditions. *Food Hydrocolloids*, **10**(3), 323–328.
- Sharma, Sharma, Nam, Doss, Lee, & Chakraborty. (2015). Nanoparticle based insulin delivery system: the next generation efficient therapy for Type 1 diabetes. *Journal of Nanobiotechnology*, **13**(1), 74.
- Shi, Xiao, Kamaly, & Farokhzad. (2011). Self-assembled targeted nanoparticles: Evolution of technologies and bench to bedside translation. *Accounts of Chemical Research*, **44**(10), 1123–1134.
- Shigemasa, Saito, Sashiwa, & Saimoto. (1994). Enzymatic degradation of Chitin and Partially Deacetylated Chitins. *International Journal of Biological Macromolecules*, **16**(1), 43–49.
- Silva, Rodrigues, Silva, Reis, & Duarte. (2017). Engineered tubular structures based on chitosan for tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Applications*, **0**(0), 088532821774469.
- Singla, & Chawla. (2001). Chitosan : some pharmaceutical and biological aspects – an update, (Illum 1998), 1047–1067.
- Sinsuebpol, Chatchawalsaisin, & Kulvanich. (2013). Preparation and in vivo absorption evaluation of spray dried powders containing salmon calcitonin loaded chitosan nanoparticles for pulmonary delivery. *Drug Design, Development and Therapy*, **7**, 861–873.
- Sistemas de liberación Bioadhesivos Bioadhesive delivery systems. (2000), 115–128.
- Smith, Wood, & Dornish. (2004). Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions, **21**(1).
- Sogias, Williams, & Khutoryanskiy. (2008). Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, **9**(7), 1837–1842.
- Sou, Forbes, Gray, ... Morton. (2016). Designing a multi-component spray-dried formulation platform for pulmonary delivery of biopharmaceuticals : The use of polyol , disaccharide , polysaccharide and synthetic polymer to modify solid-state properties for glassy stabilisation. *Powder Technology*, **287**, 248–255.
- Sou, Kaminskas, Nguyen, Carlberg, McIntosh, & Morton. (2013). The effect of amino acid excipients on

- morphology and solid-state properties of multi-component spray-dried formulations for pulmonary delivery of biomacromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **83**, 234–243.
- Sriamornsak, & Wattanakorn. (2008). Rheological synergy in aqueous mixtures of pectin and mucin. *Carbohydrate Polymers*, **74**(3), 474–481.
- Stetefeld, McKenna, & Patel. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, **8**(4), 409–427.
- Suriñach, Baro, Bordas, Clavaguera, & Clavaguera-Mora. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, **31**, 11–17.
- Teng, Li, Luo, Zhang, & Wang. (2013). Cationic β - Lactoglobulin Nanoparticles as a Bioavailability Enhancer: Protein Characterization and Particle Formation.
- Thevarajah, Bulanadi, Wagner, Gaborieau, & Castignolles. (2016). Towards a less biased dissolution of chitosan. *Analytica Chimica Acta*, **935**, 258–268.
- Tolstoguzov. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein- polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, **4**(6), 429–468.
- Uragami, Saito, & Miyata. (2015). Pervaporative dehydration characteristics of an ethanol / water azeotrope through various chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers*, **120**, 1–6.
- Vanschaik. (n.d.). CC BY-SA 3.0.
- Venkatesham, Ayodhya, Madhusudhan, Veera Babu, & Veerabhadram. (2014). A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*, **4**(1), 113–119.
- Vesterager, Kjems, Yang, ... Perez Quiñones. (2013). Self-assembled nanoparticles of modified-chitosan conjugates for the sustained release of dl - alpha -tocopherol. *Carbohydrate Polymers*, **92**, 856–864.
- Vorburger, Dagata, Wilkening, & Iizuka. (1999). Industrial uses of STM and AFM. *Computer Standards & Interfaces*, **21**(2), 196.
- Wang, Chen, Wang, & Xing. (2014). Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate – chitosan beads. *Process Biochemistry*, **49**(10), 1682–1690.
- Washington, Washington, & Wilson. (2000). *Physiological pharmaceutics: barriers to drug absorption*, CRC Press.
- Weiss, M., Steiner, D. F., Philipson. (2014). *Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships*.
- Weissig, Pettinger, & Murdock. (2014). Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *International Journal of Nanomedicine*, **9**, 4357–4373.
- Xiao, Gömmel, Davidson, & Zhong. (2011). Intrinsic tween 20 improves release and antilisterial properties of co-encapsulated nisin and thymol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(17), 9572–9580.
- Yamanaka, & Leong. (2008). Engineering strategies to enhance nanoparticle-mediated oral delivery. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **19**(12), 1549–1570.
- Yang, Han, Zheng, Dong, & Liu. (2015a). Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **123**, 53–66.
- Yang, Xu, Qu, & Li. (2015b). The influence of amino acids on aztreonam spray-dried powders for inhalation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **10**(6), 541–548.
- Yao, Ji, Yin, & Wang. (1995). Investigation of pH-Sensitive Drug Delivery System of Chitosan / Gelatin Hybrid Polymer Network, **38**, 77–82.
- Yin, Fei, Cui, Cui, & Chunhua. (2007). Superporous hydrogels containing poly (acrylic acid- co - acrylamide) / O -carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks. *Biomaterials*, **28**, 1258–1266.

- Yokoyama, Fukushima, Uehara, ... Okano. (1998). Characterization of physically entrapment and chemically conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for in vivo delivery to a solid tumor. *J. Contr. Rel.*, **50**, 79–92.
- Yu, Wu, Shi, & Farokhzad. (2016). Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. *Journal of Controlled Release*, **240**, 24–37.
- Zhang, Huang, Wang, ... Anifuso. (2017). Atomic force microscopy for two-dimensional materials : A tutorial review. *Optics Communications*, (May). doi:10.1016/j.optcom.2017.05.015
- Zhang, Mujeeb, Feng, Li, & Du. (2016). Physically entrapped gelatin in polyethylene glycol scaffolds for three-dimensional chondrocyte culture. doi:10.1177/0883911516633893
- Zhang, Nie, Guo, Wang, Cui, & Xie. (2018). Conformational properties of a bioactive polysaccharide from *Ganoderma atrum* by light scattering and molecular modeling. *Food Hydrocolloids*, **84**, 16–25.
- Zhang, & Zhang. (2002). Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, **61**(1), 1–8.
- Zhang, Zhang, Jiang, & Xia. (2013). The hypolipidemic activity of chitosan nanopowder prepared by ultrafine milling. *Carbohydrate Polymers*. doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.037
- Zhang, Zhang, Wu, Wang, Niu, & Li. (2008). Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68**(3), 526–534.
- Ziani, Oses, Coma, & Maté. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT - Food Science and Technology*, **41**(10), 2159–2165.

Conclusiones Generales

✓ Los biopolímeros basados en recursos biodegradables o en materiales de desecho están generando un creciente interés, tanto en la sociedad en general como en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria, nutracéutica, así como también en el sector agrícola, ya que supone darle valor agregado a un subproducto, generando nuevos productos con aplicación en las áreas mencionadas. Nuestro país no escapa a tal realidad, es por ello que se ha recurrido a un quitosano obtenido a partir de quitina cuyo destino final era el desechado en repositórios en la costa argentina. Los materiales basados en quitosano están involucrados en una enormidad de recursos médicos, industriales y aplicaciones de bioingeniería como biorremediación, descontaminación de tejido de radionúclidos y reemplazo óseo por nombrar algunos. Debido a la flexibilidad intrínseca y conformacional y la versatilidad del quitosano, se ha llevado a cabo empíricamente el desarrollo de materiales novedosos: nanopartículas tipo *core-shell*, *clusters* y nanoentrampadas por deshidratación.

✓ En primer lugar, se realizó en forma completa la caracterización físico química del quitosano argentino como primer paso previo a su aplicación en nanopartículas. A tal fin se ha empleado un conjunto de técnicas analíticas de alta performance. La comprensión de las propiedades moleculares de este quitosano argentino permitió un diseño más eficiente y racional de las estructuras en las cuales se lo empleó. Por lo tanto, este enfoque se puede utilizar para adaptar estas propiedades a diversas necesidades específicas. En este caso, un uso sistemático de la información teórica y experimental concertada puede proporcionar una gran cantidad de información, más clara, de la dinámica estructural de este polisacárido. Éste sigue siendo un campo emergente que se beneficiará en los próximos años del desarrollo de parámetros más exactos como así como novedosos modelos capaces de echar luz en la escala nanoscópica.

✓ Esta es la primera tesis realizada con un quitosano de origen argentino. Aún quedan retos pendientes para mejorar el proceso y controlar las variables de su producción y lograr producir este biopolímero a una mayor escala para usos industriales que sean competitivos con los costos de los polímeros tradicionales. Dos componentes son cruciales en la determinación del precio de polímeros elaborados con materias primas renovables y su evaluación es imprescindible para garantizar una competencia con los polímeros de origen de la industria petroquímica: el costo de las materias primas y de la energía, así como la inversión de capital para establecer una unidad de producción industrial.

✓ Diferentes aspectos deben ser evaluados con el fin de aumentar la productividad y reducir el costo de la producción de quitosano argentino como: mejora de las variables de proceso a mayor escala, uso de la mayor parte de subproductos de la industria como materia prima, diseño de biorreactores, estrategias de operación del proceso, modelado matemático; caracterización, aplicación. En este sentido, el desarrollo de nuevas aplicaciones será crucial para lograr aumentar los volúmenes de producción y rentabilidad asociada a estos materiales.

✓ En el desarrollo de las nanocápsulas, el empleo de quitosano como material encapsulante presenta múltiples ventajas: es una sustancia abundante, ya que la quitina es una de las sustancias mayoritarias en la naturaleza, es de bajo costo relativo y su obtención ha sido ampliamente descrita, convirtiéndose en un reemplazante natural de los polímeros sintéticos. Es el único polímero policatiónico conocido en la naturaleza, en donde su alta densidad de cargas positivas le confiere propiedades físicas, químicas y biológicas únicas.

✓ Desde hace poco más de treinta años se ha estado trabajando en el desarrollo, la validación y la implementación de técnicas de reemplazo que involucran principalmente el uso de sistemas *in vitro*. Pero el rol que éstos desempeñan o el vigor que poseen para estos fines dependerá del tipo y sistema de ensayos que se esté empleando. Es un gran desafío el desarrollar y validar técnicas *in vitro* que permitan hacer de ellas una práctica de aplicación simple y confiable a partir de la cual se puedan aproximar conclusiones, sabiendo que la extrapolación a sistemas *in vivo* no siempre es una correlación directa. En este trabajo de Tesis se ha llevado a cabo la evaluación de la citotoxicidad del quitosano empleado cultivos celulares de las líneas HeLa y 3T3-L1. Ese tipo de ensayos ofrece además la posibilidad de detectar cambios celulares tempranos que podrían ser inadvertidos *in vivo*, cuestión clave para el quitosano, ya que es conocido por alterar las uniones estrechas entre células. Se ha demostrado que la desorganización de tales uniones es de carácter transiente y en acuerdo con la literatura científica, responde a mecanismos moleculares inducido por este polisacárido. No se observó citotoxicidad mediante el ensayo que evalúa parámetros metabólicos y energéticos en cultivos celulares puestos en contacto con este quitosano.

✓ La relación célula-quitosano se atribuye en gran parte a la hipótesis de que existe una atracción electrostática entre las moléculas de quitosano cargadas electropositivamente y las células cargadas electronegativamente. La carga positiva neta de las moléculas de quitosano se atribuye a la protonación de grupos amino. Por lo tanto, un quitosano con el peso molecular aquí determinado presenta alta carga neta positiva, lo que se correlacionaría con un aumento de la unión celular. Se debe tener en consideración que la protonación de dichos grupos ocurre a $\text{pH} < 6$ y las condiciones de cultivo usadas en estudios celulares son a pH neutros ($\sim 7.2-7.4$) en los que los grupos amino no estarían fuertemente protonados, la hipótesis de atracción electrostática con respecto al aumento en la unión celular, que aumentaría con el grado de desacetilación, se torna discutible

✓ Esta Tesis abre las puertas a futuras investigaciones ya que tanto el grado de desacetilación como el peso molecular son factores importantes en la manipulación de la funcionalidad del quitosano en cuanto a las respuestas celulares que genera. Queda por comprender el efecto conjunto del peso molecular y del grado de DD para el control o la manipulación de los comportamientos celulares. Por lo tanto, estos factores deben estudiarse adecuadamente para aclarar y comprender mejor los procesos subyacentes que controlan las interacciones fundamentales célula-quitosano. El quitosano no es solo un biopolímero, sino una familia diversa de ellos, cada uno de los

cuales tiene una identidad basada en la quitina de origen, métodos de obtención, grado de desacetilación, peso molecular y niveles de impurezas. Debido a que es difícil controlar estos muchos factores, los datos sobre quitosano y su relación con estructuras biológicas varían en la literatura. Solo a través de una cuidadosa y detallada caracterización del quitosano como la realizada en este trabajo permitió avanzar mínimamente en nuestra comprensión y conocimiento de los factores que influyen y controlan las interacciones entre propiedades del polisacárido y aquellas biológicas. La comprensión mejorada de estas interacciones será esencial para permitir el desarrollo y la traducción efectivos de dispositivos de implantes viables basados en quitosano para uso clínico.

✓ Se diseñaron nanocomplejos insulina-quitosano aplicando el principio de ensamblaje macromolecular. Se determinó la concentración de la solución de quitosano suficiente para lograr la completa cobertura de superficie de agregados proteicos. En otros términos, se constituyeron nanopartículas de tipo *core-shell*. Las interacciones entre ambos biopolímeros fueron moduladas por el pH de la solución y la configuración de la nanopartícula influenciada además por la concentración de quitosano. Las interacciones de tipo hidrodinámica y coloidal se evaluaron mediante la técnica de dispersión de la luz y potencial ζ , determinaciones que permiten encontrar la zona de interacción electrostática entre estas macromoléculas. Este último confirmó la cobertura superficial ejercida por el CS. Otras relaciones de masa I/CS permitieron constatar la formación de otro tipo de nanopartícula, de conformación similar a flóculos o clusters, que también fueron analizadas a fin de comprobar su estabilidad coloidal y su tamaño. Las propiedades de las curvas de flujo reflejaron la asociación de los bio-polímeros y el patrón de formación de los nanocomplejos. La aplicación de modelos matemáticos a los datos experimentales permitió obtener parámetros que describían el proceso de nanocomplejamiento, es decir, los parámetros cinéticos de la formación de nanocomplejos bajo las condiciones aquí consideradas.

✓ Los nanocomplejos abren nuevas perspectivas, desde el punto de vista básico, en el estudio referente a relaciones de masa, cargas y la influencia ejercida por las condiciones intrínsecas y extrínsecas de la solución en la que se encuentran los biopolímeros. Desde el punto de vista tecnológico, es factible el diseño de nuevos nano-vehículos para el desarrollo de una nueva generación de productos farmacéuticos, capaces de proteger proteínas con funciones específicas de las condiciones hostiles del cuerpo, aumentando su absorción y ejerciendo la liberación controlada, tal como lo demostró el ensayo de actividad biológica. Además, los nanocomplejos generados de acuerdo con esta configuración podría ser el punto de partida para nuevos diseños de fármacos destinados a nuevas rutas de administración, como la pulmonar, relevantes para usos pediátricos.

✓ Para este trabajo de Tesis se han puesto a punto métodos para estudiar dinámicas de activación e internalización de los complejos I-CS. De esta manera, se lograron detectar las diferencias en los perfiles de activación de pAKT, efector río abajo, estimulado por la insulina y los nanocomplejos (*core-shell*, *clusters* y las nanopartículas nanodeshidratadas). Como futuras investigaciones queda el

estudio del modelo de internalización para insulina encapsulada en células, la determinación de la colocalización con marcadores de endosomas tempranos y más tarde con marcadores lisosomales.

✓ Las simulaciones computacionales son una disciplina en expansión hoy en día, ya que constituyen una herramienta muy poderosa para dar respuesta a interrogantes como el modo de interacción insulina-quitosano, lo cual puede abordarse desde el estudio de las interacciones entre proteína-polielectrolitos. Tales interacciones son una de las propiedades que requiere más comprensión para soportar aplicaciones comerciales. Este fue otro principal interrogante al que se intentó dar respuesta aquí, variando el pH de las soluciones. Se identificaron diferentes regímenes de formación de complejos para el sistema I-CS. Hay tres regiones distintas observadas tanto por los resultados simulados como por los experimentales. Se caracterizan por interacciones coulómbicas y el mecanismo de regulación de cargas.

✓ Las diferencias cuantitativas entre los límites de las regiones pueden asignarse a muchos factores: la sensibilidad de los métodos experimentales que no es comparable con la exactitud de los resultados de las simulaciones, el modelo molecular aproximado para CS para el polisacárido que no caracteriza estrictamente el CS real, la falta de otro componente como el efecto hidrofóbico de ambas especies (debido al uso de un modelo de disolvente continuo) y otras interacciones, como la proteína-proteína, ya que solo se simuló un solo par de proteína-polielectrolito. El último está directamente relacionado con las diferentes escalas jerárquicas entre las condiciones experimental (escala mesoscópica) y simulada (escala molecular). La simulación simplemente permitiría explicar los factores físico-químicos que afectan este proceso en los experimentos, a pesar de sus limitaciones intrínsecas. Sin embargo, las simulaciones permitieron la caracterización cualitativa de la interacción I-CS, complementando los hallazgos experimentales y contribuyendo a la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a los experimentos. El mecanismo de regulación de la carga que a menudo se observa en los sistemas biológicos se observó nuevamente para este sistema. Esto contribuye a demostrar cuán general e importante es este mecanismo a pesar de ser relativamente nuevo en la literatura sobre proteínas de interés farmacéutico y nutracéutico.

✓ Se ha explorado una nueva tecnología como el proceso de nano-spray o nanodeshidratación. Este procedimiento implica el atrapamiento físico de la I en una matriz de CS. La nanodeshidratación ha sido utilizada para la preparación de micro y nanopartículas como método alternativo al autoensamblaje, porque en comparación con otras técnicas, es una tecnología de costo relativamente bajo, rápida y fácil de escalar. El proceso fue flexible, adaptable al procesamiento comúnmente utilizado en el equipo, y produjo partículas con buenas propiedades.

✓ Se han encontrado las condiciones para obtener nanopartículas de CS preparadas secando soluciones por pulverización con asistencia de un campo eléctrico. Se obtuvieron partículas con tamaños situados en la nanoescala, alto valor absoluto de potencial ζ , lo cual correlaciona con la

estabilidad coloidal, aunque heterogéneas en su ultraestructura. El control de sus propiedades se realizó ajustando la concentración de la solución de CS utilizada como alimentación, el tamaño de la boquilla y la temperatura de secado. La I contenida en nanopartículas presentó actividad biológica determinada en cultivos celulares, y la eficiencia de la carga fue alta. Estas nanopartículas de CS preparadas por nanodeshidratación tienen mucho potencial como una novedosa forma de administración de insulina.

En este trabajo se desea explicitar que como perspectiva para el futuro cercano, se contempla el estudio del efecto del quitosano y de las nanopartículas aquí generadas en sistemas *in-vivo*. En la actualidad existen varios cientos de publicaciones fácilmente accesibles a través de *PubMed*, *Web of Science* y otros motores de búsqueda que informan los resultados de estudios *in vivo* que examinan materiales en base a CS para estrategias de reparación, regeneración y tratamiento de tejidos entre otros. Muchos de esos estudios, sin embargo, involucran quitosanos que han sido modificados químicamente, entrecruzados covalentemente o compuestos de alguna forma con otros polímeros, cerámicas, cristales, incluso aleaciones o tejidos biológicos. *Nunca se han realizado estudios in-vivo con el CS argentino aquí empleado.* Las modificaciones químicas mencionadas o formulaciones compuestas, si bien son importantes para desarrollar materiales basados en CS para aplicaciones biológicas, ofrecen la dificultad de la comprensión de las respuestas fundamentales del tejido del huésped al CS como material básico. Un examen superficial de los trabajos en bibliografía muestra que existe mucha variabilidad entre los resultados *in vivo*, similar a la observada para los estudios *in vitro*, lo cual se atribuye en términos generales a los distintos pesos moleculares y al grado de desacetilación. Como corolario a este respecto se puede afirmar que cada quitosano “debe” contar con sus propios estudios *in-vivo* e *in-vitro*.