

3. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano

F. M. GOYCOOLEA^{1,2}, C. REMUÑÁN-LÓPEZ¹, M. J. ALONSO¹

¹ *Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.*

Santiago de Compostela.

² *Laboratorio de Biopolímeros. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, México.*

Los polisacáridos son los polímeros naturales más versátiles debido al amplio espectro de propiedades químicas, físicas y funcionales que confluyen en los organismos vivos, tales como conferir estructura, almacenar energía y otras funciones mucho más especializadas, tales como reconocimiento y adhesión en células eucariontes, señalización y activación de procesos de resistencia en plantas, formación de biopelículas en microorganismos, entre otras. A pesar del elevado tonelaje de polisacáridos que se utilizan como materias primas en las industrias de fibras, textil, papel y alimentos (p. ej. derivados de celulosa y almidones) hay cada vez mayor evidencia que sugiere que ciertas familias de polisacáridos poseen propiedades funcionales tales que pueden ser explotadas en otros sectores industriales especializados como el biomédico, cosmético y farmacéutico. Es especialmente relevante que algunos de estos biopolímeros combinan propiedades fisicoquímicas como la capacidad de formar sistemas tipo hidrogeles, micro y nanopartículas, con propiedades biológicas como la bio y mucoadhesividad que en su conjunto los hacen particularmente atractivos en la ingeniería y diseño de materiales empleados en ciencias de la salud.

En esta Sección se abordan las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de sistemas de nanopartículas a base de quitosano y de quitosano combinado con oligo y polisacáridos que abarcan los siguientes componentes: ciclo-dextrinas, alginato, ácido hialurónico y glucomanano. Desde nuestro punto de

vista, estos sistemas actualmente tienen alto potencial para el desarrollo de una nueva generación de nanopartículas coloidales poliméricas que factiblemente se convertirán en nanomedicinas innovadoras para la administración de fármacos vía transmucosa.

NANOPARTÍCULAS CONSTITUIDAS POR QUITOSANO

Generalidades sobre el quitosano

El quitosano es un aminopolisacárido obtenido a escala industrial por N-desacetilación termoalcalina de la quitina aislada de los desechos de crustáceos. A lo largo de la década pasada el quitosano se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos y comercialmente en la manufactura de parches cicatrizantes (e.g. HemCon[®]). Más del 50% del número total de solicitudes de patentes registradas en 2006 que reivindican el uso de este biopolímero como una parte sustancial de la invención están relacionadas con la liberación de fármacos, ingeniería de tejidos y cicatrización de heridas (1). Actualmente estos son los nichos de mercado de mayor crecimiento en el mundo (2).

Químicamente, el término quitosano define a una familia de herteropolisacáridos lineales que están formados por 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosa (unidades D) y 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucosa (unidades A) unidas en (1 \rightarrow 4) (Figura 3.1). Las unidades de tipo A a menudo están presentes en menor proporción que las de tipo D, y su contenido, expresado como la relación molar de unidades A frente al total (A+D), se conoce como el grado de acetilación que se expresa como porcentaje (GA) o como una fracción (F_A). Junto al grado de polimerización, el GA es un parámetro fundamental que determina directamente las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano (3-5).

Además de la proporción molar neta de unidades A, su distribución en la cadena del quitosano determina las propiedades y varía con el protocolo de preparación. Muestras de quitosano homogéneamente desacetilado con F_A en el rango de 0.04-0.49, han demostrado por ¹H NMR que la frecuencia de distribución de diadas corresponde a un patrón aleatorio. Mientras que muestras de quitosano con el mismo rango de F_A producidas bajo condiciones heterogéneas parecen tener una distribución ligeramente más cercana a un patrón de bloque (6).

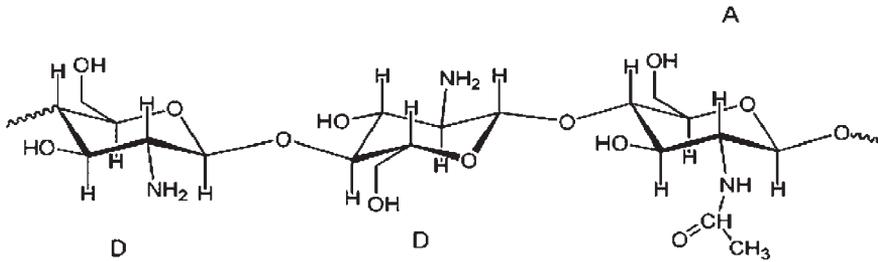


FIGURA 3.1. Estructura esquemática representativa de una cadena de quitosano conteniendo residuos de monosacáridos 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosos (residuos A) y 2-amino-2-deoxi- β -D-glucopiranosos (residuos D), ambos unidos por enlaces β (1-4).

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves. Además, el carácter policationico le confiere al quitosano alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas (p. ej. insulina, pADN, siARN, heparina, etc.) y antigénicas, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica. Las propiedades fisicoquímicas, biológicas y farmacológicas del quitosano han sido descritas en detalle en varios artículos de revisión (7-12) y en un libro editado en Español (13).

El quitosano se ha utilizado ampliamente en la industria de alimentos y está aprobado como aditivo en Japón. Se comercializa en Europa, EUA y en otros países como un atrapador de grasa en formulaciones para reducir el colesterol y el sobrepeso, se ha evaluado en ensayos clínicos como potenciador de la penetración de fármacos por vía nasal (14) y como excipiente farmacéutico (15). Una monografía para el uso biomédico de la sal de hidrocloreuro de quitosano ha sido incluida en la cuarta edición de la Farmacopea Europea publicada en 2002. Se sabe que el quitosano es degradado por varias enzimas, entre ellas las quitinasas y la lisozima presente en superficies mucosas y en suero humano (16-19) así como por enzimas gástricas como la papaína, pepsina, y lipasa A (20). Otras propiedades biológicas han sido ampliamente estudiadas en el quitosano, tanto *in vitro* como en modelos animales, entre ellas cabe mencionar las siguientes: mucoadhesividad (21, 22), biocompatibilidad (17, 23), baja toxicidad (24), inmunoestimulación (25-28), capacidad para facilitar la absorción de macromoléculas biológicas a través de barreras epiteliales por la apertura transitoria de las uniones estrechas celulares (29-33). Por otra parte, a lo largo de la pasada década se ha dedicado un gran esfuerzo al estudio de las modificaciones químicas del quitosano para, de este modo, explorar su máximo potencial de aplicación. Entre los principales productos derivados, merecen especial mención

quitosano trimetilado, tiolado, N,O-carboximetilado y el injertado con polietilén glicol (PEG), los cuales exhiben propiedades mejoradas para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas (34-36). Estas modificaciones son determinantes no sólo en el patrón de solubilidad del quitosano, sino en sus propiedades biológicas y funcionales (37-40).

MÉTODOLOGÍAS Y PARÁMETROS CRÍTICOS DE PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO

Las nanopartículas a base de quitosano se forman de acuerdo a una aproximación de tipo ‘bottom-up’ como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. En estas nanopartículas o nanoesferas el fármaco puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida (o semi-sólida). Las metodologías más comunes mediante las cuales es posible preparar nanopartículas a base de quitosano se presentan en la Figura 3.2. A menudo, se utiliza una combinación de métodos; por ejemplo, entrecruzamiento covalente de

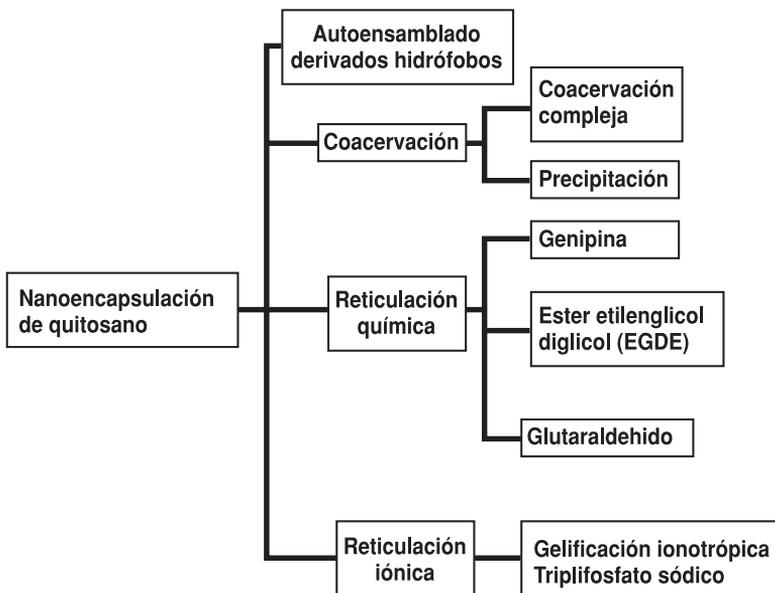


FIGURA 3.2. Métodos para preparar nanopartículas de quitosano.

la superficie de nanopartículas previamente obtenidas por coacervación. Es importante señalar que a pesar de la diversidad de métodos documentados y agentes químicos disponibles para obtener nanopartículas a base de quitosano, sólo unos cuantos de éstos ofrecen potencial real para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas debido al estricto marco regulatorio que deben cumplir los excipientes para la liberación de fármacos. Dentro de los que mayor atención han recibido, destacan aquellos basados fundamentalmente en el principio de la gelificación iónica del quitosano utilizando tripolifosfato pentasódico (TPP) (41).

Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en el desarrollo de plataformas para la liberación de fármacos basadas en nanopartículas de quitosano gelificado ionotrópicamente con TPP (41). Entre las ventajas de este sistema cabe destacar que evita el uso de altas temperaturas, solventes orgánicos o procesos drásticos como la sonicación, que unido a la naturaleza policationica del quitosano le confieren a estos sistemas la capacidad para asociar de forma eficiente y preservar la estabilidad y bioactividad de macromoléculas terapéuticas contra su degradación. Este sistema ha mostrado alta capacidad de carga de péptidos y proteínas hidrofílicas tales como insulina (42-46), albúmina sérica de bovino (47, 48) y toxoide tetánico (46). La capacidad de carga se ve principalmente afectada por la solubilidad y el pI de la proteína (46), la carga teórica de ésta (47), pH (44) y por el peso molecular del quitosano (46). Otras macromoléculas que se han cargado exitosamente en prototipos de estas nanopartículas incluyen: pDNA (49), heparina (50), β -lactoglobulina (51), y péptidos hidrofóbicos como la ciclosporina A (CyA) (52,53). Moléculas pequeñas hidrófilas como glicirrizinato de amonio (fármaco antiinflamatorio) (54) también han sido asociadas a estos sistemas.

El mecanismo propuesto para la formación de nanopartículas de quitosano-TPP plantea que la gelificación ionotrópica del quitosano ocurre por interacciones electrostáticas entre productos de la disociación del TPP en solución acuosa ($P_3O_{10}^{-5}$ y $HP_3O_{10}^{-4}$), con los grupos $-NH_3^+$ del quitosano (41). El tamaño de partícula de este sistema es muy sensible al pH y la fuerza iónica (55). A su vez, el efecto de otras condiciones preparativas y de las características intrínsecas del quitosano ha sido estudiado, con atención a la composición (47, 48, 56); peso molecular y grado de acetilación del quitosano (46, 47, 57, 58). En general, el tamaño de partícula en este sistema se ha observado que varía en un rango de 100 a 350 nm; el potencial zeta entre +20 y +50 mV e invariablemente poseen una morfología esférica de acuerdo a evidencia de microscopía de transmisión electrónica y de fuerza atómica (59). Dichas características, confieren a las nanopartículas de quitosano propiedades óptimas para la interacción con diversos epitelios.

PROPIEDADES DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS Y APLICACIONES BIOFARMACÉUTICAS DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO

Habida cuenta de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, el quitosano se ha utilizado en investigación farmacéutica centrada en el desarrollo de vehículos nanoparticulares innovadores. En este sentido, son de destacar en estos sistemas tanto la capacidad para proteger macromoléculas bioactivas frente a la degradación, como la habilidad para transportarlas a través de las barreras de las mucosas. En consecuencia, su aplicación se ha enfocado al desarrollo de nanovehículos aptos para la administración por vías no invasivas, tales como las mucosas ocular, nasal y oral (60-63). Adicionalmente, estudios recientes han demostrado la factibilidad de incorporar nanopartículas de quitosano-TPP en micropartículas a base de manitol secadas por aspersión para la administración por vía del epitelio pulmonar (64). A continuación se da cuenta del potencial de estos sistemas para la administración transmucosal en sus distintas modalidades.

Administración ocular

La eficacia de nanopartículas de quitosano para prolongar la administración de fármacos a la superficie del ojo ha sido firmemente demostrada (61, 63). Esto se ha conseguido con CyA como fármaco modelo cuya administración se puede ver beneficiada de una liberación prolongada, toda vez que este fármaco se prescribe para el tratamiento del síndrome de ojo seco severo. Es interesante anotar que las nanopartículas de quitosano fueron capaces de proveer una administración selectiva y prolongada de CyA a la mucosa ocular sin comprometer tejidos internos y evitando la absorción sistémica (52). En estudios subsecuentes, utilizando quitosano marcado fluorescentemente fue posible demostrar que la adhesión de nanopartículas de quitosano a la córnea y conjuntiva persiste durante más de 24 h (65).

Administración nasal

Las nanopartículas de quitosano han demostrado mejorar el transporte y biodisponibilidad de macromoléculas terapéuticas y antigénicas a través de la mucosa nasal (66, 67). Los estudios para mejorar la eficacia de nanopartículas para la liberación de macromoléculas por vía nasal se han centrado en dos tipos de macromoléculas: insulina y antígeno de toxoide tetánico. La administración de

nanopartículas de quitosano cargadas con insulina por vía nasal en conejo conducen a una disminución significativa de los niveles de glicemia (~ 40%), con respecto a una solución de insulina y quitosano (42). En otros estudios se ha abordado la respuesta inmune posterior a la administración de nanopartículas cargadas con toxoide tetánico, empleado como un antígeno modelo (46). Paralelamente, se ha demostrado el potencial de las nanopartículas de quitosano para la administración de plásmidos por vía nasal, con resultados prometedores (68). Otros autores también han generado resultados interesantes al utilizar este sistema para la inmunización genética por vía nasal y pulmonar frente a Hepatitis B y *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente (69, 70). En general, los resultados de estudios diversos son consistentes con la hipótesis que las nanopartículas de quitosano atraviesan la mucosa nasal y alcanzan las células presentadoras de antígeno. Los mecanismos en virtud de los cuales las nanopartículas de quitosano mejoran el transporte intranasal de macromoléculas terapéuticas, se entienden como una consecuencia de la facilidad de interacción de dichas nanopartículas con el epitelio nasal.

Administración oral

Las nanopartículas de quitosano también han sido ampliamente estudiadas como vehículos para la administración oral de macromoléculas terapéuticas (43, 45, 62, 71). En este particular, la administración oral de nanopartículas de quitosano cargadas con insulina a ratas diabéticas resultó en la aparición de una respuesta hipoglucémica en un período de 8 h posterior a la administración, la cual se prolongó hasta por 24 h (43). La evidencia experimental de estos y otros estudios (45), es consistente con la hipótesis de que estos sistemas son capaces de adherirse firmemente y traspasar el epitelio intestinal, además de ceder el péptido en forma sostenida al torrente sanguíneo. Esta hipótesis ha sido corroborada por observaciones de microscopía de barrido láser confocal (CLSM) que revelaron que una porción de las nanopartículas son internalizadas en cultivos celulares monocapa tipo enterocito Caco-2 y que dicha interacción es aun más importante con células que secretan mucus, MTX-E12 (72). De aquí, que se haya sugerido que la presencia de mucus favorece la interacción de las partículas con el epitelio subyacente. Aun cuando esta interpretación no puede trasladarse directamente a la situación *in vivo*, se puede aceptar razonablemente que las nanopartículas de quitosano son capaces de conferir protección al péptido frente a la degradación y facilitan la interacción con mucosas absorbentes.

NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS A BASE DE QUITOSANO Y OTROS OLIGO Y POLISACÁRIDOS

Una nueva generación de nanopartículas ha sido desarrollada en nuestro Grupo y otros, incorporando por un lado quitosano, y por otro, oligo y polisacáridos que han incluido: ciclodextrinas, alginato, ácido hialurónico y glucomanano. La base racional para la incorporación de dichos componentes en las nanopartículas ha sido el buscar mejorar la interacción con barreras mucosas y por tanto incrementar la biodisponibilidad de macromoléculas terapéuticas al administrarlas por vía transmucosa. En esta sección abordaremos en detalle las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de los siguientes sistemas nanoparticulares híbridos: quitosano-ciclodextrinas, quitosano-alginato, quitosano-ácido hialurónico y quitosano-glucomanano.

NANOPARTÍCULAS QUITOSANO-CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos, producidos a partir de la amilosa y constituidos por 6, 7 u 8 unidades (α -, β - o γ -ciclodextrinas, respectivamente) de D-glucosa articuladas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$. Las CDs poseen una cavidad interior lipofílica y una superficie externa de naturaleza hidrofílica. Esta estructura molecular característica confiere a las CDs la capacidad para albergar en su interior a moléculas (generalmente de naturaleza hidrófoba) dando lugar a complejos de inclusión que presentan una serie de ventajas en formulaciones farmacéuticas, que incluyen: protección contra la degradación física, química y enzimática; estabilización y aumento de la solubilidad; control de la liberación; reducción de la irritación y enmascaramiento de sabores y olores desagradables (73). En el caso de macromoléculas, su tamaño e hidrofilia previenen que sean incluidas en su totalidad en el interior de la cavidad de las CDs. No obstante, se ha descrito que pueden hacerlo parcialmente por vía de interacciones de sus cadenas hidrófobas (74), siendo esta inclusión parcial suficiente para mejorar la estabilidad (75). Otras propiedades ventajosas descritas para las ciclodextrinas, incluyen la habilidad para inhibir la función de la glicoproteína-P, así como de incrementar la permeabilidad de los epitelios (74). Algunas ciclodextrinas han demostrado ser altamente efectivas como promotoras de la absorción de macromoléculas, tales como la insulina o calcitonina, a través del epitelio nasal (76) y pulmonar (77).

Otra ventaja importante a resaltar sobre las CDs es el alto grado de conocimiento existente acerca de sus propiedades farmacéuticas y toxicológicas. Las

β -CDs naturales ya han sido aprobadas en EUA como excipiente GRAS. Por otra parte, mediante modificación química, las CDs naturales son sustituidas en los grupos hidroxilos con grupos metilo, hidroxipropil, carboximetil o sulfobutil éster, de forma que se han obtenido derivados aniónicos más hidrosolubles e incluso con mejores perfiles de toxicidad que las ciclodextrinas sin modificar. En la actualidad se comercializan varios derivados de CDs en diferentes formulaciones y para distintas vías de administración (78).

Habida cuenta de las ya mencionadas ventajas que exhiben las CDs por sí mismas como excipientes farmacéuticos, éstas han sido incorporadas en partículas nanométricas como una estrategia para diseñar sistemas de liberación versátiles capaces de encapsular fármacos con diferentes propiedades fisicoquímicas. El abordaje más común en este sentido, ha consistido en la incorporación de complejos de inclusión fármaco-CD previamente formados en nanopartículas poliméricas. La presencia de CDs en estos sistemas resulta generalmente en un incremento de la carga de fármaco (79, 80).

Por otra parte, nuestro grupo ha sido pionero en demostrar la factibilidad tecnológica de formar nanopartículas híbridas compuestas a base de quitosano con derivados de ciclodextrinas: hidroxipropil- β -ciclodextrina, carboximetil- β -ciclodextrina y sulfobutil éter- β -ciclodextrina (50, 81-84). Esta estrategia ofrece la ventaja de combinar las propiedades de conferir solubilidad, estabilidad y permeabilidad de las ciclodextrinas con aquellas mucoadhesivas y también permeabilizantes del quitosano, para devenir en un tipo de nanovehículo de liberación de fármacos con características únicas.

Las nanopartículas de quitosano-CD pueden prepararse utilizando la técnica basada en el concepto de gelificación ionotrópica aplicado al quitosano (41). Brevemente, estos sistemas se forman debido al ensamblado en forma de estructuras nanométricas del quitosano al interactuar con un agente reticulante. Dicho agente reticulante puede ser, o bien TPP o la propia CD (82), en dependencia de la carga eléctrica de la CD elegida. En el caso de CD con bajo grado de sustitución por grupos aniónicos, se precisa del uso de TPP para promover la gelificación del quitosano. En contraste, la incorporación de CD con un elevado grado de sustitución con grupos aniónicos está mediada por la interacción electrostática con el quitosano y las CDs por sí mismas pueden actuar como agentes reticulantes.

Tal como sucede con las nanopartículas compuestas únicamente por quitosano, el tamaño de aquellas que incorporan CD varía en dependencia de los parámetros de formulación, tales como el grado de acetilación y peso molecular

del quitosano y la relación de masa entre el quitosano y la CD. En general, la incorporación de CD tiene un efecto moderado sobre las características físicas de las nanopartículas resultantes cuyos valores de tamaño y potencial zeta fluctúan en un rango entre 275 y 550 nm y son cercanos a +35 mV, respectivamente (82). La inclusión de CDs neutras conlleva a una leve disminución del potencial zeta de la nanopartícula, un efecto que se atribuye a la presencia de CD en la superficie (81). Lógicamente, en el caso de nanopartículas que contienen CDs aniónicas, la reducción del potencial zeta es más pronunciada (82). Mediante uso de macroanálisis elemental ha sido posible concluir que la carga electrostática de la CD es el principal factor que determina la composición de nanopartículas de quitosano-CD. En el caso de CDs neutras, la incorporación en la matriz alcanza hasta un 20%, en tanto que para aquellas que contienen CDs aniónicas éstas pueden representar hasta un 60% de la composición final (82).

Las nanopartículas de quitosano-CD han sido evaluadas en su habilidad para cargar fármacos con propiedades fisicoquímicas diversas incluyendo tanto sustancias de muy baja solubilidad como macromoléculas. Por ejemplo, fármacos altamente hidrófobos como el triclosan y la furosemida pueden incorporarse satisfactoriamente en este tipo de nanopartículas gracias a su inclusión previa en la cavidad de la CD (81). En estudios posteriores, se ha demostrado que las nanopartículas de quitosano-CD son aptas para cargar muy eficientemente diversos tipos de macromoléculas terapéuticas tales como heparina (50), insulina (84) y pDNA (83). Por tanto, esta nueva clase de nanopartículas híbridas ofrece ventajas específicas cuando se compara con las nanopartículas formadas únicamente por quitosano.

Propiedades de liberación de fármacos y aplicaciones biofarmacéuticas de nanopartículas de quitosano-ciclodextrinas

El potencial de las nanopartículas de quitosano-CD como vehículos para la administración de macromoléculas terapéuticas a través de mucosas ha sido investigado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (83, 84). Por un lado, se han llevado a cabo estudios en cultivos celulares Calu-3 (83), como modelo que simula adecuadamente las características del epitelio respiratorio (nasal y tráqueobronquial) (85). Por otra parte, se ha estudiado la capacidad de este sistema para el transporte de insulina a través de la mucosa nasal (84).

Los estudios *in vitro* en células Calu-3 han abarcado los siguientes aspectos: pruebas de citotoxicidad en células en proliferación; estudios sobre la modulación de la barrera intercelular en células diferenciadas, para lo cual se

monitorizaron los cambios en la resistencia transepitelial (TEER); estudios de internalización por CLSM y estudios de transfección con pSEAP (plásmido modelo que codifica la expresión de fosfatasa alcalina secretada).

Los resultados obtenidos en células Calu-3 revelaron que las nanopartículas que contienen CD en su composición resultaron ser menos tóxicas en un amplio rango de dosis, lo que ha sido atribuido al excelente perfil de biocompatibilidad de las CDs (78). Concretamente, los valores de IC_{50} fueron aproximadamente 3 veces mayores para estas partículas que para las formulaciones que contenían únicamente quitosano (83). A su vez, las células en estado diferenciado fueron expuestas a distintas dosis de nanopartículas y los valores de TEER medidos a distintos tiempos por un período de hasta 2 h y una vez retiradas las muestras, se continuaron monitorizaron hasta 12 h. Mientras que los tratamientos control (tampón HBSS pH 6.4 y 7.4) no produjeron cambios, las nanopartículas de quitosano-CD redujeron la TEER bajo un efecto dosis-dependiente y saturable. Estos resultados han sido atribuidos principalmente a la apertura de las uniones estrechas intercelulares, lo cual supone un aumento de la permeabilidad del epitelio al paso de moléculas por vía paracelular y pone de manifiesto el potencial de estos sistemas como promotores de la absorción de fármacos. En todos los casos se observó un efecto completamente reversible en la TEER una vez que se retiraron los tratamientos, diagnóstico de que las células permanecieron funcionalmente intactas.

Por su parte, se estudió el potencial de las nanopartículas quitosano-CD como vehículos sintéticos de ADN (83). Primeramente se utilizó microscopía CLSM a fin de evaluar la interacción de las partículas con células Calu-3 diferenciadas. Se utilizaron nanopartículas preparadas con quitosano marcado con fluoresceína, en tanto que para la precisa localización de los sistemas, se utilizó un segundo marcador del núcleo celular, el yoduro de propidio. Los resultados permitieron demostrar que las nanopartículas penetran en forma eficiente en las células y se distribuyen en forma homogénea en el medio intracelular independientemente de su composición. Esto permitió anticipar que el ADN una vez encapsulado en las nanopartículas, podría penetrar en forma eficiente al interior de las células. Posteriormente, se llevaron a cabo estudios de transfección en el mismo modelo celular, utilizando el plásmido pSEAP, cuya expresión celular permite la posibilidad de cuantificar la proteína secretada al medio de cultivo mediante una técnica no destructiva. Los resultados revelaron que todas las formulaciones de nanopartículas ensayadas dieron lugar a un mayor nivel de expresión proteica que cuando se aplicó el plásmido en forma libre. En general, los mayores niveles de expresión se observaron para nanopartículas preparadas

con quitosano de bajo peso molecular, independientemente del tipo de CD. Los resultados fueron concordantes con aquellos obtenidos en diversos estudios realizados con nanopartículas de quitosano y quitosano-ácido hialurónico y complejos de quitosano-pADN, en los cuales, las mayores eficacias de transfección encontradas para los sistemas con quitosano de bajo peso molecular se atribuyeron a una más fácil y rápida liberación intracelular del plásmido (86, 87).

Los estudios *in vivo* consistieron en la administración nasal a conejos de las formulaciones de nanopartículas de quitosano-CD conteniendo insulina, así como de un control constituido por el péptido en solución (84). Los resultados obtenidos mostraron que las nanopartículas produjeron un descenso máximo de los niveles de glucosa plasmática equivalente a un 35% del valor basal, frente a sólo un 14% producido por la administración de una dosis idéntica de insulina en solución (5 UI/kg). No se apreciaron diferencias entre el efecto hipoglucémico inducido por los diferentes sistemas (quitosano-CM- β -CD y quitosano SBE- β -CD) y la efectividad no se vio influenciada por la cantidad de quitosano ni CD presente en la formulación. En base a estos resultados, se han sugerido dos mecanismos por los que los sistemas de nanopartículas quitosano-CD son capaces de incrementar la absorción sistémica de insulina. Por un lado, las nanopartículas se adhieren al epitelio nasal, donde gracias a sus componentes (quitosano y CD), actúan como promotores de la absorción mediante la apertura de las uniones estrechas intercelulares y, simultáneamente, liberan la insulina, que a su vez ve facilitado su paso por vía paracelular. Y por otro lado, tal vez en modo minoritario, las nanopartículas pueden ser internalizadas y atravesar el epitelio nasal por vía transcelular, actuando como verdaderos nanovehículos de macromoléculas.

NANOPARTÍCULAS QUITOSANO-ALGINATO

El alginato es otro polisacárido obtenido principalmente a partir de algas marinas marrones y que ha atraído especial interés en el campo biomédico a lo largo de la última década (88). Químicamente, es un co-polímero constituido por poli-D-manuronato (poli-M) y poly-L-guluronato (poli-G) homopoliméricos y por bloques donde ambos residuos ocurren alternadamente. La composición de la cadena de alginato, resumida en el valor de la relación de la fracción molar de residuos de D-manuronato a L-guluronato (ratio M/G) es determinante en las propiedades fisicoquímicas y funcionales del alginato. Destaca en este sentido, la capacidad de gelificar en presencia de cationes bivalentes específicos (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) como consecuencia de la interacción cooperativa tipo ‘caja

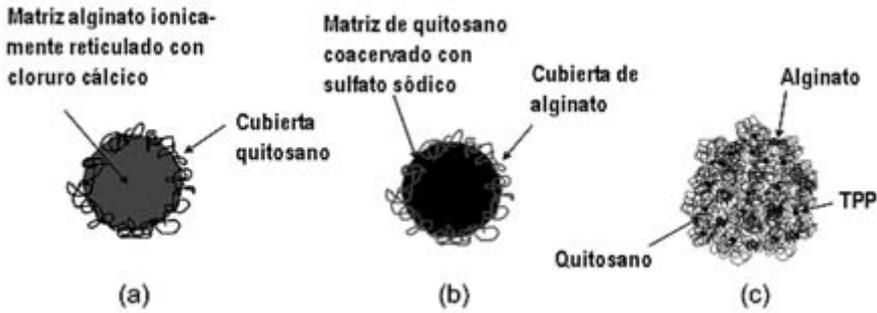


FIGURA 3.3. Representación esquemática de tres distintos tipos de nanopartículas a base de quitosano y alginato: a) Nanomatrix pre-gelificada de alginato por reticulación ionotrópica con cloruro cálcico recubierta con quitosano; b) Nanomatrix de quitosano preparada por coacervación con sulfato de sodio recubierta con alginato; c) Nanomatrix híbrida co-gelificada por gelificación ionotrópica de quitosano con tripolifosfato pentasódico (TPP) y complejación concomitante del alginato. Reproducida con permiso de Woodhead Pub. Ltd.

de huevos' ('egg-box' en Inglés) entre bloques de poli-G de longitud más de 6-10 residuos, en virtud de la cual dos grupos carboxilato forman un complejo de coordinación con el catión (89). Con base a esta capacidad de formar hidrogel y de la demostrada biocompatibilidad del alginato, se ha utilizado ampliamente en el diseño e ingeniería de biomateriales (90). Adicionalmente, desde hace casi cuatro décadas se le han atribuido al alginato propiedades bioadhesivas (91, 92). Sin embargo, sólo recientemente dichas propiedades se han explotado en formulaciones para el tratamiento de desórdenes del tracto esofágico superior como el reflujo (93), que son condicionantes del síndrome de Barret, el cual a su vez es precursor del adenocarcinoma de esófago (94).

Dado que las propiedades fisicoquímicas y biológicas del alginato en cierta medida son complementarias a las del quitosano, se ha investigado el desarrollo de sistemas nanoparticulares a base de ambos polisacáridos. Se han descrito al menos tres distintas estrategias metodológicas para preparar nanopartículas de este tipo (95), mismas que se representan esquemáticamente en la Figura 3.3 y discuten en detalle a continuación.

Nanopartículas de alginato pre-gelificado recubiertas con quitosano

Un proceso consistente en dos etapas ha sido descrito en virtud del cual el alginato es pre-gelificado en presencia de cloruro cálcico bajo sonicación para obtener un nanogel el cual es posteriormente recubierto con quitosano (96) (Figura 3.3a).

Las partículas así obtenidas presentan un tamaño medio de 650 ± 22 nm siempre y cuando se mantenga controlada la relación de masas de cloruro de calcio/alginate en el rango de 0.08 a 0.35 y a una relación de quitosano a alginate de 0.1. El papel de los principales parámetros que determinan las características de este sistema ha sido estudiado (97). En general, el uso de polímeros de bajo peso molecular conduce a partículas de menor tamaño (~ 338 -415 nm) independientemente de la relación de masa alginate/quitosano.

Nanopartículas de quitosano coacervado recubiertas con alginate

Un segundo protocolo de preparación consistente en tres etapas ha sido descrito para la preparación de nanopartículas cargadas con proteína y optimizado como una plataforma para la cesión de antígenos (98). Para este propósito, nanopartículas de quitosano son inicialmente pre-formadas al mezclar una solución de sulfato sódico en una de quitosano en presencia de un surfactante (Tween 80[®]) bajo agitación suave y sonicación. Las partículas aisladas fueron liofilizadas y resuspendidas en un tampón de fosfato (pH 7.4) e incubadas en disoluciones de ovoalbúmina de concentración variable. Posteriormente, la suspensión coloidal fue añadida sobre soluciones de alginate de concentración variable para finalmente reticular la recubierta de alginate con cloruro cálcico. Este protocolo conduce a la obtención de nanopartículas de tamaño en el rango de 100 a 1000 nm con potencial zeta marcadamente negativo (~ -35 mV) y la eficacia de asociación de ovoalbúmina fue de 40%. La recubierta de alginate se encontró que confiere estabilidad a las nanopartículas en fluido intestinal simulado (pH 6.8) a 37 °C y en consecuencia se previene la liberación tipo 'burst' de la ovoalbúmina.

Nanopartículas co-gelificadas híbridas de quitosano-alginate

Recientemente hemos descrito un nuevo tipo de sistema nanoparticulado híbrido formado en una sola etapa por la gelificación ionotrópica del quitosano con TPP concomitante a la complejación con alginate (99). Para ello, se utilizó alginate con pesos moleculares en el rango 4 a 32 kDa y una relación de masa alginate/quitosano de 0.1:1. El tamaño de las nanopartículas obtenidas estuvo en un rango de 247 - 359 nm, tuvieron una polidispersión relativamente elevada ($PI < 0.36$) y un potencial zeta de $+ 43.1 \pm 4.0$ mV. Estas nanopartículas permanecen estables en tampón acetato (pH 4.3) a 37 °C durante ~ 20 min, independientemente del peso molecular del alginate.

Propiedades de liberación de fármacos y aplicaciones biofarmacéuticas de nanopartículas de quitosano-alginato

El sistema de nanopartículas de alginato pre-gelificadas ionotrópicamente y recubiertas con quitosano ha sido aplicado para la administración oral de insulina (100), consiguiendo más de un 70% de eficacia de asociación. Los resultados obtenidos permitieron demostrar que la difusión de insulina se ve retardada por el complejo formado entre quitosano y alginato. Adicionalmente, la estructura secundaria de la insulina atrapada en la matriz de este sistema se conserva durante el proceso de preparación y liberación (101). Estudios hechos en rata diabética revelaron que la administración oral estas partículas consigue reducir en un 40% los niveles de glucosa en plasma con respecto a los valores basales con dosis de 50-100 UI/kg y mantienen la hipoglucemia durante un período superior a 18 h (100).

A su vez, nanopartículas co-gelificadas de quitosano-TPP con alginato han sido evaluadas como vehículos para la administración nasal de insulina en conejos. Los resultados mostraron que estas nanopartículas fueron capaces de facilitar el transporte de insulina a través de la mucosa nasal, y de promover una absorción significativa (equivalente a una reducción de 40% de los niveles plasmáticos de glucosa) durante un período que se prolongó durante varias horas (99).

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO-ÁCIDO HIALURÓNICO

Junto con el quitosano y el alginato, el ácido hialurónico (también llamado hialuronán) es el otro polisacárido principal que se ha considerado como base para el desarrollo de aplicaciones biomédicas. El ácido hialurónico es un aminopolisacárido que existe en la matriz extracelular de los tejidos conectivos de animales vertebrados. El ácido hialurónico tradicionalmente se extrae del humor vítreo de bovinos, de la cresta de gallos o de cordones umbilicales. El mismo polisacárido se produce actualmente a gran escala a partir de las bacterias *Streptococcus zooepidermicus* y *Streptococcus equi*, con lo cual el precio ha disminuido notablemente y por tanto el número de aplicaciones ha ido en aumento (102). La estructura química del ácido hialurónico se define como un heteropolisacárido lineal copolimérico tipo AB constituido por unidades de ácido D-glucurónico unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y por residuos 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucosa enlazadas de acuerdo a un patrón $\beta(1\rightarrow3)$. El ácido hialurónico se considera no sólo un excipiente farmacéutico sino un fármaco. Su biocompati-

bilidad y propiedades viscoelásticas son la base de su utilización en oftalmología, dermatología y en el tratamiento de la osteoartritis. Desde un punto de vista biofarmacéutico, el principal interés se ha centrado en sus propiedades bio y mucoadhesivas, particularmente debido a los receptores celulares CD44 hacia este polisacárido que ocurren en las barreras biológicas (103, 104).

El quitosano y el ácido hialurónico han sido asociados conjuntamente en nanopartículas híbridas co-gelificadas con el propósito de mejorar las propiedades para el transporte de macromoléculas (105). Esto se ha conseguido por el proceso de gelificación ionotrópica del quitosano descrito anteriormente para sistema quitosano-alginato. Este tipo de nanopartículas se forman por el mezclado simple de una disolución acuosa de quitosano con otra de ácido hialurónico en presencia de TPP. La incorporación de ácido hialurónico ha sido demostrada por medio de electroforesis en gel de agarosa y la estabilidad al ser incubadas en fluido lacrimonal simulado fue estudiada durante un período de 24 h. Las nanopartículas se forman a una relación de masa de ácido hialurónico/quitosano en el rango de 0.1:1.0 a 1:1. Ambas concentraciones, la de ácido hialurónico y la de TPP, afectan directamente al tamaño de partícula. Estas nanopartículas, al igual que las co-gelificadas a base de quitosano-alginato, presentan un potencial zeta positivo que fluctúa en el rango $\sim + 30 - \sim + 40$ mV. En general, el aumento en la cantidad de ácido hialurónico conduce a una reducción en los valores de potencial zeta, lo que ha sido interpretado como la consecuencia esperada de la localización preferente de las cadenas de ácido hialurónico sobre la superficie de las nanopartículas.

Propiedades de liberación de fármacos y aplicaciones biofarmacéuticas de nanopartículas de quitosano-ácido hialurónico

Nanopartículas a base de quitosano-ácido hialurónico se han cargado con albúmina de suero de bovino (ASB), insulina, péptidos hidrofóbicos tales como la CyA y con plásmido que codifica la expresión de proteína fluorescente verde (pEGFP-C1). En todos los casos, la eficacia de asociación es muy alta ($\sim 90\%$) y muy similar a la evaluada en nanopartículas a base de quitosano sólo. En el caso de la eficacia de asociación de ASB, se ha encontrado que la presencia de ácido hialurónico no presenta influencia sobre este parámetro. Esto ha sido explicado con base a la interacción entre ASB y el ácido hialurónico mediada por asociación hidrofoba, puentes de H y otras fuerzas intermoleculares (106). Por su parte, la CyA también ha sido incorporada en este sistema, como modelo de polipéptido notablemente hidrofobo, carga eléctrica neutra, carácter

lipofílico y que es ampliamente utilizado en terapia y como agente inmunosupresor. Esto se hizo teniendo en cuenta estudios previos en los cuales se demostró que la co-administración intravenosa de CyA y ácido hialurónico conlleva a un aumento de cuatro veces en el efecto inmunosupresor del péptido (107), un efecto atribuido a la interacción del ácido hialurónico con el receptor CD44 antes mencionada. Por su parte, la utilidad del sistema quitosano-ácido hialurónico para mejorar la biodisponibilidad de CyA posterior a la administración por vía oral (53) y ocular (52) ha sido demostrada. Las ventajas biofarmacéuticas de las nanopartículas a base de quitosano y ácido hialurónico, le hacen un excelente candidato para la liberación de macromoléculas terapéuticas por vía transmucosa.

Estudios llevados a cabo por nuestro grupo han buscado desarrollar nanovehículos innovadores a base de quitosano-ácido hialurónico para la liberación de genes (108). Para este fin, se han obtenido nanopartículas cargadas con ADN plasmídico utilizando quitosano de peso molecular ~ 10 - 12 ó ~ 125 kDa y ácido hialurónico de peso molecular < 10 ó ~ 170 kDa. Estas partículas se han formulado por gelificación ionotrópica del quitosano con TPP y complejación concomitante del ácido hialurónico con quitosano. La biocompatibilidad, internalización celular y eficacia de transfección de estas nanopartículas así como los posibles mecanismos subyacentes han sido estudiados tanto en la línea celular HEK293 (108), en un modelo de epitelio de córnea humano, como en epitelio ocular de conejo (87). Para ello, se han asociado al plásmido pEGFP-C1 y a otro que codifica la expresión de beta galactosidasa (p β -Gal). En ambos casos, más del 86% del pDNA se mantiene asociado a las diversas formulaciones de acuerdo a ensayos de electroforesis en gel. La incubación de las nanopartículas cargadas con pADN con quitosanasas y hialuronidasas, permitió comprobar que este sistema preserva intactas la conformación y bioactividad de ambos plásmidos.

En lo que a las propiedades biofarmacéuticas de este sistema se refiere, vale la pena resaltar su baja citotoxicidad independientemente del peso molecular de los polisacáridos. Aun a dosis de nanopartículas de 154 mg/cm² la viabilidad celular se mantuvo por encima de 80%. Esto representa una mejora substancial sobre las nanopartículas a base de quitosano únicamente (18 - 36 mg/cm²) en la misma línea celular. La disminución en citotoxicidad se ha atribuido a la presencia de ácido hialurónico, debido a su elevada biocompatibilidad e implicación en procesos biológicos tales como adhesión celular y proliferación, entre otros. La eficacia de transfección, según lo revelaron observaciones por microscopía CLSM, fue alta y

mostró diferencias asociadas al peso molecular del quitosano, mientras que a tiempos más prolongados no se observan diferencias significativas asociadas al peso molecular del quitosano. El efecto del quitosano de bajo peso molecular ha sido atribuido a la liberación del pADN de las nanopartículas. En tanto que quitosano de alto peso molecular exhibe mayor afinidad por el ADN y por tanto, la disociación del complejo se ve menos favorecida que en el caso de oligómeros de quitosano, una consecuencia del carácter cooperativo de la unión entre los polielectrolitos quitosano y ADN (86). Otra conclusión de los estudios de eficacia de transfección en este sistema de nanopartículas fue que el número total de células expresan la proteína fluorescente verde aumenta con la cantidad de ácido hialurónico presente. Observaciones de microscopía CLSM de la internalización y distribución intracelular llevados a cabo con p β -Gal marcado fluorescentemente revelaron que las células expuestas a las nanopartículas tuvieron una fluorescencia verde intensa, resultado de la presencia de pADN distribuido en el citoplasma. Para esta respuesta no se observaron diferencias entre las distintas formulaciones, un resultado que se puede considerar diagnóstico de que la internalización celular no es un factor limitante en la eficacia de transfección. No obstante, observaciones después de 15 h revelaron la presencia de manchas verdes asociadas a la presencia del plásmido en el citoplasma y el núcleo. En general, los patrones observados permitieron concluir que el tráfico intracelular, y por tanto el acceso del pADN al núcleo, sí son dependientes de la composición de la nanopartícula. Los ensayos de eficacia de transfección *in vivo* llevados a cabo con este sistema, han mostrado que es efectivo para transfectar células de córnea y conjuntiva después de la administración tópica en conejos (87).

NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO-GLUCOMANANO

Otro polisacárido que se ha identificado con propiedades muy atractivas para la formulación de nanopartículas a base de quitosano es el glucomanano de konyac (*Amorphophalus konjac*), un tubérculo comestible en Asia. El uso de este polisacárido está aprobado en alimentos y medicamentos en Europa, EUA y Asia. En contraste con quitosano, alginato y ácido hialurónico que contienen grupos con carga eléctrica en su estructura, el glucomanano natural es un polisacárido neutro, aunque también está disponible comercialmente el derivado fosforilado. La principal propiedad biofarmacéutica que da cuenta del potencial del glucomanano en el desarrollo de sistemas nanoparticulares para liberación de fármacos es su alto contenido de D-manosa, que le confiere la

capacidad para interactuar con superficies biológicas que contienen receptores de manosa, tales como las células M de las placas de Peyer (109, 110) y los macrófagos (111).

Las nanopartículas de quitosano-glucomanano se pueden formar ya sea en presencia o en ausencia de TPP, y con glucomanano nativo neutro o el derivado fosforilado (112, 113). Ha sido posible también preparar nanopartículas de quitosano-TPP recubiertas con el glucomanano derivatizado. En general, estas nanopartículas ofrecen varias ventajas tecnológicas, que incluyen poder ser liofilizadas en ausencia de agentes crioprotectores así como presentar mayor estabilidad en medios de alta fuerza iónica similares a los encontrados en condiciones fisiológicas (tampón PBS pH 7.4) que las nanopartículas de quitosano-TPP (112).

Las nanopartículas a base de quitosano y glucomanano fueron concebidas con la idea de optimizar el comportamiento de las nanopartículas de quitosano-TPP al potenciar la absorción de insulina administrada por la vía oral. Para ello se evaluó la eficacia de este sistema en ratas normoglicémicas. La presencia del glucomanano en la nanoestructura fue crítica para obtener una reducción de 50% en los niveles séricos de glucosa. Fue además interesante que la respuesta hipoglucémica apareció 14 h posterior a la administración y se mantuvo durante un período de > 10 h. El papel del glucomanano en potenciar la interacción de las nanopartículas con el epitelio intestinal ha sido investigado en estudios subsecuentes *in vitro* utilizando un co-cultivo de células Caco-2 y Raji como modelo de células M. Estos estudios revelaron que la presencia de glucomanano potencia drásticamente la captura de nanopartículas por las células M con respecto a las nanopartículas de quitosano (114).

CONCLUSIONES

A través de este capítulo, hemos buscado presentar una visión de los distintos sistemas nanoparticulares a base de quitosano y otros oligo y polisacáridos abarcando tanto aspectos fundamentales como sus aplicaciones en liberación de fármacos y biofarmacéuticas. Sin duda, esta clase de nanomateriales son especialmente interesantes para la administración de macromoléculas terapéuticas por vía transmucosal. Actualmente se llevan a cabo estudios toxicológicos y mecanísticos que serán la base para que su aplicación comercial se vea materializada en un futuro. Sistemas de nanopartículas híbridas tales como los que se han abordado en este trabajo, con propiedades y funcionalidad mejoradas, continuarán ampliando el

rango de estrategias para conseguir llegar a tejidos de mucosa diana, así como para reducir la cantidad de quitosano necesaria para obtener el efecto deseado.

A mediano plazo, es de esperar que sistemas nanoscópicos avanzados de liberación de fármacos a base de quitosano co-gelificado con otros polisacáridos, sean la base de nanomedicinas innovadoras relacionadas con estructuras tipo «capa-por-capas», sistemas sensibles a estímulos biológicos y aquellos modificados en la superficie obtenidos por vía de la conjugación con otras especies no sintéticas capaces de llegar a receptores celulares específicos (p. ej. azúcares, enzimas, anticuerpos, lectinas, ácido fólico), tanto para la liberación dirigida de fármacos como para terapia de cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Higuera-Ciapara, I., Toledo-Guillén, A.R. & Goycoolea F.M. (2007) Tendencias en propiedad intelectual y orientación de mercado para la quitina y quitosano. En: Argüelles-Monal W M, Campana S and Mada A, Proceedings of the IV Iberoamerican Chitin Symposium. Iberoamerican Chitin Society, Natal, Brasil.
- (2) Orive, G., Carcaboso, A.M., Hernández, R.M., Gascón, A.R. & Pedraz J.L. (2005) Biocompatibility evaluation of different alginates and alginate-based microcapsules. *Biomacromolecules*. 6:927-931.
- (3) Schipper N.G.M., Vårum K.M., Artursson P. (1996). Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. I. Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm. Res.* 13: 1686-1692.
- (4) Prasitsilp, M., Jenwithisuk, R., Kongsuwan, K., Damrongchai, N. & Watts. P. (2000). Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. *J. Mater. Sci.-Mater. M.* 11: 773-778.
- (5) Huang, M., Khor. E. & Lim. L.Y. (2004) Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm. Res.* 21: 344-353.
- (6) Vårum, K.M., Anthonsen, M.W., Grasdalen, H. & Smidsrød, O. (1991). Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by highfield n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 211: 17-23.
- (7) Skaugrud, O., Hagen, A., Borgersen, B. & Dornish, M. (1999). Biomedical and pharmaceutical applications of alginate and chitosan. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 16: 23-40.

- (8) Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N. & Aminabhavi, T.M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *J. Control. Rel.* 100: 5-28.
- (9) Ravi Kumar, M.N.V., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H. & Domb, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.* 104: 6017-6084.
- (10) George, M. & Abraham, T.E. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan-a review. *J. Control Rel.* 114: 1-14.
- (11) Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31: 603-632.
- (12) Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym. Int.* 57:3 97-430.
- (13) Pastor, A. (2004) Quitina y Quitosano. Obtención, Caracterización y Aplicaciones. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Lima, Perú.
- (14) Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A. N. & Davis, S.S. (2001). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 51: 81-96.
- (15) Singla, A.K. & Chawla, M. (2001) Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *J. Pharm. Pharmacol.* 53(8): 1047-1067.
- (16) Pangburn, S.H., Trescony, P.V. & Heller, J. (1982) Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials.* 3: 105-108.
- (17) Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y. & Nonaka, I. (1990) Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration. En: Gebelein G. G. y Dunn R.L. *Progress in Biomedical Polymers.* Nueva York, Plenum Press, 283-289.
- (18) Aiba, S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 14: 225-228.
- (19) Nordtveit, R.J., Våurn, K.M. & Smidsrød, O. (1996). Degradation of partially N-acetylated chitosan with hen egg white and human lysozyme. *Carbohydr. Polym.* 29: 163-167.
- (20) Roncal, T., Oviedo, A., López de Armentia, I., Fernández L. & Villarán, M.C. (2007) High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. *Carbohydr. Res.* 342: 2750-2756.
- (21) Lehr, C.M., Bouwstra, J.A., Schacht, E.H. & Junginger, H.E. (1992). In-vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int. J. Pharm.* 78: 43-48.

- (22) Shruti, C., Saiqa, M., Jasjeet, K., Zeemat, I. & Sushma, T. (2006). Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 1021-1032.
- (23) Vandevord, P.J., Matthew, H.W.T., Desilva, S.P., Mayton, L., Wu, B. & Wooley, P.H. (2002) Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J. Biomed. Mat. Res.* 59(3): 585-590.
- (24) Aspden, T.J., Mason, J.D. & Jones, N.S. (1997) Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on *in vitro* and *in vivo* mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J. Pharm. Sci.* 86: 509-513.
- (25) Peluso, G., Petillo, O., Ranieri, M., Santin, M., Ambrosia, L., Calabró, D., Avallone, B. & Balsamo, G (1994). Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials.* 15: 1215-1220.
- (26) Porporatto, C., Bianco, I.D. & Correa, S.G. (2005) Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. *J. Leukocyte Biol.* 78: 62-69.
- (27) Borges O., Borchard, G., De Sousa, A., Junginger, H.E. & Cordeiro-da-Silva, A. (2007) Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers. *Int. J. Pharm.* 337: 254-264.
- (28) Zaharoff, D.A., Rogers, C.J., Hance, K.W., Schlom, J. & Greiner, J.W. (2007) Chitosan solution enhances the immunoadjuvant properties of GM-CSF. *Vaccine.* 25: 8673-8686.
- (29) Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S.S. & Illum, L. (1994) Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* 11: 1358-1361.
- (30) Kotze, A.F., De Leeuw, B.J. & Luessen, H.L. (1997) Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across the intestinal epithelium: In vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers. *Int. J. Pharm.* 159: 243-253.
- (31) Schipper, N.G.M., Olsson, S., Hoostraate, A.J., De Boer, A.G., Vårum, K.M. & Artursson, P. (1997) Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res.* 14: 923-929.
- (32) Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J.X. & Kissel, T. (2000) Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50: 147-60.
- (33) Smith, J., Wood, E. & Dornish, M. (2004) Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharm. Res.* 21: 43-49.
- (34) van der Merwe, S. M., Verhoef, J. C., Verheijden, J. H. M., Kotze, A. F. & Junginger, H. E. (2004) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58: 225-235.

- (35) Bernkop-Schnürch, A., Guggi, D. & Pinter, Y. (2004). Thiolated chitosans: development and in vitro evaluation of a mucoadhesive, permeation enhancing oral drug delivery system. *J. Control. Release.* 94: 177-86.
- (36) Saito, H., Wu, X., Harris, J. M. & Hoffman, A. S. (1997) Graft copolymers of poly(ethylene glycol) (PEG) and chitosan. *Macromol. Rapid Commun.* 18: 547-50.
- (37) Kotze, A. F., Lueßen, H. L., de Leeuw, B. J., de Boer, A. G., Verhoef, J. C. & Junginger, H. E. (1998). Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *J. Control. Release.* 51: 35-46.
- (38) Thanou, M., Verhoef, J. C., Verheijden, J. H. M. & Junginger, H. E. (2001). Intestinal Absorption of Octreotide Using Trimethyl Chitosan Chloride: Studies in Pigs. *Pharm. Res.* 18: 823-828.
- (39) Bernkop-Schnürch, A., Hornof M. & Guggi, D. (2004). Thiolated chitosans. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57: 9-17.
- (40) Krauland, A.H., Guggi, D. & Bernkop-Schnürch, A. (2004) Oral insulin delivery: the potential of thiolated chitosan-insulin tablets on non-diabetic rats. *J. Control. Release.* 95: 547-555.
- (41) Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (1997) Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63: 125-132.
- (42) Fernández-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* 16: 1576-1581.
- (43) Pan, Y., Li, Y., Zhao, H., Zheng, J., Xu, H., Wei, G., Hao, J. & Cui, F. (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* 249: 139-147.
- (44) Ma, Z., Yeoh, H.H. & Lim, L.Y. (2002) Formulation pH modulates the interaction of insulin with chitosan nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 91: 1396-1404.
- (45) Ma, Z., Lim, T.M. & Lim, L.Y. (2005) Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. *Int. J. Pharm.* 293: 271-280.
- (46) Vila, A., Sánchez, A., Janes, K.A., Behrens, I., Kissel, T., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (2004). Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57: 123-131.
- (47) Xu, Y. & Du, Y. (2003) Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 250: 215-226.

- (48) Zhang, H., Oh, M., Allen, C. & Kumacheva, E. (2004) Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. *Biomacromolecules*. 5: 2461-2468.
- (49) Mao, H.Q., Roy, K., Troung-Le, V.L., Janes, K.A., Lin, K.Y., Wang, Y., August, J.T. & Leong, K.W. (2001) Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. Control Rel.* 70: 399-421.
- (50) Krauland, A.H. & Alonso, M.J. (2007) Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 340: 134-142.
- (51) Chen, L. & Subirade, M. (2005) Chitosan/ β -lactoglobulin core-shell nanoparticles as nutraceutical carriers. *Biomaterials*. 26: 6041-53.
- (52) De Campos, A.M., Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2001) Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporine A. *Int. J. Pharm.* 224: 159-158.
- (53) El-Shabouri, M. H. (2002) Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *Int. J. Pharm.* 249: 101-108.
- (54) Wu, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J. & Fu, S. (2005) Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* 295: 235-245.
- (55) López-León, T., Carvalho, E.L.S., Seijo, B., Ortega-Vinuesa, J.L. & Bastos-González, D. (2005) Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. *J. Colloid Interf. Sci.* 283: 344-351.
- (56) Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C. & McCarron, P. (2005) Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloid Surface B*. 44: 65-73.
- (57) Janes, K.A. & Alonso, M.J. (2003) Depolymerized chitosan nanoparticles for protein delivery: preparation and characterization. *J. Appl. Polym. Sci.* 88: 2769-2776.
- (58) Goycoolea, F.M., El Gueddari, N.E., Remuñán-López, C., Coggiola, A., Lollo, G., Domard, A. & Alonso, M. J. (2007) Effect of molecular weight and degree of acetylation on the physicochemical characteristics of chitosan nanoparticles. En: Fienel S., Vårum K.M., Fiumnu M.M., Hñncal A.A. *Advances in Chitin Science X*, Alp Ofset, Ankara, 542-547.
- (59) Kim, B.G. & Kang, I.J. (2006) Chitosan nanoparticles for the effective vaccine delivery system. NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech 2006. *Technical Proceedings*. 2: 388-391.
- (60) Janes, K.A., Calvo, P. & Alonso, M.J. (2001) Polysaccharide colloidal particles as delivery system. NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show-NSTI Nanotech 2006 *Technical Proceedings*. 2: 388-391.
- (61) Alonso, M.J. & Sanchez, A. (2003) The potential of chitosan in ocular drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 55: 1451-1463.

- (62) Prego, C., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) The potential of chitosan for the oral administration of peptides. *Expert Opin. Drug Del.* 2: 843-854.
- (63) Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2006) Nanoparticulate carriers for ocular drug delivery' in Torchilin V, Nanoparticles as Drug Carriers, London World Scientific-Imperial College Press, 649-674.
- (64) Grenha, A., Seijo, B. & Remuñán-López C (2005) Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 25(4/5): 427-434.
- (65) De Campos, A.M., Diebold, Y., Carvahlo, E.S., Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2004) Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: in vitro stability, in vivo fate and cellular toxicity. *Pharm. Res.* 2: 803-810.
- (66) Köping-Höggard, M., Sanchez, A. & Alonso M.J. (2005). Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert Rev. Vaccines.* 4: 185-196.
- (67) Csaba, N., Garcia-Fuentes, M. & Alonso, M.J. (2006). The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 3: 463-478.
- (68) Csaba, N., Sánchez, A., Fernández-Megía, E., Novoa-Carballal, R. & Alonso M.J. (2004) Chitosan nanoparticles for the delivery of plasmid DNA: preparation and characterization. *Eur. J. Pharm. Sci.* 23: 54.
- (69) Bivas-Benita, M., Laloup, M., Verstehey, S., Joelle, D., De Braekeleer, J., Jongert, E. & Borchard, G. (2003) Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan nanoparticles: preparation characterization, and preliminary in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 266: 17-27.
- (70) Khatri, K., Goyal, A.K., Gupta, P.N., Mishra, N. & Vyas, S.P. (2006) Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B. *Int. J. Pharm.* 354: 235-241.
- (71) Cui, F., Zhang, L., Zheng, J. & Kawashima, Y. (2004) A study of insulin-chitosan complex nanoparticles used for oral administration. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 14: 435-439.
- (72) Behrens, I., Vila Pena, A.I., Alonso, M.J. & Kissel, T. (2002) Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport. *Pharm. Res.* 19: 1185.
- (73) Loftsson, T. & Brewster, M.E. (1996) Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* 85: 1017-1025.
- (74) Irie, T. & Uekama, K. (1999) Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36: 101-123.
- (75) Dotsikas, Y. & Loukas, Y.L. (2002) Kinetic degradation study of insulin complexed with methyl-beta cyclodextrin. Conformation of complexation with electrospray mass spectroscopy and ¹H NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 487-494.

- (76) Merkus, F.W., Verhoef, J.C., Marttin, E., Romeijn, S.G., van der Kuy, P.H.M., Hermens, W.A.J.J. & Schipper, N.G.M. (1999) Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36: 41-57.
- (77) Kobayashi, S., Kondo, S. & Juni, K. (1996) Pulmonary delivery of salmon calcitonin dry powders containing absorption enhancers in rats. *Pharm. Res.* 13: 80-83.
- (78) Challa, R., Ahuja, A., Ali, J. & Khar, R.K. (2005) Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 6: E329-E357.
- (79) Da Silveira, A.M., Ponchel, G., Puisieux, F. & Duchene, D. (1998) Combined poly(isobutylcyanoacrylate) and cyclodextrins nanoparticles for enhancing the encapsulation of lipophilic drugs. *Pharm. Res.* 15: 1051-1055.
- (80) Boudad, H., Legrand, P., Lebas, G., Cheron, M., Duchene, D. & Ponchel, G. (2001) Combined hydroxypropyl- β -cyclodextrin and poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles intended for oral administration of saquinavir. *Int. J. Pharm.* 218: 113-24.
- (81) Maestrelli, F., Garcia-Fuentes, M., Mura, P. & Alonso, M.J. (2006) A new drug nanocarrier system consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63: 79-86.
- (82) Trapani, A., Garcia-Fuentes, M. & Alonso, M. J. (2008) Novel drug nanocarriers combining hydrophilic cyclodextrins and chitosan. *Nanotechnology.* 19: 185101.
- (83) Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C. & Alonso, M.J. (2008) Chitosan/cyclodextrin nanoparticles can efficiently transfect the airway epithelium in vitro. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* En Prensa, Disponible en línea: DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.09.020.
- (84) Teijeiro-Osorio, D., Remuñán-López, C. & Alonso, M.J. (2009) New Generation of Hybrid Poly/Oligosaccharide Nanoparticles as Carriers for the Nasal Delivery of Macromolecules. *Biomacromolecules.* DOI: 10.1021/bm800975j.
- (85) Florea, B.I., Meaney, C., Junginger, H.E. & Borchard, G. (2002) Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSc.* 4: E12.
- (86) Köping-Höggård, M., Vårum, K. M., Issa, M., Danielsen, S., Christensen, B. E., Stokke, B. T. & Artursson P. (2004) Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Therapy.* 11: 1441-1452.
- (87) De la Fuente, M., Seijo, B. & Alonso, M. J. (2008) Bioadhesive hyaluronan/chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. *Gene Therapy.* 15: 668-676.

- (88) Park, H. & Lee, K.-Y. (2008) Alginate hydrogels as matrices for tissue engineering. En: Natural-based polymers for biomedical applications. Eds. Reis R.L., Neves N.M., Mano J.F., Gomes M.E., Marques A.P. y Azevedo H.S. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, Inglaterra. Pp. 515-532.
- (89) Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C. & Thom, D. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Lett.* 32: 195-198.
- (90) Augst, A.D., Kong, H.J. & Mooney, D.J. (2006) Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol. Biosci.* 6: 623-633.
- (91) Chen, J.L. & Cyr, G.N. (1970) Compositions producing adhesion through hydration. En: Manley R.S. Adhesion in Biological Systems. Academic Press, New York, 163-181.
- (92) Smart, J.D., Kellaway, I.W. & Worthington, E.C. (1984) An in vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 36: 295-299.
- (93) Batchelor, H.K., Banning, D., Dettmar, P.W., Hampson, F.C., Jolliffe, I.G. & Craig, D.Q.M. (2002) An in vitro mucosal model for prediction of the bioadhesion of alginate solutions to the oesophagus. *Int. J. Pharm.* 238: 123-132.
- (94) Dettmar, P.W., Strugala, V., Tselepis, C. & Jankowski, J.A. (2007) The effect of alginates on deoxycholic-acid-induced changes in oesophageal mucosal biology at pH 4. *J. Biomat. Sci.-Polym. E.* 18: 317-333.
- (95) Alonso, M.J., Goycoolea, F.M. & Higuera-Ciapara, I. (2008) Chitosan-polysaccharide blended nanoparticles for controlled drug delivery. En: Natural-based polymers for biomedical applications. Eds. Reis R.L., Neves N.M., Mano J.F., Gomes M.E., Marques A.P. y Azevedo H.S. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, Inglaterra. Pp. 644-679.
- (96) De, S. & Robinson, D. (2003) Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate of poly-L-lysine-alginate nanospheres. *J. Control. Rel.* 89: 101-112.
- (97) Douglas, K.L. & Tabrizian, M. (2005) Effect of experimental parameters on the formation of alginate-chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. *J. Biomater Sci Polymer Edn.* 16: 43-56.
- (98) Borges, O., Borchard, G., Coos Verhoef, J., de Sousa, A. & Junginger, H.E. (2005) Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int. J. Pharm.* 299: 155-166.
- (99) Goycoolea, F.M., Lollo, G., Remuñán-López, C., Quaglia, F. & Alonso, M.J. (2009) Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for transmucosal delivery of macromolecules. *Biomacromolecules*, Submitted.

- (100) Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Sampaio, P., Neufeld, R. & Ferreira, D. (2007) Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharm. Res.* 24: 2198-2206.
- (101) Sarmiento, B., Ferreira, D., Veiga, F. & Ribeiro, A. (2006) Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydr. Polym.* 66: 1-7.
- (102) Kogan, G., Soltés, L., Stern, R. & Gemeiner, P. (2007) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.* 29: 17-25.
- (103) Alho, A.M. & Underhill, C.B. (1989) The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 108: 1557-1565.
- (104) Knudson, W., Chow, G. & Knudson, C.B. (2002) CD-44 mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol.* 21: 15-23.
- (105) De la Fuente, M., Seijo, B. & Alonso, M. J. (2008) Novel hyaluronan based nanocarriers for transmucosal delivery of macromolecules. *Macromol. Biosci.* 5: 441-450.
- (106) Xu, S., Yamanaka, J., Sato, S., Miyama, I. & Yonese, M. (2000) Characteristics of complexes composed of sodium hyaluronate and bovine serum albumin. *Chem. Pharm. Bull.* 48 (6): 779-783.
- (107) Gowland, G. (1998). Fourfold increase in efficiency of cyclosporin A when combined with hyaluronan: Evidence for mode of drug transport and targeting. *Int. J. Immunother.* 19 (1): 1-7.
- (108) De la Fuente, M., Seijo, B. & Alonso, M. J. (2008) Design of novel polysaccharidic nanostructures for gene delivery. *Nanotechnology.* 19(7): art. no. 075105.
- (109) Takada, M., Yuzuriha, T., Iwamoto, K. & Sunamoto, J. (1984). Increased lung uptake of liposomes coated with polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta.* 80 :237-44.
- (110) Tomizawa, H., Aramaki, Y., Fujii, Y., Hara, T., Suzuki, N., Yachi, K., Kikuchi, H. & Tsuchiya, S. (1993) Uptake of phosphatidylserine liposomes by rat Peyer's patches following intraluminal administration. *Pharm. Res.* 10: 549-552.
- (111) Cui, Z., Hsu, C.H. & Mumper, R.J. (2003) Physical characterization and macrophage cell uptake of mannan-coated nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29: 689-700.
- (112) Alonso-Sande, M., Cuña, M., Reumñán-López, C., Teijeiro-Osorio, D., Alonso-Lebrero, J.L. & Alonso, M.J. (2006) Formation of new glucomannan-chitosan nanoparticles and study of their ability to associate and deliver proteins. *Macromolecules.* 39: 4152-4158.

- (113) Cuña, M., Alonso-Sande, M., Remuñán-López, C., Pivel, J.P., Alonso-Lebrero, J.L. & Alonso, M.J. (2006) Development of Phosphorylated Glucomannan-coated chitosan nanoparticles as nanocarriers for protein delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 2887-2895.
- (114) Alonso-Sande, M., Des Rieux, A., Schneider, Y.-C., Reumñán-López, C., Alonso, M.J. & Prát, V. (2006) Uptake studies of chitosan and chitosan- glucomannan nanoparticles in human intestinal FAE model. 33rd annual meet Controlled Release Society, Viena.