



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES.**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**ENSAMBLE DE MICROESFERAS POROSAS CON TGF $\beta$ 3 Y SU APLICACIÓN  
EN REGENERACIÓN CELULAR**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRA EN CIENCIAS E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**PRESENTA:**

**FIS. GÉNESIS OSORIO TORIBIO**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DR. ENRIQUE JAIME LIMA MUÑOZ**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA.**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**DR. GERARDO LEYVA GÓMEZ**  
**INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JUNIO 2017.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mi hija Saori*





# Agradecimientos

Este trabajo de Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas. Mi intención es no omitir a nadie, así que solo me queda decirles gracias a todas esas personas por su invaluable apoyo, comentarios, aportaciones, observaciones, palabras de aliento, amor y paciencia.



# Resumen

Este proyecto propone desarrollar un nanosistema que favorezca el ensamble de la proteína factor de crecimiento transformante beta 3 ( $TGF\beta 3$ ) en una matriz polimérica biodegradable de quitosano, mediante la evaluación de factores que afectan las propiedades de carga y liberación de la proteína, que incluyen la relación de masa entre el quitosano (CS) y el tripolifosfato de sodio (TPP), además de la cantidad del  $TGF\beta 3$ , inicialmente encapsulado. La técnica empleada para la preparación de las nanopartículas de CS se basa en la reticulación iónica utilizando TPP como agente de reticulación. Para la caracterización del nanosistema se parte de nanopartículas de quitosano sin proteína, con el objetivo de optimizar su proceso de producción, para posteriormente incorporarles la proteína  $TGF\beta 3$  y evaluar la eficiencia de encapsulación, la estabilidad de almacenamiento y la tasa de liberación.

Como resultado la distribución de tamaño de las partículas mostró la presencia de una población unimodal compuesta por partículas de escala nano con forma esférica. La encapsulación de la proteína fue posible con el método de reticulación iónica y el comportamiento de su mecanismo de liberación se pudo ajustar a modelos matemáticos de liberación de fármacos. Siendo la reticulación iónica un método eficaz para conseguir un nanosistema con las características físico-químicas aptas para encapsular la proteína  $TGF\beta 3$ .





# Índice

<b>Agradecimientos</b>	<b>v</b>
<b>Resumen</b>	<b>vii</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Conceptualización de la investigación . . . . .	1
1.2. Antecedentes y objetivo . . . . .	3
1.3. Estructura de capítulos . . . . .	6
<b>2. Descripción del sistema</b>	<b>7</b>
2.1. Introducción . . . . .	7
2.2. Aspectos generales del quitosano . . . . .	8
2.2.1. Metodología química para la obtención del quitosano . .	9
2.2.2. Propiedades físico-químicas y biológicas del quitosano . .	10
2.2.3. Limitaciones . . . . .	12
2.3. Factor de crecimiento transformante beta 3 . . . . .	13
2.3.1. Funciones biológicas . . . . .	13
2.3.2. Estructura química . . . . .	14
2.3.3. Mecanismo de liberación . . . . .	15
2.4. Importancia de la nanoencapsulación de agentes biológicos . . .	16
2.4.1. Fundamentos de la nanopartículas . . . . .	17
<b>3. Obtención de nanopartículas</b>	<b>21</b>
3.1. Introducción . . . . .	21
3.2. Nanopartículas reticuladas iónicamente . . . . .	22
3.2.1. Interacciones involucradas en la reticulación iónica . . .	22
3.2.2. Principios de la formación . . . . .	22
3.3. Factores que influyen en la síntesis de nanopartículas de CS . . .	24
3.3.1. Concentración de solución de CS y TPP . . . . .	24
3.3.2. Relación de masa de CS a TPP . . . . .	24
3.3.3. Concentración de ácido acético . . . . .	25
3.3.4. pH de la solución de CS . . . . .	26

3.3.5. Temperatura ambiente durante el proceso de reticulación	26
3.3.6. Velocidad de agitación . . . . .	27
3.4. Ventajas y desventajas de las nanopartículas reticuladas iónicamente . . . . .	27
<b>4. Fundamentos teóricos de las técnicas de caracterización</b>	<b>29</b>
4.1. Introducción . . . . .	29
4.2. Técnicas para la caracterización física de las nanopartículas . . .	29
4.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) . . . . .	29
4.2.2. Microscopía de fuerza atómica (AFM) . . . . .	30
4.2.3. Dispersión dinámica de la luz (DLS) . . . . .	31
4.2.4. Potencial zeta . . . . .	32
4.3. Técnicas bioquímicas para evaluar la proteína . . . . .	33
4.3.1. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) . . .	33
4.3.2. Dicroísmo circular (DC) . . . . .	34
<b>5. Técnicas experimentales</b>	<b>37</b>
5.1. Introducción . . . . .	37
5.2. Metodología experimental para la obtención de las nanopartículas	37
5.2.1. Materiales . . . . .	37
5.2.2. Preparación de nanoesferas de CS cargadas con TGF $\beta$ 3	38
5.3. Caracterización física de las nanopartículas . . . . .	39
5.3.1. Análisis por SEM y AFM . . . . .	39
5.3.2. Análisis por DLS y potencial zeta . . . . .	40
5.4. Análisis bioquímicos de la proteína . . . . .	41
5.4.1. Detección del TGF $\beta$ 3 por el método ELISA . . . . .	41
5.4.2. Análisis por DC . . . . .	45
<b>6. Resultados y discusión</b>	<b>47</b>
6.1. Introducción . . . . .	47
6.2. Caracterización física . . . . .	47
6.2.1. Nanopartículas sin proteína . . . . .	48
6.2.2. Nanopartículas con proteína . . . . .	53
6.3. Análisis bioquímicos de la proteína . . . . .	55
6.3.1. Liberación <i>in vitro</i> de la proteína . . . . .	55
6.3.2. Evaluación de la estructura del TGF $\beta$ 3 después de ser liberado de las NPs con dicroísmo circular . . . . .	61
<b>7. Conclusiones</b>	<b>65</b>
<b>8. Perspectivas</b>	<b>67</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>69</b>

# Índice de figuras

2.1. Estructura molecular del quitosano. Fuente: (Agrawal et al., 2010). .....	9
2.2. Estructura tridimensional de la proteína TGF $\beta$ 3 formada por: (A) seis láminas beta y tres hélices alfa; y (B) tres puentes de disulfuro. Fuente: (Cox, 1995). .....	15
3.1. Representación esquemática del método de reticulación iónica para la formación de nanopartículas de CS/TPP. Fuente: (Grenha, 2012). .....	23
4.1. Representación esquemática de la técnica inmunológica sándwich ELISA para detectar una sustancia biológica. .....	34
6.1. Efecto de la razón de masa entre las soluciones CS/TPP en el tamaño de las nanopartículas derivadas de la síntesis de nanopartículas de quitosano sin proteína, vistas por imágenes SEM y AFM. Las imágenes SEM con un aumento X 50,000 tomadas a 5.0 kV son: (A) con razón de masa 2.5:1 (w/w), y (B) con razón de masa 5:1 (w/w); mientras que las imágenes de AFM vistas en una ventana de 500 nm son: (C) con razón de masa 2.5:1 (w/w), y (D) con razón de masa 5:1 (w/w). .....	48
6.2. Nanopartículas de quitosano sin proteína con relación de masa 5:1 (w/w) formuladas por técnica de reticulación iónica, vista por SEM con un aumento de X100,000. .....	49
6.3. Los análisis por DLS para las NPs sin proteína con relación de masa 5:1 (w/w) son: (A) una distribución Gaussiana unimodal que muestra nanopartículas de aproximadamente 84.69 nm de diámetro, con una (B) función de correlación que exhibe un decaimiento exponencial. .....	50
6.4. Cambios en la distribución de tamaño de las NPs de quitosano sin proteína como consecuencia de la evolución de las NPs en el tiempo, medidos por DLS para tres tiempos en un periodo de 8 días. .....	52

6.5. Imágenes SEM de micropartículas derivadas de la sintetización de nanopartículas de quitosano cargadas con dos concentraciones diferentes de TGFβ 3 después del secado vistas con dos aumentos. 0.26 μg/mL de TGFβ 3: (A) X 25,000, (B) X 50,000; y 0.4 μg/mL de TGFβ 3: (C) X 25,000, (D) X 50,000. . . . .	54
6.6. Curva de calibración para el TGFβ 3 de siete puntos. El gráfico muestra los valores promedio de los ensayos realizados por triplicado en un mismo experimento a diferentes tiempos durante un período de 10 días. Las barras representan la desviación estándar. El límite de detección fue 15.6 pg/mL de TGFβ 3 detectado por ELISA. . . . .	56
6.7. Representación de la fracción de proteína liberada (Q) en el momento t, con los modelos cinéticos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas. Se evaluarán ambas concentraciones de proteína inicialmente encapsulada. 0.26 μg/mL de TGFβ 3: (A) modelo de Higuchi, (B) modelo de Korsmeyer-Peppas; y 0.4 μg/mL de TGFβ 3: (C) modelo de Higuchi, (D) modelo de Korsmeyer-Peppas. . . . .	59
6.8. Comparativo del mecanismo de liberación de las NPs cargadas con 0.26 μg/mL y 0.4 μg/mL de TGFβ 3, representado por el modelo de Korsmeyer-Peppas. . . . .	60
6.9. Espectros de dicroísmo circular de la solución estándar de TGFβ 3, de las NPs sin proteína y del TGFβ 3 después de ser liberado de las NPs. Las concentraciones de TGFβ 3 utilizadas se indican en la figura. . . . .	61
6.10. Evaluación temporal de 4 tiempos durante un periodo de 6 días de la estructura del TGFβ 3 liberado de las NPs, mediante dicroísmo circular para ambas concentraciones de proteína: (A) 0.26 μg/mL y (B) 0.4 μg/mL de TGFβ 3. . . . .	62

# Índice de Tablas

1.1. <i>Hitos históricos en la evolución de la nanomedicina. Fuente: (Jain, 2012).</i> . . . . .	4
2.1. <i>Relación entre los parámetros estructurales y propiedades del quitosano. Fuente: (Dash et al., 2011)</i> . . . . .	11
2.2. <i>Tamaño típico de varios objetos a escala nanométrica. Fuente: (Ober y Gupta, 2011)</i> . . . . .	17
2.3. <i>Comparación entre la velocidad de sedimentación y el movimiento browniano de partículas a escala nanométrica. Fuente: (Ober y Gupta, 2011)</i> . . . . .	20
3.1. <i>Síntesis de nanopartículas basadas en quitosano: ventajas y desventajas. Fuente: Agnihotri et al. (2004) y Kashyap et al. (2015)</i> . .	28
5.1. <i>Distribución de las soluciones en la placa del kit ELISA para la detección de la proteína TGF<math>\beta</math> 3, con una sensibilidad superior a los 5.7 pg/mL.</i> . . . . .	44
6.1. <i>Valores del tamaño, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (pot-<math>\zeta</math>) de las NPs en función del tiempo.</i> . . . . .	52
6.2. <i>Valores del tamaño, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (pot-<math>\zeta</math>) de las NPs cargadas con TGF<math>\beta</math> 3.</i> . . . . .	53
6.3. <i>Efecto de la cantidad de TGF<math>\beta</math> 3 encapsulado en la eficiencia de encapsulación (EE) de las NPs de CS.</i> . . . . .	56
6.4. <i>Los coeficientes de determinación ajustado (<math>R^2_{ajustado}</math>), las constantes de velocidad de liberación (<math>k_i</math>) y el exponente de difusión (<math>n</math>) obtenidos aplicando diferentes modelos matemáticos.</i> . . . . .	58



# Capítulo 1

## Introducción

**RESUMEN:** Este capítulo explica brevemente en qué consiste el presente trabajo, así como los estudios previos que lo han impulsado. También se encuentra aquí una descripción del resto de los capítulos que conforman la tesis.

### 1.1. Conceptualización de la investigación

En los últimos años, el estudio de formulaciones farmacéuticas novedosas se ha encausado en desarrollar rutas alternas de administración de fármacos, con el objetivo de optimizar dicho proceso y hacerlo no invasivo. Las micro y nanopartículas son sistemas que hasta el momento parecen ser los más prometedores en la liberación de fármacos, presentando nuevas oportunidades para los agentes activos que antes eran inadecuados para las formulaciones tradicionales de medicamentos orales o inyectables. La primera descripción del uso de los sistemas nanofarmacéuticos la hicieron Birrenbach y Speiser (1976).

A continuación, se mencionan brevemente algunas de las propiedades y características que han impulsado el desarrollo de las nanopartículas, mismas que se retomarán con mayor detalle a lo largo del escrito. La eficiencia de encapsulación<sup>1</sup> (EE) de un fármaco en nanopartículas es relativamente mayor que otros sistemas de administración de fármacos coloidales; al modificar apropiadamente el tamaño y superficie de dichas partículas se consigue superar barreras biológicas y bioquímicas, proteger fármacos/proteínas de la degradación que pueden experimentar en el entorno biológico, además de alcanzar objetivos farmacológicos. Por lo que resulta oportuno utilizarlos para modular la liberación controlada y sostenida de fármacos de manera localizada, mejorando

---

<sup>1</sup>La eficiencia de carga determina la cantidad (masa) de fármaco encapsulado en las nanopartículas. En la sección se explica cómo se calcula.



así la eficacia y aminorando la toxicidad de fármacos (Kammona y Kiparissides (2012); Ricci et al. (2004); Rosen y Abribat (2005); Shmulewitz et al. (2006); Zhang et al. (2008)).

Si bien existe un extenso repertorio de materiales, tales como polímeros naturales y sintéticos, lípidos y agentes tensoactivos; disponibles para construir nanovehículos de fármaco (Blasi et al. (2007); Duncan (2003); Kumari et al. (2010)), los ingenieros están restringidos por la biocompatibilidad de los materiales, subproductos tóxicos y el coste de fabricación, entre otros. Otro aspecto importante a considerar, es que el diámetro de los capilares más pequeños en el cuerpo humano es de aproximadamente  $4 \mu m$  (Mishra, 2013), por lo tanto es preciso que las dimensiones de las partículas sólidas estén por debajo de ese límite para facilitar el acceso a todos los lugares en el cuerpo por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. La miniaturización de la partícula también reduce el riesgo de reacciones irritantes en el lugar suministrado.

La mayor parte de los sistemas de administración de fármacos utiliza polímeros naturales basados en proteínas (por ejemplo, colágeno, gelatina y albúmina) y polisacáridos (por ejemplo, almidón, dextrano y quitosano). Las nanopartículas a base de polisacáridos han recibido un gran impulso tecnológico, especialmente por las ventajas y potencialidades que ofrece tales como flexibilidad para conseguir perfiles de liberación deseables del fármaco, rentabilidad, facilidad de adaptación para su uso en aplicaciones específicas mediante reacciones químicas sencillas, gran variedad de propiedades físico-químicas, y una óptima aceptación reguladora (Liu et al., 2008). Aunado a lo anterior, muestran biocompatibilidad y biodegradabilidad, que son las características básicas de los polímeros utilizados como biomateriales. Por lo tanto, se han posicionado entre los sistemas más utilizados en las formulaciones farmacéuticas.

Otro de los principales aspectos que deben cumplir las nanopartículas transportadoras de fármacos es ser inmunológicamente neutras una vez administradas en el organismo. Muchas de las nanopartículas tienen un tamaño y forma semejantes a elementos tales como los virus. Así, las nanopartículas podrían estimular o suprimir la respuesta inmunitaria, y provocar reacciones de hipersensibilidad o inmunosupresión, por lo que es imprescindible analizar su compatibilidad con los elementos del sistema inmunitario (Zolnik et al., 2010). Si bien los datos publicados sugieren claramente que las nanopartículas interactúan con el sistema inmunitario, uno de los retos es desarrollar protocolos estandarizados para evaluar sus efectos.

En este trabajo se utiliza un sistema a base de quitosano, dado que este polímero catiónico y sus derivados son de interés en el área farmacéutica por sus propiedades únicas, tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja

toxicidad (Lee et al., 1995), actividad antimicrobiana y mucohesión (Doktorovova y Souto, 2009), lo que lo convierte en un material versátil y con gran potencial como vehículo de fármacos. Con respecto a su respuesta inmunológica los materiales de quitosano se requiere una evaluación cuidadosa de la estructura de quitosano, la pureza, la respuesta a la dosis, y la tasa de aclaramiento *in vivo* para revelar si las respuestas inmunológicas a un implante de quitosano dado están promoviendo o inhibiendo el rendimiento objetivo (Hermann y Fong, 2016). Por otro lado, tenemos que además el quitosano es un biopolímero natural, que se deriva de la quitina mediante la desacetilación de la misma en condiciones muy alcalinas y a altas temperaturas (Hosokawa et al. (1990); Agulló et al. (2004a); Rabea et al. (2003)). Además de que favorece los procesos de reparación de la piel, ya que estimula la hemostasia y acelera la regeneración de tejidos (Ueno et al. (1999); Khor (2003); Şenel y McClure (2004)). Se cree que el quitosano acelera la formación de fibroblastos y aumenta reacciones de fase temprana en la cicatrización (Paul y Sharma, 2004). Este producto ha tenido auge en la investigación biomédica, debido a que los materiales naturales son más biocompatibles que los materiales sintéticos. Además de que se metaboliza por ciertas enzimas humanas, tales como la lisozima, siendo biodegradable (Ahmed y Ikram, 2016). El quitosano puede ser preparado en diversas presentaciones, tales como tabletas, películas, hidrogeles, pastas, fibras, polvos y micro / nanopartículas (Dash et al., 2011).

Las nanopartículas de quitosano se pueden sintetizar a través de varias técnicas. Estas incluyen microemulsión, gelificación iónica, emulsificación, difusión de disolventes, etc. (Agnihotri et al. (2004); Hamidi et al. (2008); Liu et al. (2008); Nagpal et al. (2010); Songsurang et al. (2011); Zhang y Kawakami (2010)). El presente trabajo utiliza la técnica de gelificación iónica con tripolifosfato (TPP) como el agente de entrecruzamiento, ya que se ha reportado como una técnica apropiada para fabricar nanopartículas de quitosano. Al ser un método simple, suave, no tóxico, que evita el uso de disolventes orgánicos y altas temperaturas, permite la encapsulación exitosa de moléculas lábiles, tales como proteínas (Al-Qadi et al. (2012); Berger et al. (2004); Nasti et al. (2009); Xu y Du (2003)). Asimismo, es posible ajustar el tamaño de las nanopartículas obtenidas mediante la modificación de los parámetros del proceso, por ejemplo las concentraciones de quitosano y TPP, la relación de peso y volumen de la solución quitosano/TPP, el valor de pH, entre otros (Dong et al., 2013).

## 1.2. Antecedentes y objetivo

El término nanotecnología se deriva de la palabra griega «nano», que significa «enano», y se utiliza para definir los productos, procesos y propiedades en la escala nano/micro que han resultado de la convergencia de las ciencias

básicas, técnicas analíticas y metodologías de diversas disciplinas como la química, física, ingeniería eléctrica, ciencia de los materiales y la biología molecular (Kubik et al., 2005). La NNI por sus siglas en inglés *National Nanotechnology Initiative*, define la nanotecnología como la investigación y el desarrollo a niveles atómico, molecular o macromolecular en el rango de 0.1 a 100 nanómetros, para crear estructuras, dispositivos y sistemas con novedosas propiedades funcionales. A esta escala, los científicos e ingenieros pueden manipular átomos para crear materiales con propiedades mejoradas, tales como una mayor estabilidad química, menor peso, mayor control del espectro de la luz, y una mayor reactividad química que sus contrapartes de mayor escala (Webster (2005); Wolfe et al. (2003)).

La nanomedicina es un subcampo de la nanotecnología, que se ha definido como «el monitoreo, reparación, construcción y control de los sistemas biológicos humanos a nivel molecular, utilizando nanodispositivos y nanoestructuras de ingeniería»(Bawa, 2005). Actualmente, la nanomedicina comprende la detección de partículas; sistemas de administración y transporte de fármacos; y la nanofabricación de biomateriales con propiedades inusuales de resistencia, dureza, fricción reducida y biocompatibilidad mejorada. Entre los proyectos que se vislumbran para el futuro de la nanomedicina, se encuentra la creación de nanomáquinas capaces de internarse en el cuerpo, para la reparación de lesiones que implican la escala nano, tales como las cerebrales o cardiovasculares (Morrow et al., 2007).

La Tabla 1.1 presenta los hitos históricos que han impulsado el estudio y evolución de la nanotecnología en el ámbito farmacéutico.

Tabla 1.1: *Hitos históricos en la evolución de la nanomedicina*. Fuente: (Jain, 2012).

Año	Acontecimientos
1905	Einstein publicó un documento en el que calcula el diámetro de una molécula de azúcar como aproximadamente 1 nm.
1931	Max Knoll y Ernst Ruska construyen el primer microscopio electrónico, que permite obtener imágenes a nivel subnanomolar.
1959	El premio Nobel de física Richard Phillips Feynman dio una conferencia titulada «Hay mucho sitio al fondo», en la Reunión Anual de la Sociedad Americana de Física. Donde, describió el principio de la manipulación de átomos individuales utilizando máquinas más grandes para la fabricación de máquinas cada vez más pequeñas (Feynman, 1961).
1974	Inicio del desarrollo de la electrónica molecular de Aviram y Rattner (Hush, 2003).

Año	Acontecimientos
1974	Norio Tanaguchi de Japón acuñó la palabra «nanotecnología».
1979	Se utilizan nanopartículas de oro coloidal como sondas de alta densidad de electrones en la microscopía electrónica e inmunocitoquímica (Batten y Hopkins, 1979).
1981	Se concibe la idea de diseñar máquinas moleculares análogas a las enzimas y ribosomas (Drexler, 1981).
1984	La primera descripción del término dendrímero y el método de preparación de poli(amidoamina) dendrímeros (Tomalia et al., 1985).
1985	El descubrimiento de los fullerenos (fulerenos) de Robert Curl, Richard Smalley, y Harold Kroto, lo que dio lugar a la concesión del Premio Nobel de Química 1996 (Bartlett, 1985).
1987	Orientación de nanopartículas recubiertas con anticuerpos monoclonales para tratar el cáncer (Douglas et al., 1986).
1987	Publicación del libro visionario de la nanotecnología <i>Engines of Creation</i> (Eric, 1986).
1988	La maduración del campo de la química supramolecular relevante para la nanotecnología: la construcción de moléculas artificiales que interactúan entre sí dando lugar a la concesión del premio Nobel (Lehn, 1988).
1990	Los átomos visualizados por el microscopio de efecto túnel descubierto en la década de 1980 en el IBM® Urich Laboratorio (Zürich, Suiza), que dio lugar a la concesión de un premio Nobel (Eigler y Schweizer, 1990).
1991	El descubrimiento de los nanotubos de carbono (Iijima et al., 1992).
1994	Administración de fármacos basada en nanopartículas (Kreuter, 1994).
1995	La FDA, por sus siglas en inglés <i>Food and Drug Administration</i> aprobó el Doxil, una formulación liposomal de doxorubicina, como un agente de quimioterapia intravenosa para el sarcoma de Kaposi. El fármaco de tamaño nanométrico realizado por liposomas resultó ser menos tóxico.
1997	Fundación de la primera empresa de nanotecnología molecular-Zyvex Corporación.
1998	Por primera vez se usaron nanocristales como etiquetas biológicas, las cuales mostraron ser superiores a los fluoróforos existentes (Bruchez et al., 1998).
1998	Se utilizaron nanoesferas de ADN para la administración de genes controlada (Truong-Le et al., 1998)
1998	El uso del término «nanomedicina» en las publicaciones (Freitas, 1998).

Año	Acontecimientos
2000	La FDA aprueba por primera vez un producto que incorpora la tecnología de NanoCrystal® (Elan, King of Prussia, PA, EE.UU.), una formulación de dosis sólida del inmunosupresor sirolimus-Rapamune® (Wyeth).
2003	La Iniciativa Nacional de Nanotecnología es anunciada en los Estados Unidos (Roco, 2003).
2003	El Senado de los Estados Unidos aprobó la Ley de Investigación y Desarrollo de Nanotecnología, por lo que la Iniciativa Nacional de Nanotecnología se posiciona como una entidad legal.
2005	La FDA aprobó Abraxane™, un taxano basado en la nanotecnología, para el tratamiento de cáncer de mama. La forma de nanopartículas del fármaco supera los problemas de insolubilidad encontradas con paclitaxel y evita el uso de disolventes tóxicos.

Este trabajo forma parte de una línea de investigación cuya motivación surgió del interés por desarrollar sistemas que encapsularán fármacos biológicos para posteriormente ser suministrados en el sitio de interés de un modelo biológico de manera controlada. El fármaco biológico que se utilizó en este trabajo fue el factor de crecimiento  $TGF\beta 3$ , el cual puede resultar útil en los estudios destinados a promover la regeneración tisular de heridas. En la sección 2.3 se detalla más acerca de esta proteína. En particular, el objetivo del presente trabajo es proporcionar una metodología que permita manufacturar y caracterizar nanopartículas de quitosano cargadas con la proteína  $TGF\beta 3$  para el tratamiento de regeneración tisular. Al cargar en las nanopartículas el factor de crecimiento, se busca retardar su bioactividad para la diferenciación de células madre así como favorecer un patrón de liberación sostenida. Para alcanzar dicho objetivo, las nanopartículas son evaluadas mediante microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, microscopía de fuerza atómica y espectroscopia de correlación de fotones. Además de las técnicas de detección, cuantificación y caracterización estructural de la proteína  $TGF\beta 3$ . Cabe mencionar que en la literatura no está reportado la encapsulación de dicha proteína bajo las condiciones aquí expuestas.

### 1.3. Estructura de capítulos

Además de este capítulo introductorio, esta tesis consta de otros seis capítulos, cuyos contenidos se describen brevemente:

- El capítulo 2 introduce el proceso de obtención del quitosano y discute brevemente las propiedades físicas y químicas de éste. Asimismo, describe las características físicas intrínsecas de las nanopartículas. Por último describe brevemente las características de la proteína  $TGF\beta 3$ .

- El capítulo 3 explica en qué consiste la técnica de gelificación iónica empleada para la nanoencapsulación. Asimismo, menciona las ventajas y desventajas de dicha técnica.
- El capítulo 4 describe las bases teóricas de las técnicas de diagnóstico de las nanopartículas tales como: microscopía electrónica de barrido y microscopía de fuerza atómica y dispersión dinámica de luz. Además expone las técnicas de detección, cuantificación y caracterización estructural de la proteína TGF $\beta$ 3.
- El capítulo 5 presenta el desarrollo experimental para la manufactura de las nanopartículas de quitosano y carga de las mismas con la proteína TGF $\beta$ 3. Así como también el arreglo experimental configurado para evaluar la eficiencia de encapsulación y liberación de la proteína.
- El capítulo 6 expone y discute los resultados obtenidos tanto en la evaluación de las nanopartículas de quitosano como en la caracterización del sistema ensamblado.
- El capítulo 7 finalmente destaca los puntos más relevantes del trabajo y las conclusiones a las que éstos conducen.



## Capítulo 2

# Descripción del sistema

### RESUMEN:

Este capítulo explica cada uno de los componentes que conforman el nanosistema, así como las propiedades más relevantes de ellos. También se discute brevemente la importancia de encapsular material biológico con biopolímeros, en particular la proteína TGF $\beta$  3 en nanopartículas de quitosano.

### 2.1. Introducción

La historia del quitosano se remonta al siglo XIX, cuando Rouget (Dodane y Vilivalam, 1998) discutió acerca de los procedimientos para obtener el quitosano a partir de la desacetilación de la quitina. En los últimos 20 años los trabajos y estudio de este polímero han cobrado auge, principalmente por su uso potencial en diversas aplicaciones. Recientemente, en la medicina regenerativa se ha contemplado utilizar el quitosano, debido a que cuenta con cualidades deseables para la regeneración y cicatrización tisular, tales como hemostasis, bacteriostasis, biocompatibilidad y propiedades de biodegradabilidad, además de inhibir la fibroplasia en la cicatrización de heridas y promover el crecimiento del tejido y la diferenciación en cultivo (Alsarra, 2009). Comúnmente se busca que los productos empleados para cubrir heridas emulen las propiedades de la piel humana, tales como adherencia, elasticidad, durabilidad, oclusividad e impermeabilidad a las bacterias (Alsbjörn, 1984). Debido a sus biocompatibilidad, capacidad de absorber los exudados y formar películas, los productos de quitosano son idóneos para el tratamiento de heridas y quemaduras (Quinn et al., 1985). Asimismo, puede utilizarse como vehículo para suministrar de manera controlada factores de crecimiento que favorezcan el mecanismo de cicatrización; una de las presentaciones prometedoras para este fin son las nanoesferas, que son capaces de atravesar superficies biológicas, logrando así potenciar su efecto terapéutico sobre la cicatrización de heridas.



Al integrar dicho sistema, es posible prolongar el período de actividad de los factores de crecimiento, ya que por si solos presentan problemas con la biodisponibilidad sostenida en las heridas debido a su alta capacidad difusiva y corta vida media; además de protegerlos de condiciones adversas. Las nanopartículas de quitosano fueron preparadas por primera vez por Calvo et al. (1997a).

Por otro lado, pese a que los agentes antibacterianos ayudan a prevenir y tratar infecciones, además de curar heridas, no necesariamente participan activamente en el proceso fisiológico de la cicatrización de heridas. De ahí la importancia de complementar el efecto terapéutico de las nanopartículas de quitosano incorporándoles factores de crecimiento, los cuales están implicados en los procesos fisiológicos de división celular, migración, diferenciación, expresión de proteínas y producción de enzimas; interviniendo así en la inflamación, proliferación y fases migratorias de una herida en proceso de cicatrización (Dai et al., 2011). Se ha reportado que existe una gran variedad de factores de crecimiento que funcionan en el proceso de cicatrización de heridas, entre los cuales se incluye el factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en inglés  $TGF\beta$ , abreviatura de *transforming growth factor beta*) perteneciente a una superfamilia de factores de crecimiento que incluye tres isoformas para  $TGF\beta$  (1,2,3) (Roberts y Sporn, 1988), cada uno de los cuales son altamente homólogos y a menudo intercambiables en una variedad de ensayos biológicos, no obstante, están codificadas por genes distintos y tienen promotores únicos (Roberts y Sporn, 1988) (Roberts y Sporn, 1990). En este trabajo se utiliza el factor de crecimiento  $TGF\beta$  3.

A continuación en las secciones 2.2 y 2.3, se describe con mayor detalle las partes que conforman el sistema de *nanopartícula de quitosano -  $TGF\beta$* .

## 2.2. Aspectos generales del quitosano

El quitosano es un polímero natural que se obtiene por desacetilación de la quitina su polímero matriz, un polisacarido ampliamente distribuido en la naturaleza. Anualmente, alrededor de 100 billones de toneladas de quitina son sintetizadas por crustáceos, insectos, moluscos y hongos (Tharanathan y Kittur, 2003). Teniendo en cuenta lo anterior, la quitina es el biopolímero más abundante después de la celulosa, no obstante continúa siendo un producto infraexplotado a nivel mundial a pesar de su amplia gama de aplicaciones potenciales y habituales.

Debido a la mala solubilidad de la quitina en solución acuosa y en disolventes orgánicos, es poco utilizado en aplicaciones prácticas, mientras que el quitosano al ser una variante artificial de la quitina, modifica sustancialmente sus propiedades resultando ser más adecuado en aplicaciones biológicas. Quitosano es, de hecho, un nombre colectivo que representa a una familia de po-

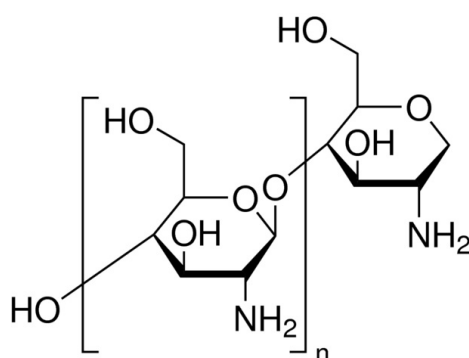


Figura 2.1: Estructura molecular del quitosano. Fuente: (Agrawal et al., 2010).

límeros de diferentes grados de desacetilación (DD) y peso molecular (Mw), definidos en términos del porcentaje de grupos amino primarios en la cadena principal del polímero (Rinaudo, 2006). Comúnmente, la DD del quitosano comercial está entre 70 y 95 %, y el Mw entre 10 y 1.000 kDa. El quitosano es un polisacárido lineal con la fórmula química ( $C_6H_{11}O_4N$ ) que consiste en un copolímero compuesto por dos tipos de unidades estructurales distribuidas de manera aleatoria a lo largo de la cadena, la N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina, las cuales se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo  $\beta(1-4)$  glicosídicos (Hoppe-Seiler, 1994) que produce una estructura rígida no ramificada; las propiedades, biodegradabilidad, y el papel biológico de quitosano dependen con frecuencia en las proporciones relativas de éstas unidades.

El quitosano es un polímero policatiónico que tiene un grupo amino y dos grupos hidroxilo en el residuo hexosaminide de repetición (Agrawal et al., 2010) (ver figura 2.1); esta composición hace que el quitosano sea hidrófilo y débilmente básico (Wan et al., 2004). El nombre sistemático del quitosano, según la IUPAC por sus siglas en inglés: *International Union of Pure and Applied Chemistry*, es 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (D-glucosamina) y 2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa (N-acetil-D -glucosamina), donde los dos tipos de unidades de repetición están unidos por enlaces glicosídicos  $\beta(1-4)$  (Roberts, 1992). Después del refinamiento, el quitosano tiene una estructura cristalina rígida a través de enlaces de hidrógeno inter e intra-molecular (Dash et al., 2011).

### 2.2.1. Metodología química para la obtención del quitosano

Existen diversas técnicas reportadas para extraer la quitina, la mayoría de ellas, incluido el método industrial, se basan en procesos químicos para la hidrólisis de proteínas y la eliminación de la materia inorgánica. De manera muy

general, la metodología química para la obtención del quitosano a partir del tratamiento de la quitina puede dividirse en las siguientes etapas (de Sousa et al., 2015): acondicionamiento de la materia prima (lavado y molienda); extracción de la proteína (desprotonización, tratamiento con disolución acuosa diluida de hidróxido de sodio a 65-100°C); eliminación de las impurezas inorgánicas (desmineralización, con disoluciones ácidas diluidas a temperatura ambiente); algunos incluyen la decoloración para mejorar el color de la quitina extraída, mediante disolventes orgánicos o la oxidación química de los pigmentos restantes; y finalmente la desacetilación termoquímica de la quitina, que conduce a la obtención del quitosano, se lleva a cabo a través de métodos alcalinos (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003). El proceso de desacetilación es relativamente duro y consiste en la eliminación de grupos aceto de la cadena molecular quitina por tratamiento con hidróxido de sodio (NaOH) concentrado en un período prolongado de tiempo, dejando atrás grupos amino completos (NH<sub>2</sub>). El tratamiento de la quitina con solución álcali sucede en concentraciones de 40-45 % (w/v) a 90-120°C durante 4-5 horas (Dash et al., 2011). La versatilidad del quitosano depende en gran medida del alto grado de reactividad química del grupo amino (Alsarra et al., 2002). Cada una de estas etapas repercute en las características del material final, tales como el grado de desacetilación, el peso molecular y la distribución del peso molecular, así como la distribución de unidades desacetiladas a lo largo de la cadena del polisacárido (Roberts (1997); Anthonsen et al. (1993)).

En general, los procesos de obtención de quitosano consumen grandes cantidades de agua y energía, que pueden dar lugar a desechos corrosivos. Es por ello, que actualmente se investigan metodologías alternas con tratamientos enzimáticos, no obstante aún no se consigue la eficiencia de los métodos químicos, fundamentalmente en lo que respecta a la eliminación del material inorgánico (Beaney et al., 2005).

### **2.2.2. Propiedades físico-químicas y biológicas del quitosano**

Los grupos aminos en la estructura del biopolímero, lo convierte en un polieléctrolito catiónico natural con un pKa de alrededor de 6,5. Asimismo, la presencia de los grupos amino e hidroxilo, permite que el quitosano sea fácilmente modificado químicamente (Krajewska, 2001). La apariencia física del quitosano, es la de copos inodoros e incoloros (Sonia y Sharma, 2011). Los dos parámetros estructurales más importantes que influyen en las propiedades del quitosano son el DD y Mw. En conjunto ambos factores determinan las características físicas, químicas y biológicas del biopolímero (Jiang et al., 2014), ver Tabla 2.1.

Tabla 2.1: *Relación entre los parámetros estructurales y propiedades del quitosano.*  
Fuente: (Dash et al., 2011)

Propiedad	Característica estructural <sup>a</sup>
Solubilidad	↑ <i>DD</i>
Cristalinidad	↓ <i>DD</i>
Biodegradabilidad	↓ <i>DD</i> , ↓ <i>M<sub>w</sub></i>
Viscosidad	↑ <i>DD</i>
Biocompatibilidad	↑ <i>DD</i>
Biológica	
Mucoadhesión	↑ <i>DD</i> , ↑ <i>M<sub>w</sub></i>
Analgésico	↑ <i>DD</i>
Antimicrobiano	↑ <i>DD</i>
Incremento en los efectos de permeación	↑ <i>DD</i>
Antioxidante	↑ <i>DD</i> , ↓ <i>M<sub>w</sub></i>
Hemostático	↑ <i>DD</i>

<sup>a</sup> ↑ - Directamente proporcional a la propiedad; ↓ - inversamente proporcional a la propiedad.

### 2.2.2.1. Propiedades físico-químicas

Las principales propiedades fisicoquímicas del quitosano son el grado de desacetilación, peso molecular, solubilidad y viscosidad; todas ellas estrechamente relacionadas.

**Grado de desacetilación.** El *DD* permite diferenciar el quitosano de la quitina e indica el porcentaje de grupos amino primarios presentes en la cadena principal del polímero. Las condiciones empleadas para la reacción durante la fabricación de quitosano determina su *DD* y *M<sub>w</sub>* (el quitosano comercial típico tiene un *DD* de 66 a 95 % y un peso molecular medio que oscila entre 3.800 y 20.000 Daltons).

**Peso molecular.** El *M<sub>w</sub>* y su distribución intervienen en la funcionalidad del quitosano, y determinan en gran medida la solubilidad y viscosidad del mismo (Tsaih y Chen, 1999). Además, afecta la actividad que presente el quitosano como espesante, antifúngico, vehículo de liberación, entre otras aplicaciones (Agulló et al., 2004b). Altos *M<sub>w</sub>* en el quitosano (aproximadamente 1.400 kDa) demuestran mayor nivel de mucoadhesión a comparación con los de bajo *M<sub>w</sub>* (entre 500-800 kDa), debido a que el primero tiene un mayor nivel de viscosidad (Sonia y Sharma, 2011).

**Solubilidad.** A diferencia de la quitina, el quitosano es fácilmente soluble en soluciones ácidas diluidas a un pH menor de 6,0. La solubilización se produce a través de la protonación de los grupos amino en la posición C-2 de los residuos de D-glucosamino, por lo que el polisacárido se convierte en policación

en medios ácidos (Sonia y Sharma, 2011). La presencia de los grupos amino indica que el pH altera sustancialmente la carga y propiedades del quitosano. A bajo pH, estos aminos se protonan y cargan positivamente, haciendo que el quitosano sea un polielectrolito catiónico soluble en agua. Mientras que, cuando el pH aumenta por encima de 6,0, los aminos de quitosano se desprotonan y el polímero pierde su carga, volviéndose insoluble. La transición de soluble a insoluble se produce en su valor de pKa alrededor de pH entre 6 y 6,5, que es un intervalo particularmente conveniente para aplicaciones biológicas (Yi et al., 2005).

**Viscosidad.** La viscosidad de las soluciones obtenidas de quitosano, dependen del DD, Mw, concentración, temperatura, pH, fuerza iónica y el solvente ácido utilizado. En las soluciones de quitosano, la viscosidad aumenta con la concentración del mismo, y disminuye con la temperatura y con el aumento de DD (Dash et al., 2011). Esta propiedad también influye en las propiedades biológicas, tales como cicatrización de heridas y mejora de la osteogénesis, así como la biodegradación por la lisozima (Gérentes et al., 2002).

#### 2.2.2.2. Propiedades biológicas

En cuanto a las propiedades biológicas del quitosano, podemos mencionar su biodegradabilidad, biocompatibilidad, actividad antimicrobiana; entre otros.

- **Biodegradable.** En el cuerpo humano, el quitosano se puede biodegradar por la lisozima y la enzima bacterina del colon (Jiang et al., 2014). Diversos estudios han demostrado que la máxima tasa de degradación in vitro se alcanza cuando el DD es de aproximadamente 50%, debido a que existe una mayor hidroficidad (Freier et al. (2005); Kurita et al. (2000)). Al aumentar dicho umbral (DD>50%) ocurre el efecto contrario, a causa del aumento de la cristalinidad y la reducción en el número de grupos de N-acetilglucosamina. Quitosanos altamente desacetilados exhiben una mínima degradación (Kurita et al., 2000). También el Mw juega un importante papel en la degradación del biopolímero, ya que al mantener el DD constante, los quitosanos con alto Mw se degradan más lentamente que los de menor Mw (Zhang y Neau, 2001).
- **Biocompatible.** En los últimos decenios se ha investigado acerca de la biocompatibilidad del quitosano, empleando para ello diversos modelos biológicos. Los resultados han demostrado que el DD del quitosano influye sobre el comportamiento biológico del material tanto in vitro como in vivo (Jiang et al., 2014). La evidencia sugiere que el quitosano con un mayor DD tolera el crecimiento celular de mejor manera (Prasitsilp et al., 2000) y produce menor reacción inflamatoria (Molinario et al., 2002); confiriéndole un carácter biocompatible al biopolímero.

- **Actividad antimicrobiana.** Los mecanismos exactos de la actividad antimicrobiana del quitosano aún no son claros; sin embargo los estudios realizados, sugieren que dicha actividad depende de varios factores intrínsecos tales como la estructura molecular, el DD, y el Mw, y factores extrínsecos, tales como especies de microorganismos y pH del medio ambiente (Kong et al., 2010).
- **Internalización celular.** En presentación de partículas, existe evidencia de la capacidad de internalización celular del quitosano (Murugan et al., 2015). Se ha demostrado que la absorción de nanopartículas de tamaños entre 110 hasta 390 nm es mayor que el de las micropartículas de quitosano  $>1 \mu m$ .

### 2.2.3. Limitaciones

A continuación se mencionan algunas limitantes que presenta el quitosano en cuanto aplicaciones biológicas. A pH fisiológico de 7,4, el quitosano tiene baja solubilidad, limitando su absorción en el sistema y su aplicación in vivo (Bhattarai et al., 2010). Para superar este inconveniente del quitosano, algunos investigadores desarrollan derivados de quitosano con mayor solubilidad a pH fisiológico (Thanou et al., 2001). Otra limitación, se presenta cuando es utilizado como sistema de liberación sostenida en medios acuosos, ya que éste absorbe rápidamente agua del medio e induce la rápida liberación del fármaco encapsulado, debido a su hinchamiento (Park et al., 2010). No obstante, las investigaciones por superar dichas limitaciones, continúan en pie.

## 2.3. Factor de crecimiento transformante beta 3

El factor de crecimiento transformante beta ( $TGF\beta$ ) es una proteína con una amplia gama de efectos biológicos. Se codifica por el gen  $TGF\beta 3$  localizado en el cromosoma 14q24.3. Esta proteína interviene en varios procesos celulares, es una molécula de señalización que regula la diferenciación y proliferación celular hasta procesos fisiológicos complejos como la inflamación y la cicatrización de tejidos, incluyendo también a la formación del hueso, cartilago, entre otros (Sosa y Macías, 2004). El  $TGF\beta$  se libera a través de la degranulación plaquetaria y es secretada por todos los principales tipos de células que participan en el proceso de reparación, incluyendo linfocitos, macrófagos, células endoteliales, células de músculo liso, células epiteliales y fibroblastos (Clark, 2013).

El término *factor de crecimiento transformante beta* ( $TGF\beta$ ) pertenece a una superfamilia que comprende más de 40 miembros agrupados en diferentes subfamilias por similitud entre ellos. La subfamilia del  $TGF\beta$  incluye cinco isomorfos (Roberts y Sporn, 1990). Las tres primeras,  $TGF\beta 1$ ,  $TGF\beta 2$  y  $TGF\beta$

3, son altamente homólogas entre sí y han sido identificadas en mamíferos, incluyendo humanos, mientras que el TGF $\beta$  4 se ha aislado en pollo y el TGF $\beta$  5 en *Xenopus*<sup>1</sup>. Una característica singular de esta molécula es que su autoinducción provoca la expresión sostenida en el sitio de la herida y extiende la eficiencia tanto de la expresión inicial endógena de TGF $\beta$  liberada después de la lesión, así como la exógena que puede ser aplicada a la herida para estimular su reparación (Clark, 2013).

### 2.3.1. Funciones biológicas

Una de las funciones más ampliamente descritas es la capacidad del TGF $\beta$  para mejorar y/o acelerar la reparación de tejidos, la cuál ha sido estudiada en una extensa variedad de modelos animales. Las tres isoformas de mamífero del TGF $\beta$  son habitualmente intercambiables *in vitro* o cuando se aplican exógenamente a una herida (Kane et al. (1991); Levine et al. (1993)). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que cada una de las tres isoformas se expresan en patrones únicos después de la herida. Aunque los tres isoformas cuentan con propiedades biológicas similares, sus potencias relativas dependen de la función que está siendo probada y del ensayo utilizado (Howles, 1997). En lo que concierne a este estudio la isoforma que se usará es la TGF $\beta$  3, a la cual se le atribuye al menos dos funciones biológicas distintas e importantes: (1) la formación de paladar secundario; (2) la curación de heridas sin cicatrices durante las etapas embrionarias de mamíferos (Choi et al., 2015).

La función del TGF $\beta$  3 como mediador potencial de la reducción de cicatrices en la curación de heridas durante las etapas embrionarias de mamíferos, se propuso al observar altos niveles de la misma en heridas embrionarias (Ferguson y O'Kane, 2004). Asimismo, se informó que la administración exógena de TGF $\beta$  3, en ratas adultas, reduce la formación de cicatrices en las heridas cutáneas (Shah et al., 1995); esta actividad sugirió el potencial terapéutico del TGF $\beta$  3 como un agente anti-cicatrices. Los altos grados de homología del ligando TGF $\beta$  3 y sus receptores entre los seres humanos y otras especies animales respaldan los resultados obtenidos a partir de estudios en animales *in vivo*, para realizar ensayos clínicos destinados a establecer su eficiencia terapéutica en seres humanos (Occlleston et al., 2009).

### 2.3.2. Estructura química

La denominación común internacional (DCI), para la forma recombinante humana del TGF $\beta$  3 es «avotermína», que es una proteína homodimérica de 25 kDa, su secuencia genética es muy conservada a través de las especies (Occlleston et al., 2009). Hay seis láminas beta y tres alfa hélices en cada subunidad

---

<sup>1</sup>*Xenopus* es un género de ranas acuáticas que son nativas del sur de África (Wallingford et al., 2010).

de dímero (Cox, 1995). La subunidad forma una forma de mano con las hojas beta creando el nudillo, el pulgar y los dedos de uno a cuatro. La palma de la mano está formada por un núcleo de disulfuro que se crea a través de un nudo de tres puentes disulfuro. Los puentes entre Cys 44 y Cys 109 y Cys 48 y Cys 111 crean un anillo lo suficientemente grande para permitir el paso del tercer puente, Cys 15 y Cys 78. Dado que ambos dímeros comparten una homología de secuencia alta, su plegado es idéntico. Los dímeros están unidos por un enlace disulfuro entre la hoja beta central de cinco hilos en los dos residuos de Cys 77. Esta interacción es muy probablemente estabilizada por la hélice alfa de un monómero y la hoja beta de otro (Cox, 1995).

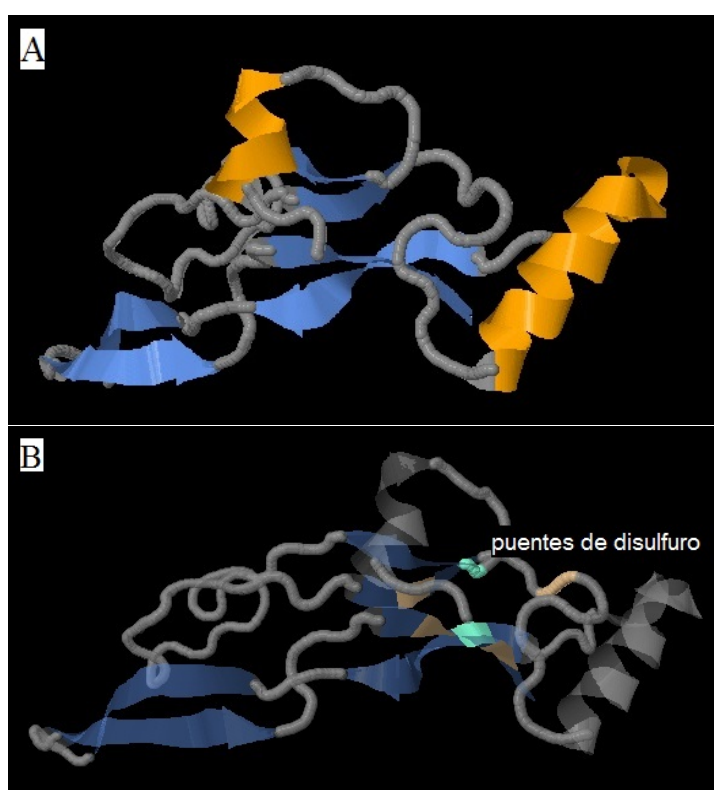


Figura 2.2: Estructura tridimensional de la proteína  $TGF\beta 3$  formada por: (A) seis láminas beta y tres hélices alfa; y (B) tres puentes de disulfuro. Fuente: (Cox, 1995).

El  $TGF\beta 3$  es altamente estable bajo condiciones ácidas; su actividad completa se conserva en ácido acético 1 M a  $95^{\circ}C$ , y el método de extracción de ácido/etanol es una forma práctica para aislarlo de muchos tejidos. La presencia de 18 residuos de media-cistina en cada molécula dimérica contribuye sin duda a esta estabilidad (Sporn et al., 1986).



### 2.3.3. Mecanismo de liberación

El TGF $\beta$  3 típicamente se libera en la herida en forma de un gran complejo latente a partir de los gránulos  $\alpha$  de plaquetas, cuando se desgranulan por exposición a trombina. Una vez activado, el TGF $\beta$  3 atrae las células al sitio de la herida mediante quimiotaxis y luego simula la formación de tejido de granulación (Clark, 2013).

Al ser activado el TGF $\beta$  3, los niveles de éste están estrictamente regulados en el cuerpo, y cuando la proteína no se unen rápidamente se desnaturaliza en complejos o es degradada y eliminada por el aclaramiento (Jen et al., 2002). La vida media del TGF $\beta$  3 activo es solamente de 2-3 minutos. Es por ello que se busca la administración exógena sostenida del TGF $\beta$  3 a través de reservorios inactivos y protegidos para la liberación lenta del TGF $\beta$  3 activo en sitios de aplicación local.

## 2.4. Importancia de la nanoencapsulación de agentes biológicos

A lo largo de los años diversas investigaciones en el área farmacéutica, se han encaminado en optimizar los métodos convencionales de administración de fármacos, teniendo como objetivo que la distribución y liberación del principio activo sea eficiente. Algunos de los avances que se han conseguido a través de la micro y nano encapsulación de fármacos, es: (i) proteger el agente activo contra la degradación, (ii) controlar la tasa de liberación del fármaco durante periodos cortos o prolongados, además de (iii) facilitar la administración.

Los efectos de los tratamientos farmacológicos están fuertemente relacionados con el «rango terapéutico», que se refiere al intervalo entre la *concentración mínima efectiva*, por debajo de la cual no hay efectos terapéuticos, y la *concentración mínima que produce toxicidad*, por encima de la cual se producen efectos tóxicos secundarios. Uno de los retos en el área farmacéutica es optimizar los efectos terapéuticos en los tratamientos farmacológicos, a través de sistemas de administración que prolonguen la concentración del fármaco en el sitio activo durante el rango terapéutico.

Al combinar cuidadosamente el atrapamiento físico de agentes bioactivos con la conjugación química de otros factores bioactivos, los sistemas de suministro inteligentes e innovadores, pueden ser diseñados para mantener la liberación de los productos biológicos individuales o múltiples de una manera controlada para la terapia espacio-temporal en la reparación de heridas, eficaz. La elección adecuada del mecanismo de liberación es casi tan importante como la selección del agente biológico apropiado, para permitir una liberación controla-

da de manera adecuada y obtener la respuesta deseada. La entrega acertada del agente biológico puede repercutir en la dosificación, así como la velocidad de liberación y en última instancia, define un perfil de liberación farmacocinético terapéuticamente eficaz (Lam et al., 2015).

Uno de los sistemas de liberación que resulta atractivo para la administración de fármacos, son las nanopartículas (NP), debido a su pequeña dimensión, alta área de superficie en relación al volumen, alta eficiencia en la carga de fármaco, y capacidad de responder rápidamente a los estímulos ambientales tales como la temperatura, pH, los campos magnéticos, o ultrasonidos (Santo et al. (2013); Butoescu et al. (2009); Horisawa et al. (2002)). Entre las ventajas de utilizar NPs como sistema de liberación, tenemos que éstas pueden ser incorporadas a las células a través del mecanismo de endocitosis, lo que permite que el fármaco encapsulado se acumule en el sitio de acción, aumentando así su concentración; además de que el área superficial de las NPs es excepcionalmente alto en relación al volumen, aumentando su afinidad a los fármacos terapéuticos y a los estímulos externos. Sin embargo, un área de superficie alta a la relación de volumen también puede reducir la estabilidad del vehículo de suministro de tamaño nanométrico, y la tendencia de ciertos NPs a agregarse en partículas a microescala puede mitigar las ventajas de un sistema de NP (Santo et al., 2012).

Como se expuso en la sección 2.3, el TGF $\beta$  3 es crucial en los estados de reparación de lesiones. Por lo que la entrega exógena de esta proteína a través de las NPs puede potenciar su acción terapéutica, además de protegerlo de condiciones adversas que pudiese encontrar en el ambiente al que es expuesto. En la literatura (Wang et al. (2010); Mierisch et al. (2002); Holland et al. (2007); Guo et al. (2010b); Park et al. (2009); Guo et al. (2010a); Ansboro et al. (2014)), se reporta el uso de sistemas de liberación para la entrega de proteínas TGF $\beta$ 's con resultados que indican que dichos sistemas son prometedores para aplicaciones locales de liberación sostenida activados por diversos estímulos ambientales, además de incrementar su eficacia y reducir los efectos secundarios.

#### 2.4.1. Fundamentos de la nanopartículas

Para impulsar el desarrollo de las NPs como sistema de liberación de fármacos, es crucial entender las propiedades intrínsecas de las NPs que sean relevantes para su uso farmacéutico. Algunas de estas propiedades incluyen el tamaño, área superficial, velocidad de sedimentación, propiedades magnéticas y ópticas, además de la vía de administración (Ober y Gupta, 2011).

Tabla 2.2: *Tamaño típico de varios objetos a escala nanométrica.* Fuente: (Ober y Gupta, 2011)

Objeto	Tamaño (nm)
Átomo de carbono	0,1
ADN de doble hélice (diámetro)	3
Ribosoma	10
Virus	≈ 100
Bacterias	≈ 1,000
Glóbulo rojo	5,000
Cabello humano (diámetro)	50,000
Resolución de los ojos humanos sin ayuda	100,000

#### 2.4.1.1. Tamaño de la nanopartícula

La unidad básica en los procesos biológicos es la célula y las reacciones bioquímicas dentro de ella. Con el desarrollo de la nanotecnología la intervención de manera selectiva en los procesos celulares, es posible debido a que las escalas de interacción son comparables. Para destacar que las NPs son de gran utilidad a nivel celular, en la Tabla 2.2 se compara el tamaño de diversos sistemas biológicos en la escala nanométrica.

#### 2.4.1.2. Área superficial de la nanopartícula

El tamaño de las NPs, les confiere propiedades interesantes, que vistas desde la óptica farmacéutica resultan útiles en la administración de fármacos. El número de moléculas presentes en la superficie de una partícula es inversamente proporcional al tamaño de la partícula. Para una partícula esférica sólida de diámetro  $d$ , el área superficial por unidad de masa,  $S_g$ , es (Ober y Gupta, 2011)

$$S_g = \left( \frac{\pi d^2}{4} \right) \left( \frac{\pi d^3}{6} \right)^{-1} = \frac{3}{2d\rho_s} \quad (2.1)$$

donde  $\rho_s$  es la densidad del sólido. Si el diámetro de la molécula es  $\sigma$ , entonces el porcentaje de moléculas que se encuentran en contacto directo con la superficie de la partículas está dado por

$$\begin{aligned} \% \text{Moléculas en la superficie} &= \frac{(4/3)\pi[d^3 - (d - \sigma)]^3}{(4/3)\pi d^3} 100 \\ &= 100 \left[ \left( \frac{\sigma}{d} \right)^3 - 3 \left( \frac{\sigma}{d} \right)^2 + 3 \left( \frac{\sigma}{d} \right) \right] \quad (2.2) \end{aligned}$$

Al experimentar mayor área de contacto, las NPs se adhieren con mayor fuerza debido a las interacciones del tipo van der Waals.

### 2.4.1.3. Suspensión y asentamiento de las nanopartículas

La fuerza gravitacional que experimenta una NP en comparación con una micropartícula es menor, debido a la diferencia de tamaño, de modo que en una suspensión líquida las NPs permanecen suspendidas durante más tiempo, mientras que en el caso de las micropartículas, estas fácilmente precipitan en el fondo del recipiente que las contiene (Ober y Gupta, 2011).

La resistencia al movimiento de las partículas en un fluido viscoso, se puede calcular usando la ley de Stokes, que se expresa como

$$F_d = 3\pi\nu\mu d \quad (2.3)$$

donde  $F_d$  es la fuerza de fricción,  $\mu$  es la viscosidad dinámica y  $\nu$  es la velocidad de flujo en relación al objeto.

A partir de la ley de Stokes es posible conocer la velocidad de sedimentación de las partículas,  $\nu$ , inmersas en un sistema, al considerar que al mantenerse constante la velocidad de las partículas, la fuerza que hace caer la partícula y la resistencia al movimiento dada por 2.3 se igualan, dando como resultado la siguiente expresión.

$$\nu = \frac{d^2 g(\rho_s - \rho_1)}{18\mu_1} \quad (2.4)$$

donde  $g$  es la aceleración que experimentan las partículas debido a la fuerza gravitacional ( $9.8 \text{ m/seg}$  a nivel del mar),  $\rho_1$  es la densidad de la solución líquida ( $997 \text{ kg/m}^3$  para agua a  $25^\circ\text{C}$ ) y  $\mu_1$  su viscosidad ( $0.00089 \text{ Pa/seg}$  para el agua a  $25^\circ\text{C}$ ).

Otro de los factores involucrados en el proceso de sedimentación de las partículas, es el movimiento Browniano de éstas. De acuerdo a la teoría de Einstein, en la que el desplazamiento promedio,  $x$ , de una partícula al tiempo  $t$ , se calcula, según la siguiente expresión

$$x = \sqrt{\frac{2k_B T t}{\pi\mu d}} \quad (2.5)$$

Tabla 2.3: Comparación entre la velocidad de sedimentación y el movimiento browniano de partículas a escala nanométrica. Fuente: (Ober y Gupta, 2011)

Tamaño de partícula (nm)	Velocidad de sedimentación (nm/seg)	Movimiento browniano (nm en 1 seg)
1	0,00043	54,250
10	0,043	17,155
100	4,30	5,425
1,000	430	1,716
10,000	43,005	543

donde  $k_B$  es la constante de Boltzman ( $1,38 \cdot 10^{-23} J/K$ ) y T es la temperatura en Kelvin (Ober y Gupta, 2011). El movimiento browniano de una NP debido a la fluctuación térmica es mucho mayor a la velocidad de sedimentación, ver Tabla 2.3. Esto les confiere una propiedad particular, que indica que partículas con tamaño inferior a los 1,000 nm, se mantienen suspendidas fácilmente a pesar de la alta densidad sólida. Por el contrario, micropartículas de mayor tamaño se asientan fácilmente en el fondo del recipiente que las contiene debido a la fuerza gravitacional. El comportamiento de las NPs en suspensión, es debido a que la fuerza gravitacional no es más fuerte que el movimiento térmico aleatorio de las partículas. Sin embargo, la sedimentación de estos sistemas puede ser inducido mediante centrifugación, en caso de ser necesaria para la separación de partículas. La velocidad de las partículas bajo centrifugación, se calcula como:

$$v = \frac{\pi x d^2 (\rho_s - \rho_l)}{\mu} \left( \frac{rpm}{60} \right)^2 \quad (2.6)$$

Debido al tamaño de las nanopartículas y al control de las propiedades superficiales, estas partículas pueden tener acceso profundo al cuerpo humano logrando una mayor localización del fármaco en el tejido diana. Lo expuesto anteriormente ha motivado el estudio del nanosistema de esta Tesis, que tal parece es un sistema prometedor para ser aplicado en la regeneración celular de heridas y/o quemaduras.

## Capítulo 3

# Obtención de nanopartículas

**RESUMEN:** Este capítulo se centra en el proceso de obtención de NPs de quitosano mediante la técnica de reticulación iónica, dando detalles de en qué consiste la técnica y qué factores influyen en la síntesis de las NPs. Asimismo, menciona las ventajas y desventajas de dicha técnica.

### 3.1. Introducción

Como se mencionó en el Capítulo 2, el quitosano (CS) es un polisacárido natural que resulta atractivo para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos por sus características biodegradables y biocompatibles, además de su carácter catiónico. Sin embargo, el CS es una base débil, soluble en solución ácida acuosa diluida ( $\text{pH} < 6.5$ ) (Kunjachan et al., 2014), lo que limita su aplicación como sistema de liberación. Para superar esta desventaja, es necesario utilizar agentes entrecruzantes que permitan reducir la solubilidad del CS en agua y disolventes orgánicos, además de aumentar su resistencia a la degradación química o biológica y mantener la estabilidad de la matriz para controlar la liberación del principio activo. Por otro lado es necesario que los agentes utilizados para el entrecruzamiento/reticulación de los sistemas de administración de fármacos basados en CS no induzcan toxicidad de los reactivos u otros efectos indeseables. Recientemente se ha propuesto aplicar la técnica de reticulación física reversible por interacción electrostática en la preparación de formulaciones (Ilium (1998); Dumitriu y Chornet (1998)). La formación de complejos entre las macromoléculas de carga opuesta para preparar microesferas de CS ha atraído mucha atención debido a que el proceso es muy simple y suave (Polk et al. (1994); Liu et al. (1997)). El tripolifosfato (TPP) es un polianión, que puede interactuar con el catiónico CS por fuerzas electrostáticas (Kawashima et al. (1985); Y. Kawashima (1985)), y formar un gel a un pH inferior (Kas, 1997). Después de que Bodmeier et al. (1989) informó de la preparación del complejo

de TPP-CS dejando caer gotas de CS en una solución de TPP, muchos investigadores han explorado su potencial uso farmacéutico (Shiraishi et al. (1993); Sezer y Akbuçça (1995); Aydın y Akbuçça (1996); Calvo et al. (1997b); Calvo et al. (1997a); Shu y Zhu (2000)). En el método de reticulación iónica, CS se disuelve en solución ácida acuosa para obtener el catión de CS. A continuación se añade esta solución gota a gota con agitación constante a la disolución del polianiónico TPP. Debido a la formación de complejos entre las especies de carga opuesta, CS se somete a gelificación iónica y precipita para formar partículas esféricas.

En las secciones 3.2 y 3.3 se explica en que consiste la técnica de reticulación iónica empleada para la nanoencapsulación, así como los factores involucrados en ella, respectivamente. En la sección 3.4 se exponen las ventajas y desventajas de dicha técnica.

## **3.2. Nanopartículas reticuladas iónicamente**

La reticulación física reversible consiste en interacciones electrostáticas. El CS al ser un polisacárido catiónico con pH neutro o básico, contiene grupos amino libres que le confieren un carácter hidrofóbico. Sin embargo, al introducirlo en soluciones de pH ácido, tales como el ácido acético, los grupos amino se someten a protonación, convirtiéndose el CS en un polielectrólito catiónico soluble. Dicha naturaleza catiónica le permite formar nanoesferas usadas para la administración controlada de fármacos, a través de las redes que el CS construye al reticularse iónicamente en presencia de entidades cargadas negativamente, mediante puentes iónicos entre las cadenas poliméricas de CS con carga positiva.

### **3.2.1. Interacciones involucradas en la reticulación iónica**

Las interacciones iónicas entre las cargas negativas del agente de reticulación y los grupos amino cargados positivamente del CS son las principales interacciones dentro de la red, y su naturaleza depende del tipo de agente de reticulación. Sin embargo, existen otros grupos que conforman la cadena de CS, tales como los grupos hidroxilo que también pueden interactuar con el reticulante iónico (Mi et al., 1997). Asimismo, en el interior de la red es posible que sucedan otro tipo de interacciones debido a la reducción de la repulsión electrostática tras la neutralización del CS por el agente de reticulación (Brack et al. (1997); Shu et al. (2001); Ruel-Gariepy et al. (2000)), tales como puentes de hidrógeno intercatenarios e interacciones hidrófobas por una disminución de la DD de CS (Ruel-Gariepy et al., 2000).

### 3.2.2. Principios de la formación

La reticulación iónica requiere multivalentes contra-iones como reticulantes para formar puentes entre las cadenas poliméricas, tales como TPP (Mi et al., 1999b). El método convencional de la reticulación iónica consiste en disolver el CS en solución ácida, que cuaterniza sus grupos amino haciéndolo soluble, para posteriormente adicionarle el agente de reticulación, ya sea solubilizado (Ruel-Gariepy et al., 2000) o dispersado (Brack et al. (1997); Draget et al. (1992)) , a la solución de CS (ver figura 3.1). Este es un procedimiento simple y suave, que permite la formación de un hidrogel homogéneo por una reacción de reticulación al azar (Draget et al., 1992).

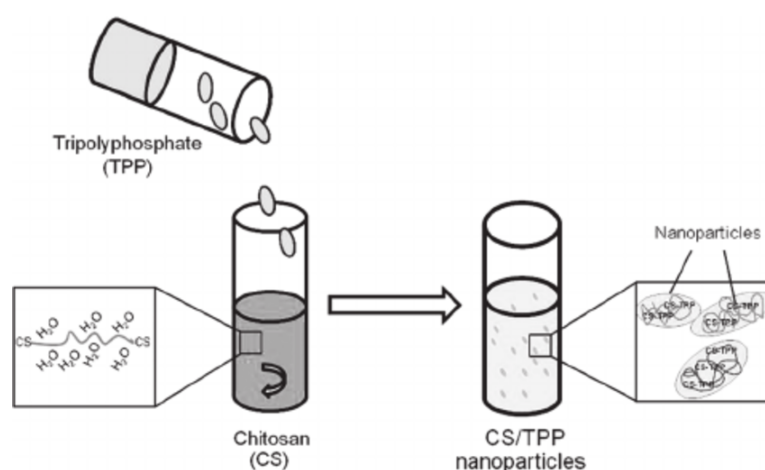


Figura 3.1: Representación esquemática del método de reticulación iónica para la formación de nanopartículas de CS/TPP. Fuente: (Grenha, 2012).

Entre las propiedades que caracterizan un hidrogel iónicamente reticulado de CS, se encuentran la resistencia mecánica, el hinchamiento y la liberación del fármaco (Remunan-Lopez y Bodmeier, 1997), que se ven fuertemente influenciadas por la densidad de reticulación. Durante la reacción de reticulación intervienen los siguientes factores: el tamaño del agente de reticulación y las cargas globales del CS y agente de reticulación. A menor tamaño molecular del agente reticulante es más sencilla su difusión en el medio (Mi et al., 1999a), de modo que la reacción de reticulación en la que actúa se agiliza. Al utilizar moléculas aniónicas con alta densidad de carga como agente reticulante, por ejemplo el TPP, la densidad de carga global está en función de su valor de  $pK_a$ , así como también del valor de pH de la solución resultante tras suceder la reacción de dicha molécula con el CS (Mi et al. (1999b); Shu et al. (2001); Kubota y Kikuchi (1992)), para el cual el  $pK_a$  global es de aproximadamente 6,5 (Lee et al., 1999). La interacción entre ambos electrolitos, se favorece cuando la densidad de carga global es suficientemente alta. Esto significa que durante la reacción de



reticulación el valor de pH es similar al valor del  $pK_a$  del CS y el agente de reticulación (Berger et al., 2004). Cabe destacar que, si el pH es demasiado alto, las cargas positivas del CS se neutralizan y el sistema no es reticulado iónicamente pero sufre una inversión de la fase de coacervación, ya que el CS precipita (Mi et al., 1999a). Con el fin de evitar la precipitación de CS, la solución no debe tener un valor de pH superior a 6. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que el pH ácido puede disminuir la biocompatibilidad del sistema (Berger et al., 2004).

Además del tamaño del agente de reticulación y las densidades de carga global de los electrólitos, la densidad de reticulación está en función de otros parámetros, tales como: la concentración del agente de reticulación (Brack et al. (1997); Shu y Zhu (2002a); Dureja et al. (2001)); el Mw (Brack et al., 1997), DD (Ruel-Gariepy et al., 2000) y la concentración de CS (Brack et al. (1997); Sezer y Akbuçsa (1995); Dureja et al. (2001)); y la duración de la reacción (Mi et al. (1997); Shu y Zhu (2000); Dureja et al. (2001)).

### 3.3. Factores que influyen en la síntesis de nanopartículas de CS

A continuación se describe cómo ciertos factores influyen en las características físico-químicas de las NPs reticuladas iónicamente.

#### 3.3.1. Concentración de solución de CS y TPP

Las concentraciones de ambos componentes afectan el proceso de síntesis y características fisicoquímicas de las NPs de CS. Como ya se mencionó en la sección 3.2, en condiciones ácidas los grupos amino del CS se protonan provocando una fuerte repulsión electrostática entre las moléculas del mismo, que las mantiene separadas y evita su aglomeración (Mi et al. (1999a); Shu y Zhu (2002b)). En cambio, los enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos amino e hidroxilo de las cadenas del CS tienden a juntarlas. De ahí que ambas interacciones influyan en el tamaño de las NPs de CS durante el proceso de síntesis (Qun y Ajun, 2006). De lo anterior se infiere que si la repulsión electrostática entre las moléculas de CS es dominante, el tamaño de las nanopartículas se reduce; mientras que si el enlace de hidrógeno entre cadenas es el que predomina, el tamaño aumenta.

Diversos grupos de investigación han concluido que existen ciertos rangos de concentraciones (2,0-1,5 mg/ml y 1,0-0,5 mg/ml) de CS y TPP, capaces de sintetizar partículas a nanoescala (Calvo et al. (1997a); Gan et al. (2005); Jaiswal et al. (2012); Saharan et al. (2015); Kashyap et al. (2015)). En el caso del CS, al aumentar su concentración por encima del valor crítico, la interacción

de enlace de hidrógeno se hace más fuerte y las moléculas de CS abundantes se mezclan en la reticulación haciendo que el tamaño de la partícula sea mayor. A su vez, al aumentar la concentración de TPP, éste ocupa la mayoría de los grupos amino, causando la disminución del potencial zeta, que a su vez afecta la estabilidad de las NPs, ya que al reducirse la repulsión electrostática entre las partículas de CS, las partículas comienzan a agregarse, sintetizándose partículas de mayor tamaño durante la reacción de reticulación. Es por esto que las concentraciones de CS y TPP juegan un papel crucial en la síntesis de NPs.

### 3.3.2. Relación de masa de CS a TPP

Los investigadores han observado que a partir de cierto volumen de TPP durante la reacción de reticulación, las estructuras entrecruzadas comienzan a formarse. Conforme aumenta el volumen de TPP en la solución, el tamaño de partícula se reduce debido a la mayor densidad de reticulación entre CS y TPP y la solución se vuelve opalescente. A medida que el volumen de TPP sigue aumentando, las moléculas de CS se someten a una reticulación completa y el exceso de TPP provoca que más moléculas de CS participen en la formación de una sola partícula, dando como resultado una partícula de mayor tamaño. Si el volumen de TPP continúa aumentando en la mezcla de reticulación la repulsión electrostática entre las moléculas de CS disminuye debido a la neutralización de grupos amino por TPP, afectando la estabilidad de las partículas durante la agitación, lo que conduce a su precipitación. Hasta el momento no se ha reportado una relación de masa estandarizada para optimizar la síntesis de NPs de CS, debido a que factores tales como el Mw y el DD del CS también influyen para definir dicho parámetro. Sin embargo, en la mayoría de los experimentos en los que se ha reportado la obtención de NPs de CS usando TPP como agente reticulante, la proporción de masa de CS y TPP se mantuvo en el intervalo de 2,5:1 a 5:1 (Fan et al. (2012); Saharan et al. (2015), Kashyap et al. (2015)).

### 3.3.3. Concentración de ácido acético

El ácido acético esencialmente se utiliza para disolver el CS en agua, no obstante su concentración en la solución influye en las interacciones entre el CS y el TPP durante el proceso de reticulación. Como ya se discutió en la sección 3.2.2 al agregar el ácido acético a la solución de CS, aumenta en ella la concentración de iones  $H^+$ , convirtiéndola en una solución altamente protonada; que al ser reticulada con el TPP, precipita para formar partículas. En consecuencia la concentración del ácido acético juega un papel importante durante el proceso de reticulación. Investigaciones como la reportada por Fan et al. (2012), explican que a bajas concentraciones de ácido acético (0,1 mg/ml) se dispone de un menor número de iones  $H^+$  para la protonación de grupos amino, por lo que existe un número insuficiente de sitios de interacción para el TPP, de ahí que la reticulación sea no uniforme para obtener NPs monodispersas. Por otro lado, al

preparar NPs con una alta concentración de ácido acético (0,8 mg/ml), indirectamente se provoca un aumento de contraiones ( $CH_3COO^-$ ) que protegen los puntos de reticulación a los que se puede acceder mediante el TPP; además de causar un efecto de blindaje que disminuye la repulsión electrostática entre las partículas, así como también la capa de hidratación superficial de las mismas, que facilita la agregación de partículas, y da como resultado una distribución de tamaños más amplia. De lo antes expuesto se infiere que para obtener una distribución de tamaño de partícula unimodal y estrecha, la concentración de ácido acético no debe ser ni demasiado elevada ni demasiado baja; sino una concentración intermedia que permita mejorar el grado de protonación y aumentar su capacidad potencial del CS para formar enlaces cruzados con el TPP.

#### 3.3.4. pH de la solución de CS

Las redes formadas por reticulación iónica de CS contienen grupos ionizables, que exhiben hinchamiento sensible al pH y liberación del fármaco por difusión (Ruel-Gariepy et al. (2000); Sezer y Akbuçşa (1995); Remunan-Lopez y Bodmeier (1997)) a través de su estructura porosa (Ruel-Gariepy et al. (2000); Draget et al. (1992); Risbud et al. (2001)). Las interacciones iónicas entre cadenas de CS, que dependen de la densidad de reticulación establecido durante la formación de la red (Mi et al. (1999b); Mi et al. (1997); Sezer y Akbuçşa (1995)), son las principales promotoras del proceso de hinchamiento. El incremento de la densidad de reticulación induce la reducción del hinchamiento y la sensibilidad al pH, mejorando la estabilidad de la red (Mi et al. (1999b); y Mi et al. (1999a)); mientras que la liberación del fármaco disminuye. No obstante, en condiciones externas, los hidrogeles iónicamente reticulados también se ven modificados por el pH del medio de aplicación (Mi et al. (1999b); Shu et al. (2001); y Vazquez et al. (1995)).

Al disminuir el pH, la densidad de carga del agente de reticulación y por tanto la densidad de reticulación disminuyen, favoreciendo el hinchamiento, debido a la repulsión de los grupos amino libres protonados del CS. Al ser demasiado grande la disminución del pH, puede ocurrir la disociación de los enlaces iónicos y disolución de la red (Shu et al. (2001); Mi et al. (1999a)), provocando la rápida liberación del fármaco (Liu et al., 1997).

Si el pH aumenta, disminuye la protonación del CS e induce una disminución de la densidad de reticulación, lo que permite el hinchamiento debido a que aumenta la separación entre las cadenas del CS. A medida que el pH del medio aumenta, los grupos amino del CS se neutralizan y la reticulación iónica se inhibe (Draget et al., 1992); ya que la separación entre cadenas también aumenta, reduciendo así la interacción entre ellas, hasta provocar la liberación del agente de reticulación iónica (Mi et al. (1997); Draget et al. (1992)). La variación del pH también influye en el potencial zeta de las NPs, reduciéndose

gradualmente a medida que aumenta el pH de la mezcla de reacción.

Según las investigaciones realizadas por Fan et al. (2012), un pH de alrededor de 4.5 y 5.5 es ideal para obtener un menor tamaño de partículas con potencial zeta positivo neto.

### **3.3.5. Temperatura ambiente durante el proceso de reticulación**

La temperatura de la reacción de reticulación también juega un papel importante en la modificación de la monodispersidad y el tamaño de las partículas. A baja temperatura (0-4°C) se obtienen NPs de menor talla que las fabricadas a mayores temperaturas (16-25°C), y la distribución de tamaños es unimodal estrecha (Fan et al., 2012).

Durante el proceso de síntesis, la flexibilidad, la rigidez y la capa de hidratación unida a hidrógeno en las moléculas del CS son influenciadas directamente por la temperatura (Chen y Tsaih (1998); Colic et al. (1998)). A medida que la temperatura de la solución de CS disminuye, el volumen específico de la molécula de CS aumenta y la flexibilidad de su cadena disminuye; por otro lado al disminuir la temperatura de la suspensión de CS/TPP rápidamente aumentan las interacciones por puente de hidrógeno entre los grupos polares del CS y las moléculas de agua, dando lugar a que las NPs se rodeen con una capa de hidratación inmediatamente después de su formación, reduciendo así la probabilidad de colisión directa entre ellas, y por tanto la agregación, durante el proceso de agitación. Asimismo, la baja temperatura ambiente favorece la estabilización gradual de la estructura de las NPs, al ser más alta la rigidez del

### **3.3.6. Velocidad de agitación**

Durante el proceso de reticulación es importante evitar la agregación de las partículas, además de lograr una distribución de tamaños estrecha. Esto se puede conseguir al agitar constantemente la solución durante las interacciones iónicas entre los grupos amino del CS y el TPP, debido a que la agitación impide que el exceso de CS y TPP participen en la reticulación y también previene la reticulación intermolecular. No obstante, si la energía mecánica asociada con la velocidad de agitación de la reacción excede la energía de repulsión electrostática entre las cargas superficiales positivas de las partículas, eventualmente se desencadenan fenómenos de agregación que inducen la síntesis de partículas de mayor tamaño (Fàbregas et al., 2013).

### **3.4. Ventajas y desventajas de las nanopartículas reticuladas iónicamente**

La formación de partículas reticuladas iónicamente es ventajosa porque el proceso es relativamente simple, suave y no requiere altas temperaturas, ni el uso de disolventes orgánicos, evitando así el problema de la eliminación de residuos antes de su administración a organismos vivos (Dash et al., 2011), además de posibilitar la encapsulación exitosa de moléculas lábiles, como las proteínas (Berger et al. (2004); Nasti et al. (2009)).

Sin embargo, entre sus principales desventajas son la posible falta de estabilidad mecánica y el riesgo de disolución del sistema, debido a una inflamación muy sensible al pH, además de la agregación/fusión de partículas inmediatamente después de la preparación o por una estabilidad física/química limitada cuando las suspensiones de NPs se almacenan durante un período de tiempo prolongado.

Este trabajo revisa solamente el método de reticulación iónica para la síntesis de NPs de CS, sin embargo se han desarrollado diversos métodos para la síntesis de NPs basadas en CS. A continuación en la tabla 3.1 se mencionan algunos de ellos incluidas sus ventajas y desventajas.

Tabla 3.1: *Síntesis de nanopartículas basadas en quitosano: ventajas y desventajas.*

Fuente: Agnihotri et al. (2004) y Kashyap et al. (2015)

Método	Ventajas	Desventajas
Reticulación en emulsión	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fácil control de tamaño de partícula</li> <li>2. Buena eficiencia de carga</li> <li>3. Buena estabilidad de los nanomateriales</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Necesidad de eliminar el aceite y el surfactante</li> <li>2. El reticulante puede reaccionar con el ingrediente activo</li> <li>3. La purificación de nanopartículas es un proceso tedioso</li> </ol>
Emulsión de gota método coalescencia	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mayor eficiencia de encapsulación</li> <li>2. No hay reactividad del reticulante con el ingrediente activo</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Debido a la ausencia de nanopartículas de reticulación, la estabilidad disminuye</li> <li>3. El exceso de álcali induce más precipitación y conduce a un mayor tamaño de partícula</li> </ol>
Método de miscelas inversas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Nanopartículas estables, pequeñas y monodispersadas con índice de polidispersidad adecuado</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Procedimiento engorroso</li> <li>2. Posibilidad de efecto secundario de los componentes de la reacción (disolvente, surfactante, etc.)</li> </ol>
Método de tamizado	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Procedimiento muy sencillo y rápido</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Necesita tamiz especializado con tamaño particular para el tamaño deseable de nanopartículas</li> </ol>
Método de secado por pulverización	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Mecanizado para la producción en masa</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. El tamaño de las nanopartículas depende del tamaño de la boquilla, el caudal y la temperatura del aire</li> <li>2. El componente sensible a la temperatura no puede ser encapsulado</li> </ol>



## Capítulo 4

# Fundamentos teóricos de las técnicas de caracterización

**RESUMEN:** Este capítulo describe las técnicas utilizadas para caracterizar el sistema de las NPs de CS-TGF $\beta$  3, así como su importancia.

### 4.1. Introducción

La caracterización es crucial para establecer una comprensión y un control sobre la síntesis de NPs y sus posibles aplicaciones. Una gran variedad de técnicas se utiliza con varias funciones diferentes, todas con diversos beneficios e inconvenientes. Es importante que durante el desarrollo de la investigación se entienda el uso potencial y apropiado de los instrumentos y técnicas utilizados para analizar las NPs y sus propiedades. Las técnicas más comunes incluyen, pero no se limitan a, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), dispersión dinámica de luz (DLS), potencial zeta. Las aplicaciones de estas técnicas para los nanomateriales serán revisadas y descritas en las siguientes secciones, al igual que las técnicas orientadas al análisis de la proteína TGF $\beta$  3, tales como: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), dicroísmo circular (DC) y espectrometría de fluorescencia.

### 4.2. Técnicas para la caracterización física de las nanopartículas

#### 4.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Un microscopio electrónico de barrido ó SEM por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscope*, utiliza haces focalizados de electrones en lugar



de fotones, para magnificar un objeto. Esta característica le confiere una alta resolución en las imágenes tridimensionales obtenidas, ofreciendo información topográfica, morfológica y de composición de diversos materiales. La resolución con una muestra ideal es alrededor de 5 nm, longitud correspondiente al diámetro del haz de electrones.

El haz de electrones en los equipos SEM proviene de un filamento que funciona como un cátodo y puede ser de distintos materiales. El más común de ellos es tungsteno y tiene forma de anillo. A dicho cátodo se le aplica un potencial eléctrico que, provoca su calentamiento y acelera el haz de electrones hacia una columna en dirección al ánodo, que es positivo respecto al filamento, y constituye una poderosa fuente de atracción. El haz de electrones es enfocado mediante un sistema de lentes y es desviado por un campo magnético; ambos procesos necesarios para la incidencia sobre la muestra. Al conjunto constituido por la fuente de electrones y el sistema de enfoque, comúnmente se le llama «la columna» ya que éste se encuentra normalmente en un tubo vertical.

Cuando un sistema SEM está en funcionamiento, la columna debe ser sometida a vacío. Esta condición es debido a que; si la muestra se encuentra en un medio con gas, el haz de electrones no podrá ser generado. Además, la presencia de gases podría provocar una reacción con la fuente de electrones, quemándola o provocar ionización en el haz, lo que produciría descargas e inestabilidades en el haz. Una vez que los electrones incidentes interactúan con la superficie de la muestra, los electrones energéticos de ésta se liberan. Los patrones de dispersión hechos por la interacción produce información sobre el tamaño, forma, textura y la composición de la muestra. Una variedad de detectores se utilizan para atraer a diferentes tipos de electrones dispersados, incluyendo electrones secundarios y retrodispersados, así como los rayos X.

#### 4.2.2. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Esta técnica pertenece a la familia de la *microscopía de sonda escaneada*, y permite obtener imágenes de partículas individuales y grupales en tres dimensiones. La AFM fue inventada por Binnig et al. (1986). Entre las aplicaciones más comunes de un AFM se encuentra la evaluación de propiedades físicas, como la morfología y la textura de la superficie, junto con información de tamaño, tales como longitud, ancho y altura (Vesenka et al., 1993). Para analizar estas propiedades, un AFM, cuenta con una punta de sonda mecánica, un piezoeléctrico, que facilita realizar pequeños desplazamientos, con una resolución en el orden de un nanómetro. Los componentes básicos de un AFM son el voladizo basado en silicio y la sonda unida, la base de exploración controlada electrónicamente y el sistema de deflexión óptica que consiste en un diodo láser y un fotodetector (Hinterdorfer y Dufrêne, 2006)

La teoría detrás de la imagen de AFM se basa en la *ley de Hooke*, que indica que la extensión de un resorte está en proporción directa a la carga agregada a ella (Burgess, 2012). En el caso de un AFM, el voladizo es el resorte y los cambios en la carga del resorte se traducen en cambios en la topografía superficial. Muchas fuerzas se pueden medir vía AFM incluyendo mecánico, van der Waals y electrostático, la medición de éstas fuerzas se hace a través de la punta cuando ésta es empujada hacia la muestra o retraída de ella en la dirección  $z$ , la medición de esta fuerza es con una sensibilidad de piconewtons. La fuerza es controlada midiendo la deflexión (flexión vertical) del voladizo durante el escaneo de una muestra, y habitualmente se monitorea mediante un haz láser enfocado en el extremo libre del voladizo y reflejado en una matriz de fotodiodos, que permite recolectar un conjunto de datos para ser convertidos en una imagen (Hinterdorfer y Dufrêne, 2006).

El AFM es un instrumento versátil, ya que no requiere una corriente entre la superficie de la muestra y la punta, lo que permite el examen y el movimiento en regiones potenciales de una muestra (Merkus, 2009). Para el estudio de las NPs utilizando esta técnica, se requiere que estas últimas se depositen como suspensión evaporada sobre la superficie lisa de un soporte de silicio o mica (Montasser et al., 2002).

#### 4.2.3. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La técnica de DLS comúnmente se utiliza para medir el tamaño de las partículas en suspensión. La teoría que respalda esta técnica se basa en que a escala nanométrica las partículas se rigen por el movimiento browniano causado por la colisión de moléculas disolventes, siendo insignificante la contribución de las fuerzas electromagnéticas y gravitatorias (Saharan y Pal, 2016). Como ya se mencionó en la sección 2.4.1.3, el movimiento browniano está influenciado por el tamaño de las partículas, la viscosidad y la temperatura. La técnica DLS se centra en medir el tamaño de partícula a través de los cambios aleatorios en la intensidad de la luz, resultado de la interferencia que causa el movimiento browniano del gran número de partículas presentes en la muestra. El tamaño medio medido por el DLS es el diámetro hidrodinámico. El diámetro hidrodinámico es el diámetro de la partícula junto con la capa de moléculas de agua o iones o componentes de los medios en la superficie (Saharan y Pal, 2016).

El principio de DLS se basa en incidir una fuente de luz sobre la suspensión que se encuentra contenida en una celda, mediante de un haz láser (Karas y Hillenkamp, 1988). El haz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en la suspensión, se dispersa en todas direcciones (dispersión de Rayleigh), la intensidad de dispersión fluctúa con el tiempo. Esta fluctuación se debe al movimiento browniano que las partículas experimentan en suspensión. El haz dispersado a continuación, se recoge con un detector, ya sea en un ángulo de

90° o 173° (Mishra, 2013). La señal se analiza en términos de una función de autocorrelación, ya que los datos entrantes se procesan en tiempo real (Merkus, 2009). La tasa de fluctuación de la intensidad es inversamente proporcional al coeficiente de difusión traslacional ( $D$ ) de las partículas, que puede convertirse en tamaño de partícula utilizando la ecuación Stokes-Einstein, que se obtiene a partir de las ecuaciones 2.3 y 2.5.

$$d_h = \frac{k_B T}{3\pi\mu D} \quad (4.1)$$

donde  $d_h$  es el diámetro hidrodinámico,  $T$  es la temperatura absoluta,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $\mu$  es el coeficiente de viscosidad y  $D$  es el coeficiente de difusión.

Al analizar por DLS la NPs de CS hay que tomar en cuenta que este tiene grupos amino que proporcionan una carga neta positiva y que dicha naturaleza catiónica le da la posibilidad de interactuar con componentes aniónicos presentes en el medio circundante. Estas interacciones (Saharan y Pal, 2016). Estas interacciones afectan su difusión en el medio y por consiguiente el módulo de diámetro hidrodinámico. La distribución de tamaños de las partículas se evalúa mediante el valor del índice de polidispersidad o PDI por sus siglas en inglés *polydispersity index*. Su rango de valores va de 0 a 1, el valor 1 significa partículas altamente polidispersadas y menos de 1 indica partículas monodispersadas (Saharan y Pal, 2016). Las NPs de CS muestran variabilidad en los valores de PDI en diferentes experimentos debido a diferentes relaciones de masa y concentraciones de CS y TPP durante la preparación de las partículas.

#### 4.2.4. Potencial zeta

Con este parámetro se puede evaluar la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido unida a la partícula dispersada. Asimismo el potencial zeta es un indicador de la estabilidad de las partículas. Es importante que la magnitud del potencial zeta sea grande, ya que esto significa que la repulsión electrostática entre partículas adyacentes, con carga similar, es mayor. Evitando la formación de aglomerados en la solución (Zeta, 1997). Por otro lado, a mayor magnitud del potencial zeta mayor es la actividad biológica de las partículas, siendo más afines hacia las membranas y otros aniones. En las NPs de CS el potencial zeta siempre permanece positivo debido a la presencia de los grupos amino. Los valores del potencial zeta en las NPs de CS varían de +20 a +90 mV (Saharan y Pal, 2016).

En la práctica, el potencial zeta de la dispersión se mide mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de la dispersión. Las partículas dentro de la dispersión con un potencial zeta migrarán hacia el electrodo de carga opues-

ta con una velocidad proporcional a la magnitud del potencial zeta (O'Brien y Hunter, 1981).

### 4.3. Técnicas bioquímicas para evaluar la proteína

#### 4.3.1. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

El ensayo ELISA, utiliza el concepto de inmunología básica de la unión de un antígeno a su anticuerpo o que permite la detección de cantidades muy pequeñas de antígenos tales como proteínas. ELISA se basa en la detección de un antígeno que directa o indirectamente produce una reacción cuyo producto, se puede medir espectrofotométricamente (Gan y Patel, 2013). Esta técnica, utiliza marcadores enzimáticos para detectar y amplificar las reacciones antígeno-anticuerpo. La degradación de un sustrato por la enzima, produce una reacción colorimétrica que permite cuantificar las reacciones antígeno-anticuerpo. Las enzimas que se utilizan con mayor frecuencia en los inmunoensayos son la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina. Estas enzimas presentan la ventaja de que pueden conjugar por técnicas simples y tienen varios sustratos. Entre los sustratos solubles que más utilizan para la peroxidasa se encuentra la tetrametilbencidina (TMB).

Los tres principales métodos en los que se basan todos los ELISAs son: *ELISA directo*, *ELISA indirecto* y *ELISA sándwich*. Para fines de este trabajo solo explicaremos en que consiste el método del *ELISA sándwich*, ya que este es el que se utilizó para cuantificar la proteína TGF $\beta$  3.

El *ELISA sándwich* (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmuno complejos), se trata de un ensayo en el se recubre el pozo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno de interés, que será retenido en el pozo al ser reconocido por el primer anticuerpo. A continuación, se realiza un segundo lavado que elimina el material no retenido y se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado con una enzima. Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo (Crowther, 2000) (ver figura 4.1).

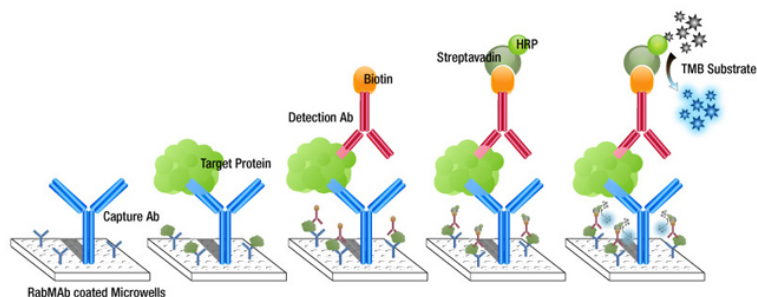


Figura 4.1: Representación esquemática de la técnica inmunológica sándwich ELISA para detectar una sustancia biológica.

#### 4.3.2. Dicroísmo circular (DC)

Cuando un haz de luz polarizado, incide sobre una muestra en la cual la onda correspondiente a la componente del campo eléctrico circularmente polarizado a la derecha ( $E_D$ ) es absorbido de una manera distinta a la componente de la onda circularmente polarizado a la izquierda ( $E_I$ ), se da el fenómeno de dicroísmo circular. Como consecuencia de la diferencia de absorción entre  $E_D$  y  $E_I$ , la longitud de ambos vectores es distinta, de ahí que el vector resultante  $E$  no describa una circunferencia, sino una elipse y esta luz se dice que está polarizada elípticamente (Greenfield, 2006). Para describir esta última se suele utilizar un parámetro denominado elipticidad,  $\theta$ . Éste es el ángulo cuya tangente es la razón del eje menor  $b$  de la elipse respecto al mayor  $a$ .

$$\theta = \arctan\left(\frac{b}{a}\right) \quad (4.2)$$

Cuando un haz de luz (campo electromagnético) atraviesa un objeto, su vector eléctrico  $E$  interacciona con los electrones de los átomos que lo componen. Esta interacción tiene el efecto de disminuir la velocidad de propagación y la amplitud del vector  $E$ , conocidas como *refracción*,  $n$ , y *absorción*, la cual viene descrita por el *coeficiente de extinción molar*,  $\epsilon$ , respectivamente. Ambos parámetros,  $n$  y  $\epsilon$ , dependen de la longitud de onda de una forma tal que refleja la estructura electrónica y la geometría de las moléculas (Freifelder, 1981).

Algunas biomoléculas poseen asimetría molecular, es decir, sus imágenes en espejo no son idénticas. Estas moléculas son llamadas quirales (Hammes, 2005). Al interactuar estas moléculas con la luz polarizada circularmente, los índices de refracción y los coeficientes de extinción molar son diferentes para  $E_D$  y  $E_I$ . Al graficar la absorbancia diferencial,  $\Delta\epsilon$ , entre  $E_D$  y  $E_I$ , contra la longitud

de onda,  $\lambda$ , se produce un espectro de DC (Keiderling et al. (2000); Cantor y Schimmel (1980); Sreerama y Woody (2004)).

$$\Delta\epsilon = \epsilon_I - \epsilon_D \quad (4.3)$$



## Capítulo 5

# Técnicas experimentales

**RESUMEN:** Este capítulo presenta las diversas técnicas experimentales desarrolladas para la fabricación y diagnóstico del nanosistema CS-TGF $\beta$  3.

### 5.1. Introducción

Como se mencionó en el capítulo 3, existen diversos factores que influyen en la síntesis de NPs de CS al ser reticuladas iónicamente. El presente trabajo utilizó el TPP como agente reticulante. Los valores de los parámetros descritos en la sección 3.3 se eligieron en base a lo reportado en la literatura; el impacto de éstos sobre el tamaño de la partícula, así como el rendimiento de la reacción se evalúan usando las técnicas descritas en la sección 4.2. Por otro lado, la cinética de liberación y estabilidad de la proteína TGF $\beta$  3 tras haber sido encapsulada en el sistema de NPs de CS, puede determinarse por las técnicas descritas en la sección 4.3.

Este capítulo inicialmente explica la metodología experimental desarrollada para la obtención de las NPs. Posteriormente describe la preparación de las muestras, así como el equipo y parámetros utilizados en las técnicas aplicadas para la caracterización física de las NPs. Finalmente, se exponen las técnicas empleadas para analizar la proteína TGF $\beta$  3.

### 5.2. Metodología experimental para la obtención de las nanopartículas

#### 5.2.1. Materiales

Quitosano (bajo peso molecular, pureza  $\geq 75.0\%$ ), ácido acético glacial (grado reactivo ACS, pureza  $\geq 97\%$ ), tripolifosfato de sodio (TPP) (grado técni-



co, pureza 85 %), hidróxido de sodio (grado reactivo, pureza  $\geq 97.00\%$ ), todos estos reactivos fueron de la marca Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA). Mientras que la proteína TGF $\beta$  3<sup>1</sup>. (pureza  $\geq 98\%$ ) fue adquirida en la presentación liofilizada de Peprotech, (Rocky Hill, NJ, USA). A lo largo del estudio se utilizó agua desionizada de un sistema Milli-Q.

Para la reconstitución<sup>2</sup> de la proteína liofilizada se procedió de la siguiente manera, primero los 10  $\mu\text{g}$  de TGF $\beta$  3 que contiene el vial se resuspendieron en 5 mM de ácido cítrico (pureza 99 %) de la marca Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA), a la concentración de 0.1  $\text{mg}/\text{mL}$ . Luego, se diluyó en un buffer de BSA<sup>3</sup> (0.1 %) y se prepararon alícuotas de 2  $\mu\text{L}$  con concentraciones de: 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0.6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### 5.2.2. Preparación de nanoesferas de CS cargadas con TGF $\beta$ 3

La preparación de las NPs de quitosano se basa en el método de Calvo (Calvo et al., 1997a), en el que se utiliza el método de reticulación iónica de CS con aniones TPP. En este estudio se modificó dicho método ajustando algunos parámetros, para evaluar la influencia de éstos en el diseño del nanosistema que nos interesa. Los parámetros elegidos para el ajuste son: la relación de masa de las soluciones CS y TPP, y la cantidad inicial de la proteína TGF $\beta$  3. El proceso de manufactura ya ajustado consistió en disolver 2.5  $\text{mg}/\text{mL}$  de CS en una solución acuosa de ácido acético al 0.05 % (v/v). La solución de CS se agitó a 180 RPM durante 24 horas a temperatura ambiente usando un agitador magnético. Posteriormente el pH se ajustó a 5.5 con una solución de hidróxido de sodio 0.5 M. El TPP se disolvió en agua desionizada hasta una concentración final de 0.25  $\text{mg}/\text{mL}$ . Las soluciones de TPP y CS se filtraron a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de la marca Merck-Millipore, (Darmstadt, Alemania). A continuación a 4°C, la solución de TPP se añadió gota a gota a la solución de quitosano (0.3  $\text{mL}/\text{min}$ ) con una relación CS:TPP igual a 5:1 (% w/w) y se mantuvieron en agitación magnética vigorosa, 600 RPM. Después de la adición completa de TPP, las muestras se retiraron del agitador y se mantuvieron a 4°C hasta el momento de las mediciones.

Para la incorporación de la proteína en el nanosistema se procedió de manera similar. Una vez preparadas las soluciones de CS y TPP, bajo las condiciones explicadas en el párrafo anterior, se continuó con el proceso de integración de la proteína TGF $\beta$  3 al sistema de la siguiente forma: a 1  $\text{mL}$  de solución de CS

<sup>1</sup>La proteína utilizada en este estudio se adquirió con el laboratorio PEPROTECH, Catalogo 100-36E y Lote 0910AF410-1.

<sup>2</sup>Se siguió el procedimiento descrito en la hoja técnica proporcionada por el proveedor PEPROTECH

<sup>3</sup>El buffer utilizado fue una solución previamente preparada por el personal del laboratorio en el que se trabajó.

se añadió 4  $\mu\text{L}$  (0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y 2  $\mu\text{L}$  (0.6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de alícuota TGF $\beta$  3; *i.e.*, 0.8 y 1.2  $\mu\text{g}$  de TGF $\beta$  3, respectivamente<sup>4</sup>. Un vez añadida la proteína a la solución de CS esta se conservó en agitación a 180 RPM durante 30 min para que la mezcla se homogeneizará. Después por goteo se adicionó 2 mL de la solución de TPP preservando las condiciones empleadas para la preparación de las NPs de CS sin proteína. De modo que las concentraciones finales de TGF $\beta$  3 en las soluciones de CS-TPP fueron de 0.26  $\mu\text{g}$  para las muestras a las que se agregó 0.8  $\mu\text{g}$  de TGF $\beta$  3, y de 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las que se les añadió 1.2  $\mu\text{g}$ .

Las concentraciones para realizar el estudio de encapsulamiento y cinética de liberación de la proteína TGF $\beta$  3 fueron elegidas arbitrariamente en base a la disponibilidad de ésta para realizar los estudios de: SEM, AFM, DLS, DC y estudio inmunológico por kit ELISA.

En las siguientes secciones de este capítulo se exponen las técnicas y equipos utilizados para caracterizar el nanosistema CS-TGF $\beta$  3.

## 5.3. Caracterización física de las nanopartículas

### 5.3.1. Análisis por SEM y AFM

#### 5.3.1.1. Preparación de las muestras

Para analizar las NPs por SEM y AFM fue necesario secar las muestras previamente. En la literatura existe una amplia descripción de los procesos que se utilizan para este fin, en este estudio se utilizó el reportado por Xu et al. (2011) para sistemas coloidales. Este proceso consistió en adicionar etanol a la solución acuosa de NPs ya reticuladas, con una relación en volumen NPs/etanol de 1:4, buscando así disminuir la tensión superficial del espécimen, además de evitar la formación de una película hidratada delgada sobre la superficie de partículas durante el proceso de secado. Luego, se filtró el espécimen a través de una membrana con tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  de la marca Merck-Millipore, (Darmstadt, Alemania), previo a depositar una gota de éste sobre la superficie de una oblea de silicio en la que se secó al colocar dicho sistema en una cámara de vacío durante un lapso de 30 a 60 segundos. Una vez lista la muestra, se colocó en el equipo correspondiente para analizarla.

Para evitar la desnaturalización del sistema cargado con la proteína, la cantidad de etanol debe ser controlada con precisión. El tiempo de secado es también un papel importante para este sistema porque la proteína se puede desnaturalizar a alta temperatura.

---

<sup>4</sup>Los valores se calcularon de la siguiente manera: (4  $\mu\text{L}$ ) · (0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) = 0.8  $\mu\text{g}$  y (2  $\mu\text{L}$ ) · (0.6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) = 1.2  $\mu\text{g}$

### 5.3.1.2. Equipo y parámetros

La morfología superficial de las NPs se examinó con un microscopio electrónico de barrido (SEM, JSM-6700F, JEOL Ltd., Akishima, Japan). con una corriente de sonda de 1.0 a 5.0 *kV*. Las muestras se observaron en vista plana con ampliaciones desde 10,000X hasta 150,000X con una resolución de 1 *nm*, utilizando bajos voltajes para evitar la carga superficial. El equipo lo operó el Dr. Omar Novelo Peralta, del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM-UNAM).

Las variaciones de la morfología y rugosidad de las NPs se evaluaron con imágenes de topografía AFM e imágenes de fase en modo de toma de CA con un equipo de la marca JEOL, (SPM-4210, Tokyo, Japan). El equipo lo operó el Ing. Carlos Flores Morales, del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM-UNAM).

### 5.3.2. Análisis por DLS y potencial zeta

#### 5.3.2.1. Preparación de las muestras

Antes de analizar las muestras por DLS y potencial zeta, es necesario que éstas se encuentren en solución homogénea. Si la concentración de la muestra es alta, se debe diluir en el mismo líquido en el que se preparó originalmente. Las soluciones preparadas tienen que ser claras o muy ligeramente turbias. Aunque si el tamaño de partícula de la muestra es tan pequeño puede que incluso las dispersiones concentradas no muestren turbidez, como es el caso de las muestras que analizamos para este estudio. Lo que se hace en estos casos es medir varias concentraciones hasta obtener una en la que el resultado sea independiente de la concentración elegida. La relación en volumen de solución de NPs/agua desionizada utilizada para optimizar las mediciones en este estudio fue de 1:30, que se mezcló con ayuda de un agitador vortex para homogenizar la solución. Una vez que la solución resultante fue homogénea se filtró a través de una membrana con tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  de la marca Merck-Millipore, (Darmstadt, Alemania) y se agregó 1 *mL* de ésta en la celda correspondiente. Para las mediciones por DLS se utilizó la celda *DTS0012*, mientras que para las mediciones de potencial zeta se utilizó la celda *DTS1060*.

En ambas mediciones se debe tener cuidado que las celdas antes de ser utilizadas se encuentren libres de algún contaminante y que la muestra depositada en la celda no tenga burbujas.

### 5.3.2.2. Equipo y parámetros

El tamaño hidrodinámico y potencial zeta de las NPs de CS se midió por espectroscopia de correlación de fotones utilizando el analizador Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) con los siguientes parámetros: ángulo del detector 90°, índice de refracción de 1.7, temperatura de 25°C, ácido acético como dispersante con una viscosidad de 0.9299 cP e índice de refracción de 1.332. La amplia gama de aplicaciones para el DLS está en el intervalo de 1 nm a 1 micra, que es el rango máximo de rendimiento perfecto de la dispersión de luz dinámica. El equipo se encuentra en la Facultad de Farmacia de la UAEM.

## 5.4. Análisis bioquímicos de la proteína

### 5.4.1. Detección del TGF $\beta$ 3 por el método ELISA

La sección 4.3.1 menciona el fundamento teórico de la técnica ELISA, así como del ensayo *ELISA sándwich*. A continuación describimos en que consisten las fases de éste último:

1. En una placa de microtitulación de 96 pozos que viene pre-recubierta con un anticuerpo conjugado con *biotina*<sup>5</sup> específico para el TGF $\beta$  3, se añadió 100  $\mu$ L de las soluciones<sup>6</sup> estándar, blancos y muestra<sup>7</sup> en los pozos correspondientes, y se incubaron 1 hora a 37°C y 96 % de humedad. En ese momento el antígeno TGF $\beta$  3 presente en las soluciones se fijó en el anticuerpo biotinado.
2. A continuación, se aspiró cada pozo y se agregó 100  $\mu$ L de *avidina*<sup>8</sup> conjugada con el anticuerpo específico, marcado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) a cada pozo de la microplaca y se incubó 1 hora a 37°C y 96 % de humedad. En este paso la *biotina* se unió firmemente con la *avidina*.

El complejo que se formó de la unión *avidina-biotina* funcionó como intermediario en la reacción de detección del antígeno y permitió amplificar la sensibilidad de la reacción inmunoenzimática (ELISA), ya que varias moléculas de *biotina* pudieron unirse a una proteína y por la afinidad

---

<sup>5</sup>La *biotina* es una vitamina de bajo peso molecular (244 D), que presenta una afinidad por la *avidina* superior a la mostrada por el anticuerpo ante el antígeno (unas diez veces más) (Brio Leon y Rovira, 1995).

<sup>6</sup>Las soluciones estándar y blanco las provee el kit SEB949Hu ELISA (Cloud-Clone Corp., Houston, TX).

<sup>7</sup>En la subsección 5.4.1.1 se explica cómo se obtienen estas muestras.

<sup>8</sup>La *avidina* es una glucoproteína de peso molecular 67.000 D, que presenta cuatro lugares de unión por los cuales se puede unir la *biotina* y conjugarse con diversos marcadores (Brio Leon y Rovira, 1995).

*biotina-avidina*, resultó que cada molécula de proteína se vio unida a través de la *biotina* con varias moléculas de *avidina* marcadas (Harlow et al., 1988). De modo que a una molécula de antígeno le correspondieron múltiples moléculas del marcador.

3. Nuevamente se aspiró y lavó tres veces cada pozo con un buffer de lavado, y se añadió 90  $\mu\text{L}$  de la solución de sustrato TMB (tetrametilbenzidina) e incubó 10-20 minutos a 37°C y 96% de humedad, protegiéndolo de la luz.

Pasado el tiempo de revelado, sólo los pozos que contienen TGF $\beta$  3, anticuerpo conjugado con *biotina* y la enzima conjugada con *avidina* exhibirían un cambio de color.

4. La reacción enzima-sustrato se terminó mediante la adición de 50  $\mu\text{L}$  de la solución de ácido sulfúrico y el cambio de color se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm  $\pm$  10 nm. La concentración del TGF $\beta$  3 en las muestras se determinó mediante la comparación de la densidad óptica (DO) de las muestras con la curva estándar.

#### 5.4.1.1. Liberación *in vitro* del TGF $\beta$ 3

Para evaluar la liberación de la proteína TGF $\beta$  3 a partir de formas de dosificación nanométrica, se utilizó el método de diálisis (DM). En este método, la separación física de las formas de dosificación se consigue mediante el uso de una membrana de diálisis que permite la facilidad de muestreo a intervalos periódicos. Con la técnica de diálisis regular, las NPs se introducen en una bolsa de diálisis que se sella subsiguientemente y se coloca en un vaso más grande que contiene una solución, esta última se mantiene en constante agitación, usando un agitador magnético, para evitar gradientes de concentración y temperatura. En general, el volumen del medio exterior debe ser 100 veces mayor que el volumen encerrado en una bolsa de diálisis. En este estudio, el volumen del medio interno (NPs de CS cargadas con TGF $\beta$  3 a una concentración de 0.26 y 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fue de 0.45 mL, mientras que el volumen del medio externo (PBS<sup>9</sup>, pH 7.4) fue de 45 mL. Considerando lo anterior, la capacidad volumétrica del vaso de precipitado requerido para el estudio de liberación *in vitro* fue de 50 mL. Debido a que esta técnica funciona según los principios de difusión, es importante que el corte de peso molecular (MWCO), para la membrana de diálisis sea tal que la proteína liberada de las NPs se difundan rápidamente desde un compartimento, a través de la membrana, y entre en el segundo compartimento desde donde se muestrea para su análisis. El MWCO de la membrana elegida

<sup>9</sup>La preparación del buffer fosfato salino (conocido por sus siglas en inglés, PBS, de phosphate buffered saline) se preparó a una concentración 1X siguiendo la metodología reportada en (Protocols, 2006).

(Spectra/Por 7<sup>10</sup>) para realizar este estudio fue de 50 *kDa*, tomando como referencia que el peso molecular de la proteína TGF $\beta$  3 es de 25 *kDa*.

El sistema descrito anteriormente se utilizó para evaluar por triplicado la liberación de: NPs cargadas con TGF $\beta$  3 a las concentraciones de 0.26 y 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de 2  $\mu\text{L}$  de TGF $\beta$  3 a una concentración de 0.6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  resuspendido en 0.43 *mL* de PBS (pH 7.4); teniendo un total de nueve sistemas. Para mantener bajo las mismas condiciones experimentales los nueve sistemas, se utilizó una placa de calentamiento y agitación de 10 posiciones (IKA - Número 3691101). Dichas condiciones fueron: agitación constante a 180 RPM y temperatura de 37°C durante 10 días continuos. Para conservar la temperatura de los sistema, cada uno de ellos se aisló térmicamente con papel aluminio.

El muestreo de los sistemas se realizó durante siete tiempos (30 minutos, 4 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 6 días y 10 días), este consistió en tomar 150  $\mu\text{L}$  de cada envase para posteriormente almacenarlo a una temperatura de -70°C. El volumen de solución tomado en el muestreo, se recuperó para cada envase agregando 150  $\mu\text{L}$  de PBS (pH 7.4), que al igual que las soluciones de los nueve sistemas también se mantuvo a 37°C y en agitación constante a 180 RPM (ocupando la décima posición de la placa), en la tabla 5.1 se representan las posiciones de las soluciones tomadas en el muestreo, así como también las soluciones: estándar y blanco mencionadas en la subsección 5.4.1. Finalmente, la cantidad de TGF $\beta$  3 liberada en cada tiempo se determinó usando el kit de ELISA de TGF $\beta$  3.

---

<sup>10</sup>Especificaciones del producto: membrana pretratada con EDTA, no contiene traza de metales pesados ni azufre; tamaño de poro 50 *kDa*, ancho plano 12 *mm*, diámetro 7.5 *mm* y volumen/longitud 0.45 *mL/cm*.

Tabla 5.1: Distribución de las soluciones en la placa del kit ELISA para la detección de la proteína TGFβ 3, con una sensibilidad superior a los 5.7 pg/mL.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1 pg/mL (solución estándar)	1 pg/mL (solución estándar)	1 pg/mL (solución estándar)	30 min 0.8 μg (TGFβ 3)	30 min 0.8 μg (TGFβ 3)	30 min 0.8 μg (TGFβ 3)	30 min 0.8 μg (NPs)	30 min 0.8 μg (NPs)	30 min 0.8 μg (NPs)	30 min 1.2 μg (NPs)	30 min 1.2 μg (NPs)	30 min 1.2 μg (NPs)
<b>B</b>	500 pg/mL (solución estándar)	500 pg/mL (solución estándar)	500 pg/mL (solución estándar)	4 hrs 0.8 μg (TGFβ 3)	4 hrs 0.8 μg (TGFβ 3)	4 hrs 0.8 μg (TGFβ 3)	4 hrs 0.8 μg (NPs)	4 hrs 0.8 μg (NPs)	4 hrs 0.8 μg (NPs)	4 hrs 1.2 μg (NPs)	4 hrs 1.2 μg (NPs)	4 hrs 1.2 μg (NPs)
<b>C</b>	250 pg/mL (solución estándar)	250 pg/mL (solución estándar)	250 pg/mL (solución estándar)	1 día 0.8 μg (TGFβ 3)	1 día 0.8 μg (TGFβ 3)	1 día 0.8 μg (TGFβ 3)	1 día 0.8 μg (NPs)	1 día 0.8 μg (NPs)	1 día 0.8 μg (NPs)	1 día 1.2 μg (NPs)	1 día 1.2 μg (NPs)	1 día 1.2 μg (NPs)
<b>D</b>	125 pg/mL (solución estándar)	125 pg/mL (solución estándar)	125 pg/mL (solución estándar)	2 días 0.8 μg (TGFβ 3)	2 días 0.8 μg (TGFβ 3)	2 días 0.8 μg (TGFβ 3)	2 días 0.8 μg (NPs)	2 días 0.8 μg (NPs)	2 días 0.8 μg (NPs)	2 días 1.2 μg (NPs)	2 días 1.2 μg (NPs)	2 días 1.2 μg (NPs)
<b>E</b>	62.5 pg/mL (solución estándar)	62.5 pg/mL (solución estándar)	62.5 pg/mL (solución estándar)	3 días 0.8 μg (TGFβ 3)	3 días 0.8 μg (TGFβ 3)	3 días 0.8 μg (TGFβ 3)	3 días 0.8 μg (NPs)	3 días 0.8 μg (NPs)	3 días 0.8 μg (NPs)	3 días 1.2 μg (NPs)	3 días 1.2 μg (NPs)	3 días 1.2 μg (NPs)
<b>F</b>	31.2 pg/mL (solución estándar)	31.2 pg/mL (solución estándar)	31.2 pg/mL (solución estándar)	6 días 0.8 μg (TGFβ 3)	6 días 0.8 μg (TGFβ 3)	6 días 0.8 μg (TGFβ 3)	6 días 0.8 μg (NPs)	6 días 0.8 μg (NPs)	6 días 0.8 μg (NPs)	6 días 1.2 μg (NPs)	6 días 1.2 μg (NPs)	6 días 1.2 μg (NPs)
<b>G</b>	15.6 pg/mL (solución estándar)	15.6 pg/mL (solución estándar)	15.6 pg/mL (solución estándar)	10 días 0.8 μg (TGFβ 3)	10 días 0.8 μg (TGFβ 3)	10 días 0.8 μg (TGFβ 3)	10 días 0.8 μg (NPs)	10 días 0.8 μg (NPs)	10 días 0.8 μg (NPs)	10 días 1.2 μg (NPs)	10 días 1.2 μg (NPs)	10 días 1.2 μg (NPs)
<b>H</b>	0.0 pg/mL (solución estándar)	0.0 pg/mL (solución estándar)	0.0 pg/mL (solución estándar)	1 ng/mL (TGFβ 3 estándar)	1 ng/mL (TGFβ 3 estándar)	1 ng/mL (TGFβ 3 estándar)	0.8 μg (sobr.)	0.8 μg (sobr.)	0.8 μg (sobr.)	1.2 μg (sobr.)	1.2 μg (sobr.)	1.2 μg (sobr.)

#### 5.4.1.2. Equipo y parámetros

El kit ELISA que se utilizó para identificar el factor de crecimiento transformante beta 3 ( $TGF\beta$  3), se adquirió con el fabricante Cloud-Clone Corp., (Houston, TX), las especificaciones del producto fueron las siguientes: producto N° SEB949 Hu, especie *Homo sapiens* (humano), método de ensayo sándwich doble anticuerpo, rango de detección 15.6-1000  $pg/mL$ , la mínima dosis detectable del kit es típicamente menor que 5.7  $pg/mL$ .

El lector de absorción en microplacas que se utilizó para realizar la medición de absorbancia del inmunoensayo ELISA es el equipo iMark, (Bio-Rad, Philadelphia, PA), usando el filtro de 450 nm. El equipo se encuentran en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo (CENIAQ) localizado en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

#### 5.4.2. Análisis por DC

##### 5.4.2.1. Preparación de las muestras

Para evitar resultados erróneos, todas las muestras debían ser de la más alta pureza posible. Filtrar las muestras y el buffer a través de un filtro con tamaño de poro de 0.2  $\mu m$  a 0.45  $\mu m$  fue una buena manera de eliminar el polvo, proteína agregada y otras partículas que pudiesen interferir en las mediciones de DC. Antes de analizar las muestras de interés, comprobamos mediante la realización de espectros en blanco apropiados, que la absorbancia del buffer no fuese demasiado alta e indicaría si las señales de fondo surgían de cualesquiera componentes quirales.

Además, fue importante asegurar que la proteína que se estudiaba fuese estable durante el periodo del experimento en las condiciones empleadas. La estabilidad se evaluó buscando evidencias de actividad biológica o de una pérdida de señal dependiente del tiempo.

Las muestras que analizamos por DC son soluciones de NPs cargadas con la proteína  $TGF\beta$  3, que se encontraban en dos concentraciones: 0.26 y 0.4  $\mu g/mL$ . Los espectros en blanco que consideramos apropiados analizar fueron: agua desionizada, solución de NPs sin proteína, PBS (pH 7.4) y 2  $\mu L$  de  $TGF\beta$  3 (0.2  $\mu g/\mu L$ ) resuspendida en 100  $\mu L$  de PBS (pH 7.4). El objetivo de este estudio fue hacer un seguimiento *in vitro* de cuatro tiempos similar al que se describe en la sección 5.4.1.1, conservando las muestras en una incubadora a una temperatura de 37°C durante todo el estudio.



#### 5.4.2.2. Equipo y parámetros

Los espectros de dicroísmo circular (CD) se recogieron usando el espectroscopio espectropolarímetro JASCO J-815, (Jasco inc., Easton, MD) a temperatura ambiente. Los espectros de todas las muestras se registraron en un intervalo de longitud de onda de 200-250 *nm*, usando una celda de cuarzo de 1.0 *cm* de recorrido óptico, con una resolución de 0.2 *nm* a una velocidad de 10 *nm/min*. Los datos se procesaron posteriormente para la sustracción en blanco y la reducción del ruido y se registró un promedio de cinco señales. Todas las mediciones de CD se informan como elipticidades ( $\theta$ , mdeg). El equipo se encuentra en la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía (ENMH), del IPN.

## Capítulo 6

# Resultados y discusión

**RESUMEN:** Este capítulo presenta los resultados obtenidos a partir del desarrollo experimental descrito en el capítulo 5 para el nanosistema CS-TGF $\beta$  3.

### 6.1. Introducción

El capítulo está dividido en dos secciones principales que contienen los resultados para la caracterización física de las NPs de CS y en el análisis bioquímico de la proteína TGF $\beta$  3. El primer punto es determinar el efecto sobre la formación de las NPs de CS, provocado por el proceso de manufactura. Tanto el tamaño como la morfología de las NPs fueron evaluadas mediante análisis de SEM, AFM y DLS. La estabilidad y actividad biológica de las NPs, son propiedades que se pudieron evaluar a través de DLS y del potencial zeta. Al encapsular la proteína TGF $\beta$  3, la capacidad de encapsulación y cinética de liberación se determinó por análisis bioquímicos y técnicas espectroscópicas.

### 6.2. Caracterización física

Esta sección incluye los resultados de la caracterización física de las NPs de CS sin y con proteína. En el capítulo anterior se describió la metodología experimental para la obtención de ambos nanosistemas, ver sección 5.2. En cada uno de estos nanosistemas se evaluó la influencia de alguno de los parámetros, para el caso de las NPs sin proteína se usaron los valores: 2.5:1 (w/w) y 5:1 (w/w) para la relación de masa entre las soluciones CS/TPP; mientras que en el caso de las NPs con proteína la concentración de TGF $\beta$  3 inicial fue: 0.26 y 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se incluye al estudio la medición del potencial zeta de ambos sistemas.

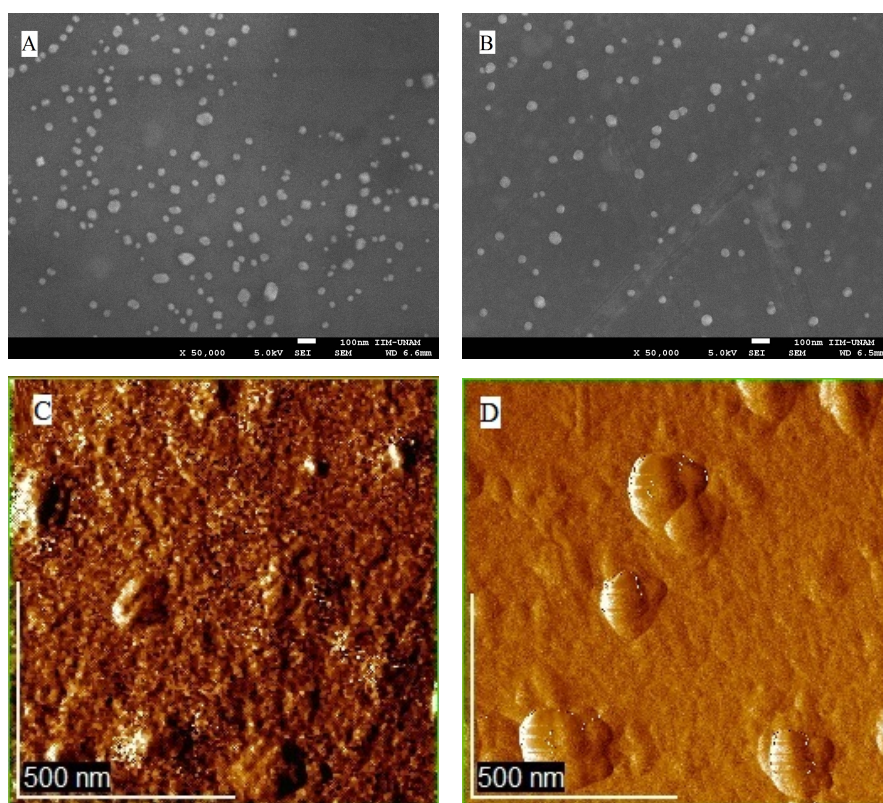


Figura 6.1: Efecto de la razón de masa entre las soluciones CS/TPP en el tamaño de las nanopartículas derivadas de la síntesis de nanopartículas de quitosano sin proteína, vistas por imágenes SEM y AFM. Las imágenes SEM con un aumento  $\times 50,000$  tomadas a 5.0 kV son: (A) con razón de masa 2.5:1 (w/w), y (B) con razón de masa 5:1 (w/w); mientras que las imágenes de AFM vistas en una ventana de 500 nm son: (C) con razón de masa 2.5:1 (w/w), y (D) con razón de masa 5:1 (w/w).

### 6.2.1. Nanopartículas sin proteína

La relación de masa entre CS y TPP es crítica y controla el tamaño y la distribución del tamaño de las nanopartículas. Se ha encontrado que el tamaño de las NPs puede afectar el rendimiento biológico de las nanopartículas de CS (Pan et al., 2002). Por esta razón, antes de encapsular la proteína en las NPs de CS, el efecto de la relación de CS/TPP sobre las características de tamaño de las NPs se estudió con el fin de encontrar la relación óptima que resulta de las NPs de baja capacidad y distribución de tamaños estrecha.

En la figura 6.1 se incluyen los resultados obtenidos del análisis AFM y SEM para el tamaño de las NPs, al modificar el parámetro de relación masa

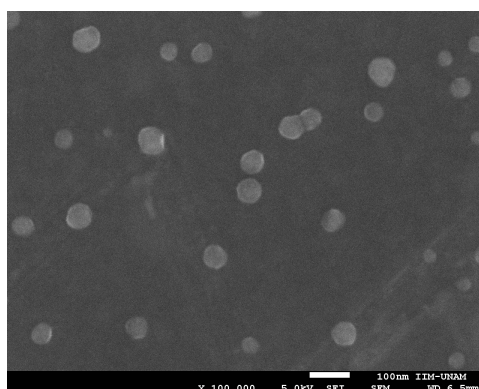


Figura 6.2: Nanopartículas de quitosano sin proteína con relación de masa 5:1 (w/w) formuladas por técnica de reticulación iónica, vista por SEM con un aumento de  $\times 100,000$ .

entre las soluciones de CS/TPP. El radio de las NPs, denotado por  $r_{NP}$ , se obtiene directamente de las imágenes utilizando la escala de referencia que proporciona la imagen y considerando que las NPs son esféricas. Se puede ver de inmediato que la distribución de tamaños es más estrecha con el aumento de CS. La forma de las NPs se observa más esférica al aumentar el volumen de TPP. También la magnitud del radio de las NPs con relación 2.5:1 (w/w) es mayor que el de las NPs con relación 5:1 (w/w). La imagen SEM revela que las NPs para esta última relación de masa tienen un intervalo de tamaño entre 50 y 80 nm, que se ajusta con la medición del tamaño por AFM. Estos comportamientos pueden ser entendidos en términos del efecto que provoca el aumento de volumen de TPP en la densidad de reticulación entre CS y TPP. Dichos resultados proporcionan una ventana de procesamiento simple para manipular y optimizar el tamaño nano para la aplicación prevista. En este estudio, el CS/TPP con relación 5:1 con tamaño de NPs menor a 100 nm fue elegido para la preparación de NPs cargadas con proteína. Las características morfológicas de las NPs de CS/TPP se examinaron usando SEM.

La figura 6.2 muestra que las NPs son partículas esféricas, con superficie lisa y una estrecha distribución de tamaños. Es importante señalar que en ambos estudios, AFM y SEM, el equipo requiere que las muestras estén secas (ver sección 5.3.1.1), de modo que en dichos estudios es necesario evaporar el medio donde se encuentran inmersas las NPs. La condición antes mencionada debe tomarse en cuenta al comparar los resultados obtenidos de estos estudios y los de DLS, ya que en este último las mediciones de tamaño son de las NPs suspendidas en agua, por lo que el radio obtenido corresponde al «radio hidrodinámico», que suele ser mayor que el de las NPs sin solvente.

Dicho lo anterior, a continuación revisaremos los resultados obtenidos con DLS para el tamaño de las NPs utilizando la relación masa 5:1 (w/w) entre

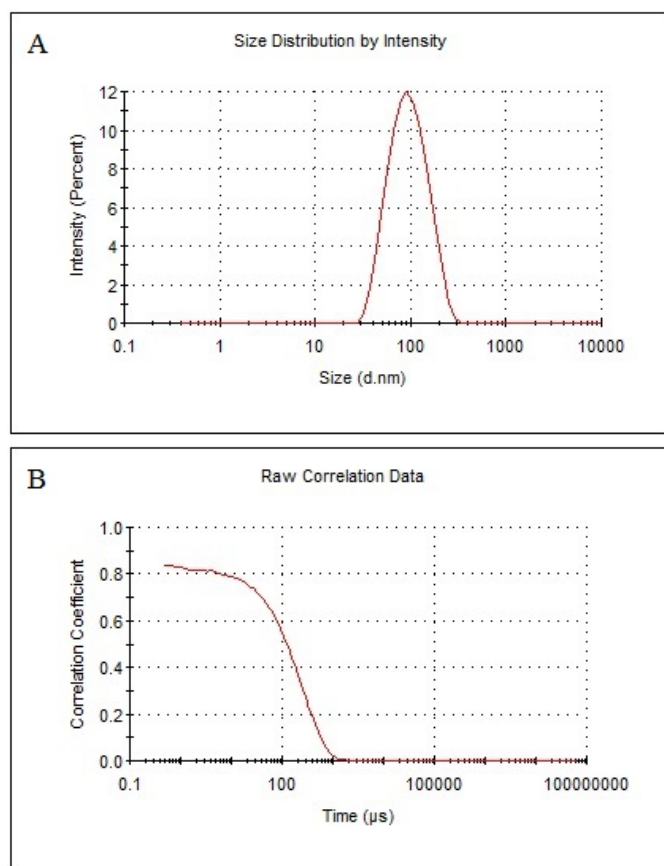


Figura 6.3: Los análisis por DLS para las NPs sin proteína con relación de masa 5:1 (*w/w*) son: (A) una distribución Gaussiana unimodal que muestra nanopartículas de aproximadamente 84.69 nm de diámetro, con una (B) función de correlación que exhibe un decaimiento exponencial..

las soluciones de CS/TPP. El DLS calcula el diámetro hidrodinámico y se rige por la ecuación de Stokes-Einstein, (ver ecuación 4.1). La figura 6.3 muestra el análisis de distribución de intensidad de los tamaños de las NPs y su respectiva función de correlación.

Las distribuciones de la intensidad en función del tamaño de las NPs indican que las partículas recolectadas en la muestra tienen un diámetro medio de 84.69 nm. La distribución de intensidad se pesa de acuerdo con la intensidad de dispersión de cada fracción de partícula o población. La función de correlación contiene toda la información relativa a la difusión de las partículas dentro de la muestra que se está midiendo. Mediante el ajuste de esta función exponencial, se calcula el coeficiente de difusión  $D$  ( $D$  es proporcional a la vida media del decaimiento exponencial). Con el coeficiente de difusión  $D$  ahora conocido, es posible calcular el diámetro hidrodinámico usando una variación de la ecuación

de Stokes-Einstein (Worldwide, 2011). De las mediciones de DLS se obtiene un diámetro medio de partícula  $\bar{D}_{DLS}$  (denominado como Average-z <sup>1</sup> en los resultados) que se relaciona con la distribución de tamaños basada en la intensidad de la luz dispersada  $h_{\theta_r}(Di)$  a través de:

$$\bar{D}_{DLS} = \frac{\sum_{i=1}^N h(D_i)}{\sum_{i=1}^N \frac{h(D_i)}{D_i}} \quad (6.1)$$

donde  $h_{\theta_r}(Di)$  expresa la fracción de intensidad dispersada por las partículas de tamaño  $Di$  a un ángulo  $\theta_r$ .

La desviación estándar de la distribución del tamaño de las partículas se puede obtener directamente de las estadísticas de la distribución. Aquí, la distribución del tamaño se puede modelar con una distribución gaussiana teórica, en la que la polidispersidad indica el grado de variación, o amplitud de una campana gaussiana. Tradicionalmente, esta polidispersidad también se ha convertido en un índice de polidispersidad PDI que es el cuadrado de la polidispersidad por dispersión de la luz. El índice de polidispersión (PDI) que se obtiene para las NPs de CS es de 0.162 <sup>2</sup>, este valor indica que la muestra es moderadamente polidispersa, es decir, que la distribución no es ni extremadamente polidispersa, ni amplia, ni en ningún sentido estrecha.

La carga superficial para las NPs con relación de masa 5:1 (w/w) en solución se analizó por medición del potencial zeta, obteniendo  $pot - \zeta = 21.4 \pm 3.12 \text{ mV}$ . El valor positivo del potencial zeta es acorde a lo esperado, pues la cadena de CS presenta grupos amino. Dicho valor cae dentro del intervalo reportado en (Saharan y Pal, 2016) (+20 mV, 90 mV), sin embargo se encuentra en el límite inferior, según lo reportado para las NPs de CS, por lo que inferimos que la dispersión tiende a agregarse con el tiempo debido a interacciones de van der Waals entre partículas adyacentes.

Los tamaños determinados por SEM, AFM y DLS estaban en buen acuerdo con los tamaños nominales reportados en la literatura. La monodispersidad y forma esférica también pudo ser confirmada.

<sup>1</sup>El Average-z es el tamaño hidrodinámico medio ponderado por la intensidad de la colección de partículas medida por dispersión dinámica de la luz (DLS).

<sup>2</sup>El valor de PDI entre 0.08 y 0.7, es el rango en el cual los algoritmos de distribución funciona mejor (Shaw, 2013)

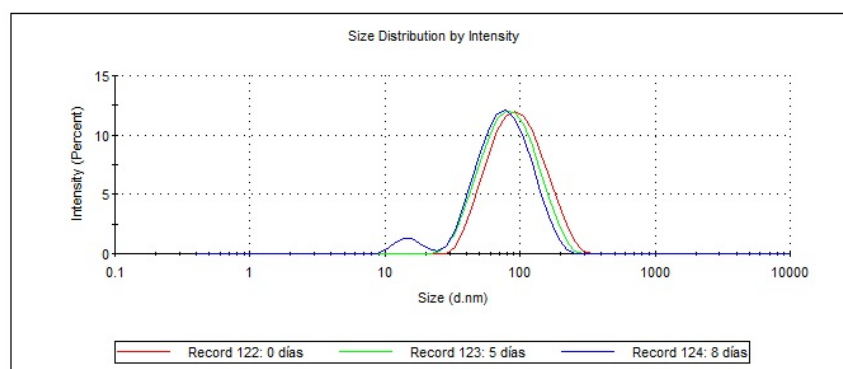


Figura 6.4: Cambios en la distribución de tamaño de las NPs de quitosano sin proteína como consecuencia de la evolución de las NPs en el tiempo, medidos por DLS para tres tiempos en un periodo de 8 días.

Tabla 6.1: Valores del tamaño, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta ( $\text{pot-}\zeta$ ) de las NPs en función del tiempo.

Tiempo (días)	Tamaño (nm)	PDI	$\text{pot-}\zeta \pm \sigma$ (mV)
0	84.69	0.162	$21.4 \pm 3.12$
5	72.84	0.185	$-1.79 \pm 3.54$
8	62.02	0.232	$-21.7 \pm 10.8$

### 6.2.1.1. Evolución de las nanopartículas en el tiempo

Usando la técnica DLS se evaluó el comportamiento del tamaño y potencial zeta de las NPs en el tiempo. Para ello se analizó una muestra de NPs preparada bajo las condiciones descritas en la sección 5.2.2 con relación de masa 5:1 (w/w), durante tres tiempos. Lo que se obtuvo, es que la distribución de tamaños se corre ligeramente hacia la izquierda a medida que transcurre el tiempo, y que al cabo de ocho días un segundo pico aparece en la distribución con una intensidad de 5.3% (ver figura 6.4). Luego, el valor del PDI aumenta con el tiempo, en la tabla 6.1 se exponen los valores obtenidos.

Este incremento en el índice de polidispersión puede ser entendido si se tienen en cuenta las características biodegradables del quitosano. Además, de la acción del agente reticulante TPP y su relación en masa con el CS en la solución resultante, ya que una densidad de reticulación más alta, ralentiza la degradación de las NPs. Así pues, se tiene que al degradarse las NPs aparecen «restos» de partículas de tamaños diversos y por esto, el equipo muestra los picos en los valores donde se encuentra la mayor cantidad.

Tabla 6.2: Valores del tamaño, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (pot- $\zeta$ ) de las NPs cargadas con TGF $\beta$  3.

Concentración de TGF $\beta$ 3 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Tamaño DLS (nm)	PDI	pot- $\zeta \pm \sigma$ (mV)
0.26	290.4	0.384	17.5 $\pm$ 5.02
0.4	298.0	0.418	19.2 $\pm$ 4.32

De manera simultánea se midió el potencial zeta de la muestra como función del tiempo. La tabla 6.1 incluye los valores obtenidos del potencial zeta para los diferentes tiempos. Lo que se observa es que a medida que transcurre el tiempo el signo del potencial zeta pasa de positivo a negativo, podemos interpretar este comportamiento como la pérdida de estabilidad de las NPs debido a su degradación, lo que se traduce como una disminución de la repulsión electrostática entre las partículas.

### 6.2.2. Nanopartículas con proteína

La concentración de TGF $\beta$  3 encapsulada fue: 0.26 y 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para evaluar el efecto de los cambios morfológicos y de tamaño dependientes de la concentración se utilizó SEM y DLS. Se investigaron las NPs con la relación de masa 5:1 (w/w). Los resultados se resumen en la tabla 6.2. Cabe resaltar que los tamaños medidos por SEM, no son concluyentes, pues el proceso de secado de la muestra altera las condiciones óptimas requeridas para conservar la proteína, provocando la agregación. Lo anterior claramente es visible en la imagen SEM de NPs no protegidas, donde se puede ver que se fusionan entre sí, generando micropartículas (ver figura 6.5). Después del secado, se encontró un aumento de tamaño significativo en las NPs dejando de ser clasificadas en la escala nanométrica.

Es importante mencionar que en este estudio no se realizaron pruebas para analizar la interacción directa entre el CS y la proteína TGF $\beta$  3, lo que sabemos a grandes rasgos es que las interacciones físicas incluyendo el enlace de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals, las interacciones electrostáticas o hidrodinámicas se utilizan ampliamente para cargar fármacos en biomateriales y lograr perfiles deseables de liberación controlada. Todas ellas son muy dependientes del acondicionamiento del pH, tanto en los procesos de carga y liberación del fármaco. La modificación del medio de pH es crítica en la carga y administración de proteínas y puede usarse como una aproximación para modular los perfiles de liberación de proteínas. A un pH inferior al punto isoelectrónico de la proteína, la molécula está cargada positivamente mientras que a pH superior al punto isoelectrónico está cargada negativamente. Esta modificación puede aumentar o disminuir la afinidad de las proteínas para los biomateriales



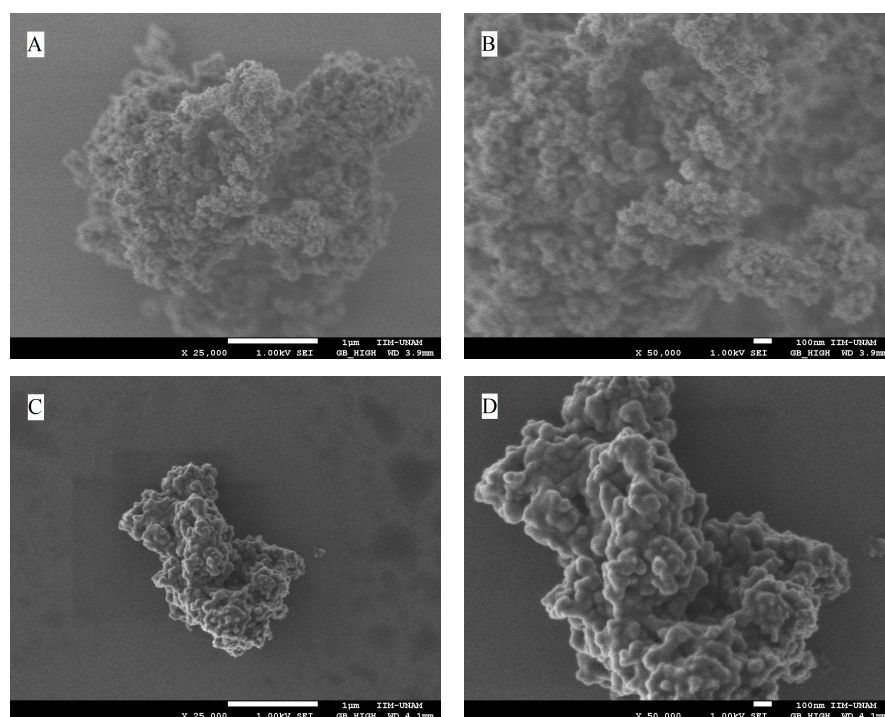


Figura 6.5: Imágenes SEM de micropartículas derivadas de la sintetización de nanopartículas de quitosano cargadas con dos concentraciones diferentes de TGFβ 3 después del secado vistas con dos aumentos. 0.26 μg/mL de TGFβ 3: (A) X 25,000, (B) X 50,000; y 0.4 μg/mL de TGFβ 3: (C) X 25,000, (D) X 50,000.

(Tiwari et al., 2016). El punto isoeléctrico (pI) teórico del TGFβ 3 es  $pI = 6.10^3$  y el medio en el que la proteína se disuelve en un fosfato de solución salina (PBS) con pH 7.4. De modo que considerando lo antes descrito resulta que al ser el pH superior al punto isoeléctrico, el TGFβ 3 está cargado negativamente. Usando el resultado anterior como referencia es posible atribuir el aumento del tamaño de la NP cargada, medido con DLS, a la interacción iónica entre el TGFβ 3 cargado negativamente y el CS cargado positivamente en las condiciones de preparación (~pH 6).

La estabilidad de las NPs se evaluó mediante la medición de su carga superficial con el potencial zeta. Los resultados de estas mediciones se incluyen en la tabla 6.2, notamos que los potenciales zeta son positivos, debido a la presencia de los grupos amino en el CS. Para las NPs cargadas con 0.26 μg/mL de TGFβ 3 el valor del potencial zeta es ligeramente menor al de las cargadas con

<sup>3</sup>Este valor lo calculamos usando la secuencia de aminoácidos de la proteína, consultada en la hoja de referencia del proveedor, usando el programa ExPASy, SIB Bioinformatics Resource Portal disponible en la página [http://au.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html)

0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dicho comportamiento sugiere que al incrementar la concentración de TGF $\beta$  3 encapsulado, disminuye la proporción de grupos amina libres en la cadena de CS. Como consecuencia directa de esto, la estabilidad del nanosistema se favorece. La disminución del potencial zeta después de la adición de proteína se debe razonablemente a la deposición parcial de la proteína cargada negativamente sobre la superficie de la partícula, reduciendo la carga neta total.

### 6.3. Análisis bioquímicos de la proteína

A continuación se muestra el análisis que se realizó para evaluar la cinética de liberación del TGF $\beta$  3, tras haber sido encapsulado por reticulación iónica en el nanosistema. En este estudio, se utilizó el programa *DDSolver* para ajustar los datos de liberación de la proteína a modelos matemáticos. La selección del modelo adecuado para dicho ajuste es esencial, no solo para la evaluación cuantitativa de las características de liberación de la proteína sino también para la comparación de los perfiles de liberación. *DDSolver* proporciona una serie de criterios estadísticos para evaluar la bondad del ajuste de un modelo, incluyendo el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{ajustado}$ ). Para los modelos de liberación con el mismo número de parámetros, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se puede utilizar para discriminar el modelo más apropiado. Sin embargo, cuando se comparan modelos con diferentes números de parámetros, se debe usar el coeficiente de determinación ajustado donde  $n$  es el número de puntos de datos y  $p$  es el número de parámetros en el modelo (Zhang et al., 2010). Luego, el mejor modelo debe ser el que tiene el mayor valor de  $R^2_{ajustado}$  (Costa y Lobo, 2001). Los resultados correspondientes se exponen en la subsección 6.3.1.

Por otro lado, en la subsección 6.3.2, se muestran los espectros de DC para las dos concentraciones de proteína (0.26 y 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) TGF $\beta$  3.

#### 6.3.1. Liberación *in vitro* de la proteína

A partir de los datos obtenidos por espectroscopía para el kit ELISA, se construyó la curva de calibración (ver figura 6.6) usando el programa *GraphPad Prism 7.02*. Luego, se determinó la eficiencia de encapsulamiento (EE) de las NPs cargadas con TGF $\beta$  3. Para ello, se obtuvo la concentración de la proteína en el sobrenadante mediante el ensayo ELISA, tras haber centrifugado las muestras de NPs a 330 RPM durante 10 min a 25°C para separar el sobrenadante. La cantidad de proteína cargada en las NPs se calculó como la diferencia entre la carga objetivo y la proteína recuperada en el sobrenadante. La eficiencia de encapsulamiento (EE) se calculó usando la ecuación 6.2, los resultados se incluyen en la tabla 6.3.

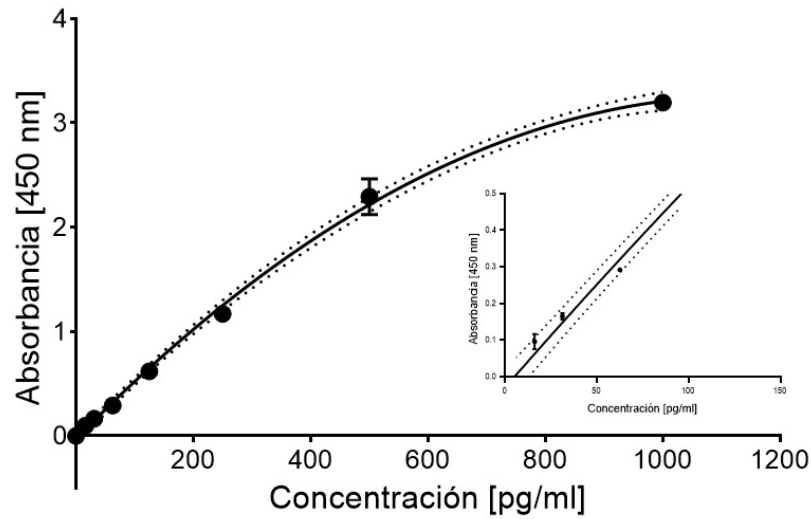


Figura 6.6: Curva de calibración para el TGF $\beta$  3 de siete puntos. El gráfico muestra los valores promedio de los ensayos realizados por triplicado en un mismo experimento a diferentes tiempos durante un período de 10 días. Las barras representan la desviación estándar. El límite de detección fue 15.6 pg/mL de TGF $\beta$  3 detectado por ELISA.

Tabla 6.3: Efecto de la cantidad de TGF $\beta$  3 encapsulado en la eficiencia de encapsulación (EE) de las NPs de CS.

Cantidad de TGF $\beta$ 3 ( $\mu$ g)	EE (%)
0.26	39.25
0.4	43.89

$$EE(\%) = \frac{[TGF\beta 3]_{\text{encapsulado}} - [TGF\beta 3]_{\text{en el sobrenadante}}}{[TGF\beta 3]_{\text{encapsulado}}} * 100 \quad (6.2)$$

Finalmente, calculamos el porcentaje de proteína liberada en los diferentes tiempos para ambas cantidades de proteína usando la ecuación resultante de la curva de calibración, ecuación 6.3, y con el programa DDSolver evaluamos el mecanismo de liberación de la proteína de las NPs mediante la introducción de datos de liberación en los siguientes modelos matemáticos:

$$A_{\lambda} = -0,02851 + 0,005742C - 2,505e^{-6}C^2 \quad (6.3)$$

donde  $A_\lambda$  es la absorbancia del TGF $\beta$  3 a 450 nm y  $C$  es la concentración de éste en la muestra.

1. Baker-Lonsdale:

$$\frac{3}{2}[1 - (1 - Q)^{2/3}] - Q = k_1 t; \quad (6.4)$$

2. Higuchi:

$$Q = k_2 t^{0,5}; \quad (6.5)$$

3. Hixon-Crowell:

$$(1 - Q)^{1/3} = -k_3 t; \quad (6.6)$$

4. Korsmeyer-Peppas:

$$Q = k_4 t^n; \quad (6.7)$$

donde  $Q$  es la fracción de proteína liberada en el momento  $t$ , mientras que  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  y  $k_4$  son las constantes de velocidad de liberación, que se obtuvieron ajustando el perfil de liberación del fármaco a, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7 respectivamente; finalmente  $n$  es el exponente que indica el mecanismo de liberación del fármaco <sup>4</sup>. Estos modelos se utilizan ampliamente en la literatura para modelar la cinética de liberación de diferentes tipos de fármacos de diversos vehículos de suministro (Radin et al. (2009); Gu et al. (2014); Abdel-Hameed et al. (2014)). A continuación se describe brevemente en que consisten los modelos:

- Baker-Lonsdale (6.4), describe la liberación de fármacos contenidos en matrices de forma esféricas. Esta ecuación se aplica para la linealización de datos de liberación de varias formulaciones de microcápsulas o microsferas (Fuentes et al., 2005).

---

<sup>4</sup>Cuando el valor de  $n$  es 0.50 la liberación del fármaco sigue un mecanismo de difusión de tipo Fickiano (en este caso el perfil de liberación se ajusta a la ecuación 6.5). Una difusión anómala o no Fickian se produce cuando los valores de  $n$  son mayores que 0.50 y menores de 1. En los casos donde el sistema de liberación es un material poroso, la constante  $n$  puede tomar valores menores que 0.50, puesto que se combinan los mecanismos de difusión parcial a través de una matriz hinchada y a través de los poros llenos de agua (Doadrio Villarejo y Vallet Regí, 2006). Además, valores de  $n < 0.50$  denotan la existencia de otro proceso simultáneo al proceso de difusión (Sá Barreto, 2009).

Tabla 6.4: Los coeficientes de determinación ajustado ( $R^2_{ajustado}$ ), las constantes de velocidad de liberación ( $k_i$ ) y el exponente de difusión ( $n$ ) obtenidos aplicando diferentes modelos matemáticos.

Modelos matemáticos	0.8 $\mu\text{g}$			1.2 $\mu\text{g}$		
	$R^2_{ajustado}$	$k_i$	$n$	$R^2_{ajustado}$	$k_i$	$n$
Baker-Lonsdale	0.7209	0.0005	-	0.9655	0.001	-
Higuchi	0.9190	5.0022	-	0.9469	5.2953	-
Hixon-Crowell	0.7185	0.0020	-	0.7725	0.0023	-
Korsmeyer-Peppas	0.9614	5.9709	0.4640	0.9664	8.6521	0.3990

- Higuchi (6.5), este modelo se basa en la hipótesis de que: (i) la concentración inicial de fármaco en la matriz es mucho mayor que la solubilidad del fármaco; (ii) la difusión del fármaco tiene lugar sólo en una dimensión (el efecto de borde debe ser insignificante); (iii) las partículas de fármaco son mucho más pequeñas que el espesor del sistema; (iv) el hinchamiento y la disolución de la matriz son despreciables; (v) la difusividad del fármaco es constante; y (vi) condiciones de fregado perfectas siempre se alcanzan en el entorno de liberación (Dash et al., 2010). Esta relación puede usarse para describir la disolución del fármaco a partir de diferentes sistemas geométricos y porosos (Grassi y Grassi, 2005).
- Hixon-Crowell (6.6), la ecuación describe la liberación de sistemas en los que hay un cambio en el área superficial y el diámetro de las partículas o tabletas (Dash et al., 2010). Esta expresión se aplica a la forma de dosificación farmacéutica tal como comprimidos, donde la disolución se produce en planos que son paralelos a la superficie del fármaco si las dimensiones del comprimido disminuyen proporcionalmente, de tal manera que la forma geométrica inicial permanece constante todo el tiempo (Chen et al., 2007).
- Korsmeyer-Peppas (6.7), este modelo proporciona información sobre el tipo de mecanismo de liberación del fármaco que tiene lugar a partir de dispositivos poliméricos hinchables (Ritger y Peppas, 1987).

Los coeficientes de determinación ajustado ( $R^2_{ajustado}$ ) y las constantes de velocidad de liberación aplicando los modelos matemáticos, para las dos diferentes cantidades de TGF $\beta$  3 encapsulado en las NPs de CS, se incluyen en la tabla 6.4. El rendimiento de cada modelo se evaluó mediante la inspección visual de la forma y los valores de  $R^2_{ajustado}$  (ver tabla 6.4). Los modelos Higuchi y Korsmeyer-Peppas tienen valores relativamente altos para el  $R^2_{ajustado}$ . Esto sugiere que ambos modelos pueden ser adecuados, ver figura 6.7. Sin embargo, es importante hacer notar que en las NPs de CS vistas por SEM y AFM (ver figuras 6.1 y 6.5) se observan como partículas esféricas lisas (es decir, sin poros visi-

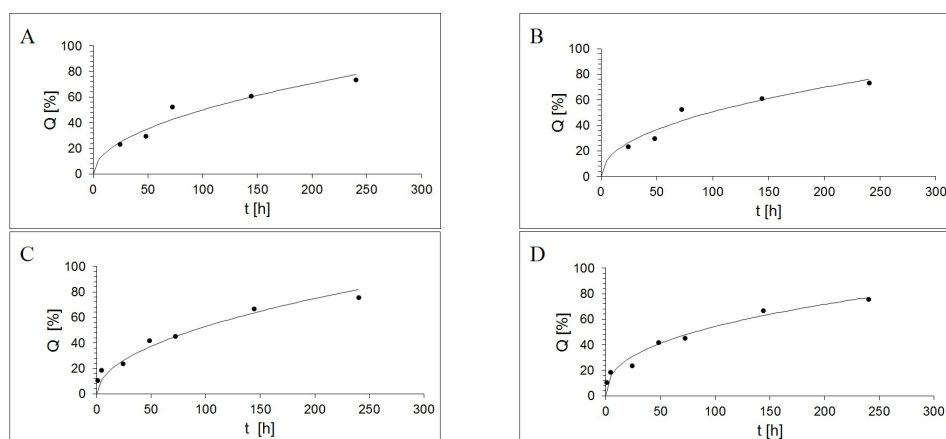


Figura 6.7: Representación de la fracción de proteína liberada ( $Q$ ) en el momento  $t$ , con los modelos cinéticos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas. Se evaluaron ambas concentraciones de proteína inicialmente encapsulada.  $0.26 \mu\text{g/mL}$  de TGF $\beta$  3: (A) modelo de Higuchi, (B) modelo de Korsmeyer-Peppas; y  $0.4 \mu\text{g/mL}$  de TGF $\beta$  3: (C) modelo de Higuchi, (D) modelo de Korsmeyer-Peppas.

bles en la superficie); y haciendo una inspección más cercana, nos percatamos de que existe una diferencia entre los valores del  $R^2_{\text{ajustado}}$  de ambos modelos. Como consecuencia, el modelo Korsmeyer-Peppas parece ser más adecuado y por lo tanto se utilizó posteriormente para describir la cinética de liberación. La geometría de la matriz depende del valor del exponente de difusión  $n$ , para matrices esféricas: si  $n < 0.43$ , se produce liberación de fármaco mediada por difusión de Fick; si  $0.43 < n < 0.85$ , ocurre un transporte no fickiano; y la liberación mediada por erosión corresponde a  $n > 0.85$ . Los valores del exponente de difusión obtenidos para ambas cantidades de la proteína (ver tabla 6.4), indican que para la menor cantidad de TGF $\beta$  3 el mecanismo de transporte pudiese ser anómalo (no fickiano), mientras que para la mayor cantidad el mecanismo sería el de difusión de Fick. Este último valor difiere un poco del valor antes mencionado para dicho mecanismo, esto lo podemos atribuir al hecho de que el tamaño de las NPs es polidisperso, como lo exhibe el PDI en la tabla 6.2.

Basado en estos hallazgos, la representación gráfica de Korsmeyer-Peppas para la concentración de  $0.4 \mu\text{g/mL}$  del TGF $\beta$  3, sugiere que el mecanismo de liberación (ver figura 6.7D) sucede de modo bifásico. La primera fase se caracteriza por una liberación rápida durante las primeras cuatro horas, que probablemente es el resultado de la solubilización de la proteína que se encuentra cerca de la superficie. La segunda fase se caracteriza por una liberación más lenta que podría atribuirse a la degradación de las NPs de CS que conduce a la difusión de la proteína atrapada. Los porcentajes de proteína liberada para las diferentes cantidades de TGF $\beta$  3 ( $0.26$  y  $0.4 \mu\text{g/mL}$ ) el primer día, fueron

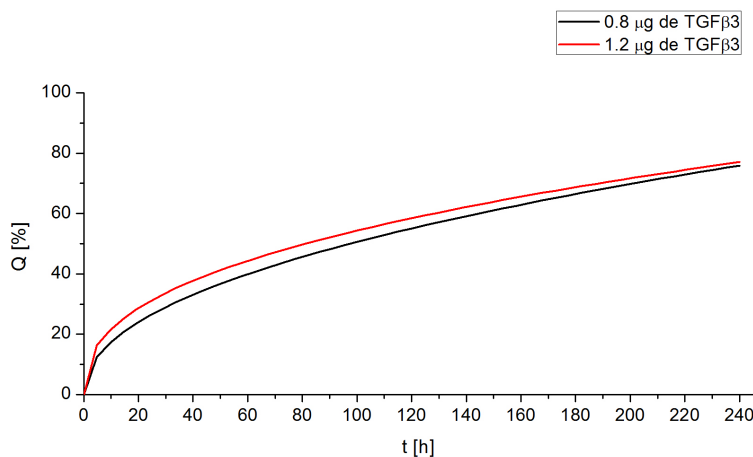


Figura 6.8: Comparativo del mecanismo de liberación de las NPs cargadas con 0.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TGF $\beta$  3, representado por el modelo de Korsmeyer-Peppas.

26.09% y 30.75% respectivamente (ver figura 6.8). Esto se puede entender debido a la cantidad de proteína cargada, siendo más alta la liberación inicial para las NPs con mayor proteína. De modo que al aumentar la cantidad de proteína dentro de la NP, aumenta el gradiente de difusión de la proteína hacia el medio induciendo una liberación más rápida de la misma y, en consecuencia, un mayor efecto ráfaga. El peso molecular de la proteína, es probable que también influya en la tasa de difusión. Al final del experimento de liberación (10 días) las NPs de CS aún estaban cargadas con un 75.94% y 77.07% respectivamente. Por tanto, ambos sistemas tenían la capacidad de proporcionar dosis sostenidas de proteína durante más de 10 días.

Entendemos que para ambas concentraciones de proteína, los mecanismos de liberación son diferentes debido a que, la introducción del medio de disolución en la matriz polimérica promueve procesos complejos que modifican la difusión continua, dando lugar a un comportamiento de liberación no fickiana para el caso de las NPs con menor cantidad de proteína encapsulada, pues el espacio disponible en el interior de las NPs es mayor.

Cabe aclarar que, la actividad biológica del TGF $\beta$  3 durante el experimento se atenúa, ya que se sabe que la mayoría de las proteínas se desnaturalizan cuando se exponen a condiciones ambientales duras como el calentamiento o la exposición a disolventes orgánicos. Para reducir el impacto de factores adversos, las NPs cargadas se prepararon a 4°C y se conservaron a -20°C, para

proteger al máximo la actividad biológica de la proteína. En este experimento se intentó cuantificar dicha atenuación o modificación de la proteína, mediante el análisis de las muestras con dicroísmo circular, conservando en lo posible las condiciones utilizadas para el kit ELISA, los resultados se exponen en la siguiente subsección.

### 6.3.2. Evaluación de la estructura del TGF $\beta$ 3 después de ser liberado de las NPs con dicroísmo circular

La preparación de las NPs sobre la estructura de la proteína TGF $\beta$  3 se evaluó mediante espectros de CD. Interacciones físicas débiles tales como interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals estabilizan la estructura secundaria de la proteína. Durante la formación de las NPs, el complejo CS/TPP interactúa ampliamente con el TGF $\beta$  3 que implica las fuerzas antes mencionadas. Estos procesos podrían cambiar la conformación tridimensional del TGF $\beta$  3. El análisis de CD se realizó para comprender el impacto de estos factores de formulación en la estructura de la proteína. El TGF $\beta$  3 recién resuspendido en solución PBS (pH 7.4) se seleccionó como control (solución estándar).

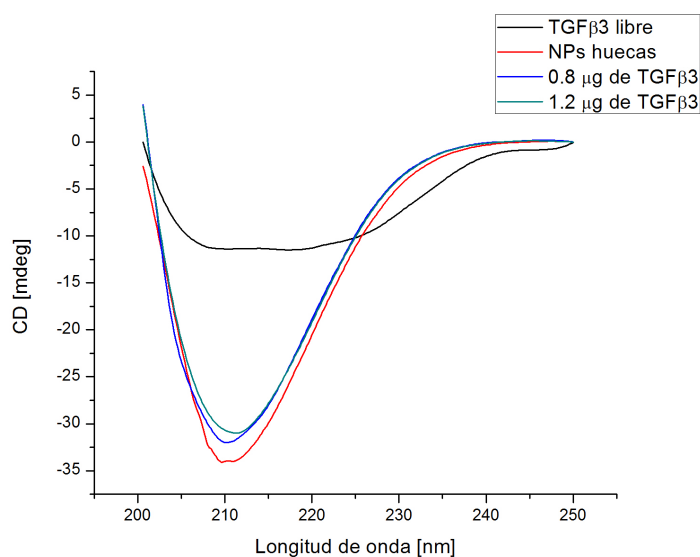


Figura 6.9: Espectros de dicroísmo circular de la solución estándar de TGF $\beta$  3, de las NPs sin proteína y del TGF $\beta$  3 después de ser liberado de las NPs. Las concentraciones de TGF $\beta$  3 utilizadas se indican en la figura.

La figura 6.9 representa el espectro de CD de la solución TGF $\beta$  3 estándar, la solución de NPs sin proteína y el TGF $\beta$  3 liberado de las NPs (para ambas cantidades de proteína). Los resultados muestran claramente una superposición



significativa en la forma del pico de toda la región estudiada para las NPs con y sin TGF $\beta$  3. No siendo así para el espectro correspondiente al TGF $\beta$  3 libre. A partir de estos datos podemos especular que la estructura del TGF $\beta$  3 fue perturbada debido a su encapsulación o tratamiento para la formación de las NPs. O la cantidad de proteína liberada está por debajo de los parámetros de sensibilidad del equipo de medición, aunque las diferencias entre los espectros de las NPs sin proteína y cargadas no muestran cambios importantes de señal.

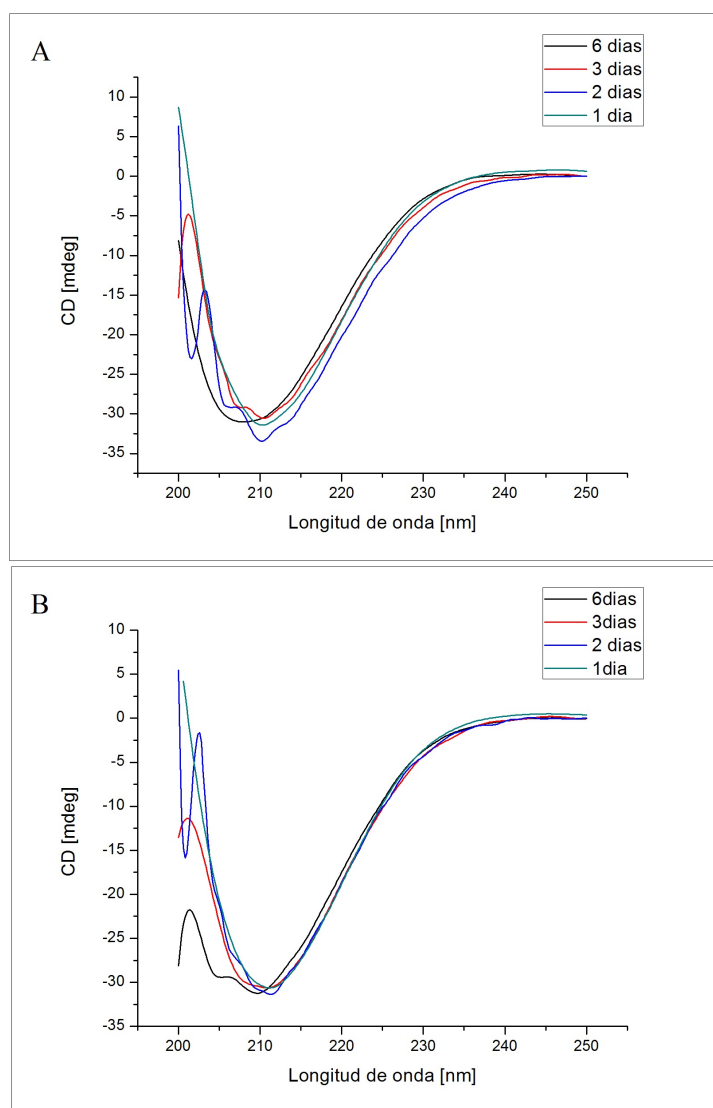


Figura 6.10: Evaluación temporal de 4 tiempos durante un periodo de 6 días de la estructura del TGF $\beta$  3 liberado de las NPs, mediante dicroísmo circular para ambas concentraciones de proteína: (A) 0.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y (B) 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TGF $\beta$  3.

Por otro lado al evaluar por separado la evolución temporal de las NPs cargadas con diferentes concentraciones de proteína (0.26 y 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ver figura 6.10, notamos que para ambos casos los espectros conservan la forma en el intervalo de longitud de onda de:  $\sim 210$  nm y 250 nm. Después de dicho intervalo las señales del espectro se amplía y aparece un segundo pico en 205 nm para ambos casos. Este comportamiento en los espectros se pueden entender como consecuencia de la degradación de la matriz polimérica en el tiempo.

Este estudio global nos abre todo un panorama al estudio de las NPs en este tipo de sistema. Con esto terminamos el trabajo de la tesis de maestría.

## Capítulo 7

# Conclusiones

En este estudio hemos evaluado la viabilidad de encapsular la proteína TGF $\beta$  3 en las NPs de CS mediante la técnica de reticulación iónica, usando TPP como agente reticulante. Las variables de formulación como la relación de masa de las soluciones CS/TPP y la cantidad de TGF $\beta$  3 inicialmente encapsulada influyen en las propiedades de las NPs, tales como el tamaño, la eficacia de encapsulación, el hinchamiento, la erosión y el comportamiento de liberación de la proteína. La relación de masa óptima entre CS/TPP fue 5:1 (w/w), y la eficiencia de encapsulamiento fue mayor para la concentración 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de TGF $\beta$  3. En las condiciones antes mencionadas, el tamaño de las NPs cargadas fue de 290.0 nm con un PDI y potencial zeta aceptables, ambos medidos por DLS; y una eficiencia de carga del 43.89%. Los estudios SEM y AFM revelaron NPs con superficies lisas y de forma esférica. La información referente al mecanismo de liberación de la proteína encapsulada en las NPs de CS se obtuvo al ajustar los datos correspondientes a los perfiles de liberación con el modelo de Korsmeyer-Peppas. Respecto a los resultados obtenidos por DC, tenemos que cuando la proteína está en NPs su concentración está por debajo de los límites de detección de señal de DC. De modo que no es posible concluir si hay modificaciones de la conformación tridimensional.

Los resultados del trabajo realizado nos conducen a la conclusión de que, el nanosistema y metodología utilizada para su preparación son adecuados para encapsular la proteína TGF $\beta$  3; sin embargo, si se requiere una carga mayor de TGF $\beta$  3 es necesario optimizar otras variables a las evaluadas en este trabajo.



## **Capítulo 8**

# **Perspectivas**



# Bibliografía

*Y así, del mucho leer y del poco dormir, se le  
secó el cerebro de manera que vino a perder  
el juicio.*

Miguel de Cervantes Saavedra

- ABDEL-HAMEED, S., EL-KADY, A. y MARZOUK, M. Magnetic glass ceramics for sustained 5-fluorouracil delivery: characterization and evaluation of drug release kinetics. *Materials Science and Engineering: C*, vol. 44, páginas 293–309, 2014.
- AGNIHOTRI, S. A., MALLIKARJUNA, N. N. y AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release*, vol. 100(1), páginas 5–28, 2004.
- AGRAWAL, P., STRIJKERS, G. J. y NICOLAY, K. Chitosan-based systems for molecular imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62(1), páginas 42–58, 2010.
- AGULLÓ, E., MATO, R., PENICHE, C., TAPIA, C., HERAS, A., PASTOR DE ABRAM, A. y PASTOR DE ABRAM, A. Generalidades. *Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú, páginas 44–8, 2004a.
- AGULLÓ, E., MATO, R., TAPIA, C., HERAS, A., SAN ROMÁN, J., ARGÜELLES, W., GOYCOOLEA, F., MAYORGA, A., NAKAMATSU, J. y PASTOR, A. Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. *Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú*, páginas 157–169, 2004b.
- AHMED, S. y IKRAM, S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achievements in the Life Sciences*, 2016.
- AL-QADI, S., GRENHA, A., CARRIÓN-RECIO, D., SEIJO, B. y REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: in vivo evaluation of insulin-loaded formulations. *Journal of controlled release*, vol. 157(3), páginas 383–390, 2012.



- ALSARRA, I. A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *International journal of biological macromolecules*, vol. 45(1), páginas 16–21, 2009.
- ALSARRA, I. A., BETIGERI, S. S., ZHANG, H., EVANS, B. A. y NEAU, S. H. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. *Biomaterials*, vol. 23(17), páginas 3637–3644, 2002.
- ALSBJÖRN, B. In search of an ideal skin substitute. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery*, vol. 18(1), páginas 127–133, 1984.
- ANSBORO, S., HAYES, J. S., BARRON, V., BROWNE, S., HOWARD, L., GREISER, U., LALOR, P., SHANNON, F., BARRY, F. P., PANDIT, A. ET AL. A chondromimetic microsphere for in situ spatially controlled chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Controlled Release*, vol. 179, páginas 42–51, 2014.
- ANTHONSEN, M. W., VÅRUM, K. M. y SMIDSRØD, O. Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of n-acetylation. *Carbohydrate Polymers*, vol. 22(3), páginas 193–201, 1993.
- AYDIN, Z. y AKBUÇŞA, J. Chitosan beads for the delivery of salmon calcitonin: preparation and release characteristics. *International journal of pharmaceutics*, vol. 131(1), páginas 101–103, 1996.
- BARTLETT, R. J. *Comparison of Ab Initio Quantum Chemistry with Experiment for Small Molecules: The State of the Art*. Springer Science & Business Media, 1985.
- BATTEN, T. y HOPKINS, C. Use of protein a-coated colloidal gold particles for immunoelectronmicroscopic localization of acth on ultrathin sections. *Histochemistry*, vol. 60(3), páginas 317–320, 1979.
- BAWA, R. Will the nanomedicine âpatent land grabâ thwart commercialization? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 1(4), páginas 346–350, 2005.
- BEANEY, P., LIZARDI-MENDOZA, J. y HEALY, M. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 80(2), páginas 145–150, 2005.
- BERGER, J., REIST, M., MAYER, J. M., FELT, O., PEPPAS, N. y GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 57(1), páginas 19–34, 2004.
- BHATTARAI, N., GUNN, J. y ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 62(1), páginas 83–99, 2010.

- BINNIG, G., QUATE, C. F. y GERBER, C. Atomic force microscope. *Physical review letters*, vol. 56(9), página 930, 1986.
- BIRRENBACH, G. y SPEISER, P. Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 65(12), páginas 1763–1766, 1976.
- BLASI, P., GIOVAGNOLI, S., SCHOUBBEN, A., RICCI, M. y ROSSI, C. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 59(6), páginas 454–477, 2007.
- BODMEIER, R., OH, K.-H. y PRAMAR, Y. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 15(9), páginas 1475–1494, 1989.
- BRACK, H., TIRMIZI, S. y RISEN, W. A spectroscopic and viscometric study of the metal ion-induced gelation of the biopolymer chitosan. *Polymer*, vol. 38(10), páginas 2351–2362, 1997.
- BRIO LEON, M. Á. y ROVIRA, P. R. *Manual de bases teórico prácticas de inmunotoxicología*. Universidad de Oviedo, 1995.
- BRUCHEZ, M., MORONNE, M., GIN, P., WEISS, S. y ALIVISATOS, A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *science*, vol. 281(5385), páginas 2013–2016, 1998.
- BURGESS, R. *Understanding nanomedicine: an introductory textbook*. CRC Press, 2012.
- BUTOESCU, N., SEEMAYER, C. A., FOTI, M., JORDAN, O. y DOELKER, E. Dexamethasone-containing plga superparamagnetic microparticles as carriers for the local treatment of arthritis. *Biomaterials*, vol. 30(9), páginas 1772–1780, 2009.
- CALVO, P., REMUNAN-LOPEZ, C., VILA-JATO, J. y ALONSO, M. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 63(1), páginas 125–132, 1997a.
- CALVO, P., REMUÑAN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J. L. y ALONSO, M. J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical research*, vol. 14(10), páginas 1431–1436, 1997b.
- CANTOR, C. R. y SCHIMMEL, P. R. *Biophysical Chemistry: Techniques for the Study of Biological Structure and Function. II*. WH Freeman, 1980.
- CHEN, R. H. y TSAIH, M. L. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute hcl solution. *International journal of biological macromolecules*, vol. 23(2), páginas 135–141, 1998.

- CHEN, S., ZHU, J. y CHENG, J. Preparation and in vitro evaluation of a novel combined multiparticulate delayed-onset sustained-release formulation of diltiazem hydrochloride. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 62(12), páginas 907–913, 2007.
- CHOI, B., LEE, Y., PI, J., JEONG, Y., BAEK, K. y YOON, J. Overproduction of recombinant human transforming growth factor beta 3 in chinese hamster ovary cells. *Protein expression and purification*, vol. 110, páginas 102–106, 2015.
- CLARK, R. *The molecular and cellular biology of wound repair*. Springer Science & Business Media, 2013.
- COLIC, M., FISHER, M. L. y FRANKS, G. V. Influence of ion size on short-range repulsive forces between silica surfaces. *Langmuir*, vol. 14(21), páginas 6107–6112, 1998.
- COSTA, P. y LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*, vol. 13(2), páginas 123–133, 2001.
- COX, D. A. Transforming growth factor-beta 3. *Cell biology international*, vol. 19(5), páginas 357–372, 1995.
- CROWTHER, J. R. *The ELISA guidebook*, vol. 149. Springer Science & Business Media, 2000.
- DAI, T., TANAKA, M., HUANG, Y.-Y. y HAMBLIN, M. R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert review of anti-infective therapy*, vol. 9(7), páginas 857–879, 2011.
- DASH, M., CHIELLINI, F., OTTENBRITE, R. y CHIELLINI, E. Chitosan: a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*, vol. 36(8), páginas 981–1014, 2011.
- DASH, S., MURTHY, P. N., NATH, L. y CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, vol. 67(3), páginas 217–23, 2010.
- DOADRIO VILLAREJO, A. y VALLET REGÍ, M. Liberación de fármacos en matrices biocerámicas. *Monografía XIX. Avances y perspectivas. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia*, 2006.
- DODANE, V. y VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, vol. 1(6), páginas 246–253, 1998.
- DOKTOROVOVA, S. y SOUTO, E. B. Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery: a comprehensive review. *Expert opinion on drug delivery*, vol. 6(2), páginas 165–176, 2009.

- DONG, Y., NG, W. K., SHEN, S., KIM, S. y TAN, R. B. Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. *Carbohydrate polymers*, vol. 94(2), páginas 940–945, 2013.
- DOUGLAS, S., DAVIS, S. y ILLUM, L. Nanoparticles in drug delivery. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, vol. 3(3), páginas 233–261, 1986.
- DRAGET, K. I., VÄRUM, K. M., MOEN, E., GYNNILD, H. y SMIDSRØD, O. Chitosan cross-linked with mo (vi) polyoxyanions: a new gelling system. *Biomaterials*, vol. 13(9), páginas 635–638, 1992.
- DREXLER, K. E. Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 78(9), páginas 5275–5278, 1981.
- DUMITRIU, S. y CHORNET, E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 31(3), páginas 223–246, 1998.
- DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*, vol. 2(5), páginas 347–360, 2003.
- DUREJA, H., TIWARY, A. y GUPTA, S. Simulation of skin permeability in chitosan membranes. *International journal of pharmaceutics*, vol. 213(1), páginas 193–198, 2001.
- EIGLER, D. M. y SCHWEIZER, E. K. Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. *Nature*, vol. 344(6266), páginas 524–526, 1990.
- ERIC, D. K. Engines of creation. the coming era of nanotechnology. 1986.
- FÀBREGAS, A., MIÑARRO, M., GARCÍA-MONTOYA, E., PÉREZ-LOZANO, P., CARRILLO, C., SARRATE, R., SÁNCHEZ, N., TICÓ, J. y SUÑÉ-NEGRE, J. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan–tripolyphosphate nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, vol. 446(1), páginas 199–204, 2013.
- FAN, W., YAN, W., XU, Z. y NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 90, páginas 21–27, 2012.
- FERGUSON, M. W. y O'KANE, S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, vol. 359(1445), páginas 839–850, 2004.
- FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the bottom. *Miniaturization*"(HD Gilbert, ed.) Reinhold, New York, 1961.

- FREIER, T., KOH, H. S., KAZAZIAN, K. y SHOICHET, M. S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by n-acetylation. *Biomaterials*, vol. 26(29), páginas 5872–5878, 2005.
- FREIFELDER, D. *Técnicas de bioquímica y biología molecular*, vol. 3. Reverté, 1981.
- FREITAS, R. A. Exploratory design in medical nanotechnology: a mechanical artificial red cell. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, vol. 26(4), páginas 411–430, 1998.
- FUENTES, G., LARA, A., PEÓN, E. y TORRES, M. Preliminary evaluation of tetracycline/hema+ hap composites as bone substitutes and drug controlled delivery matrixes. *Latin American applied research*, vol. 35(1), páginas 9–14, 2005.
- GAN, Q., WANG, T., COCHRANE, C. y MCCARRON, P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–tpp nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 44(2), páginas 65–73, 2005.
- GAN, S. D. y PATEL, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 133(9), páginas 1–3, 2013.
- GÉRENTES, P., VACHOUD, L., DOURY, J. y DOMARD, A. Study of a chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery. *Biomaterials*, vol. 23(5), páginas 1295–1302, 2002.
- GRASSI, M. y GRASSI, G. Mathematical modelling and controlled drug delivery: matrix systems. *Current drug delivery*, vol. 2(1), páginas 97–116, 2005.
- GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*, vol. 1(6), páginas 2876–2890, 2006.
- GRENHA, A. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *Journal of drug targeting*, vol. 20(4), páginas 291–300, 2012.
- GU, C., LE, V., LANG, M. y LIU, J. Preparation of polysaccharide derivatives chitosan-graft-poly (ε-caprolactone) amphiphilic copolymer micelles for 5-fluorouracil drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 116, páginas 745–750, 2014.
- GUO, X., LIAO, J., PARK, H., SARAF, A., RAPHAEL, R. M., TABATA, Y., KASPER, F. K. y MIKOS, A. G. Effects of  $\text{tgf-}\beta\text{3}$  and preculture period of osteogenic cells on the chondrogenic differentiation of rabbit marrow mesenchymal stem cells encapsulated in a bilayered hydrogel composite. *Acta biomaterialia*, vol. 6(8), páginas 2920–2931, 2010a.

- GUO, X., PARK, H., YOUNG, S., KRETLOW, J. D., VAN DEN BEUCKEN, J. J., BAGGETT, L. S., TABATA, Y., KASPER, F. K., MIKOS, A. G. y JANSEN, J. A. Repair of osteochondral defects with biodegradable hydrogel composites encapsulating marrow mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Acta biomaterialia*, vol. 6(1), páginas 39–47, 2010b.
- HAMIDI, M., AZADI, A. y RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60(15), páginas 1638–1649, 2008.
- HAMMES, G. G. *Spectroscopy for the biological sciences*. John Wiley & Sons, 2005.
- HARLOW, E., LANE, D. ET AL. A laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory*, vol. 579, 1988.
- HINTERDORFER, P. y DUFRÊNE, Y. F. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nature methods*, vol. 3(5), páginas 347–355, 2006.
- HOEMANN, C. y FONG, D. Immunological responses to chitosan for biomedical applications. *Chitosan Based Biomaterials Volume 1: Fundamentals*, página 45, 2016.
- HOLLAND, T., BODDE, E., CUIJPERS, V., BAGGETT, L., TABATA, Y., MIKOS, A. y JANSEN, J. Degradable hydrogel scaffolds for in vivo delivery of single and dual growth factors in cartilage repair. *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 15(2), páginas 187–197, 2007.
- HOPPE-SEILER, F. Chitin and chitosan. *Ber Dtsch Chem Ges*, vol. 27, páginas 3329–31, 1994.
- HORISAWA, E., KUBOTA, K., TUBOI, I., SATO, K., YAMAMOTO, H., TAKEUCHI, H. y KAWASHIMA, Y. Size-dependency of dl-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. *Pharmaceutical research*, vol. 19(2), páginas 132–139, 2002.
- HOSOKAWA, J., NISHIYAMA, M., YOSHIHARA, K. y KUBO, T. Biodegradable film derived from chitosan and homogenized cellulose. *Industrial & engineering chemistry research*, vol. 29(5), páginas 800–805, 1990.
- HOWLES, P. N. Transforming growth factor  $\beta$ 3: Pharmacological properties and physiological functions. *Clinical Immunology Newsletter*, vol. 17(8), páginas 109–117, 1997.
- HUSH, N. S. An overview of the first half-century of molecular electronics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1006(1), páginas 1–20, 2003.
- IIJIMA, S., AJAYAN, P. y ICHIHASHI, T. Growth model for carbon nanotubes. *Physical review letters*, vol. 69(21), página 3100, 1992.

- ILIUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical research*, vol. 15(9), páginas 1326–1331, 1998.
- JAIN, K. K. *The handbook of nanomedicine*. Springer Science & Business Media, 2012.
- JAISWAL, M., CHAUHAN, D. y SANKARARAMAKRISHNAN, N. Copper chitosan nanocomposite: synthesis, characterization, and application in removal of organophosphorous pesticide from agricultural runoff. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 19(6), páginas 2055–2062, 2012.
- JEN, A., MADÖRIN, K., VOSBECK, K., ARVINTE, T. y MERKLE, H. Transforming growth factor  $\beta$ -3 crystals as reservoirs for slow release of active  $\text{tgf-}\beta$ 3. *Journal of controlled release*, vol. 78(1), páginas 25–34, 2002.
- JIANG, T., JAMES, R., KUMBAR, S. y LAURENCIN, C. Chitosan as a biomaterial: structure, properties, and applications in tissue engineering and drug delivery. *Natural and synthetic biomedical polymers*, vol. 5, páginas 91–113, 2014.
- KAMMONA, O. y KIPARISSIDES, C. Recent advances in nanocarrier-based mucosal delivery of biomolecules. *Journal of controlled release*, vol. 161(3), páginas 781–794, 2012.
- KANE, C. J., HEBDA, P. A., MANSBRIDGE, J. N. y HANAWALT, P. C. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor  $\beta$ 1 expression during cutaneous wound healing. *Journal of cellular physiology*, vol. 148(1), páginas 157–173, 1991.
- KARAS, M. y HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry*, vol. 60(20), páginas 2299–2301, 1988.
- KAS, H. S. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *Journal of Microencapsulation*, vol. 14(6), páginas 689–711, 1997.
- KASHYAB, P. L., XIANG, X. y HEIDEN, P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International journal of biological macromolecules*, vol. 77, páginas 36–51, 2015.
- KAWASHIMA, Y., HANDA, T., KASAI, A., TAKENAKA, H., LIN, S. y ANDO, Y. Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate–chitosan. *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 74(3), páginas 264–268, 1985.
- KEIDERLING, T., BEROVA, N., NAKANISHI, K. y WOODY, R. Circular dichroism: Principles and applications. *New York*, 2000.

- KHOR, L., E.; LIM. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, vol. 24, páginas 2339–2349, 2003.
- KONG, M., CHEN, X. G., XING, K. y PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, vol. 144(1), páginas 51–63, 2010.
- KRAJEWSKA, B. Diffusional properties of chitosan hydrogel membranes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 76(6), páginas 636–642, 2001.
- KREUTER, J. Drug targeting with nanoparticles. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, vol. 19(3), páginas 253–256, 1994.
- KUBIK, T., BOGUNIA-KUBIK, K. y SUGISAKA, M. Nanotechnology on duty in medical applications. *Current pharmaceutical biotechnology*, vol. 6(1), páginas 17–33, 2005.
- KUBOTA, N. y KIKUCHI, Y. Preparation and properties of macromolecular complexes consisting of chitosan derivatives and potassium metaphosphate. *Die Makromolekulare Chemie*, vol. 193(2), páginas 559–566, 1992.
- KUMARI, A., YADAV, S. K. y YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 75(1), páginas 1–18, 2010.
- KUNJACHAN, S., JOSE, S. y LAMMERS, T. Understanding the mechanism of ionic gelation for synthesis of chitosan nanoparticles using qualitative techniques. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, vol. 4(2), 2014.
- KURITA, K., KAJI, Y., MORI, T. y NISHIYAMA, Y. Enzymatic degradation of  $\beta$ -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, vol. 42(1), páginas 19–21, 2000.
- LAM, J., LU, S., KASPER, F. K. y MIKOS, A. G. Strategies for controlled delivery of biologics for cartilage repair. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 84, páginas 123–134, 2015.
- LEE, J. W., KIM, S. Y., KIM, S. S., LEE, Y. M., LEE, K. H. y KIM, S. J. Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly (acrylic acid). *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 73(1), páginas 113–120, 1999.
- LEE, K. Y., HA, W. S. y PARK, W. H. Blood compatibility and biodegradability of partially n-acylated chitosan derivatives. *Biomaterials*, vol. 16(16), páginas 1211–1216, 1995.



- LEHN, J.-M. Supramolecular chemistryâscope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices (nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 27(1), páginas 89–112, 1988.
- LEVINE, J., MOSES, H., GOLD, L. y NANNEY, L. Spatial and temporal patterns of immunoreactive transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 during excisional wound repair. *The American journal of pathology*, vol. 143(2), página 368, 1993.
- LIU, L.-S., LIU, S.-Q., NG, S. Y., FROIX, M., OHNO, T. y HELLER, J. Controlled release of interleukin-2 for tumour immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres. *Journal of Controlled Release*, vol. 43(1), páginas 65–74, 1997.
- LIU, Z., JIAO, Y., WANG, Y., ZHOU, C. y ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60(15), páginas 1650–1662, 2008.
- MERKUS, H. G. *Particle size measurements: fundamentals, practice, quality*, vol. 17. Springer Science & Business Media, 2009.
- MI, F.-L., CHEN, C.-T., TSENG, Y.-C., KUAN, C.-Y. y SHYU, S.-S. Iron (iii)-carboxymethylchitin microsphere for the ph-sensitive release of 6-mercaptopurine. *Journal of controlled release*, vol. 44(1), páginas 19–32, 1997.
- MI, F.-L., SHYU, S.-S., LEE, S.-T. y WONG, T.-B. Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 37(14), páginas 1551–1564, 1999a.
- MI, F.-L., SHYU, S.-S., WONG, T.-B., JANG, S.-F., LEE, S.-T. y LU, K.-T. Chitosan-polyelectrolyte complexation for the preparation of gel beads and controlled release of anticancer drug. ii. effect of ph-dependent ionic crosslinking or interpolymer complex using tripolyphosphate or polyphosphate as reagent. *Journal of applied polymer science*, vol. 74(5), páginas 1093–1107, 1999b.
- MIERISCH, C. M., COHEN, S. B., JORDAN, L. C., ROBERTSON, P. G., BALIAN, G. y DIDUCH, D. R. Transforming growth factor- $\beta$  in calcium alginate beads for the treatment of articular cartilage defects in the rabbit. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 18(8), páginas 892–900, 2002.
- MISHRA, A. K. *Nanomedicine for drug delivery and therapeutics*. John Wiley & Sons, 2013.

- MOLINARO, G., LEROUX, J.-C., DAMAS, J. y ADAM, A. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials. *Biomaterials*, vol. 23(13), páginas 2717–2722, 2002.
- MONTASSER, I., FESSI, H. y COLEMAN, A. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 54(3), páginas 281–284, 2002.
- MORROW, K. J., BAWA, R. y WEI, C. Recent advances in basic and clinical nanomedicine. *Medical Clinics of North America*, vol. 91(5), páginas 805–843, 2007.
- MURUGAN, K., CHOONARA, Y. E., KUMAR, P., BIJUKUMAR, D., DU TOIT, L. C. y PILLAY, V. Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures. *International journal of nanomedicine*, vol. 10, página 2191, 2015.
- NAGPAL, K., SINGH, S. K. y MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 58(11), páginas 1423–1430, 2010.
- NASTI, A., ZAKI, N. M., DE LEONARDIS, P., UNGPHAIBOON, S., SANSONGSAK, P., RIMOLI, M. G. y TIRELLI, N. Chitosan/tpp and chitosan/tpp-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. *Pharmaceutical research*, vol. 26(8), páginas 1918–1930, 2009.
- OBER, C. A. y GUPTA, R. B. Nanoparticle technology for drug delivery. *Ideas Concyteg*, vol. 6(72), páginas 714–726, 2011.
- O'BRIEN, R. W. y HUNTER, R. J. The electrophoretic mobility of large colloidal particles. *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 59(13), páginas 1878–1887, 1981.
- OCCLESTON, N. L., FAIRLAMB, D., HUTCHISON, J., O'KANE, S. y FERGUSON, M. W. Avotermin for the improvement of scar appearance: a new pharmaceutical in a new therapeutic area. *Expert opinion on investigational drugs*, vol. 18(8), páginas 1231–1239, 2009.
- PAN, Y., LI, Y.-J., ZHAO, H.-Y., ZHENG, J.-M., XU, H., WEI, G., HAO, J.-S. ET AL. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International journal of pharmaceuticals*, vol. 249(1), páginas 139–147, 2002.
- PARK, J. H., SARAVANAKUMAR, G., KIM, K. y KWON, I. C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 62(1), páginas 28–41, 2010.

- PARK, J. S., YANG, H. N., WOO, D. G., CHUNG, H.-M. y PARK, K.-H. In vitro and in vivo chondrogenesis of rabbit bone marrow-derived stromal cells in fibrin matrix mixed with growth factor loaded in nanoparticles. *Tissue Engineering Part A*, vol. 15(8), páginas 2163–2175, 2009.
- PAUL, W. y SHARMA, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs*, vol. 18(1), páginas 18–23, 2004.
- POLK, A., AMSDEN, B., DE YAO, K., PENG, T. y GOOSEN, M. Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 83(2), páginas 178–185, 1994.
- PRASITSILP, M., JENWITHISUK, R., KONGSUWAN, K., DAMRONGCHAI, N. y WATTS, P. Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. *Journal of materials science: materials in medicine*, vol. 11(12), páginas 773–778, 2000.
- PROTOCOLS, C. S. H. Phosphate-buffered saline (pbs). Available: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247.short>, 2006.
- QUINN, K., COURTNEY, J. M., EVANS, J., GAYLOR, J. y REID, W. Principles of burn dressings. *Biomaterials*, vol. 6(6), páginas 369–377, 1985.
- QUN, G. y AJUN, W. Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution. *Carbohydrate Polymers*, vol. 64(1), páginas 29–36, 2006.
- RABEA, E. I., BADAWY, M. E.-T., STEVENS, C. V., SMAGGHE, G. y STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, vol. 4(6), páginas 1457–1465, 2003.
- RADIN, S., CHEN, T. y DUCHEYNE, P. The controlled release of drugs from emulsified, sol gel processed silica microspheres. *Biomaterials*, vol. 30(5), páginas 850–858, 2009.
- REMUNAN-LOPEZ, C. y BODMEIER, R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of Controlled Release*, vol. 44(2), páginas 215–225, 1997.
- RICCI, M., BLASI, P., GIOVAGNOLI, S., PERIOLI, L., VESCOVI, C. y ROSSI, C. Leucicostatin-a loaded nanospheres: characterization and in vivo toxicity and efficacy evaluation. *International journal of pharmaceutics*, vol. 275(1), páginas 61–72, 2004.
- RINAUDO, M. Characterization and properties of some polysaccharides used as biomaterials. En *Macromolecular Symposia*, vol. 245, páginas 549–557. Wiley Online Library, 2006.

- RISBUD, M., BHONDE, M. y BHONDE, R. Chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel does not activate macrophages: potentials for transplantation applications. *Cell transplantation*, vol. 10(2), páginas 195–202, 2001.
- RITGER, P. L. y PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release i. fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of controlled release*, vol. 5(1), páginas 23–36, 1987.
- ROBERTS, A. B. y SPORN, M. B. Transforming growth factor- $\beta$ . En *The molecular and cellular biology of wound repair*, páginas 275–308. Springer, 1988.
- ROBERTS, A. B. y SPORN, M. B. The transforming growth factor- $\beta$ s. En *Peptide growth factors and their receptors I*, páginas 419–472. Springer, 1990.
- ROBERTS, G. Chitosan production routes and their role in determining the structure and properties of the product. *Advances in chitin science*, vol. 2, páginas 22–31, 1997.
- ROBERTS, G. A. Structure of chitin and chitosan. En *Chitin Chemistry*, páginas 1–53. Springer, 1992.
- ROCO, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current opinion in biotechnology*, vol. 14(3), páginas 337–346, 2003.
- ROSEN, H. y ABRIBAT, T. The rise and rise of drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 4(5), páginas 381–385, 2005.
- RUEL-GARIEPY, E., CHENITE, A., CHAPUT, C., GUIRGUIS, S. y LEROUX, J.-C. Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 203(1), páginas 89–98, 2000.
- SÁ BARRETO, L. C. L. D. *Utilidad de algunos copolímeros acrílicos para el control de liberación de fármacos en pelets matriciales elaborados por extrusión-esferonización*. Universidade de Santiago de Compostela. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico, 2009.
- SAHARAN, V. y PAL, A. Chitosan based nanomaterials in plant growth and protection. *SpringerBriefs in plant science*, 2016.
- SAHARAN, V., SHARMA, G., YADAV, M., CHOUDHARY, M. K., SHARMA, S., PAL, A., RALIYA, R. y BISWAS, P. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International journal of biological macromolecules*, vol. 75, páginas 346–353, 2015.

- SANTO, V. E., GOMES, M. E., MANO, J. F. y REIS, R. L. From nano-to macro-scale: nanotechnology approaches for spatially controlled delivery of bioactive factors for bone and cartilage engineering. *Nanomedicine*, vol. 7(7), páginas 1045–1066, 2012.
- SANTO, V. E., GOMES, M. E., MANO, J. F. y REIS, R. L. Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineeringâpart i: recapitulation of native tissue healing and variables for the design of delivery systems. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 19(4), páginas 308–326, 2013.
- ŞENEL, S. y MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 56(10), páginas 1467–1480, 2004.
- SEZER, A. y AKBUÇŞA, J. Controlled release of piroxicam from chitosan beads. *International journal of pharmaceutics*, vol. 121(1), páginas 113–116, 1995.
- SHAH, M., FOREMAN, D. M. y FERGUSON, M. Neutralisation of tgf-beta 1 and tgf-beta 2 or exogenous addition of tgf-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of cell science*, vol. 108(3), páginas 985–1002, 1995.
- SHAW, R. Dynamic light scattering training: Achieving reliable nano particle sizing. 2013.
- SHIRAISHI, S., IMAI, T. y OTAGIRI, M. Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation. *Journal of controlled release*, vol. 25(3), páginas 217–225, 1993.
- SHMULEWITZ, A., LANGER, R. y PATTON, J. Convergence in biomedical technology. *Nature Biotechnology*, vol. 24(3), página 277, 2006.
- SHU, X. y ZHU, K. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 201(1), páginas 51–58, 2000.
- SHU, X. y ZHU, K. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 233(1), páginas 217–225, 2002a.
- SHU, X. y ZHU, K. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 54(2), páginas 235–243, 2002b.
- SHU, X., ZHU, K. y SONG, W. Novel ph-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. *International journal of pharmaceutics*, vol. 212(1), páginas 19–28, 2001.

- SONGSURANG, K., PRAPHAIRAKSIT, N., SIRALEARTMUKUL, K. y MUANGSIN, N. Electrospray fabrication of doxorubicin-chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of doxorubicin. *Archives of pharmacal research*, vol. 34(4), páginas 583–592, 2011.
- SONIA, T. y SHARMA, C. P. Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective. En *Chitosan for biomaterials I*, páginas 23–53. Springer, 2011.
- SOSA, M. G. y MACÍAS, S. M. El factor de crecimiento transformante beta (tgfb): funciones y vías de transducción. *Facultad de Medicina UNAM. REB*, vol. 23(1), páginas 3–11, 2004.
- DE SOUSA, H. C., BRAGA, M. E. y SOSNIK, A. *Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados*. Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press, 2015.
- SPORN, M. B., ROBERTS, A. B., WAKEFIELD, L. M. y ASSOIAN, R. K. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science*, vol. 233(4763), páginas 532–534, 1986.
- SREERAMA, N. y WOODY, R. W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods in enzymology*, vol. 383, páginas 318–351, 2004.
- SYNOWIECKI, J. y AL-KHATEEB, N. A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. 2003.
- THANOU, M., VERHOEF, J. y JUNGINGER, H. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 50, páginas S91–S101, 2001.
- THARANATHAN, R. N. y KITTUR, F. S. Chitinâthe undisputed biomolecule of great potential. 2003.
- TIWARI, A., PATRA, H. K. y WANG, X. *Advanced Materials Interfaces*. John Wiley & Sons, 2016.
- TOMALIA, D., BAKER, H., DEWALD, J., HALL, M., KALLOS, G., MARTIN, S., ROECK, J., RYDER, J. y SMITH, P. A new class of polymers: Starburst-dendritic. *Polymer Journal*, vol. 17(1), páginas 117–132, 1985.
- TRUONG-LE, V. L., AUGUST, J. T. y LEONG, K. W. Controlled gene delivery by dna-gelatin nanospheres. *Human gene therapy*, vol. 9(12), páginas 1709–1717, 1998.
- TSAIH, M. L. y CHEN, R. H. Molecular weight determination of 83 % degree of decetylation chitosan with non-gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. *Journal of applied polymer science*, vol. 71(11), páginas 1905–1913, 1999.

- UENO, H., YAMADA, H., TANAKA, I., KABA, N., MATSUURA, M., OKUMURA, M., KADOSAWA, T. y FUJINAGA, T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*, vol. 20(15), páginas 1407–1414, 1999.
- VAZQUEZ, B., GURRUCHAGA, M. y GONI, I. Hydrogels based on graft copolymerization of hema/bma mixtures onto soluble gelatin: swelling behaviour. *Polymer*, vol. 36(11), páginas 2311–2314, 1995.
- VESENKA, J., MANNE, S., GIBERSON, R., MARSH, T. y HENDERSON, E. Colloidal gold particles as an incompressible atomic force microscope imaging standard for assessing the compressibility of biomolecules. *Biophysical journal*, vol. 65(3), página 992, 1993.
- WALLINGFORD, J. B., LIU, K. J. y ZHENG, Y. *Xenopus*. *Current Biology*, vol. 20(6), páginas R263–R264, 2010.
- WAN, Y., CREBER, K. A., PEPPLEY, B. y TAM BUI, V. Ionic conductivity and tensile properties of hydroxyethyl and hydroxypropyl chitosan membranes. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 42(8), páginas 1379–1397, 2004.
- WANG, W., LI, B., YANG, J., XIN, L., LI, Y., YIN, H., QI, Y., JIANG, Y., OUYANG, H. y GAO, C. The restoration of full-thickness cartilage defects with bmscs and tgf-beta 1 loaded plga/fibrin gel constructs. *Biomaterials*, vol. 31(34), páginas 8964–8973, 2010.
- WEBSTER, P. World nanobiotechnology market. *Frost & Sullivan*, 2005.
- WOLFE, J., PAULL, R. y HERBERT, P. The nanotech report. *New York: Lux Capital*, 2003.
- WORLDWIDE, M. I. Dynamic light scattering, common terms defined. *Inform white paper. Malvern Instruments Limited*, páginas 1–6, 2011.
- XU, J., HOU, Z., YUAN, X. y GUO, H. Observation particle morphology of colloidal system by conventional sem with an improved specimen preparation technique. *Microscopy research and technique*, vol. 74(8), páginas 749–755, 2011.
- XU, Y. y DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International journal of pharmaceuticals*, vol. 250(1), páginas 215–226, 2003.
- Y. KAWASHIMA, A. K. H. T. S. L., T. HANDA. The effects of thickness and hardness of the coating film on the drug release rate of theophylline granules coated with chitosan-sodium tripolyphosphate complex. *Chemical and pharmaceutical Bulletin*, vol. 33(6), páginas 2469–2474, 1985.

- YI, H., WU, L.-Q., BENTLEY, W. E., GHODSSI, R., RUBLOFF, G. W., CULVER, J. N. y PAYNE, G. F. Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, vol. 6(6), páginas 2881–2894, 2005.
- ZETA, P. Un curso completo en 5 minutos. Available: [www.zeter-meter.com/contact.htm](http://www.zeter-meter.com/contact.htm), 1997.
- ZHANG, H. y NEAU, S. H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, vol. 22(12), páginas 1653–1658, 2001.
- ZHANG, L., GU, F., CHAN, J., WANG, A., LANGER, R., FAROKHZAD, O. ET AL. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. 83(5), páginas 761–769, 2008.
- ZHANG, S. y KAWAKAMI, K. One-step preparation of chitosan solid nanoparticles by electrospray deposition. *International journal of pharmaceutics*, vol. 397(1), páginas 211–217, 2010.
- ZHANG, Y., HUO, M., ZHOU, J., ZOU, A., LI, W., YAO, C. y XIE, S. Ddsolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS journal*, vol. 12(3), páginas 263–271, 2010.
- ZOLNIK, B. S., GONZALEZ-FERNANDEZ, A., SADRIEH, N. y DOBROVOLSKAIA, M. A. Minireview: nanoparticles and the immune system. *Endocrinology*, vol. 151(2), páginas 458–465, 2010.



*–¿Qué te parece desto, Sancho? – Dijo Don Quijote –  
Bien podrán los encantadores quitarme la ventura,  
pero el esfuerzo y el ánimo, será imposible.*

*Segunda parte del Ingenioso Caballero  
Don Quijote de la Mancha  
Miguel de Cervantes*

*–Buena está – dijo Sancho –; fírmela vuestra merced.  
–No es menester firmarla – dijo Don Quijote–,  
sino solamente poner mi rúbrica.*

*Primera parte del Ingenioso Caballero  
Don Quijote de la Mancha  
Miguel de Cervantes*

