



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**“MICROPARTÍCULAS POROSAS  
NANOESTRUCTURADAS DE QUITOSANO  
ACARREADORAS DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS”**

---

Por:

Karla Zuleika Saborit Pino

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Hermosillo, Sonora

Enero 2015

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Karla Zuleika Saborit Pino, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



---

Dr. Jaime Lizardi Mendoza  
Director de tesis



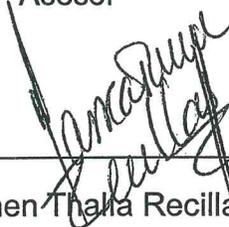
---

Dra. Elizabeth Carvajal Millán  
Asesor



---

Dra. Yolanda Leticia López Franco  
Asesor



---

Dra. Maricarmen Thalia Recillas Mota  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Directo General

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado durante mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por permitirme realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones.

Al proyecto CONACyT CB-2011-01-169626, titulado: “Formación y propiedades de estructuras porosas nanoestructuradas de quitosano”.

A mi director de tesis, el Dr. Jaime Lizardi Mendoza. Mi más sincero agradecimiento por compartir su conocimiento conmigo. Gracias por su paciencia y por apoyarme en cada paso de este gran proyecto.

Al comité de tesis Dra. Elizabeth Carvajal, Dra. Yolanda L. López Franco y Dra. Maricarmen T. Recillas Mota, por dedicarle tiempo a mi trabajo y ayudarme a mejorarlo en todos los aspectos.

A la M. en C. Alma Rosa Toledo Guillén y a la M. en C. Karla Guadalupe Martínez Robinson, por ayudarme con el trabajo en el laboratorio y facilitarme el aprendizaje en el manejo de los equipos.

A la Q.B. Alma Consuelo Campa Mada, por su gran apoyo técnico y por compartir buenos momentos conmigo. Gracias por su amistad.

Al M. en C. Orlando Tortoledo, por brindarme su apoyo permitiéndome el uso del equipo de HPLC en el Laboratorio de Cromatografía de la Coordinación de Nutrición del CIAD.

A mis compañeros de laboratorio Jorge Márquez, Ana Luisa Martínez, Javier Caro, Gonzalo Santos, Rita Paz y Mayra Méndez por sus buenos consejos, por su apoyo y por hacer más divertido el trabajo cada día.

A mis amigos Nancy Rodríguez, Alejandra Chávez, Esmeralda Urías, Ernesto Gallardo y Jonathan Díaz, por brindarme su amistad dentro y fuera del CIAD desde el primer semestre.

A mis mejores amigos Víctor Reyna y Jennifer Val, por estar siempre que los necesito, por compartir su sabiduría y ayudarme a salir adelante en los malos momentos. Gracias por esperarme cuando me ausento y porque sé que celebran este logro tan importante junto conmigo.

Agradezco infinitamente a mi familia que siempre me alienta a seguir adelante, a superarme y crecer profesionalmente. Gracias por permanecer unida, aunque tengamos que alejarnos para cumplir nuestras metas personales.

Un agradecimiento especial a mi novio Aarón Javalera, que ha ido de la mano conmigo cumpliendo esta meta. Gracias por tu gran apoyo y por haber hecho que esto haya valido aún más la pena. Te amo Chiquis, eres el mejor.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mis padres, María Dolores Pino Valenzuela y Carlos Fernando Saborit Pérez, porque con su amor, su esfuerzo, su tiempo y sus consejos, me han enseñado cosas más importantes de la vida que cualquier libro. Los amo y espero que se sientan tan orgullosos de mí como yo de ustedes.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	ii
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iv
<b>DEDICATORIA</b> .....	vi
<b>CONTENIDO</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	xii
<b>RESUMEN</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	3
2.1 Quitosano.....	3
2.2 Características Físicoquímicas del Quitosano .....	4
2.2.1 Peso Molecular .....	4
2.2.2 Grado de Acetilación.....	6
2.3 Propiedades Funcionales .....	7
2.3.1 Solubilidad .....	7
2.3.2 Propiedades Bioactivas.....	8
2.3.2.1 Biodegradabilidad .....	9
2.3.2.2 Biocompatibilidad.....	9
2.3.3 Adsorción.....	10
2.4 Formación de Estructuras .....	11
2.4.1 Capacidad de Gelificación .....	11
2.4.1.1 Geles químicos .....	12
2.4.1.2 Geles físicos .....	12

## CONTENIDO (Continuación)

2.4.2 Obtención de Materiales Porosos .....	13
2.4.2.1 Secado por liofilización .....	14
2.4.2.2 Secado por evaporación.....	14
2.4.2.3 Secado supercrítico .....	15
2.4.3 Formación de Micropartículas.....	16
2.5 Aplicaciones de Micropartículas de Quitosano .....	17
2.5.1 Quitosano como Vehículo de Transporte de Fármacos.....	17
2.5.2 Aerogeles de Quitosano Acarreadores de Moléculas Bioactivas.....	20
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
4.1 General .....	26
4.2 Particulares.....	26
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
5.1 Materiales .....	27
5.1.1 Quitosano.....	27
5.1.2 Reactivos .....	27
5.2 Métodos .....	28
5.2.1 Formación de las Micropartículas .....	29
5.2.2 Cambio de Fase Líquida.....	30
5.2.3 Carga de la Molécula Bioactiva en las Micropartículas.....	31
5.2.4 Obtención de Materiales Porosos .....	31
5.3 Caracterización de las Micropartículas Porosas Nanoestructuradas .....	32
5.3.1 Evaluación de Tamaño y Morfología de las Micropartículas.....	32
5.3.2 Identificación Química de Compuestos.....	32
5.3.3 Área superficial y Porosidad .....	33
5.3.4 Eficiencia de Asociación y Capacidad de Carga.....	33
5.3.5 Pruebas de Difusión.....	35

## CONTENIDO (Continuación)

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	36
6.1 Elaboración de las Micropartículas .....	36
6.2 Obtención de las Micropartículas Porosas Nanoestructuradas.....	37
6.3 Caracterización de las Micropartículas Porosas Nanoestructuradas .....	38
6.3.1 Micropartículas Porosas Nanoestructuradas .....	38
6.3.1.1 Evaluación del tamaño y morfología de las micropartículas .....	38
6.3.1.2 Identificación química de compuestos .....	48
6.3.1.3 Área superficial y porosidad.....	49
6.3.2 Micropartículas Porosas Nanoestructuradas Cargadas.....	50
6.3.2.1 Evaluación del tamaño y morfología de las micropartículas .....	50
6.3.2.2 Identificación química de compuestos .....	54
6.3.2.3 Área superficial y porosidad.....	55
6.3.2.4 Eficiencia de asociación y capacidad de carga.....	55
6.3.2.5 Pruebas de difusión .....	58
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	62
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	63
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	64

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química del quitosano .....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema general de trabajo .....	28
<b>Figura 3.</b> Representación del sistema de elaboración de micropartículas .....	30
<b>Figura 4.</b> Proceso de cuantificación de nobiletina en las micropartículas porosas nanoestructuradas .....	34
<b>Figura 5.</b> Hidrogeles microparticulados en NaOH .....	36
<b>Figura 6.</b> Micropartículas porosas nanoestructuradas .....	37
<b>Figura 7.</b> Micropartículas porosas nanoestructuradas de quitosano (MQsB)....	40
<b>Figura 8.</b> Micropartículas porosas nanoestructuradas (MQsB) quebradas y dañadas .....	40
<b>Figura 9.</b> Imágenes de SEM de los aerogeles (MQsB) .....	41
<b>Figura 10.</b> Ejemplos de mediciones de las MQsB mediante microscopía óptica .....	42
<b>Figura 11.</b> Histograma de frecuencia de áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) de los MQsB .....	43
<b>Figura 12.</b> Micropartículas liofilizadas (MQsL) (magnificación 4X) .....	45
<b>Figura 13.</b> Acercamiento a la superficie de las MQsL (magnificación 10X) .....	45
<b>Figura 14.</b> Imágenes de SEM de las MQsL .....	46
<b>Figura 15.</b> Histograma de frecuencia de áreas de las ( $\mu\text{m}^2$ ) MQsL.....	47
<b>Figura 16.</b> Espectro infrarrojo de la muestra de quitosano (Prymex) y de las MQsB.....	48
<b>Figura 17.</b> Isotermas BET de adsorción y desorción de $\text{N}_2$ de las micropartículas porosas de quitosano .....	50
<b>Figura 18.</b> Micropartículas de quitosano cargadas con nobiletina secadas con $\text{CO}_2$ supercrítico (MQsN) .....	51

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<b>Figura 19.</b> Imágenes de SEM de los aerogeles con nobiletina (MQsN).....	52
<b>Figura 20.</b> Histograma de frecuencia de áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) de las MQsN .....	53
<b>Figura 21.</b> Espectros IR de las muestras de quitosano (Primex), MQsB y MQsN .....	54
<b>Figura 22.</b> Isotermas BET de adsorción y desorción de N <sub>2</sub> de las MQsN .....	55
<b>Figura 23.</b> Curva de calibración para la cuantificación de nobiletina en HPLC .	56
<b>Figura 24.</b> Cromatograma de la cuantificación de nobiletina en el proceso de obtención de las MQsN lote 2.....	57
<b>Figura 25.</b> Cinética de liberación de nobiletina del lote 1 de las MQsN .....	59

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Límites de área de MQsB para cada clase.....	43
<b>Tabla 2.</b> Límite de área de MQsL para cada clase .....	47
<b>Tabla 3.</b> Área superficial específica ( $S_{BET}$ ) y volumen de poro ( $V_P$ ) de las MQsB y MQsL .....	50
<b>Tabla 4.</b> Límites de área de MQsN para cada clase.....	53

## RESUMEN

En los sistemas de liberación controlada de fármacos, el uso de quitosano es especialmente atractivo por sus propiedades, su estabilidad y disponibilidad. Se han probado varios tipos de micropartículas de quitosano como sistemas de liberación controlada para diversos agentes terapéuticos, sin embargo, el uso de estas matrices es, por lo general, como geles hidratados. Los aerogeles se obtienen mediante el secado supercrítico y tienen un valor agregado por su porosidad y área superficial; en ellos, la fase líquida es sustituida por un gas, resultando un material poroso seco que mantiene al máximo la estructura original. Esto atrae la atención en ellos para cargarlos con moléculas bioactivas y estudiar su comportamiento como agentes acarreadores. El reto en los aerogeles secados a condiciones supercríticas, es evitar arrastrar el compuesto activo durante el proceso extracción de la fase líquida (etanol) del gel. En nuestro estudio, se detalla el proceso de obtención de micropartículas porosas nanoestructuradas cargadas con nobiletina como molécula modelo. Se utilizaron condiciones supercríticas de 150 bar y 40 °C con un volumen total de CO<sub>2</sub> de 250 L durante el proceso de secado. Las micropartículas porosas nanoestructuradas se encontraron en un rango de los 100 a los 600 µm, con formas de elipse. Estas presentan una estructura interna granular aglomerada. El valor de área superficial específica fue de  $153.8 \pm 6.08 \text{ m}^2/\text{g}$ , con volumen de poro de  $0.4 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Las micropartículas se encuentran dentro del rango de los materiales mesoporosos. Tras el proceso de secado permaneció el 43.2% de la nobiletina cargada en las micropartículas, lo que representa una proporción de 1.5 mg de nobiletina por gramo de micropartículas de quitosano.

**Palabras clave:** quitosano, micropartículas, secado supercrítico, aerogeles, nobiletina.

## ABSTRACT

In controlled drug release systems, the use of chitosan is particularly attractive because of its properties, stability and availability. It has been tried several therapeutic agents in the preparation of chitosan microparticles for controlled release of drugs. In most of these, chitosan is used to form hydrogel matrices. Aerogels are dry porous materials prepared by supercritical drying of gels; they have added value for their porosity and extended surface area. To get an aerogel, the liquid phase of a gel is replaced by a gas, resulting in a dry porous material keeping its original internal structure almost unaltered. This draws attention to load them with bioactive molecules and study their behavior as carrier agents. The challenge to obtain loaded aerogels by supercritical drying consist in avoid the active compound dragging through the gel liquid phase (ethanol) exchange process. Here is detailed the process to obtain nanostructured porous microparticles loaded with nobiletin, as model bioactive molecule. Supercritical conditions of 150 bar and 40 ° C were used with a total volume of 250 L of CO<sub>2</sub> during the drying process. The dried microparticles were found in a range of 100 to 600 μm with elliptical shapes. This matrices exhibit agglomerated granular internal structure. The specific surface area was 153.8 ± 6.08 m<sup>2</sup>/g, with a pore volume of 0.4 cm<sup>3</sup>/g. Microparticles are in range of mesoporous materials. After drying process, approximately 43.2% of nobiletin remains in the microparticles, this is a proportion of 1.5 mg of nobiletin for each gram of chitosan.

**Keywords:** chitosan, microparticles, supercritical drying, aerogels, nobiletin.

## 1. INTRODUCCIÓN

El quitosano es un polímero con unidades repetitivas de dos azúcares comunes, D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, unidos por enlaces  $\beta$  (1-4). Se encuentra de forma natural en las paredes celulares de algunas algas y hongos, sin embargo, la principal fuente industrial de quitosano es la quitina (Lárez, 2006). Entre sus propiedades funcionales podemos mencionar su solubilidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad, capacidad de adsorción y formación de diversas estructuras. Estas varían significativamente en función de sus características fisicoquímicas, principalmente de su peso molecular y grado de acetilación. Todas estas propiedades le brindan al polisacárido varias aplicaciones potenciales en biomedicina, biotecnología, farmacéutica, tratamientos de aguas y cosmetología, por mencionar algunas (Dutta et al., 2004; Rinaudo, 2006; Mármol et al., 2011).

En los sistemas de liberación controlada de fármacos, el uso de polisacáridos naturales, como el quitosano, es especialmente atractivo por su estabilidad, disponibilidad y baja toxicidad. Además, sus características de biodegradabilidad y biocompatibilidad permiten su uso en el organismo. Los materiales pueden presentarse como micro- y nano-partículas, películas y otras estructuras (Sinha et al., 2004).

En el uso de micropartículas de quitosano para la liberación controlada de fármacos en el organismo, se han probado varios agentes terapéuticos. En general, se han obtenido buenos resultados con estas matrices utilizando antiinflamatorios, antibióticos, antitrombóticos, esteroides, proteínas,

aminoácidos, antidiabéticos y flavonoides, entre otros. Sin embargo, el uso de estas matrices es, por lo general, como geles hidratados cargados con las moléculas de interés (Sinha et al., 2004). No obstante, estudios recientes se han enfocado en la obtención de matrices porosas secas como sistemas acarreadores de moléculas bioactivas (García-González et al., 2011; Ulker y Erkey, 2014).

Dentro de la categoría de materiales porosos se encuentran los aerogeles. Estos se obtienen mediante el proceso de secado supercrítico, que consiste en sustituir la fase líquida de los geles por una fase gaseosa resultando un material poroso seco. Durante el secado en condiciones supercríticas, se evita la formación de la interfase vapor-líquido disminuyendo considerablemente la tensión superficial, evitando el colapso de la estructura durante la remoción del solvente. Esto permite mantener en mayor medida la estructura original resultando en una matriz con área superficial expandida y porosidad uniforme. Estas propiedades atraen la atención para cargarlos con moléculas bioactivas y estudiar su comportamiento como agentes acarreadores (Pierre y Pajonk, 2002; García-González et al., 2011).

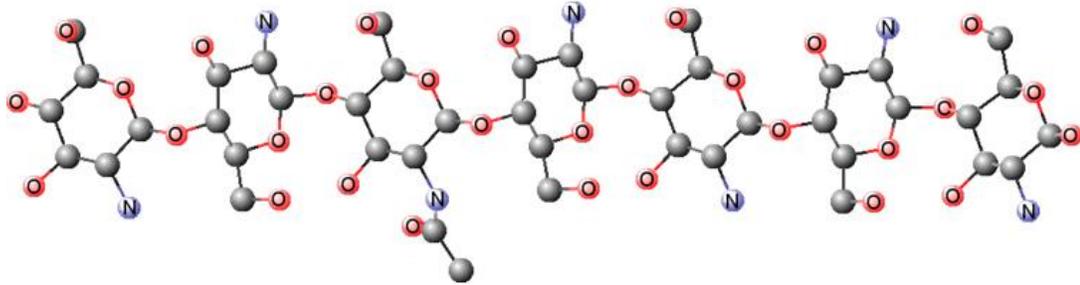
La información que existe hasta el momento, sobre el uso de materiales porosos como vehículos de moléculas bioactivas es escasa. El reto en los aerogeles secados a condiciones supercríticas, es evitar arrastrar el compuesto activo después del proceso de extracción de la fase fluida del gel. Por lo tanto, en este trabajo de investigación, se detalla el proceso de obtención de aerogeles de tamaño micrométrico, así como la capacidad de los mismos de retener moléculas bioactivas durante su elaboración. En la elaboración de las matrices, se utilizó nobiletina como molécula modelo y posteriormente se llevó a cabo su caracterización y la evaluación de la carga. Los resultados, nos permitieron conocer mejor las ventajas y dificultades que puedan presentarse en el posible uso de micropartículas porosas nanoestructuradas como sistemas acarreadores, para su aplicación como sistemas de liberación controlada.

## 2. MARCO TEÓRICO

### Quitosano

El quitosano, poli [ $\beta$ -(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosas], es un polisacárido que se encuentra de forma natural en las paredes celulares de algas y hongos (Figura 1). No obstante, su principal fuente de producción industrial, es mediante el proceso de desacetilación de la quitina. Cuando la quitina se somete a la acción de un medio alcalino muy concentrado (20-50%) a temperaturas alrededor de los 100 °C, se produce su desacetilación. Esta reacción, consiste en la pérdida del resto acetilo del grupo acetoamido del carbono 2, dejando solo el grupo amino en esa posición. El producto de esta reacción, el quitosano, presenta propiedades significativamente diferentes a la quitina de partida (Dutta et al., 2004).

Una de las diferencias más importantes entre la quitina y el quitosano es su solubilidad. La quitina no se disuelve en agua ni en solventes orgánicos comunes. Algunos de los medios reportados para disolverla son soluciones de sales neutras como LiSCN y  $\text{Ca}(\text{SCN})_2$  y el sistema propuesto por Austin, que consiste en una mezcla de ácido tricloroacético y ácido fórmico (Austin, 1975). El quitosano, por otra parte, es soluble en medios ácidos comportándose como un polication. Esto lo diferencia de otros biopolímeros ya que es una característica poco usual en los mismos. Sus características fisicoquímicas, en particular su estructura química, le permiten formar soluciones y obtener diversos materiales a partir de las mismas, con propiedades funcionales de gran interés en la investigación (Agulló, 2004).



**Figura 1.** Estructura química del quitosano.

### Características Físicoquímicas del Quitosano

Las características físicoquímicas de las cadenas poliméricas del quitosano varían de acuerdo a la materia prima de la que se extraen y al proceso al que fueron sometidas para su extracción. El efecto se puede observar principalmente en la variabilidad en el tamaño de sus cadenas y en el grado de acetilación de las mismas. Debido a esto, se considera un polisacárido polidisperso y se utilizan promedios estadísticos como parámetros de sus características, como es el caso del peso molecular o su grado de acetilación (Agulló et al., 2004). A continuación se explican estas características del quitosano.

#### **Peso Molecular**

El peso molecular representa una medida del tamaño de las cadenas presentes en una molécula de quitosano, y tiene efectos en su funcionalidad. El descenso del peso molecular del polímero provoca la reducción de los coeficientes de hinchamiento. Otra de las propiedades dependientes es su bioactividad (Agulló et al., 2004). En función de su peso molecular, el quitosano puede utilizarse como espesante, regulador de la viscosidad, estabilizador y vehículo de

liberación controlada. En la elaboración de micropartículas con tripolifosfato, se ha observado que a medida que el peso molecular aumenta y se disminuye el pH de la solución de tripolifosfato, las micropartículas son más esféricas. Además, entre menor sea el peso molecular del polímero, la liberación del compuesto es más rápida (Alasarra et al., 2002).

Por despolimerización enzimática o química, se puede reducir el peso molecular del quitosano y obtener quitoooligosacáridos. En la hidrólisis enzimática se utiliza quitinasa seguida de N-acetilación química y separación por precipitación selectiva en metanol (Aiba y Muraki, 1997); en la hidrólisis química se han utilizado ácidos minerales, como el sistema propuesto por Allan y Peyron (1995) de HCl (pH 1-2) con ácido nitroso. Las propiedades funcionales que más varían de acuerdo al peso molecular de la muestra son la bioactividad, solubilidad, grado de hinchamiento, propiedades estructurales, viscosidad, etc (Tsaih y Chen, 2003; Toan, 2009). El quitosano se comercializa como un compuesto de bajo, medio y alto peso molecular, con valores medios de 120, 400 y 600 kDa, respectivamente (Dutta et al., 2004).

Existen varios métodos para determinar el peso molecular promedio del quitosano. La viscosimetría es la técnica más utilizada para este propósito por su sencillez y eficacia. Se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca  $[\eta]$  de una solución, comparando el tiempo de flujo de un volumen específico a través de un tubo capilar, con el tiempo correspondiente del solvente utilizado. La viscosidad intrínseca está relacionada con el peso molecular en la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Ecuación 1).

$$[\eta] = KM_v^a \quad (1)$$

En esta ecuación,  $M_v$  es el peso molecular promedio viscosimétrico,  $K$  y  $a$  son dos constantes. Estas últimas dependen de la naturaleza del polímero, del sistema del disolvente utilizado y de la temperatura (Rinaudo et al., 1993;

Rinaudo et al., 1999; Parada et al., 2004). Otros métodos que se pueden utilizar en la determinación del peso molecular son la dispersión de luz y cromatografía de permeación en gel (Agulló et al., 2004; Nguyen et al., 2009).

### **Grado de Acetilación**

El quitosano es caracterizado por medio del grado de acetilación, que corresponde a la proporción de unidades de N-acetilglucosamina respecto al total de unidades que forman una molécula del mismo (Bagheri-Khoulenjani et al., 2009). La siguiente ecuación es una representación de la definición del grado de acetilación (Ecuación 2):

$$GA = \frac{A}{A+B} \times 100 \quad (2)$$

Donde *GA* es el grado de acetilación, *A* son las unidades N-acetil glucosamina y *B* son las unidades de glucosamina. Varios autores señalan la importancia de este parámetro de caracterización. Esto debido a que influye sobre sus propiedades físico-químicas, como la conformación de la molécula de quitosano a fuerzas iónicas específicas, fuerza a la elongación y fuerzas de tensión. Así como en su biodegradabilidad, actividad inmunológica, solubilidad, hinchamiento, bioactividad y biocompatibilidad (Dash et al., 2011). Entre menor sea el grado de acetilación habrá más grupos amino protonados cuando se encuentre en soluciones ácidas. En estas condiciones el quitosano es más susceptible a participar en interacciones de carácter iónico y en reacciones que involucren dicho grupo amino (Brugnerotto et al., 2001).

En la determinación del grado de acetilación, existen varios métodos utilizados. Entre los más comunes se encuentran técnicas espectroscópicas como la infrarroja, ultravioleta y resonancia magnética nuclear (RMN). También se

puede determinar mediante potenciometría y conductimetría, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), así como el análisis elemental y térmico (Argüelles-Monal et al., 2004; dos Santos et al., 2009; Kasaai, 2009). Debido a su sencillez la espectroscopía infrarroja es de las técnicas más utilizadas. La estimación por este método generalmente se basa en la correlación del GA determinado por un método absoluto (p. ej. RMN) comparado con la señal de dos o más bandas de absorción de IR determinadas. Normalmente una banda corresponde al grado de acetilación (bandas amida) y la otra sirve de referencia interna (Brugnerotto et al., 2001; Kasaai, 2008).

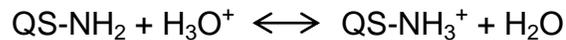
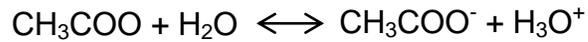
### Propiedades Funcionales del Quitosano

Las propiedades funcionales del quitosano están determinadas por sus características fisicoquímicas. Como se mencionó antes, su solubilidad, hinchamiento, biodegradabilidad, biocompatibilidad y capacidad de adsorción dependen de factores como el peso molecular y el grado de acetilación del polisacárido. A continuación se describen las propiedades funcionales de interés en esta investigación.

#### **Solubilidad**

El quitosano es soluble en diferentes medios y distintos factores ejercen efecto sobre esta propiedad. En condiciones ácidas, los grupos amino del quitosano se protonan favoreciendo la expansión y solvatación de las cadenas. En este tipo de soluciones, el quitosano es un polielectrolito catiónico, esto lo hace una excepción entre los hidrocoloides comerciales que en su mayoría son neutros o polianiónicos (Rinaudo et al., 1993; Rinaudo et al., 1999). Su solubilidad varía dependiendo del peso molecular del polisacárido, el contraión involucrado en la

solución, la temperatura y el grado de acetilación de las cadenas poliméricas. Algunos de los solventes utilizados son los ácidos inorgánicos (clorhídrico, bromhídrico, iodhídrico, etc.) y ácidos orgánicos; el más comúnmente utilizado es el ácido acético, el cual genera el siguiente equilibrio:



El único solvente orgánico para el quitosano de que se tiene conocimiento, es la mezcla en proporción 1:3 de dimetilformamida y tetróxido de dinitrógeno (Allan et al., 1971; Roberts 1992).

El quitosano tiene una conformación extendida en ambientes ácidos diluidos. Las cargas catiónicas de las unidades D-glucosamina (unidades desacetiladas) se repelen, manteniendo las cadenas expandidas en la suspensión. Sin embargo, al incrementarse la fuerza iónica en los medios sobresaturados con electrolitos, el modo de arreglo del polisacárido cambia debido al apantallamiento electrostático de las cargas. Cuando se agrega el quitosano a estas soluciones, el efecto de las cargas es minimizado y la viscosidad disminuye aunque se mantenga la flexibilidad de las cadenas (Schatz et al., 2003; Hamdine et al., 2005).

## **Propiedades Bioactivas**

Las propiedades bioactivas del quitosano han promovido el estudio de este polisacárido para su uso en medicina y otras aplicaciones biológicas. Su naturaleza catiónica es una característica única que tiene un importante efecto en el comportamiento y la funcionalidad de los biomateriales de quitosano. Este polisacárido presenta propiedades como biodegradabilidad, adhesividad y

biocompatibilidad, entre otras. Se presenta a continuación la descripción de algunas de sus propiedades bioactivas.

**Biodegradabilidad.** Cuando el quitosano se suministra vía oral se considera un polisacárido no biodisponible, es decir, no se digiere. Puede disolverse en el pH ácido del estómago y se adhiere a la mucosa intestinal, donde es susceptible a ser hidrolizado por la lisozima, que es una enzima proteolítica no específica presente en todos los tejidos del cuerpo humano. Otras enzimas que lo degradan son las quitosanasas y la pancreatina (Illum et al., 1994).

La lisozima no puede ejercer su efecto cuando el quitosano se encuentra completamente desacetilado. Aunque la forma de acción no se conoce por completo, se reporta que son necesarias tres unidades seguidas acetiladas para que la lisozima lo reconozca. En conclusión, entre más desacetilado se encuentra el biopolímero, más lenta es su degradación con lisozima. Además del grado de acetilación, el pH y el peso molecular así como el método de obtención del quitosano también influyen en su biodegradación (Agulló et al., 2004).

**Biocompatibilidad.** Un material biocompatible es aquel que presenta aceptabilidad biológica al interactuar con los tejidos orgánicos (Sastre et al., 2004). En general, los materiales de quitosano y sus derivados provocan una reacción mínima de respuesta ante esta interacción, debido a esto se considera un polímero natural no tóxico. Esta propiedad depende de sus características fisicoquímicas de su fuente y método de obtención (Singla y Chawla, 2001; Molinaro et al., 2002).

El carácter catiónico del quitosano tiene un papel muy importante en las interacciones que se dan con las células. Los estudios han mostrado, en general, una respuesta muy favorable a las pruebas de citocompatibilidad del polisacárido. Las células son atraídas por el quitosano, se adhieren y proliferan

de forma favorable. Acelera la curación de heridas promoviendo la granulación, angiogénesis, la re-epitelización y la regeneración tisular. Al contacto con la sangre, el quitosano activa el sistema complemento y los sistemas de coagulación, debido a la adsorción de proteínas sobre su superficie. Por lo tanto, el quitosano presenta muy buenas propiedades hemostáticas induciendo la rápida formación del coágulo, incluso en condiciones anticoagulantes (Sechriest et al-. 2000; Muzzarelli, 2009; Jiang et al., 2012). Estas propiedades hacen considerarlo como un buen material para la fabricación de apósitos, sistemas de andamiaje en ingeniería de tejidos, en la preparación de soportes y cementos, entre otros (Nettles et al., 2002; Mao et al., 2003; Peniche et al., 2007).

### **Adsorción**

Las propiedades catiónicas del quitosano hacen que sea muy eficiente en la adsorción de iones metálicos por interacciones electrostáticas. Para llevar a cabo la quelación, requiere los grupos  $-OH$  y  $-O$  de los residuos D-glucosamina como ligandos. Además, se necesitan al menos dos o más grupos amino de una misma cadena para unirse a un mismo ión metálico. Como consecuencia, esta propiedad es particularmente atractiva para su aplicación en tratamientos de aguas para remoción de iones metálicos (Lárez et al., 2003; Montero-Álvarez et al., 2010).

Las proteínas son también moléculas ionizables, por lo que su adsorción al quitosano dependerá de su carga. A pH superior al  $pI$  de la proteína, su carga neta será negativa; mientras que, a pH inferior, la carga será positiva. Para que una proteína interactúe de forma iónica con el quitosano su  $pI$  debe ser inferior al  $pKa$  del quitosano lo que provoca que sus cargas sean opuestas. Las interacciones que intervienen en este proceso de adsorción son de tipo iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas

(Agulló et al., 2004). Modificando parámetros como pH y fuerza iónica del medio es posible separar de nuevo la proteína del soporte.

## Formación de Estructuras

El quitosano al ser un polisacárido no presenta propiedades termoplásticas, es decir, se degrada antes de alcanzar la temperatura de transición vítrea. Por lo tanto, para la elaboración de materiales, se parte del polisacárido en solución. Se han mencionado con anterioridad los aspectos importantes a considerar al trabajar con soluciones de quitosano, como su peso molecular, su grado de acetilación y el pH, entre otros. El carácter polielectrolítico del quitosano tiene un efecto en el comportamiento de los materiales debido al tipo de interacciones que se generan (químicas o físicas). Entre los materiales más comunes se encuentran los geles, las películas y membranas, fibras, micro- y nanopartículas y materiales porosos.

### **Capacidad de Gelificación**

Los geles hidratados de quitosano constituyen uno de los tipos de materiales más utilizados de este polímero. Peppas y Korsmeyer (1987), definieron el término hidrogel como redes macromoleculares caracterizadas por su extraordinaria capacidad para absorber agua y diferentes fluidos sin disolverse. La red polimérica es penetrada por un flujo osmótico de solvente debido a la diferencia de potencial químico dentro y fuera del gel, provocando el hinchamiento. Las cadenas poliméricas por su parte, oponen una fuerza elástica hasta lograr un equilibrio entre ambos procesos (Agulló et al., 2004). Berger et al. (2004) clasifican los hidrogeles de quitosano en físicos y químicos, según el tipo de enlaces de los entrecruzamientos de la red.

Geles químicos. Dentro de estos se distinguen tres tipos de hidrogeles. Los formados solamente por quitosano y un agente entrecruzante, los denominados hidrogeles híbridos, en los que el agente entrecruzante enlaza cadenas de quitosano y otro polímero. Por último, los hidrogeles conocidos como retículos semi- o completamente interpenetrados. Todos estos hidrogeles están formados principalmente por enlaces covalentes, otras interacciones podrían ser las hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre las unidades acetiladas de quitosano y una molécula complementaria. Al incluir otro polímero en el hidrogel, se presentarían también interacciones secundarias entre éste y el quitosano. Los principales agentes entrecruzantes utilizados en los hidrogeles covalentes de quitosano son los dialdehídos, como glutaraldehído y el glioxal. El inconveniente en el uso de estos entrecruzantes es su toxicidad, por lo que los hidrogeles deben ser lavados hasta eliminar el exceso del dialdehído presente antes de su aplicación. Otros agentes no tóxicos para entrecruzar quitosano son la genipina y el ácido oxálico (Berger et al., 2004 a; Berger et al., 2004 b).

En general, los hidrogeles de quitosano entrecruzados covalentemente tienen buenas propiedades mecánicas y no se disuelven antes de pH. Encuentran su mayor aplicación en la formación de vendajes, implantes y en la preparación de partículas. Estas últimas se han utilizado como medio de administración oral de fármacos en sistemas de liberación dependientes del pH (Mi et al., 2003; Sánchez et al., 2007).

Geles físicos. Un hidrogel físico se refiere a un entrecruzamiento reversible formado entre las cadenas poliméricas en condiciones apropiadas a través de fuerzas débiles, generalmente de tipo Van der Waals y otras como puentes de hidrógeno o interacciones iónicas. Los hidrogeles físicos son fáciles de obtener y tienen gran potencial de aplicación como sistemas de liberación controlada. Además, pueden emplearse como materiales termosensibles para una liberación inmediata de un agente bioactivo. Sin embargo, su principal

desventaja es su baja estabilidad mecánica y el riesgo de disolución, debido a su sensibilidad al pH (Win et al., 2003; Montembault et al., 2005).

Existen varias formas de obtener geles físicos de quitosano, su comportamiento en solución le permite interactuar con varios compuestos. En la formación de este tipo de geles, podemos mencionar interacciones del quitosano con algunos ácidos como el tioglicólico, acrílico y ácido oxálico (Bernkop-Schnurch y Ho, 2001; Elhag, 2000; Hirano et al., 1990). También, algunos hidrogeles de quitosano están formados por entrecruzamientos iónicos mediante interacciones electrostáticas con aniones metálicos como Mo (VI), Pt (II) y Fe (III) (Win et al., 2003). Además, está la formación de complejos polielectrolitos con polianiones como la carboximetilcelulosa, alginato, pectinas, carrageninas, etc. En general, la fuerza de las estructuras depende de la cantidad de entrecruzamientos presentes en las matrices (Argüelles-Monal et al., 2000; Peniche y Argüelles-Monal, 2001; Argüelles-Monal et al., 2003; Becherán-Marón et al., 2004).

También se pueden formar geles físicos de quitosano sin la necesidad de utilizar agentes externos para entrecruzarlo. Se parte de una solución ácida diluida de quitosano y se precipita en un medio alcalino neutralizando el solvente. Como resultado se generan interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre las cadenas poliméricas, dando lugar a su condensación para formar geles. Los medios alcalinos más utilizados son el hidróxido de sodio en solución y el gas amoníaco (Montembault et al., 2005).

### **Obtención de Materiales Porosos**

En la obtención de materiales porosos a partir de los hidrogeles, la fase líquida es removida quedando solo la fase sólida formando la estructura del material. Estos materiales tienen diversas aplicaciones como absorbentes, en procesos

de separación, en embalaje y andamios en ingeniería de tejidos. Entre los métodos de remoción de la fase líquida de los geles para obtener los materiales porosos se encuentran la liofilización, la evaporación para la fabricación de xerogeles y el secado supercrítico para la obtención de aerogeles. Dependiendo del método de obtención, los materiales presentan diferencias a nivel microestructural. Otros procedimientos en la elaboración de materiales porosos son el uso de porógenos y el hilado.

Secado por liofilización. La liofilización, es un proceso comúnmente utilizado para el secado de encapsulados, partículas, películas, etc. (Cocero et al., 2009). En este proceso, el hidrogel se congela primero y, posteriormente, se seca por sublimación al vacío sin pasar por el estado líquido, es decir, no pasa por la interface vapor-líquido. Es uno de los métodos más adecuados para la deshidratación de materiales termosensibles por las temperaturas bajas que se utilizan, la velocidad lenta de secado y el uso de vacío.

Durante la congelación, la estructura del gel es modificada por la nucleación y crecimiento de cristales en la fase líquida del gel, esto tiende a producir macroporos (Pierre y Pajonk, 2002; Valentín et al., 2007). Así, el material poroso seco que se tiene al final del proceso tiene una estructura considerablemente distinta a la del gel de partida.

Secado por evaporación. Los materiales que se obtienen mediante secado por evaporación son los llamados xerogeles. Las películas y membranas de quitosano pueden considerarse xerogeles, y presentan excelentes propiedades mecánicas y de permeabilidad (Martínez-Camacho et al., 2010). El secado por evaporación de soluciones o geles implica un proceso donde al reducirse el volumen de la fase líquida, la tensión superficial compacta las cadenas y colapsa las estructuras formadas del gel. La tensión superficial que depende de la polaridad del líquido y el grado de asociación de sus moléculas, juega un

papel muy importante. Al final del proceso se obtiene un sólido nanoporoso con nada o muy poco porcentaje de agua entre las cadenas (Agulló et al., 2004).

Secado supercrítico. El secado supercrítico se basa en la sustitución de la fase líquida del gel por un fluido en estado supercrítico, comúnmente dióxido de carbono. Al reducir la presión de forma paulatina el CO<sub>2</sub> pasa del estado supercrítico a gaseoso dejando la estructura del gel sin fase líquida. De esta manera, se evita el colapso de la estructura durante la remoción del solvente minimizando la tensión superficial. Al finalizar el proceso se obtiene un material poroso que mantiene considerablemente la estructura original del gel (Pierre y Pajonk, 2002; Mukhopadhyay y Rao, 2008).

Normalmente se usa CO<sub>2</sub> en el secado supercrítico ya que no es flamable, no es tóxico, y su punto crítico (temperatura y presión) se puede superar sin esfuerzo considerable (Pierre y Pajonk, 2002; Quirk et al., 2004). Para el CO<sub>2</sub>, la región supercrítica se encuentra a una temperatura mínima de 31.2 °C y presión mínima de 73.8 bar (Cai et al., 2008). Otra ventaja al trabajar con CO<sub>2</sub> supercrítico es que se puede evitar la degradación de sustancias termolábiles, pues el proceso se lleva a cabo a temperatura muy cercana a la del ambiente.

Por otra parte, el carácter no polar del CO<sub>2</sub> es una limitante para su aplicación en la extracción de compuestos polares con fluidos supercríticos. Su polaridad puede mejorarse utilizando co-solventes, como etanol (Palma et al., 2000). En estos procesos, la extracción también se ve afectada por los tamaños de poro de la matriz donde se encuentra el compuesto que se quiere extraer, o la poca solubilidad del agua en el CO<sub>2</sub> supercrítico (Lee et al., 2010). A diferencia del agua, los alcoholes y la acetona son las fases fluidas que presentan mayor miscibilidad en el CO<sub>2</sub> supercrítico. Por lo tanto, en los hidrogeles se realiza un intercambio de fase líquida sustituyendo el agua con alcohol o acetona previamente al proceso de secado (Chang et al., 1997; Diamond y Akinfiev, 2003, Stievano y Elvassore, 2005).

Los materiales que se obtienen mediante el secado supercrítico se conocen como aerogeles y son una categoría de materiales meso y nanoporosos. Exhiben propiedades inusuales como baja densidad, gran área superficial y alta porosidad. Esto los hace particularmente atractivos para una amplia gama de aplicaciones (Pierre y Pajonk, 2002; Valentín et al., 2007). Estos materiales se pueden encontrar como películas o en láminas más gruesas, como partículas y monolitos, entre otras. Para fines de este estudio, vamos a centrar nuestra atención en los aerogeles en forma de micropartículas.

### **Formación de Micropartículas**

Las micropartículas pueden formarse por varios métodos. Podemos clasificar los procesos en físicos como secado por aspersion, aspersion por enfriamiento o congelamiento y extrusión, por mencionar algunos. Además están los procesos químicos como coacervación, co-cristalización, polimerización interfacial y gelificación iónica (Desai y Park, 2005; Parra, 2010). Un método común y bien descrito para la obtención de partículas de quitosano, se basa en la precipitación del biopolímero. El proceso consiste en dejar caer gota a gota una solución ácida diluida del polisacárido en una solución alcalina. Las estructuras obtenidas se pueden almacenar en agua, o bien, secarlas dependiendo del uso al que estén destinadas (Quignard et al., 2008; Montero-Álvarez et al., 2010).

El uso de técnicas innovadoras de formación de micropartículas y la variación en algunas características del quitosano, puede llevarnos a la obtención de sistemas óptimos para la administración de moléculas bioactivas. El tamaño de partícula, la densidad, viscosidad, grado de acetilación y peso molecular, son características importantes del polisacárido que influyen en las propiedades de las micropartículas. La dosis total de medicación y la cinética de liberación, son

las variables que pueden ser manipuladas para lograr el resultado deseado (Sinha et al., 2004).

### Aplicaciones de Micropartículas de Quitosano

Las micropartículas de quitosano se han fabricado y utilizado con varios fines, de acuerdo a las propiedades que presenta el polisacárido. Por ejemplo, se ha aprovechado su capacidad quelante para adsorción de metales pesados del agua mediante la fabricación de micropartículas compuestas de quitosano-polivinil alcohol (García-Rivas et al., 2010). Además, por su biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad, se ha utilizado como revestimiento en la elaboración de microcápsulas de alginato dirigidas al colon (Krasaekoopt et al., 2004). Se han realizado encapsulaciones de probióticos como *Lactobacillus gasseri* y *Bifidobacterium bifidum*, así como el encapsulamiento de prebióticos como la quercetina (Chavarri et al., 2010). De igual forma, las micropartículas de quitosano tienen gran potencial en la administración dirigida de fármacos (Sinha et al., 2004; Wei et al., 2010). A continuación se detalla el uso de materiales de quitosano en el transporte de fármacos y moléculas bioactivas.

### **Quitosano Como Vehículo de Transporte de Fármacos**

El quitosano se ha utilizado en la elaboración de matrices que funcionen en la administración de fármacos. Para controlar la liberación de los compuestos activos de las matrices, se buscan velocidades lentas o periodos largos de liberación aplicando recubrimientos gruesos o utilizando matrices de liberación muy lentas (Chourasia y Jain, 2003). La liberación de la sustancia activa de la matriz polimérica es controlada por difusión y por la degradación del polímero. Estos mecanismos dependen de una serie de parámetros importantes de

considerar. Entre ellos se encuentran la concentración tanto de la sustancia activa como del polímero, el pH del medio y la acción enzimática. Además están las propiedades de las partículas como tamaño de partícula y morfología e interacciones entre el fármaco y el polímero. Las características del polímero, como temperatura de transición vítrea y peso molecular, también ejercen un efecto en las características finales del sistema (Sinha et al., 2004).

Se han realizado algunos estudios sobre las matrices de liberación controlada a base de quitosano. Kumbar et al. (2002) estudiaron el efecto del entrecruzamiento utilizando glutaraldehído, ácido sulfúrico o tratamiento térmico en la preparación de microesferas de quitosano cargadas con diclofenaco sódico. Las microesferas entrecruzadas con 32% de glutaraldehído mostraron la liberación más lenta (41% en 420 min), mientras que las matrices entrecruzadas con tratamiento térmico durante 3 horas mostraron la liberación más rápida (81% en 500 min). En otro estudio, Yamada et al. (2001) observaron el efecto de un recubrimiento de quitosano en microesferas de etilcelulosa con ketoprofeno. Se observó que las micropartículas con recubrimiento mostraron una buena adhesión en la mucosa del intestino delgado de ratas. Además de mostrar niveles plasmáticos más altos y más estables de ketoprofeno que las micropartículas sin recubrimiento.

En otras investigaciones, se han analizado las micropartículas de quitosano para sistemas de liberación específica. Shah y cols. (1999) elaboraron microesferas de quitosano cargadas con amoxicilina y metronidazol para liberación específica en el estómago, como tratamiento a infecciones por *Helicobacter pylori*. También se ha estudiado el comportamiento de las micropartículas de quitosano para liberación de insulina dirigida al colon. Las cargas positivas de las micropartículas de quitosano permiten una mejor bioadhesión al intestino por su interacción con la mucosa. Lo que se relacionó con una disminución de glucosa a los valores óptimos en sangre durante la evaluación in vivo en ratas diabéticas (Wei et al., 2010).

En un estudio reciente, Luque-Alcaraz y cols. (2012), investigaron la posibilidad de cargar nanopartículas de quitosano con nobiletina. La atención que recibe este flavonoide se basa principalmente en sus propiedades antioxidantes, antitumorígenas y antiproliferativas. Se utilizó espectroscopía de infrarrojo para evaluar la inclusión de nobiletina en la matriz. Se encontró una banda centrada en  $1626\text{ cm}^{-1}$ , que se cree asociada con la posible formación de un enlace imina entre los grupos amino del quitosano y los carbonilos de la nobiletina, formando bases de Schiff. Estos resultados indican que la nobiletina se unió químicamente al quitosano. Es importante señalar que esta unión de carácter iónico es reversible en condiciones ácidas, lo que permite la liberación de la nobiletina de las nanopartículas.

Amidi y cols. (2008), prepararon micropartículas de cloruro de N-trimetil quitosano (TMC) y dextrano cargadas con insulina mediante procesamiento con  $\text{CO}_2$  supercrítico ( $40\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $110\text{ bar}$ ), utilizando la técnica de spray-drying. El tamaño promedio de las micropartículas fue de  $4\text{ }\mu\text{m}$ . Los análisis mediante HPLC mostraron una carga de insulina de 9.0-9.7%, valores muy cercanos al radio de alimentación (10%), y no se encontraron picos indicativos de productos de degradación química de la insulina. También se realizó un análisis de las micropartículas después de un año de almacenamiento a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  en viales con nitrógeno, encontrando que estas permanecieron estables sin mostrar agregación ni colapso de las estructuras. Además la insulina de las micropartículas de TMC mostró una excelente preservación, mientras que la insulina de las micropartículas de dextrano se degradó en un 10%. Esta estabilidad en el TMC se atribuye a su carácter catiónico, ya que las interacciones entre el TMC y la insulina pueden brindarle una mejor protección durante su almacenamiento en condiciones secas.

En otra investigación, Okamoto y cols. (2003) obtuvieron micropartículas de quitosano cargadas con plásmidos mediante el procesamiento con  $\text{CO}_2$  supercrítico. Utilizaron un promotor de citomegalovirus marcado con la enzima luciferasa (pCMV-Luc). La adición de quitosano en la preparación de las

partículas de pCMV-Luc ayudó a evitar la degradación durante el procesamiento con el CO<sub>2</sub> supercrítico. Las micropartículas de quitosano-pCMV-Luc se suministraron a pulmones de ratas, observando un incremento de actividad de enzimas luciferasas en comparación con el suministro de partículas de pCMV-Luc sin quitosano. En partículas de quitosano- pCMV-Luc (N/P) la actividad enzimática fue 27 veces más alta. Durante su almacenamiento (4 semanas), las partículas en polvo presentaron mayor estabilidad que las partículas en solución.

### **Aerogeles de Quitosano Acarreadores de Moléculas Bioactivas**

Actualmente, se realiza investigación en el uso de aerogeles. Si bien, no hay muchos estudios donde se apliquen aerogeles como agentes acarreadores, sus propiedades despiertan el interés en su análisis. Las propiedades de los aerogeles no solo influyen en la adsorción de las moléculas bioactivas, además se relaciona con la capacidad máxima de carga. Ésta se incrementa con una mayor área superficial y volumen de poro del aerogel. Se ha observado que tanto el área superficial como la estructura interna de la matriz de transporte influyen en la liberación de los compuestos bioactivos (García-González et al., 2011). Se han buscado formas de obtener matrices secas que mantengan compuestos activos. Sin embargo, aún se requiere generar información básica sobre este tema.

En la bibliografía, podemos encontrar dos formas diferentes de cargar los aerogeles con compuestos activos. Una opción es cargarlos durante el proceso de sol-gel. En este caso, el compuesto puede cargarse en el solvente antes de la gelificación (co-gelificación) (Lee y Gould, 2006), o bien, a través del proceso de intercambio del solvente, mediante la adsorción en la estructura del gel húmedo (Mehling et al., 2009). Esta última estrategia, consiste en disolver previamente el compuesto activo en el nuevo solvente. Se deben de tomar en

cuenta ciertos parámetros de la molécula de interés que se va a cargar al momento de trabajar con estos materiales. Entre ellos la solubilidad y dispersabilidad en la fase sol (en el caso de la co-gelificación) y bajo las condiciones de co-gelificación (pH y temperatura). Además su estabilidad y baja afinidad al solvente utilizado para la extracción al momento de realizar el cambio de fase antes del secado. Así como la baja solubilidad en CO<sub>2</sub> supercrítico para evitar la remoción del compuesto activo durante el secado supercrítico. Otra opción es cargar el aerogel obtenido, aquí se requiere de un post procesamiento adicional para cargar el compuesto. Este consiste en solubilizar la molécula en un fluido supercrítico para ponerla en contacto con la matriz, permitiendo la difusión a través del aerogel sin dañar la estructura (Smirnova et al., 2003; 2004 a; 2004 b; 2005)

La vía nasal proporciona un medio de acceso rápido de moléculas bioactivas a los pulmones y a la circulación de la sangre en general. Sin embargo, entre los factores limitantes para la absorción pulmonar se encuentra la pobre deposición de las moléculas en la región alveolar, la degradación y la baja absorción por las barreras epiteliales y de mucosa. Esto provoca la remoción de las moléculas del sistema respiratorio evitando el acceso a los alveolos. Por lo tanto, se requiere del uso de sistemas que protejan y estimulen la absorción de las moléculas (Manning et al., 1989; Carpenter y Manning, 2002). Se ha demostrado que las formulaciones secas de proteínas son absorbidas con mayor eficiencia en los pulmones en comparación con las formulaciones en solución (Hussain et al., 2006). Los aerogles de polisacáridos, pueden ser considerados como matrices útiles acarreadoras de fármacos aplicadas mediante inhalación. La baja densidad (0.05-0.3 g/cm<sup>3</sup>) y alta porosidad (> 90%) de las partículas secas del aerogel, les dan una mayor capacidad de fluir con el aire hasta los pulmones. Con esto, se reduciría la dosis de medicación y la frecuencia en su dosificación (Chow et al., 2007; García-González et al., 2011).

Molvinger y cols. (2004) reportan valores de área superficial de 73-149 m<sup>2</sup>/g en aerogeles en forma de micropartículas de sílice-quitosano (80:20 p/p). En el estudio de aerogeles de sílice-quitosano como sistemas de liberación controlada, se reportan cargas de gentamicina de 17% en peso (Miao, et al., 2006). Además, estos aerogeles pasaron las pruebas de citotoxicidad presentando un nivel muy bajo de daño celular (Ayers y Hunt, 2001). En cambio, en aerogeles de quitosano-óxido de titanio se observó un área superficial de 450-480 m<sup>2</sup>/g, volumen de poro de 1.3-1.9 cm<sup>3</sup>/g y radios de poro de 35-56 nm. La matriz compuesta presentó nuevas propiedades de estabilidad en soluciones ácidas (ácido acético 0.1 N) y en soluciones básicas (NaOH 0.1 N) que no se presentaron en los aerogeles de los materiales por separado (El Kadib et al., 2008).

En otros estudios se reporta la obtención de aerogeles en forma de micropartículas de quitosano con montmorillonita (Na-MTT). Una solución de ambos componentes se goteó sobre NaOH, las micropartículas se recolectaron, se lavaron y se realizó el intercambio de fase acuosa a alcohol para su secado supercrítico con CO<sub>2</sub>. Estas microesferas presentaron valores de área superficial de 180-320 m<sup>2</sup>/g (Ennajih et al., 2012). De igual forma, se fabricaron aerogeles en forma de micropartículas de quitosano, los cuales se cargaron con alcóxidos metálicos durante el intercambio de fase líquida. Estos materiales presentaron estructuras mesoporosas con áreas superficiales de 107-308 m<sup>2</sup>/g dependiendo del tipo de alcóxido utilizado (El Kadib et al., 2011).

En el análisis de las matrices de quitosano cargadas, se han encontrado interacciones químicas entre el polisacárido y algunas moléculas. Estas interacciones les dan estabilidad a los compuestos en las matrices y ayudan a liberarlos de forma más eficiente no solo por difusión, sino también por la degradación de los sistemas. Por ejemplo, la amina primaria del quitosano reacciona con aldehídos y cetonas para dar lugar a bases de Schiff (aldiminas y cetiminas), como en el caso de las nanopartículas de quitosano cargadas con

nobiletina (Luque-Alcaraz et al., 2012). Además, esta interacción también podría darle estabilidad a las molécula disminuyendo su extracción al someter las matrices a procesos de secado con CO<sub>2</sub> supercrítico. Por lo tanto, la nobiletina es una molécula atractiva para analizar el efecto de las interacciones ante el procesamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico en la obtención de materiales porosos nanoestructuradas como acarreadores de moléculas bioactivas.

Las condiciones óptimas de extracción de nobiletina con CO<sub>2</sub> supercrítico ya han sido reportadas. Mendiola y cols. (2007), realizaron un estudio donde se observó el efecto de la temperatura y la presión sobre el rendimiento. Se encontró que el extracto aumenta al pasar de 20 a 30 MPa, pero disminuye considerablemente al llegar a 40 MPa. El aumento en la presión provoca un aumento en la densidad, lo que altera la solubilidad del soluto. En otro estudio realizado por Ying-Hung y cols. (2010), las condiciones óptimas de temperatura y presión para la extracción fueron 80 °C y 30 MPa, respectivamente. El etanol acuoso (85% de etanol en agua) fue el mejor co-solvente. Por último, el flujo de CO<sub>2</sub> que dio mejor resultado fue de 3.0 mL/min por 80 min. Basándonos en estos estudios, podemos deducir que las condiciones desfavorables para la extracción son las temperaturas por debajo de los 80 °C (alrededor de los 40 °C) y presiones por debajo de los 20 MPa o mayores de 40 MPa.

Existen muy pocos estudios sobre compuestos cargados en aerogeles de quitosano. Estos materiales son prometedores en los sistemas de liberación controlada por las propiedades que adquieren en área superficial y porosidad, que pueden ayudar a tener una mejor eficiencia en el transporte y la liberación en áreas específicas de compuestos activos. Las características del polímero y el proceso de fabricación de aerogeles son aspectos importantes que determinan la viabilidad de producir estos sistemas. Además, como ya hemos mencionado, el quitosano presenta cualidades como mucoadhesividad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, preferentes para sistemas de liberación controlada en el organismo. Por otra parte, los conocimientos generados en

investigación sobre nobiletina, permiten inferir que funcionaría como molécula modelo para realizar estudios más a fondo en esta aplicación de los aerogeles. Conociendo sus condiciones de extracción supercrítica y su interacción química con el quitosano, podemos manipular los materiales para obtener los aerogeles cargados secados con CO<sub>2</sub> supercrítico.

### **3. HIPÓTESIS**

Es posible obtener micropartículas porosas nanoestructuradas de quitosano cargadas con nobiletina como molécula modelo, aún después de someterlas a un proceso de secado supercrítico.

## 4. OBJETIVOS

### General

Obtener y caracterizar micropartículas porosas nanoestructuradas de quitosano cargadas con nobiletina como molécula modelo.

### Particulares

- ✓ Producir micropartículas de quitosano y de quitosano cargadas con nobiletina.
- ✓ Obtener las micropartículas porosas nanoestructuradas mediante el proceso de secado supercrítico.
- ✓ Caracterizar las micropartículas porosas nanoestructuradas.
- ✓ Evaluar la carga de las micropartículas porosas nanoestructuradas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

#### Quitosano

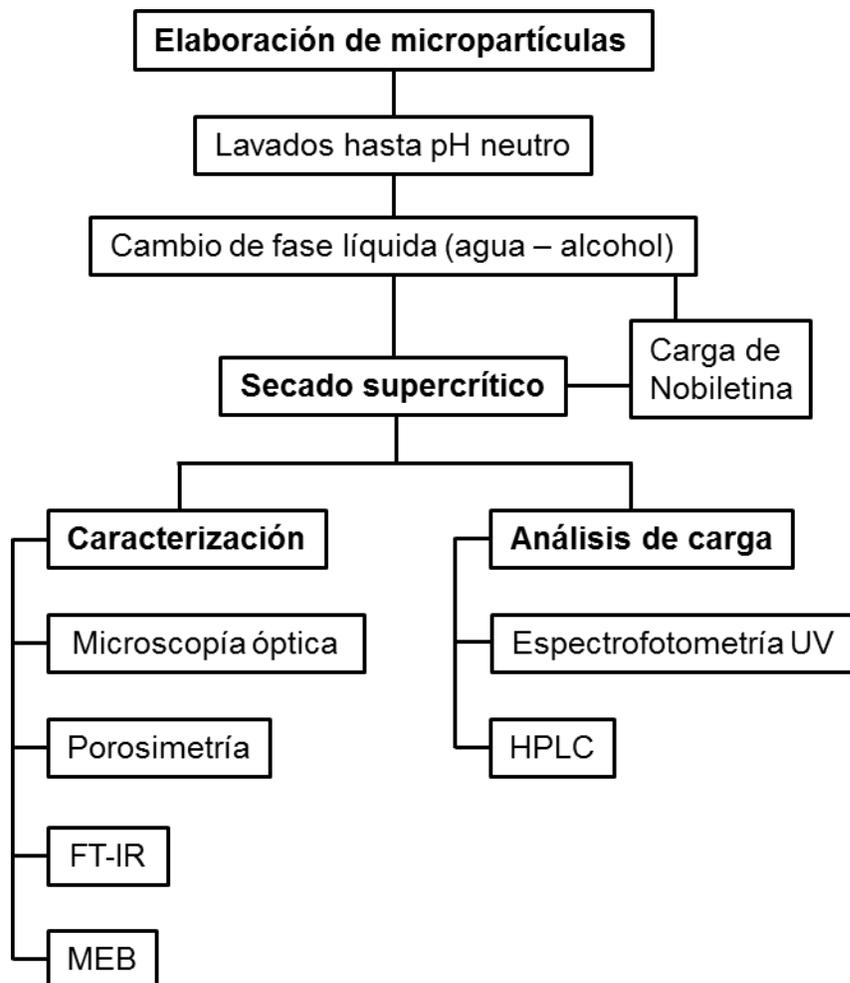
En la producción de las micropartículas se utilizó un mismo lote de quitosano. Esto con el fin de mantener sus características fisicoquímicas constantes en el proceso de fabricación de las matrices porosas nanoestructuradas. Se utilizó quitosano de cáscara de camarón (*Pandalous borealis*) de marca comercial ChitoClear® (Primex), lote No. TM 1961. El grado de acetilación es del 20% determinado mediante titulación conductimétrica por el proveedor, y del 16.3% determinado por RMM <sup>13</sup>C. El peso molecular promedio en peso ( $M_w$ )=  $201.3 \times 10^3$  g/mol determinado por dispersión de luz (Lizardi-Mendoza, 2007).

#### Reactivos

Los solventes y reactivos utilizados durante la obtención y análisis de las matrices fueron de grado analítico. En la fabricación de las micropartículas se utilizó hidróxido de sodio (NaOH) y ácido acético glacial (HAc) (St. Louis, MO 63103, USA) de Sigma Aldrich. Se utilizó agua destilada en todas las diluciones. En el proceso de secado supercrítico se empleó CO<sub>2</sub> líquido grado Coleman (99.99% pureza) marca INFRA. Como molécula modelo para cargar las micropartículas se utilizó nobiletina (≥98%) marca Sigma Aldrich N 1538 (peso molecular: 402.39 g/mol).

## Métodos

En la Figura 2 se muestra el esquema general de trabajo. Como se puede apreciar, comenzamos con la obtención de los hidrogeles microparticulados de quitosano, para después realizar los lavados y el cambio de solvente seguido de la carga. Luego se someten al proceso de secado supercrítico con CO<sub>2</sub>. Una vez hecho esto, se analizan las micropartículas para posteriormente llevar a cabo comparaciones entre los aerogeles cargados y sin carga. Por último, se realizan los experimentos de cuantificación de carga de nobiletina en las micropartículas porosas nanoestructuradas.

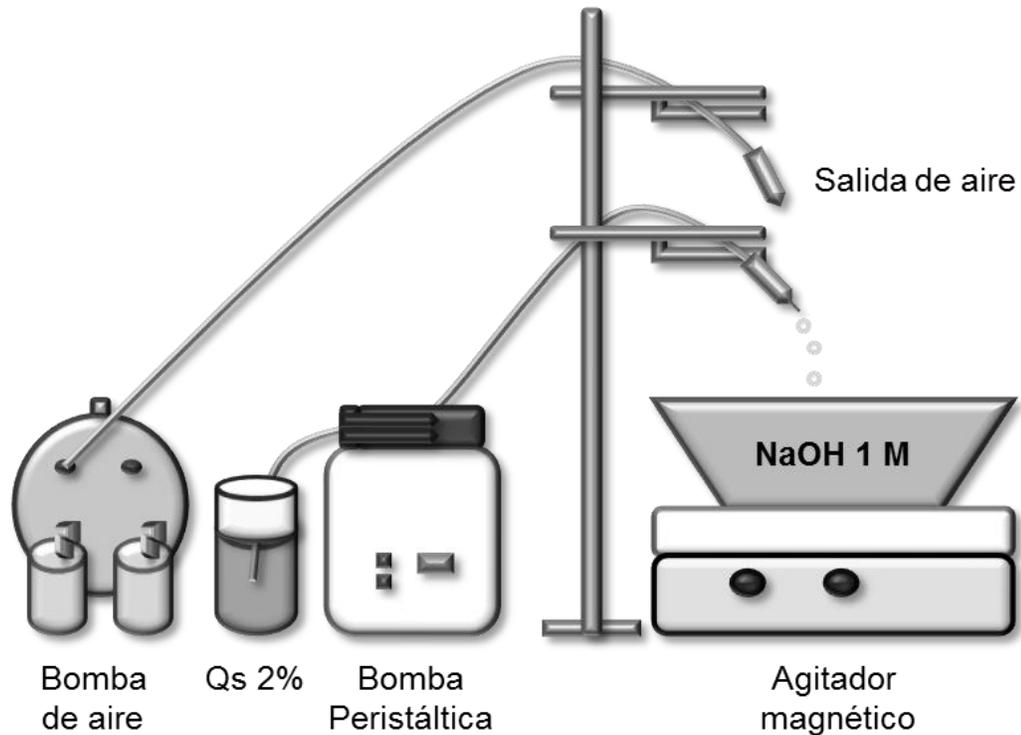


**Figura 2.** Esquema general de trabajo

## **Formación de las Micropartículas**

En el proceso de obtención de hidrogeles microparticulados, se siguió la técnica reportada por Quignard y cols. (2008) con las modificaciones de acuerdo a Hinojosa (2014). Se preparó una solución de quitosano al 2% en ácido acético (0.3 M), dejándola en agitación constante durante 24 h (Rinaudo et al., 1999). Posteriormente se pasó la solución por un filtro Whatman de 50  $\mu\text{m}$  para eliminar las impurezas. La solución se mantuvo en refrigeración durante 24 h para después proseguir con la fabricación de las matrices.

Para llevar a cabo el proceso de gelificación y obtener las micropartículas, se gotearon 50 g de la solución de quitosano sobre 2 L de NaOH (1 M). Esto a través de una jeringa de insulina con una aguja de 1.3 mm de diámetro. Se utilizó una bomba peristáltica Gilson Minipuls 3 a 2.80 rpm para regular la extrusión de la solución a través de la jeringa. Con el fin de producir micropartículas más pequeñas, se colocó un flujo de aire transversal a dos centímetros de separación de la punta de la aguja. Al caer la solución de quitosano en el NaOH, se lleva a cabo una neutralización del disolvente del quitosano (ácido acético) generando geles físicos, los cuales permanecieron en agitación durante dos horas (Figura 3). Las micropartículas se recolectaron y se lavaron con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. Posteriormente se almacenaron refrigeradas hasta su procesamiento (Sinha et al., 2004; El Kadib et al., 2011; Hamid et al., 2012).



**Figura 3.** Representación del sistema de elaboración de micropartículas.

### **Cambio de Fase Líquida**

Con el fin de remover la fase líquida, se realizó un intercambio de solvente de agua a alcohol en las micropartículas, ya que este último es miscible en  $\text{CO}_2$ . Se realizaron lavados cada hora con las diluciones de etanol en agua en concentraciones de 20, 50, 80 y 100% de etanol, repitiendo dos veces cada lavado. En el caso del etanol al 100% se realizó el lavado cada dos horas hasta alcanzar cuatro lavados.

## **Carga de la Molécula Bioactiva en las Micropartículas**

Debido a que la nobiletina no es soluble en agua, presentando mayor afinidad para solventes no polares, la carga de la molécula en las micropartículas se realizó después del proceso de obtención de las mismas. Para esto, se llevó a cabo un cambio de solvente de agua a etanol en las matrices. Cuando la fase líquida en la que se encontraban las micropartículas estaba constituida por etanol al 100 %, se retiró el alcohol en exceso y se agregaron 30 mL de solución de nobiletina en etanol con una concentración de 0.1 mg/mL y se dejó en agitación durante 24 h. De esta forma, se permitió la incorporación uniforme de la molécula bioactiva en las matrices por el proceso de difusión (García-González et al., 2011; Luque-Alcaraz et al., 2012).

## **Obtención de Materiales Porosos**

Para secar las matrices y obtener las micropartículas porosas empleamos un extractor supercrítico de CO<sub>2</sub> (Sistema ESC MARC SIMS). Se utilizó un flujo de 3400 a 4800 mL/min en condiciones supercríticas (150 bar y 40 °C). Cuando se alcanzaron los 50 L, se mantuvo el sistema estático por 30 min y después se repitió el proceso cuatro veces hasta alcanzar un volumen total de 200 L. Finalmente se disminuyó la presión hasta alcanzar la presión atmosférica para retirar las muestras secas del equipo (Santos, 2013; Tsiptsias et al., 2009; 2011). Se manejaron las mismas condiciones de secado en las micropartículas porosas nanoestructuradas sin carga o blanco (MQsB) y en las micropartículas con nobiletina (MQsN).

Para analizar diferencias de los efectos de secado en las micropartículas, se obtuvieron también micropartículas de quitosano liofilizadas (MQsL). Las micropartículas se fabricaron con el mismo proceso de gelificación en NaOH,

luego se lavaron con agua bidestilada hasta alcanzar un pH neutro. Seguido a esto, se congelaron con nitrógeno líquido y se sometieron al proceso de liofilización en un equipo Freezone 6 Labconco, por 48 h.

## Caracterización de las Micropartículas Porosas Nanoestructuradas

### **Evaluación de Tamaño y Morfología de las Micropartículas**

La microscopía electrónica proporciona información local sobre la forma y el tamaño de las estructuras secundarias del material. Por lo tanto, la estructura se observó con un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM) EVO LS10 de ZEISS con un haz de electrones de 0.800 kV de intensidad a alto vacío. El tamaño de las micropartículas y su morfología se determinaron utilizando un microscopio invertido AmScope XSB-1<sup>a</sup> con el software Toupview, Ver. 3.7.

### **Identificación Química de Compuestos**

Para verificar la pureza de las matrices, así como la inclusión de nobiletina y su interacción con el quitosano, se obtuvieron espectros de las micropartículas porosas nanoestructuradas. Para ello se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) PROTÉGÉ 460 (Nicolet Instrument Corp.). Se pulverizaron las micropartículas secas y se prepararon pastillas con KBr, posteriormente se llevó a cabo su identificación. Como blanco se utilizó el mismo quitosano en polvo con el que se prepararon las soluciones (ChitoClear®, lote No. TM 1961). Las mediciones tanto del blanco como de las

micropartículas cargadas y sin carga, se realizaron por triplicado a una resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$ .

### **Área Superficial y Porosidad**

La determinación del área superficial y volumen de poro se realizó de acuerdo al método BET. Este se basa en la teoría de Brunauer-Emmett-Teller para generar isothermas de adsorción y desorción de nitrógeno. Conociendo el volumen que ocupa una molécula de nitrógeno y la cantidad de moléculas requeridas para formar una monocapa de moléculas adsorbidas, se puede conocer el área superficial de las matrices (Quignard et al., 2008).

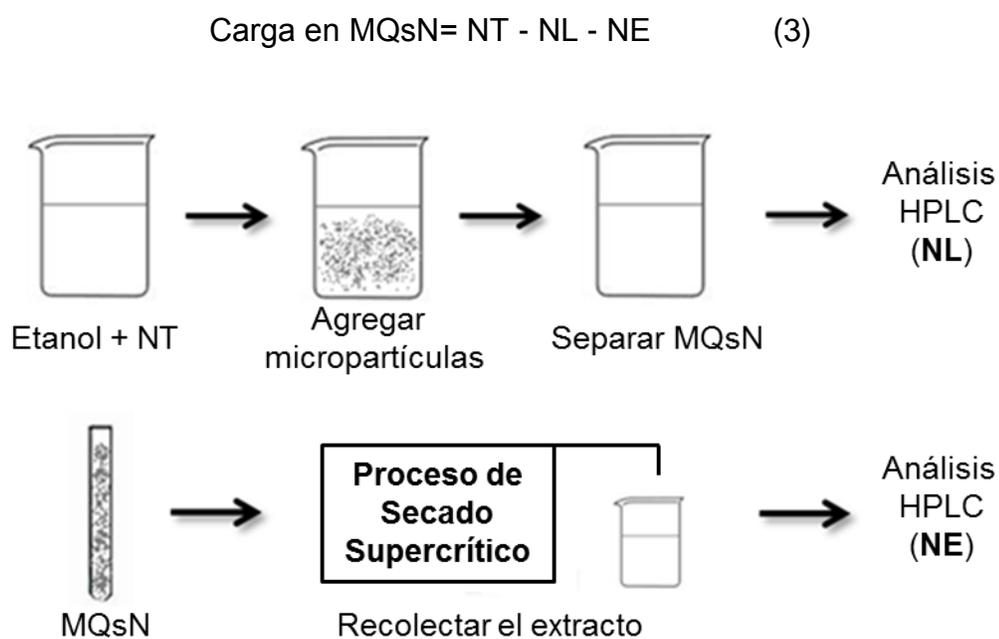
El equipo utilizado fue el analizador de área superficial y tamaño de poro Quantachrome Instrument NOVA 2200e. Las MQsB y las MQsL se desgasificaron durante 24 h a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las MQsN se desgasificaron el mismo tiempo a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente se procedió a su análisis manejando temperatura constante a  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ , y después de formar la monocapa se aumentó la presión para rellenar los poros y obtener el valor de porosidad. Las mediciones se llevaron a cabo con  $0.05 - 0.10 \text{ g}$  de aerogeles y se realizaron por triplicado para cada muestra.

### **Eficiencia de Asociación y Capacidad de Carga**

Para analizar el sobrenadante donde se encuentra la nobiletina liberada, se utilizó un equipo de HPLC ThermoScientific con detector UV-Vis proStar y una columna Varian Microsorb-MV 100-5 C18. Los solventes utilizados fueron agua grado HPLC (60%) y acetonitrilo (40%). La columna se operó a temperatura ambiente con un flujo de  $1.25 \text{ mL/min}$ , inyectando  $20 \text{ } \mu\text{l}$  de muestra por corrida.

La duración de cada análisis fue de 15 min y se realizaron a una longitud de onda de 340 nm. Las mediciones de las muestras se realizaron por triplicado.

En la Figura 4 se muestra el esquema del proceso de cuantificación de la molécula. Se partió de 30 mL de solución de nobiletina con una concentración de 0.1 mg/mL (*NT*), donde las micropartículas se dejaron en agitación durante 24 h. Después del proceso de difusión, las micropartículas fueron removidas, se midió el volumen de etanol restante y se cuantificó la nobiletina libre (*NL*), es decir, la cantidad total de molécula que no se difundió en las micropartículas. Seguido a esto, las micropartículas se llevaron al proceso de secado supercrítico. Se recolectó el etanol que se extrajo de las matrices, se midió el volumen total de extracción de etanol y se cuantificó la nobiletina presente (*NE*). De esta forma, conociendo la cantidad total de nobiletina utilizada se calculó la carga de las micropartículas por diferencia (Ecuación 3).



**Figura 4.** Proceso de cuantificación de nobiletina en las micropartículas porosas nanoestructuradas.

Al terminar el proceso de secado, se obtuvieron los pesos de los lotes de las micropartículas porosas cargadas (*PM*). Finalmente, se determinaron la eficiencia de asociación (Ecuación 4) y eficiencia de carga (Ecuación 5) de la siguiente forma:

$$\text{Eficiencia de Asociación} = \frac{NT-NL}{NT} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Eficiencia de Carga} = \frac{NT-NL}{PM} \times 100 \quad (5)$$

Para corroborar dicha carga se analizó la nobiletina presente en las micropartículas secas. Se disolvieron 0.10 g de micropartículas en 10 mL de una solución de ácido clorhídrico 0.1 M (50%) y etanol (50%) con el fin de romper las matrices de quitosano y solubilizar la nobiletina presente. Se mantuvo en agitación por 24 h y posteriormente se ajustó el pH a 7 utilizando NaOH 1 M. La solución se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos, se separó el quitosano precipitado y de ser necesario, se volvió a ajustar el pH a 7.

### **Pruebas de Difusión**

Para conocer el proceso de migración de la molécula bioactiva al exterior de las matrices de quitosano, se realizaron pruebas de difusión. Se colocaron 0.10 g de MQsN en 30 mL de etanol al 70% (v/v) y se mantuvieron en agitación constante durante todo el experimento. Se tomaron alícuotas de 2 mL del solvente a diferentes tiempos (1, 2, 4, 8, 16, 32, 48, 64, 96, 128 y 160 min). Las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10UV a una longitud de onda de 340 nm.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Elaboración de las Micropartículas

Partiendo de la solución de quitosano al 2% en ácido acético 0.3 M, se obtuvieron geles físicos microparticulados por precipitación en NaOH 1 M. Una vez obtenidas las micropartículas, se lavaron con agua destilada hasta obtener un pH neutro. Se observó un color blanco opaco en las matrices además de ser frágiles, pero con suficiente fuerza para mantenerse estables durante los lavados (Figura 5).



**Figura 5.** Hidrogeles microparticulados en agua.

## Obtención de las Micropartículas Porosas Nanoestructuradas

Previo al proceso de secado, se realizó el cambio de solvente de agua a etanol, utilizando distintas diluciones de 20, 50, 80 y 100% de alcohol. Al aumentar la concentración de etanol en el medio de las micropartículas, se fue observando mayor claridad en el solvente y una tonalidad blanca más brillante en las matrices. Una vez realizado el intercambio de fase, las micropartículas permanecieron en etanol hasta llevar a cabo el secado supercrítico con CO<sub>2</sub>. Los aerogeles presentaron una coloración blanca y, aunque continúan siendo frágiles, mostraron mayor rigidez y estabilidad que los hidrogeles (Figura 6).



**Figura 6.** Micropartículas porosas nanoestructuradas

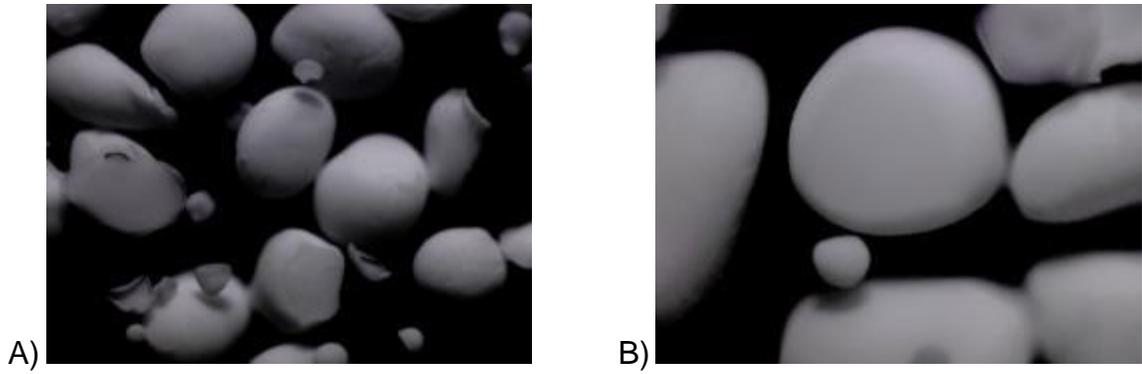
### **Micropartículas Porosas Nanoestructuradas**

Evaluación del tamaño y morfología de las micropartículas. De acuerdo con las imágenes de microscopía óptica, las micropartículas presentan variaciones en su forma y en sus tamaños. En la Figura 7 se muestran imágenes de las micropartículas porosas nanoestructuradas de quitosano (MQsB). En la imagen (Figura 7-A) se puede apreciar que no hay agregados de micropartículas y que la mayoría tienen forma de elipse, aunque también se pueden observar algunas con forma esférica. A un aumento de 10X (Figura 7-B) se puede apreciar que las micropartículas tienen superficie lisa. Por otra parte, también podemos notar que algunas de las micropartículas están de forma alargada o bien parecen aplastadas o quebradas (Figura 8). Esto puede deberse a impactos del magneto utilizado en el contenedor para mantener el agente gelificante (NaOH) en movimiento durante la etapa de fabricación de las matrices.

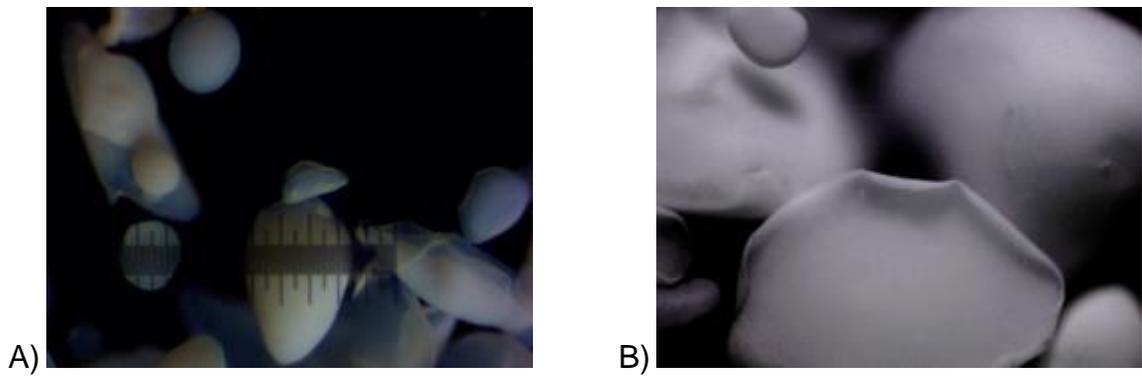
La morfología de las micropartículas fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). En la Figura 9 se observan micrografías a distintas ampliaciones de las MQsB. En A) se muestra la forma y superficie de una micropartícula a 350X, donde se puede corroborar lo apreciado en microscopía óptica, ya que se pueden apreciar partes de la superficie lisas y algunas cicatrices o concavidades que se deben probablemente al proceso de obtención. En B) se muestra una micrografía de la estructura interna (2000X), esta se observa aglomerada de forma granular, con una porosidad uniforme del material, similar a la reportada para aerogeles de quitosano (Santos 2013; Hinojosa 2014).

Debido a la forma de elipse de las micropartículas, el análisis de la distribución de tamaños se realizó de acuerdo al área ocupada en la imagen (Figura 10). Las áreas se organizaron en doce clases para tener una mayor distribución de los datos y observar de forma más precisa la frecuencia de las áreas. Para establecer los límites de cada clase, primeramente se calculó el intervalo de clase dividiendo el rango (diferencia entre el valor mayor y el valor menor) entre el número de clases. Para la clase 1, el límite inferior corresponde al valor menor de área encontrado y el límite superior corresponde al valor menor más el intervalo de clase. Para las siguientes clases, el límite inferior corresponde al límite superior de la clase anterior, mientras que para obtener el límite superior se suma el intervalo de clase calculado.

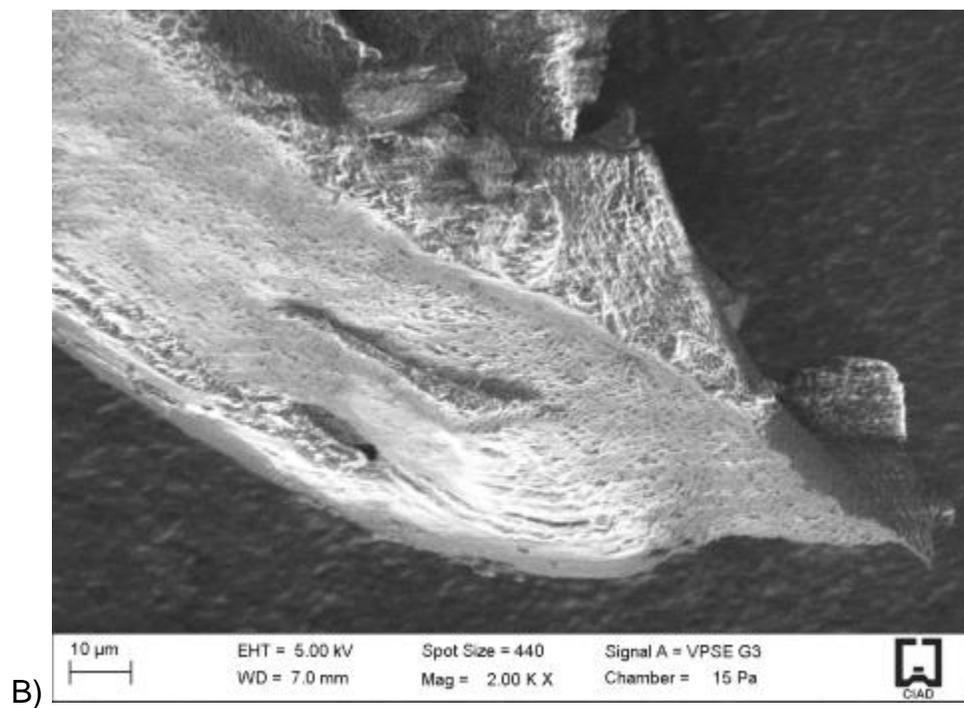
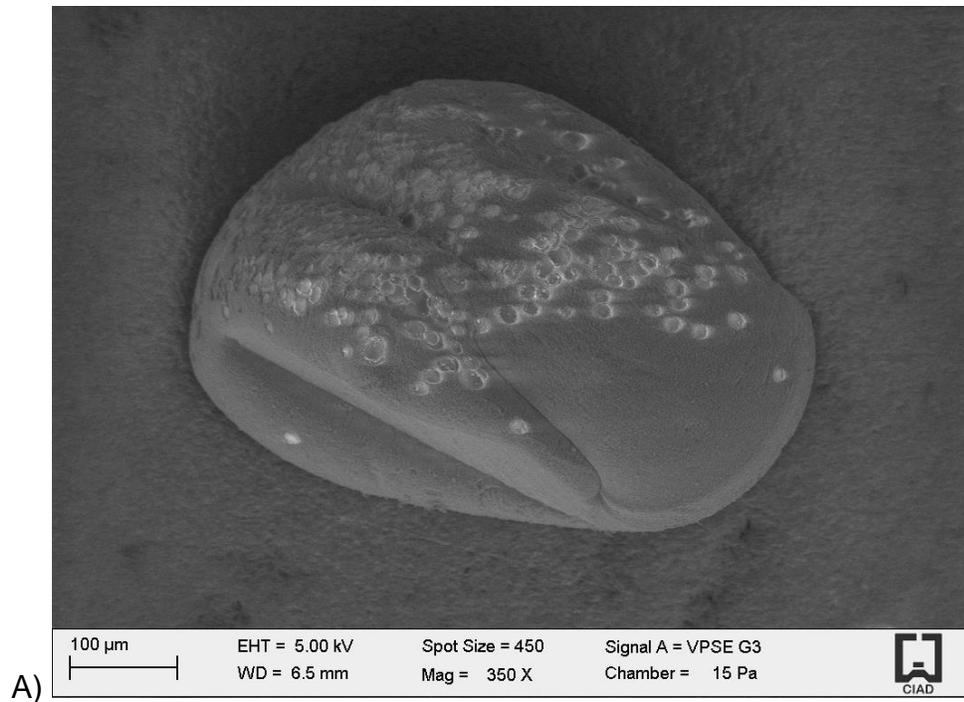
En el histograma de frecuencia para las MQsB (Figura 11), podemos observar que las de clase 1 tienen una mayor proporción con un 50%. Esta clase corresponde a micropartículas con áreas entre los 8200 y 35850  $\mu\text{m}^2$  (Tabla 1). También se analizaron las medidas de los semiejes de las micropartículas de esta clase. El semieje mayor corresponde a la distancia del centro de la elipse a su extremo más lejano, mientras que la distancia del centro al extremo más cercano es el semieje menor. Las medidas de los semiejes se reportan como el promedio  $\pm$  el error estándar. En la clase 1 de las MQsB, el promedio para el semieje mayor fue de  $85.95 \pm 2.5 \mu\text{m}$ , el semieje menor presentó un promedio de  $75.82 \pm 2.3 \mu\text{m}$ . A diferencia de las micropartículas obtenidas por Hinojosa (2014) con la misma técnica, las cuales mostraron tamaños entre los 950 y 1000  $\mu\text{m}$  de diámetro, en este caso se han obtenido matrices entre 5 y 10 veces más pequeñas.



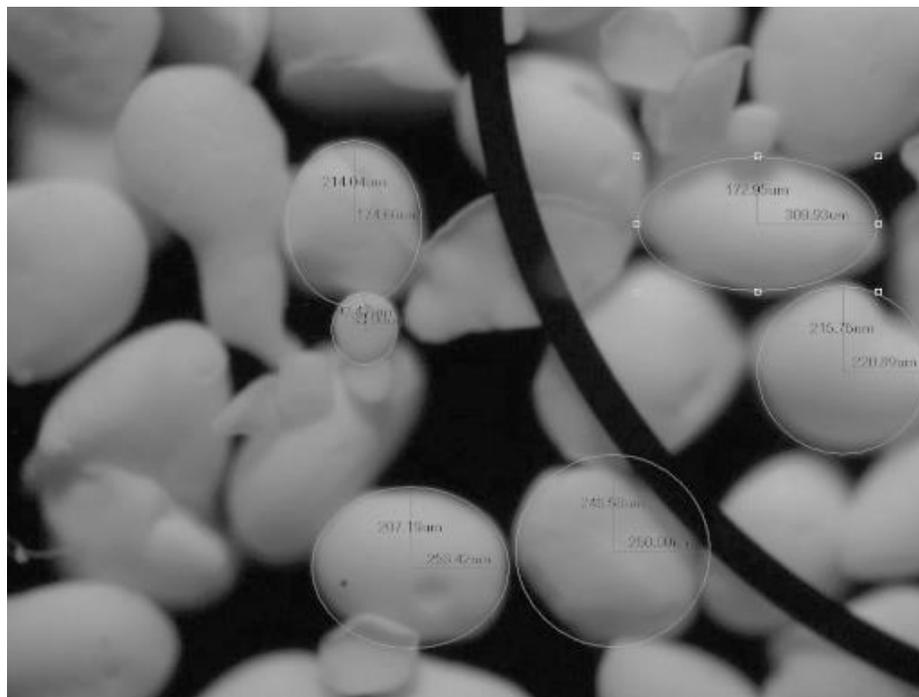
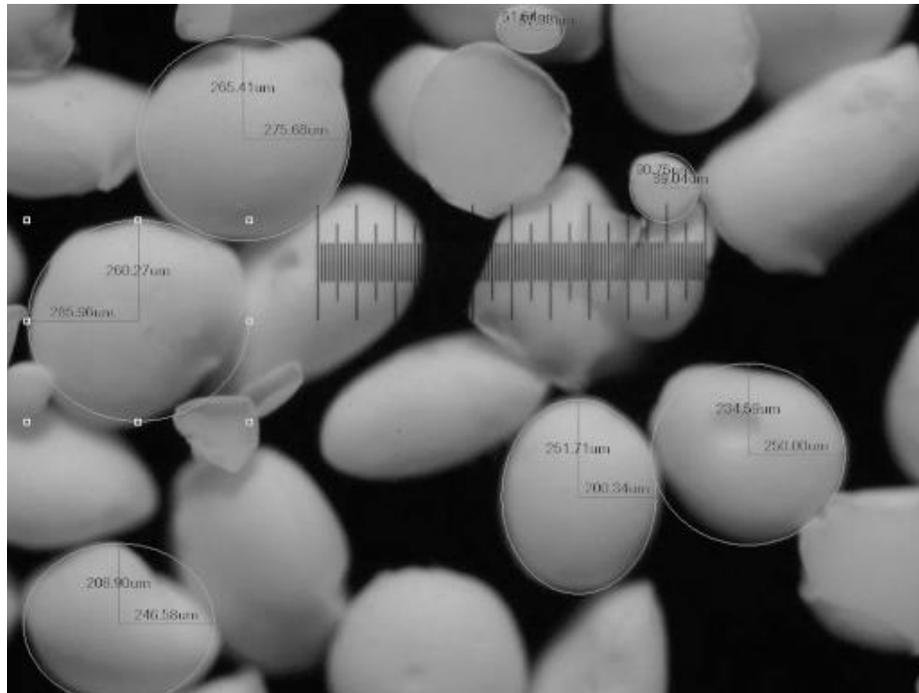
**Figura 7.** Micropartículas porosas nanoestructuradas de quitosano (MQsB).  
A) Aumento a 4X. B) Aumento a 10X.



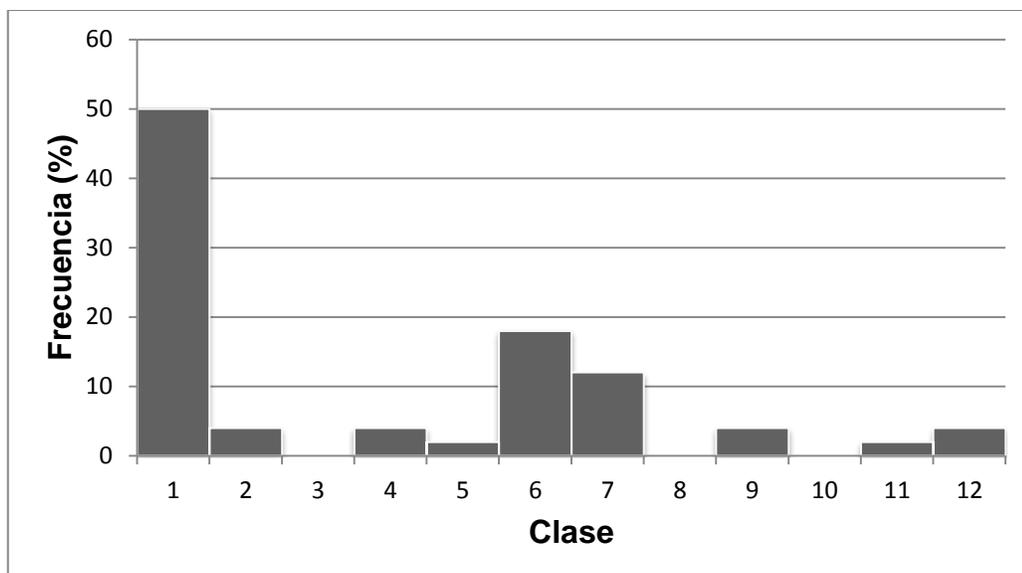
**Figura 8.** Micropartículas porosas nanoestructuradas (MQsB) quebradas y dañadas. A) Aumento a 4X. B) Aumento a 10X.



**Figura 9.** Imágenes de SEM de los aerogeles (MQsB). A) Micropartícula a magnificación de 350X. B) Estructura interna de una micropartícula a 2000X.



**Figura 10.** Ejemplos de medición de las MQSB mediante microscopía óptica.



**Figura 11.** Histograma de frecuencia de áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) de las MQsB.

**Tabla 1.** Límites de área de MQsB para cada clase.

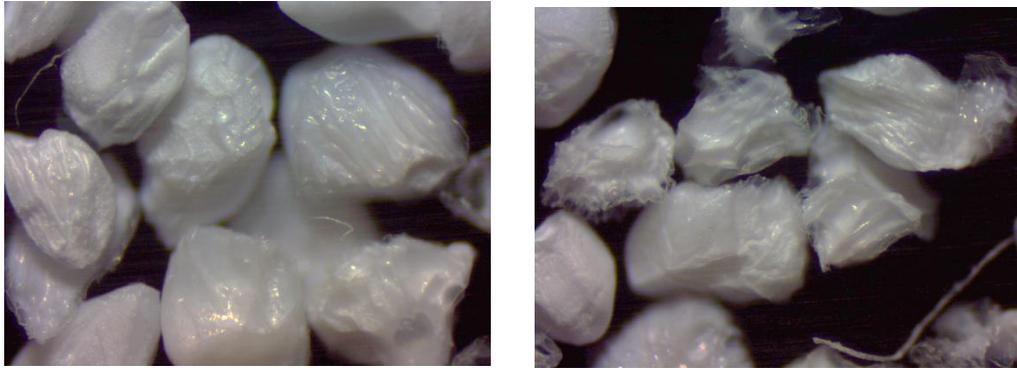
Clase	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	
	Límite inferior	Límite superior
1	8200	35850
2	35850	63500
3	63500	91150
4	91150	118800
5	118800	146450
6	146450	174100
7	174100	201750
8	201750	229400
9	229400	257050
10	257050	284700
11	284700	312350
12	312350	340000

Para hacer una comparación del tamaño y la morfología de las micropartículas secadas con CO<sub>2</sub> supercrítico, se fabricaron micropartículas con el mismo procedimiento pero secadas por liofilización. Las MQsL también muestran variaciones de tamaño y forma. Estas se muestran ovaladas y en formas irregulares en mayor proporción (Figura 12). Aunque en algunos casos las deformaciones pueden deberse al uso del magneto para la agitación del agente gelificante (como en el caso de las MQsB). En este caso las irregularidades son más marcadas tanto en la forma como en la superficie de las micropartículas. Esto puede deberse al efecto de la nucleación por la formación de cristales de hielo durante la congelación previa a la etapa de sublimación (Franks. 1998). Como resultado de este proceso, a diferencia de las micropartículas secadas por supercrítico, las superficies de las micropartículas liofilizadas se muestran ásperas y arrugadas (Figura 13).

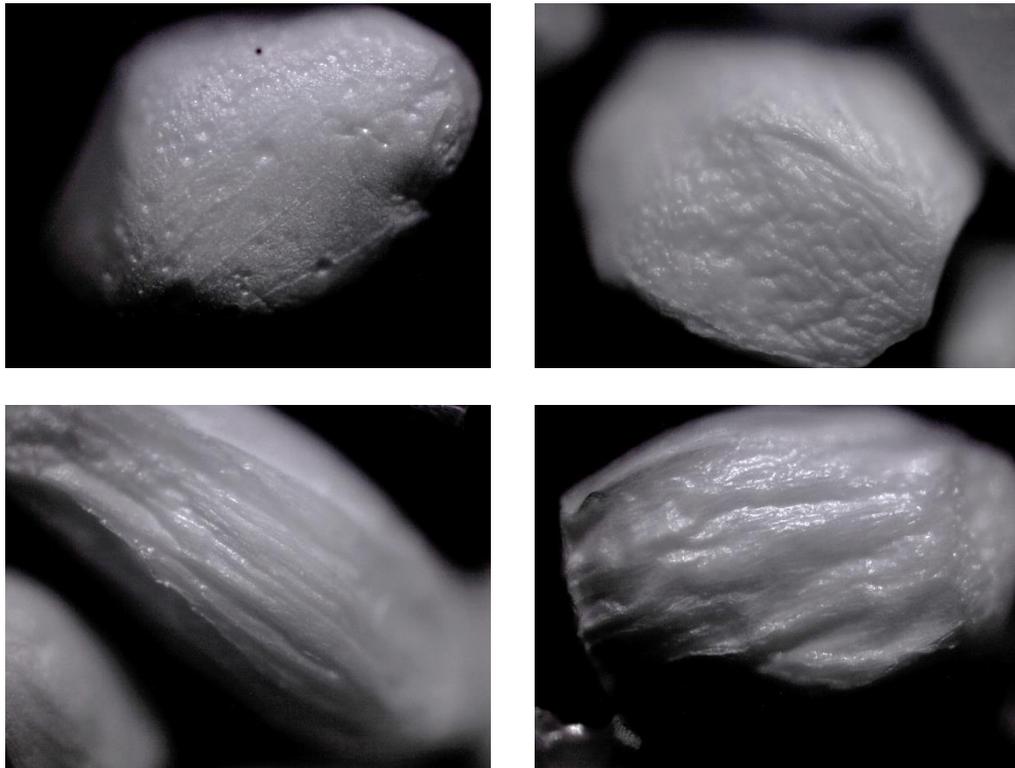
Las imágenes de SEM para las MQsL se muestran en la Figura 14. En A) podemos observar la estructura porosa heterogénea de la superficie (magnificación 1000X), además de distinguirse poros de mayor tamaño que en las micropartículas secadas en condiciones supercríticas. En B) se muestra una imagen de la estructura porosa interna a un aumento de 2000X. En el interior de la micropartícula se puede apreciar mejor el arreglo heterogéneo con poros muy grandes y zonas colapsadas. Esto, como ya comentamos, es el resultado del congelamiento y los fenómenos térmicos que ocurren en el proceso de secado (Franks. 1998).

En el histograma de frecuencia para las áreas de las MQsL se observa un comportamiento distinto (Figura 15). Las clases 7 y 8 tienen el mayor porcentaje de frecuencia con un 18% cada una. Para las micropartículas de la clase 7, las áreas se encuentran entre los 406200 y 439300  $\mu\text{m}^2$  (Tabla 2). El promedio del semieje mayor fue de  $418.37 \pm 8.7 \mu\text{m}$  mientras que el promedio para el semieje menor es de  $324.2 \pm 7.1 \mu\text{m}$ . Por otra parte, las micropartículas de la clase 8 se encuentran entre los 439300 y 472400  $\mu\text{m}^2$  de área. En esta clase, el

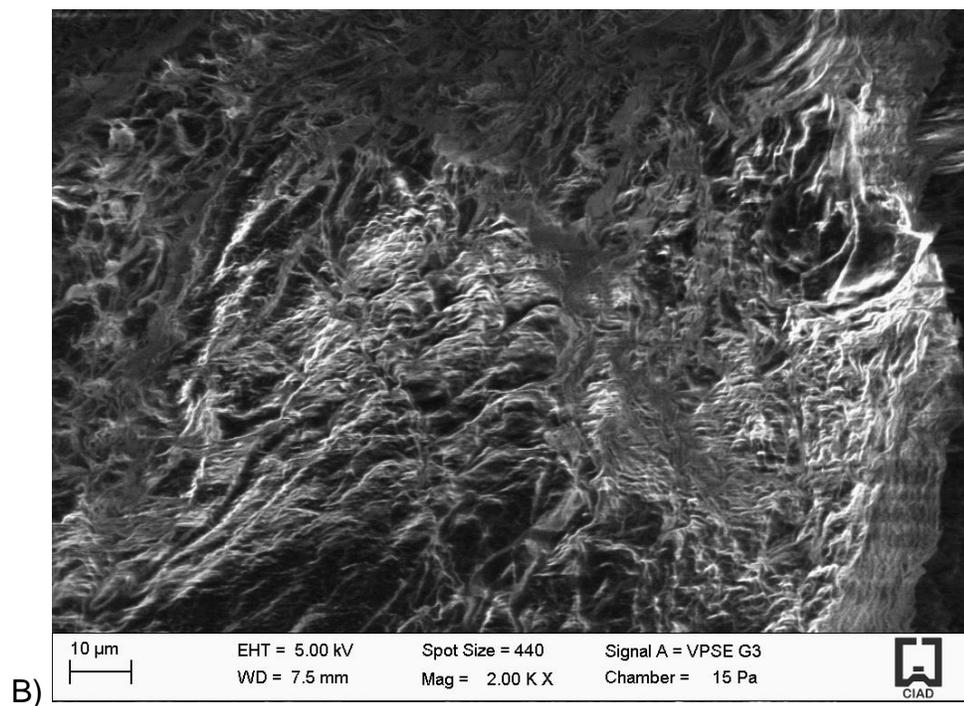
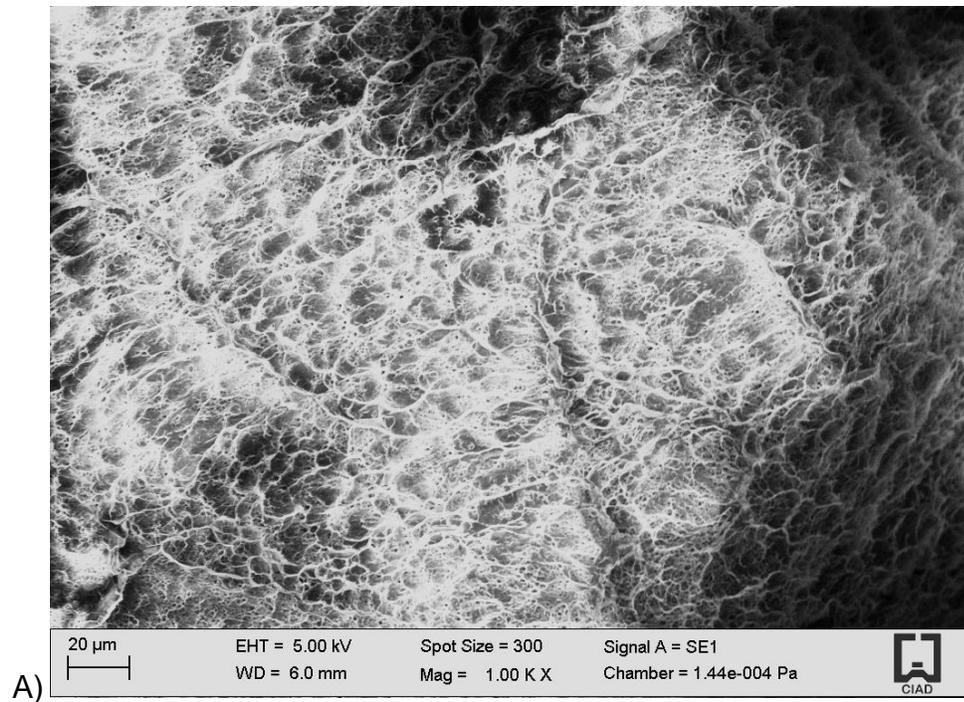
promedio del semieje mayor fue de  $416.78 \pm 8.8 \mu\text{m}$  y de  $317.16 \pm 6.8 \mu\text{m}$  para el semieje menor. Estas micropartículas son de 2 a 4 veces más grandes que las micropartículas secadas con  $\text{CO}_2$  supercrítico. Además, como se puede ver en el error estándar, los semiejes presentan valores con una gran variabilidad.



**Figura 12.** Micropartículas liofilizadas (MQsL) (magnificación 4X).



**Figura 13.** Acercamientos a la superficie de las MQsL (magnificación 10X)



**Figura 14.** Imágenes de SEM de las MQsL. A) Estructura porosa de la superficie (1000X). B) Estructura porosa interna (2000X).

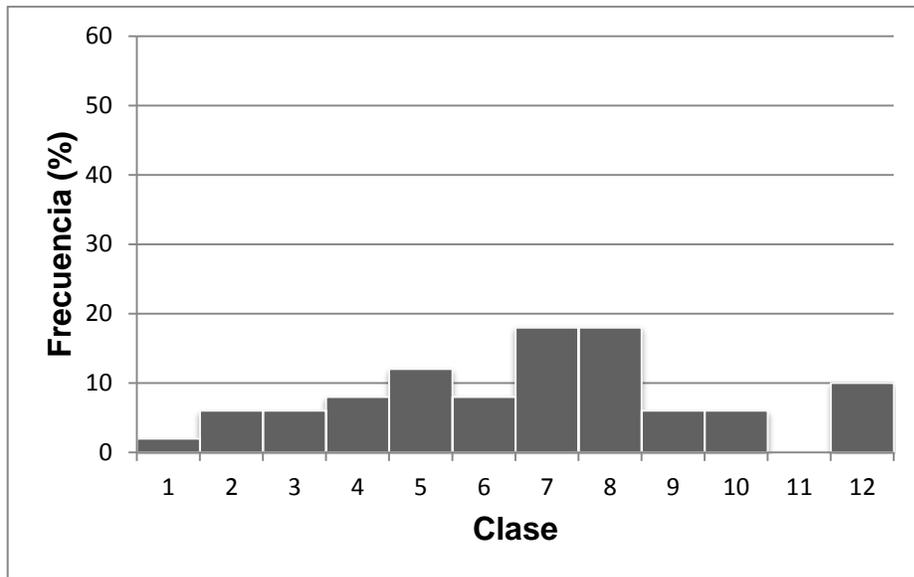
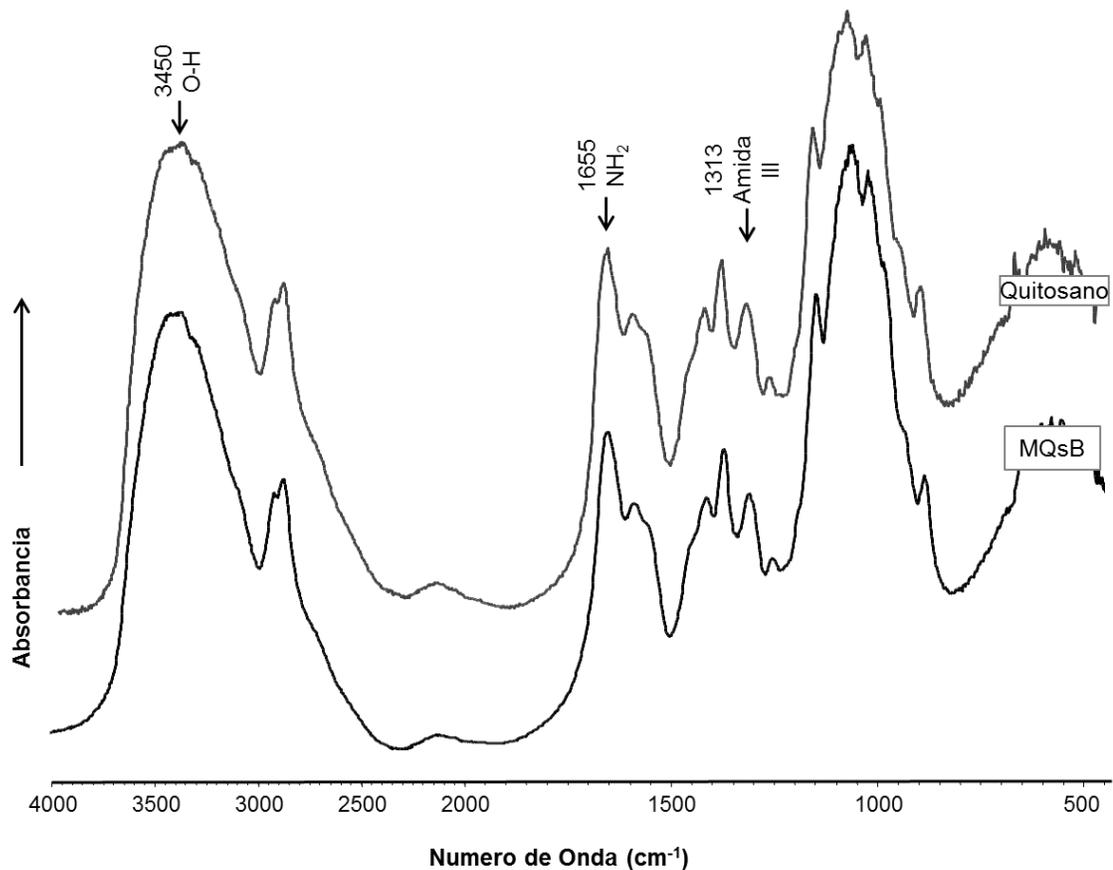


Figura 15. Histograma de frecuencia de áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) de las MQsL.

Tabla 2. Límites de área de MQsL para cada clase.

Clase	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	
	Límite inferior	Límite superior
1	207600	240700
2	240700	273800
3	273800	306900
4	306900	340000
5	340000	373100
6	373100	406200
7	406200	439300
8	439300	472400
9	472400	505500
10	505500	538600
11	538600	571700
12	571700	604800

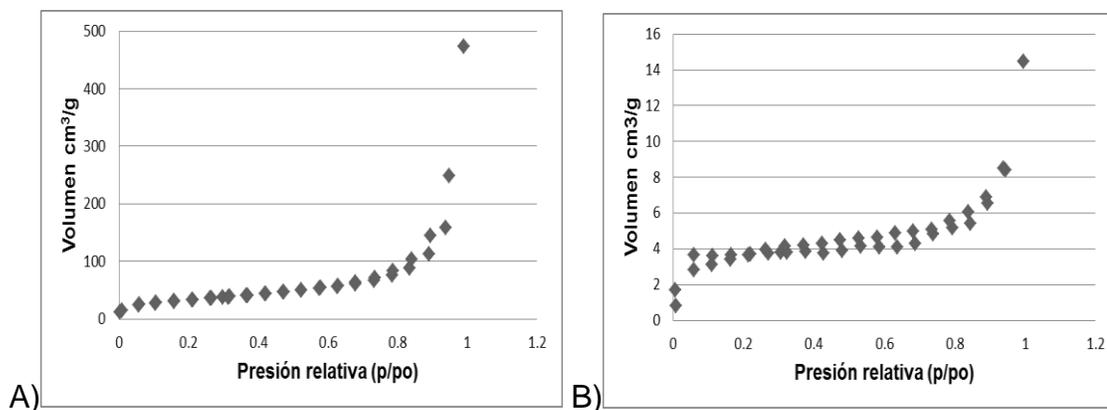
Identificación química de compuestos. Para comprobar que el proceso no estuviera alterando la estructura química del quitosano, se obtuvieron espectros con la ayuda de un FT-IR. Los datos arrojados de las micropartículas nanoporosas (MQsB) se compararon con espectros obtenidos del quitosano empleado en la elaboración de las mismas. Se observaron las bandas características a los  $3450\text{ cm}^{-1}$  (grupos O-H), a  $1655\text{ cm}^{-1}$  (amida I), a los  $1313\text{ cm}^{-1}$  (amida III),  $1082$  y  $1032\text{ cm}^{-1}$  (vibraciones del esqueleto propias de la estructura piranósica). Ambos espectros son semejantes, descartando cualquier posible alteración de esta característica fisicoquímica (Figura 16).



**Figura 16.** Espectro infrarrojo de la muestra de quitosano (Primex) y de las MQsB.

Área superficial y porosidad. Se obtuvieron los valores de área superficial específica ( $S_{\text{BET}}$ ) y volumen total de poro ( $V_p$ ) de las MQsB (Tabla 3) con la ayuda de las isothermas de adsorción BET (Figura 17-A). El  $S_{\text{BET}}$  y el  $V_p$  fueron de  $120.9 \pm 3.72 \text{ m}^2/\text{g}$  y  $0.372 \pm 0.01 \text{ cm}^3/\text{g}$  respectivamente. De acuerdo al análisis, el tamaño de poro de las MQsB fue de  $12.2 \pm 4.3 \text{ nm}$ . La isoterma de adsorción de  $\text{N}_2$  de las MQsB puede ser clasificada como tipo IV, característica de materiales mesoporosos ( $T_p = 2\text{-}50 \text{ nm}$ ) de acuerdo a la IUPAC. Hemos encontrado una menor área superficial de las micropartículas en comparación con las reportadas por Hinojosa (2014) de  $282.10 \text{ m}^2/\text{g}$ . Posiblemente esto se debe a la mayor fragilidad de las matrices, ya que al tener un menor tamaño son más difíciles de manipular y pueden ser deformadas con mayor facilidad. Sin embargo, Valentin (2005) reportó valores de  $S_{\text{BET}}$  de  $120 \text{ m}^2/\text{g}$  para aerogeles provenientes de geles obtenidos por precipitación alcalina, al igual que en nuestro estudio. El  $S_{\text{BET}}$  de las micropartículas se encuentra muy cercano a los valores reportados para aerogeles de quitosano ( $150\text{-}330 \text{ m}^2/\text{g}$ ) (Robitzer y Quignard, 2011; Santos, 2013; Moussaoui et al., 2012).

Las MQsL presentaron un  $S_{\text{BET}}$  de  $10.93 \text{ m}^2/\text{g}$ , un valor menor al reportado por Lizardi-Mendoza (2007) de  $306.8 \text{ m}^2/\text{g}$ . Esto puede deberse a alguna diferencia durante el proceso de congelación de las micropartículas con nitrógeno líquido, o durante el proceso de liofilización. No obstante, el  $S_{\text{BET}}$  se encuentra muy cercano a los valores reportados para materiales de quitosano liofilizados por Hinojosa (2014) de  $21.68 \text{ m}^2/\text{g}$ , y Reyna (2014) de  $28.29 \text{ m}^2/\text{g}$ . La isoterma de adsorción de  $\text{N}_2$  de las micropartículas liofilizadas (Figura 17-B) puede ser clasificada como tipo II, característica de materiales no porosos y macroporosos (Sing et al., 1982).



**Figura 17.** Isothermas BET de adsorción y desorción de N<sub>2</sub> de las micropartículas porosas de quitosano. A) MQsB. B) MQsL.

**Tabla 3.** Área superficial específica ( $S_{BET}$ ) y volumen de poro ( $V_p$ ) de las MQsB y MQsL.

Material	MQsB	MQsL
$S_{BET}$ (m <sup>2</sup> /g)	120.9 ± 3.72	10.93±0.506
$V_p$ (cm <sup>3</sup> /g)	0.372 ± 0.01	0.011±0.0004

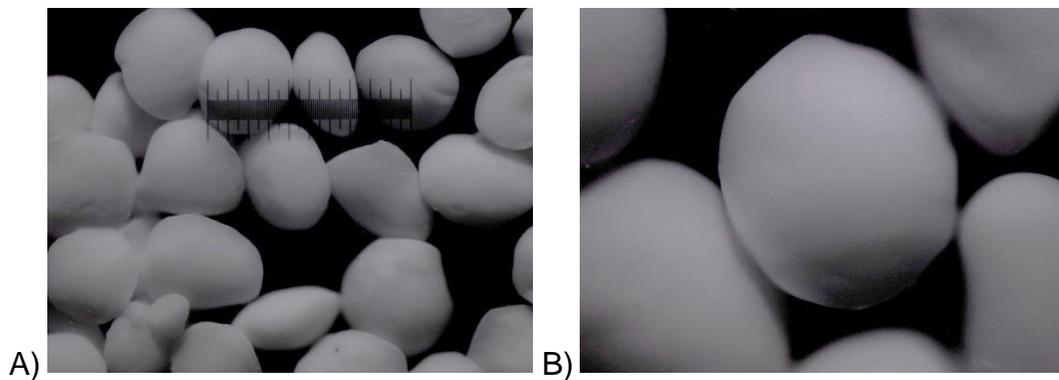
Valores promedio de 3 mediciones ± error estándar

### Micropartículas Porosas Nanoestructuradas Cargadas

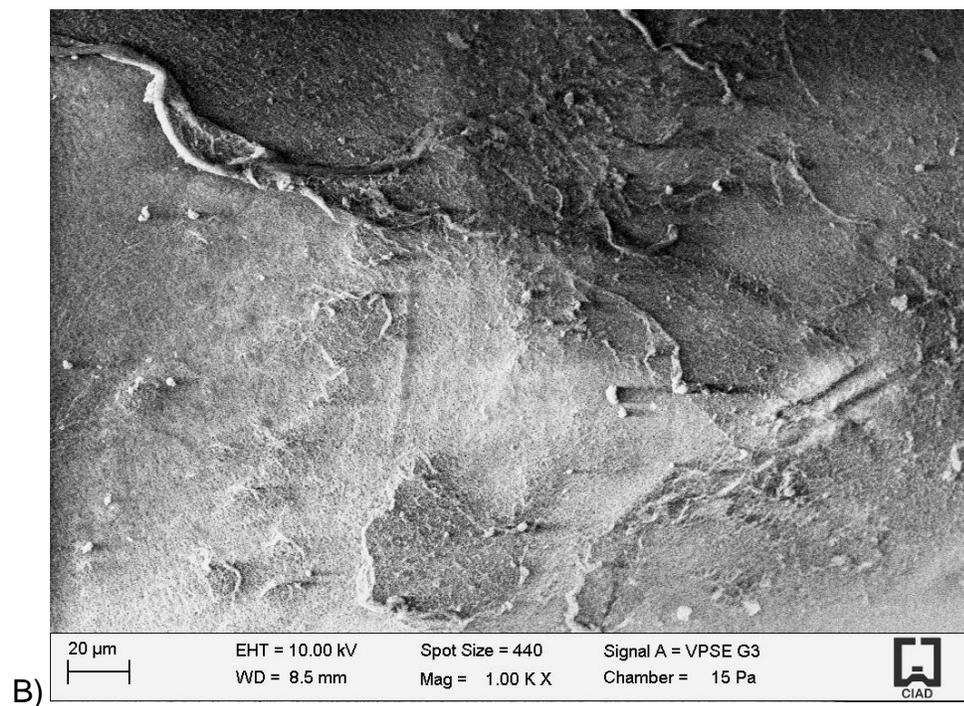
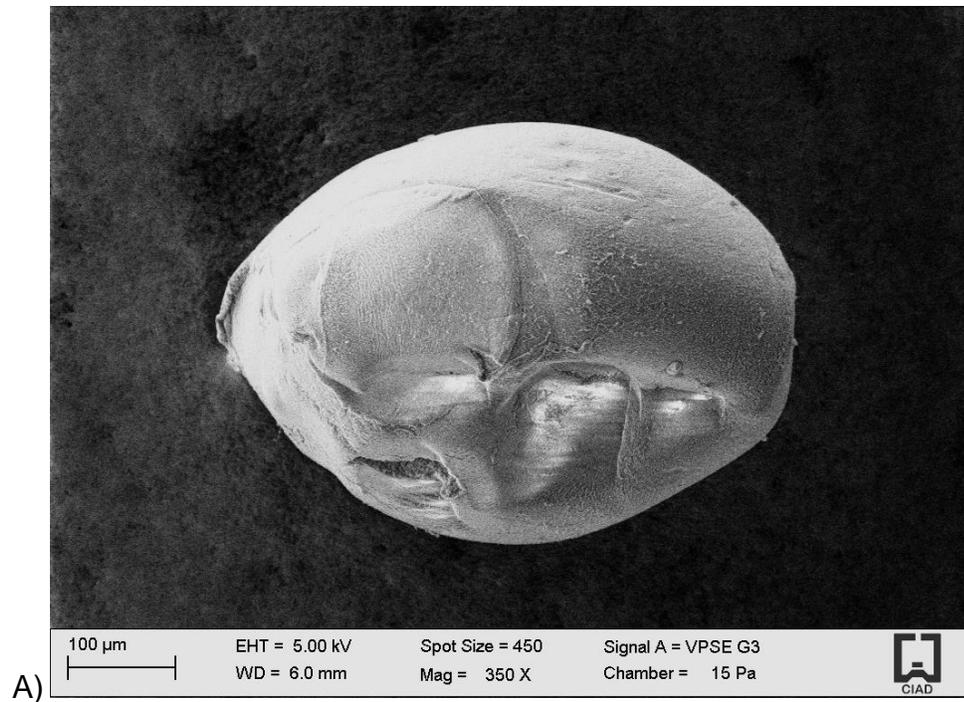
Evaluación del tamaño y morfología de las micropartículas. En las imágenes de microscopía óptica, las micropartículas con nobiletina secadas con CO<sub>2</sub> supercrítico (MQsN), al igual que las micropartículas sin carga, muestran formas de elipse y esféricas. La carga de las micropartículas no afectó la estructura de las mismas, manteniendo las estructuras lisas y uniformes. Tampoco se observa agregación de las micropartículas en este caso (Figura 18).

Las micrografías SEM para las MQsN (Figura 19) muestran resultados similares a las obtenidas de las micropartículas blanco. En la imagen A) podemos observar una micropartícula a 350X con la superficie lisa y algunas concavidades. En la imagen B) observamos un acercamiento a 1000X, donde podemos apreciar que las micropartículas no presentan heterogeneidad de poros en su superficie, manteniendo una estructura uniforme.

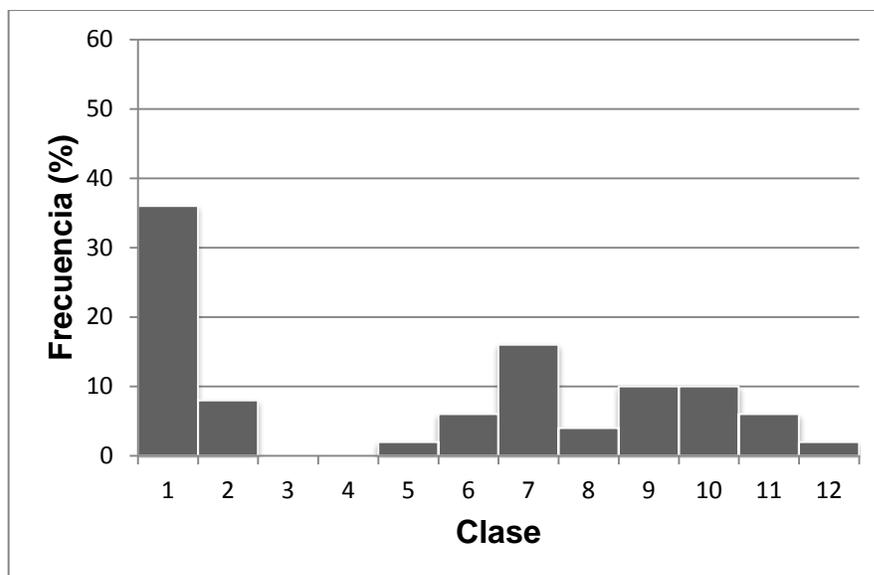
En el caso de las MQsN, el histograma de frecuencia (Figura 20) muestra un mayor porcentaje (36%) para las que se encuentran entre los 12260 y 36760  $\mu\text{m}^2$  de área (Tabla 4), correspondientes a la clase 1. Estas micropartículas presentaron promedios de  $78.95 \pm 3.1$  y  $88.18 \pm 3.5$  para los semiejes menor y mayor respectivamente. La clase con mayor porcentaje en las micropartículas cargadas es semejante a la clase sobresaliente de las micropartículas sin carga secadas en las mismas condiciones.



**Figura 18.** Micropartículas de quitosano cargadas con nobiletina secadas con  $\text{CO}_2$  supercrítico (MQsN). A) Aumento a 4X. B) Aumento a 10X.



**Figura 19.** Imágenes de SEM de los aerogeles con nobiletina (MQsN).  
 A) MQsN a magnificación de 350X. B) Superficie de una MQsN a 1000X.

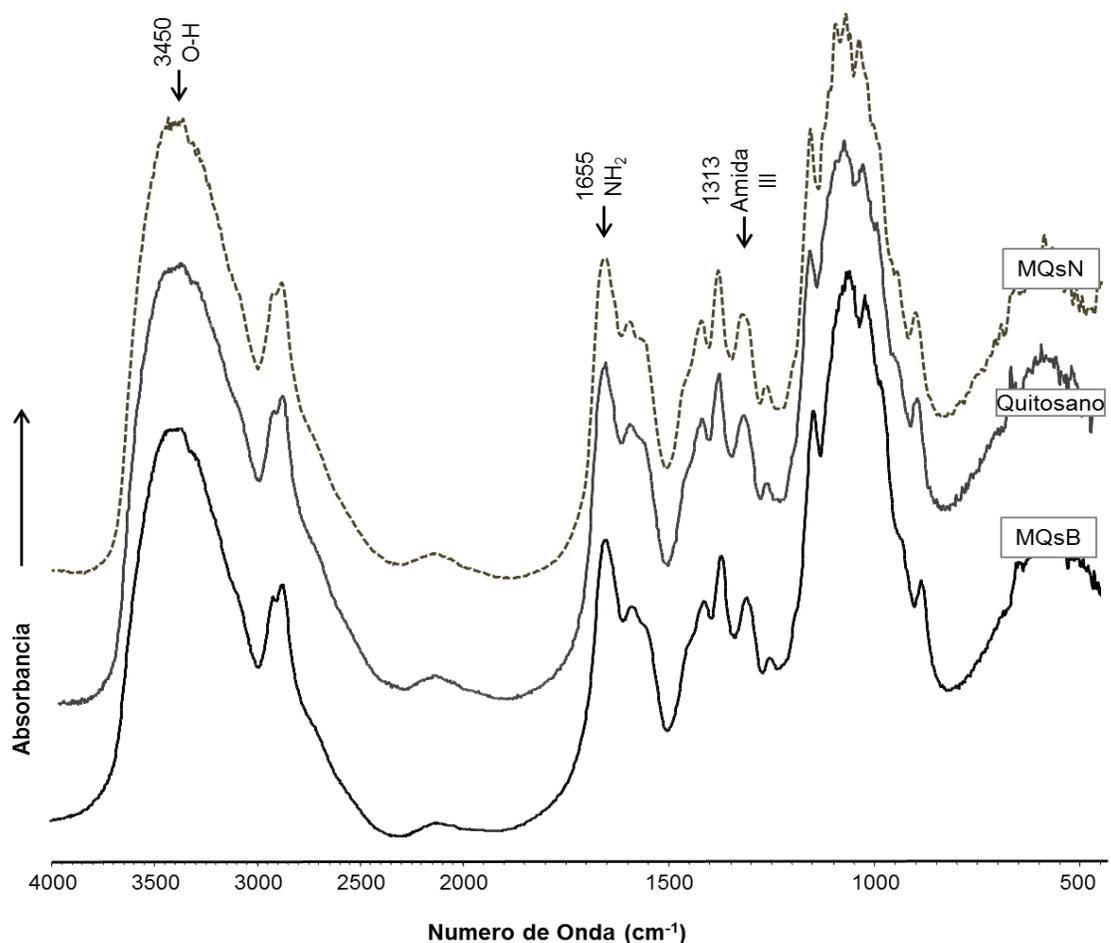


**Figura 20.** Histograma de frecuencia de áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) de las MQsN.

**Tabla 4.** Límites de área de MQsN para cada clase.

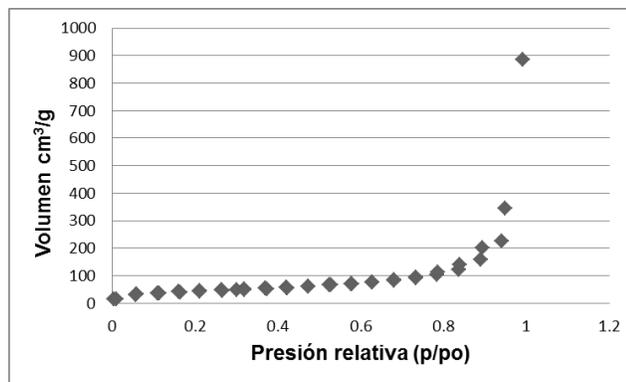
Clase	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	
	Límite inferior	Límite superior
1	12260	36760
2	36760	61260
3	61260	85760
4	85760	110260
5	110260	134760
6	134760	159260
7	159260	183760
8	183760	208260
9	208260	232760
10	232760	257260
11	257260	281760
12	281760	306260

Identificación química de compuestos. En el espectro IR (Figura 21) se buscaron las bandas  $1645\text{ cm}^{-1}$ ,  $1588$  y  $1519\text{ cm}^{-1}$  características de grupos carbonil y C=C comunes en estándares de nobiletina (ausentes en Qs). Así como una banda a los  $1626\text{ cm}^{-1}$  relacionada a la formación de la base de Schiff entre el quitosano y la molécula (Luque-Alcaráz et al., 2012). Sin embargo, en las MQsN no se detectaron los picos característicos de la nobiletina. Esto se debe a la baja proporción de la molécula en las matrices, ya que la cantidad mayor de nobiletina probable es de  $2.16\text{ mg/g}$  de quitosano. Además, al momento de elaborar las pastillas con KBr, la cantidad de la molécula presente se ve aún más reducida (por debajo del 5 %). Por lo tanto, el espectro de las MQsN es similar a los obtenidos para el quitosano empleado en la elaboración de las matrices y de las MQsB.



**Figura 21.** Espectros IR de las muestras de quitosano (Primex), MQsB y MQsN.

Área superficial y porosidad. En la Figura 22 se muestra la gráfica de isoterma de adsorción de N<sub>2</sub> de las MQsN, la cual fue utilizada para conocer el S<sub>BET</sub> y el V<sub>p</sub> de las mismas. El valor de área superficial fue de 153.88 ± 6.08 m<sup>2</sup>/g. Se puede observar un pequeño incremento en comparación con las áreas superficiales de los lotes de micropartículas sin carga. Sin embargo, se mantienen en el rango bajo de los valores reportados para aerogeles de quitosano (150-330 m<sup>2</sup>/g) (Robitzer y Quignard, 2011; Santos, 2013; Moussaoui et al., 2012). El V<sub>p</sub> se vio de igual forma aumentado a 0.49 ± 0.02 cm<sup>3</sup>/g, pero se mantiene por debajo de los valores reportados para micropartículas de quitosano secadas en condiciones supercríticas por Hinojosa (2014). El tamaño de poro encontrado en este caso fue de 11.5 ± 2.4. Al igual que en el caso de las MQsB, la isoterma de adsorción y desorción de las MQsN puede ser clasificada como tipo IV, característica de materiales mesoporosos (T<sub>p</sub>= 2-50 nm), de acuerdo con la IUPAC (Sing et al., 1982).

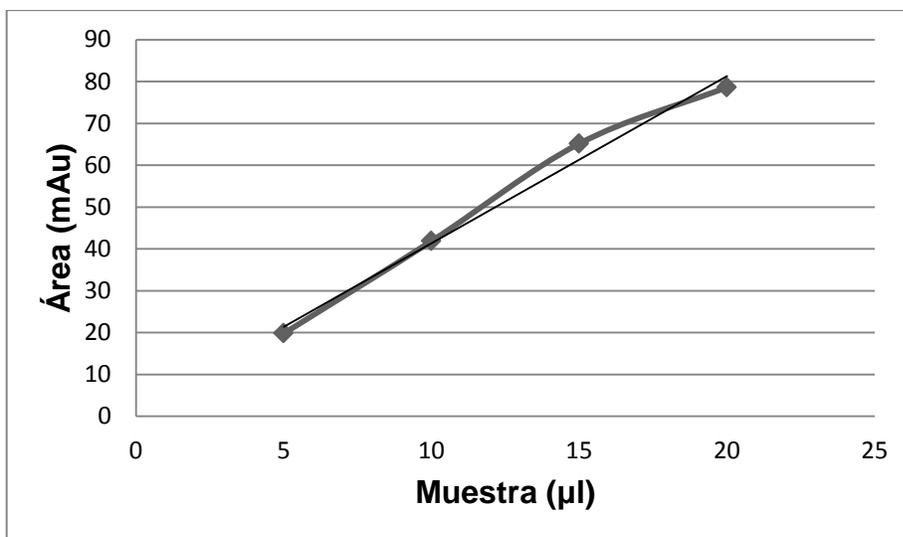


**Figura 22.** Isotherma BET de adsorción y desorción de N<sub>2</sub> de las MQsN.

Eficiencia de asociación y capacidad de carga. Para conocer la eficiencia de asociación de nobiletina en las MQsN se analizaron 3 lotes de las mismas, las cuales fueron sometidas al mismo proceso. Primeramente se cuantificó la nobiletina libre en etanol posterior al proceso de carga en cada lote. Seguido a esto, se recolectó y analizó la nobiletina presente en la fase líquida (etanol)

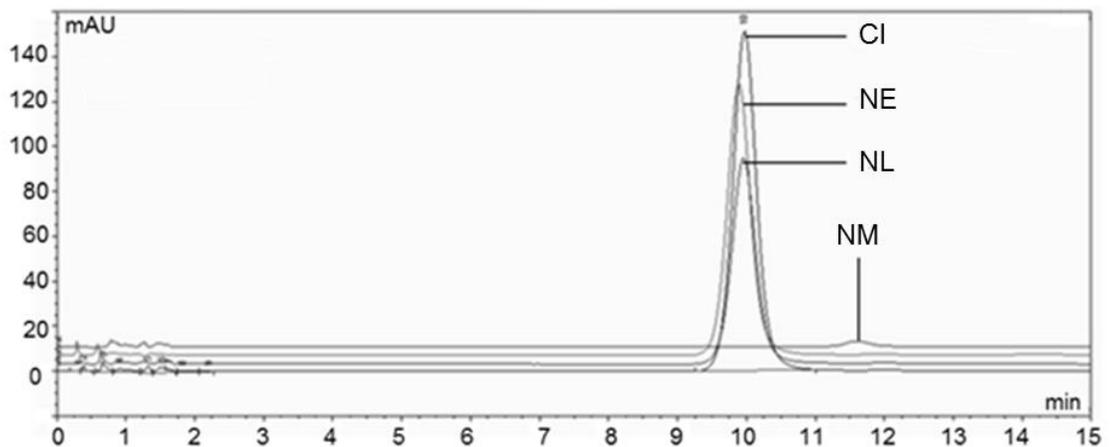
extraída durante el proceso de secado supercrítico. En base a estos datos se calculó la nobiletina presente en las micropartículas por la diferencia con respecto al total de la molécula utilizada para la carga.

En la Figura 23 se muestra la curva de calibración para la cuantificación de nobiletina por HPLC. Se realizaron 4 inyecciones con volúmenes de 20, 15, 10 y 5  $\mu\text{l}$  para hacer diluciones sobre la concentración inyectada. Se partió de una solución de nobiletina de 0.1 mg/mL. Los análisis se realizaron por duplicado para la obtención de la curva. Se graficó cada volumen de muestra contra el promedio de las áreas obtenidas a partir de los picos de absorbancia detectados en los cromatogramas. El valor de  $R^2$  fue de 0.9878 y la ecuación de la recta  $y = 3.9955x + 1.4098$ , de donde se despejó  $x$  para calcular las concentraciones de las muestras, tomando los promedios de los valores de las áreas como  $y$ .



**Figura 23.** Curva de calibración para la cuantificación de nobiletina en HPLC.

Los cromatogramas obtenidos durante el análisis de las muestras de nobiletina fueron similares. En la Figura 24 se muestra el cromatograma correspondiente a las MQsN del lote 2. Se observan los picos obtenidos para la concentración inicial (CI), la nobiletina libre después del proceso de difusión (NL), la nobiletina que se extrajo en el proceso de secado supercrítico (NE) y la nobiletina que se cuantificó en las micropartículas de quitosano secas (NM).



**Figura 24.** Cromatograma de la cuantificación de nobiletina en el proceso de obtención de las MQsN lote 2.

En el análisis de las muestras se encontró un  $32 \pm 4.6$  % de nobiletina libre tras el proceso de difusión (NL). Durante el secado supercrítico se extrajo el  $24.8 \pm 2.5$  % de la molécula de las matrices (NE). Esto indica que finalmente en las micropartículas secas se encuentra el 43.2 % del total de la nobiletina inicial. De acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 (pág. 32), la eficiencia de asociación fue de 43.1 % y la eficiencia de carga fue de 0.15 %. Esto nos indica que el 0.15 % en peso de los aerogeles corresponde a nobiletina (1.5 mg nobiletina/g de quitosano). Comparando estos datos con lo reportado por Luque-Alcaraz y cols. (2012) para nanopartículas de quitosano, tanto la eficiencia de asociación (69.1 %) como la eficiencia de carga (7.0 %) de nobiletina resultaron ser menores en nuestro estudio. Esto puede deberse a las diferencias en el

proceso de carga, al efecto del secado supercrítico y a la proporción utilizada de la molécula con respecto al polímero.

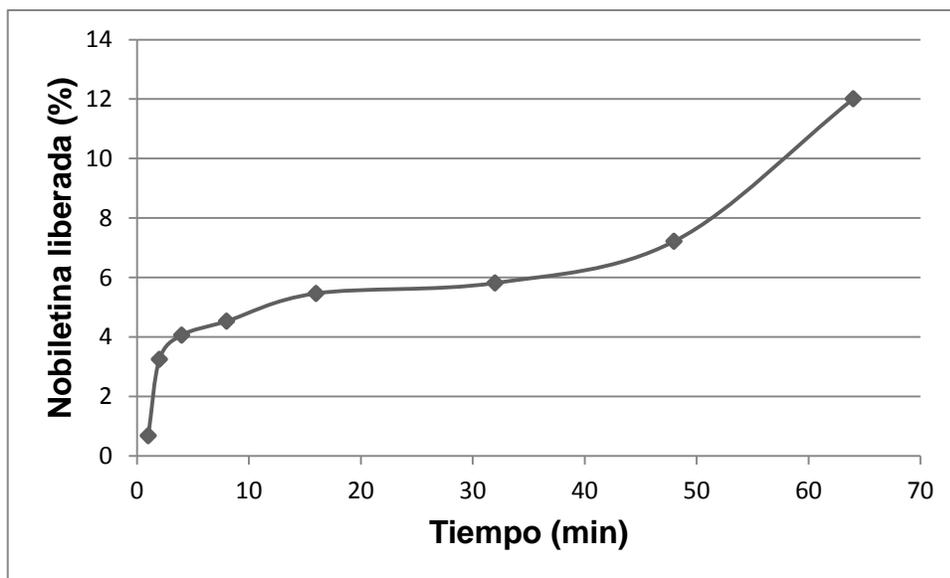
Para confirmar la carga de nobiletina en las micropartículas, se realizó un análisis directo de extracción y cuantificación de la molécula que se encontraba en los aerogeles. Las micropartículas se colocaron en una mezcla de ácido clorhídrico 0.1 M y etanol (50:50) en agitación constante durante 24 h. Las matrices se desintegraron casi en su totalidad y se formaron soluciones muy viscosas con valores de pH entre 3 y 4. Al llevar a cabo su neutralización, estas gelificaron en gran parte. Esta reacción del quitosano era de esperarse debido a sus características fisicoquímicas. Sin embargo, esto complicó la cuantificación de nobiletina ya que posiblemente no quedó disuelta, sino que fue atrapada nuevamente por el polisacárido en la red formada, o bien, fue arrastrada con el gel durante la centrifugación. Por lo tanto, sólo se logró cuantificar el 0.53 % (NM) en las MQsN.

La nobiletina cuantificada tras el proceso de secado fue muy variable en las repeticiones. Es posible que esta extracción pueda disminuirse optimizando el proceso de secado supercrítico. Esto puede lograrse manteniendo las condiciones por encima del punto supercrítico del CO<sub>2</sub>, pero variando la presión y temperatura a las condiciones menos favorables. Según lo reportado, estas condiciones desfavorables podrían encontrarse por encima de los 40 MPa (Mediola et al., 2007. Ying-Hung et al., 2010).

Pruebas de difusión. Las MQsN se colocaron en un medio donde la nobiletina fuera soluble, para de esta forma extraer la molécula libre o que no estuviera interactuando con el quitosano en las matrices. Apoyándonos en los resultados de la cuantificación de nobiletina, decidimos trabajar estas pruebas con el lote 1 de las MQsN, considerando como 100% la cantidad cuantificada de 0.016 mg de nobiletina por 0.1 g de micropartículas. Se agregó 0.1 g de MQsN en etanol (70%) y se mantuvieron en agitación con la ayuda de un magneto. Se tomaron

muestras de 2 mL a diferentes tiempos (1, 2, 4, 8, 16, 32, 48, 64, 96, 128 y 160 min) y se llevaron a analizar a un espectrofotómetro.

En la Figura 25 se muestra una gráfica de la liberación de nobiletina. Como podemos observar, el proceso de liberación parece estar alcanzando el equilibrio entre 16 y los 32 minutos, pero a partir del minuto 48 hay un aumento considerable de la concentración liberada. Las alícuotas de los minutos 96, 128 y 160, presentaron valores muy bajos de nobiletina. En estas muestras fue necesario realizar una centrifugación, ya que al disminuir el volumen donde se encontraban las MQsN en agitación, al tomar las muestras se incluían micropartículas hinchadas que podían intervenir en la medición. Posiblemente sucedió lo mismo que en las pruebas de cuantificación por HPLC y la nobiletina precipitó junto con las micropartículas.



**Figura 25.** Cinética de liberación de nobiletina del lote 1 de las MQsN.

En el experimento se encontró una liberación del 12% de nobiletina en 64 min. Si bien no se alcanzó el equilibrio, estos resultados parecen mostrar una tendencia de las matrices a retener la molécula en su interior. Mehling y cols. (2009), realizaron un estudio donde observaron la liberación de paracetamol e ibuprofeno de aerogeles de almidón. La carga de paracetamol la llevaron a cabo durante el cambio de solvente y cabe mencionar que el paracetamol no es soluble en CO<sub>2</sub> supercrítico. La liberación de paracetamol fue mucho más rápida (2 h) que la de ibuprofeno (> 6 h), el cual cargaron durante el proceso de secado disolviéndolo previamente en el CO<sub>2</sub>. Ellos atribuyen esto a una recristalización del paracetamol durante el secado y estos cristales se disuelven muy fácilmente acelerando la liberación. En cambio, el ibuprofeno se adsorbió a nivel molecular y su liberación fue más dependiente de las características de las matrices. Comparando estos resultados con los nuestros, aunque hayamos cargado la molécula en el intercambio de solvente, parece tener un comportamiento de adsorción a nivel molecular, como en el caso del ibuprofeno. La lenta migración de la molécula al exterior puede deberse a tamaños de poro pequeños, a la estabilidad de los aerogeles en etanol y a la afinidad del quitosano con la nobiletina.

Por otra parte, Temten y cols. (2009), prepararon matrices de quitosano cargadas con gentamicina y las secaron por procesamiento supercrítico. Utilizaron distintas concentraciones de 40, 80 y 160 mg/g (gentamicina:quitosano) y realizaron pruebas de difusión en PBS (37 °C). Las membranas cargadas con 40 y 80 mg/g liberaron el 90% en 25 min, mientras que la de 160 mg/g liberó el 90% en solo 7 min. Ellos atribuyen esto a la falta de agentes entrecruzantes en la gelificación (como glutaraldehído) y a la ausencia de enlaces químicos entre el fármaco y el polímero. En nuestro caso, tampoco utilizamos un agente entrecruzante, y aunque la concentración de nobiletina fue mucho menor, la liberación se retardó por mucho más de 25 min. Al parecer la concentración también juega un papel importante. Al manejar cantidades muy bajas la molécula puede interactuar más con el polímero (si es el caso) y la

adsorción a nivel molecular es más fuerte y estable al momento de rehidratar los aerogeles. Utilizando concentraciones elevadas, probablemente la molécula quedaría incrustada en las porosidades del aerogel y no sólo adsorbida en la superficie, por lo que habría una migración más rápida del fármaco hacia el exterior. Además, como se ha mencionado, la interacción entre el quitosano y la nobiletina puede estar presente en nuestras micropartículas.

## 7. CONCLUSIONES

Se obtuvieron micropartículas de quitosano y de quitosano cargadas con nobiletina que se encuentran dentro del rango de los 100 a los 600  $\mu\text{m}$ . Las micropartículas porosas nanoestructuradas se elaboraron bajo condiciones de secado supercrítico de 150 bar y 40 °C, con un flujo de 3.4-4.8 L/min de  $\text{CO}_2$ , con un volumen total de  $\text{CO}_2$  de 250 L. El área superficial de las micropartículas sin carga fue de  $120.9 \pm 3.72 \text{ m}^2/\text{g}$ , mientras que para las micropartículas con nobiletina fue de  $153.88 \pm 6.08 \text{ m}^2/\text{g}$ . Estas se encuentran en el rango bajo de los valores reportados para aerogeles de quitosano, probablemente como consecuencia de su fragilidad y tamaño. En ambos casos, las matrices se mantienen dentro del rango de los materiales mesoporosos.

Los análisis de cuantificación de nobiletina tras el proceso de difusión y la extracción en el secado, indican la permanencia del 43.2 % de la molécula en los micro-aerogeles. En el análisis directo, se cuantificó el 0.5% de la molécula en las matrices secas. La proporción fue de 1.5 miligramos de nobiletina por gramo de quitosano. Las pruebas de difusión en base a este dato, indican una migración muy lenta de la molécula al exterior de los materiales porosos. Esto puede deberse a su interacción química con el quitosano, a la baja concentración utilizada de la molécula y a la estabilidad de los aerogeles en el solvente empleado para la difusión (etanol). Por lo tanto, la liberación de nobiletina de estos aerogeles estaría mediada probablemente por la desintegración de los mismos.

## **8. RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar una optimización del proceso de secado para disminuir al máximo la extracción de nobiletina durante el procesamiento supercrítico. Además, es recomendable realizar un análisis para conocer la máxima capacidad de carga de nobiletina en las micropartículas de quitosano, así como mejorar el proceso de separación de la molécula de las matrices para su cuantificación. Por último, analizar las diferencias en el proceso de difusión de la molécula cuando esta se encuentre en mayores proporciones en las matrices.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Agulló, P., Goycoolea, I., Higuera, F., Valenzuela F., y Nakamatsu, J. 2004. Quitina y Quitosano: Obtención, Caracterización y Aplicaciones. (Fondo Editorial 2004, Ed.) Perú: Pontifica Universidad Católica del Perú. 312 p.
- Aiba, S. I. and Muraki, E. 1997. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides from Chitosan by Enzymatic Hydrolysis Followed by N-acetylation. *Advances in Chitin Science*. 2: 336-371.
- Alasarra, I. A., Betigeri, S. S., Zhang, H., Evans, B. A. and Neau, S. H. 2002. Molecular Weight and Degree of Deacetylation Effects on Lipase-Loaded Chitosan Bead Characteristics. *Biomaterials*. 23: 3637-3644.
- Allan, G. G. and Peyron, M. 1995. Molecular Weight Manipulation of Chitosan I: Kinetics of Depolymerization by Nitrous Acid. *Carbohydr. Res.* 277: 257-272.
- Allan, G. G., Jonson, P. G., Lay, Y. Z. and Sarkanen, K. V. 1971. Solubility and Reactivity of Marine Polymers in Dimethylformamide + Dinitrogen Tetroxide. *Chem. Ind.* 127.
- Amidi, M., Pellikan, H. C., de Boer, A. H., Crommelin, D. J.A., Hennink, W. E. and Jiskoot, W. 2008. Preparation and Physicochemical Characterization of Supercritically Dried Insulin-loaded Microparticles for Pulmonary Delivery. *European J. of Pharm. and Biopharm.* 68: 191-200.
- Argüelles-Monal, W., A. H. C., Acosta, N., Galed, G., Gallardo, A., Miralles, B., Peniche, C. y San Roman. J. (Ed.). 2004. Caracterización de Quitina y Quitosano. Capítulo 4. Quitina y Quitosano: Obtención, Caracterización y Aplicaciones. Lima Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

- Argüelles-Monal, W., Cabrera, G., Peniche, C. and Rinaudo, M. 2000. Conductrimetric Study of the Interpolyelectrolyte Relation between Chitosan and Polygalacturonic Acid. *Polymer*. 41: 2373-2378.
- Argüelles-Monal, W., Goycoolea, F. M., Lizardi, J., Peniche, C. and Higuera-Ciapara, I. 2003. Chitin and Chitosan in Gel Network Systems. *Polymer Gels, Fundamentals and Applications*. ACS Symposium Series 833. 102-121.
- Austin, P. R. 1977. Chitin Solution: US Patent 4,059,457.
- Ayers, M. R., & Hunt, A. J. 2001. Synthesis and Properties of Chitosan–Silica Hybrid Aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 285(1–3): 123-127.
- Bagheri-Khoulenjani, S., Taghizade, S. M. and Mirzadeh, H. 2009. An Investigation on the Short-term Biodegradability of Chitosan with Various Molecular Weights and Degrees of Deacetylation. *Carbohydrate Polymers*. 78: 773-778.
- Becherán-Marón, L., Peniche, C. and Argüelles-Mona, I W. 2004. Study of the Interpolyelectrolyte Reaction between Chitosan and Alginate: Influence of Alginate Composition and Chitosan Molecular Weight. *Int. J. Biol. Macromol.* 34: 127-133.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O. and Gurny, R. 2004. Structure and Interactions in Chitosan Hidrogels Formed by Complexation or Aggregation for Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57(1): 35-52.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J., Felt, O., Peppas, N. and Gurny, R. 2004. Structure and Interactions in Covalent and Ionically Crosslinked Chitosan Hidrogels for Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57: 19-34.
- Bernkop-Schnurch y Hopf, T.E. 2001. Synthesis and In-vitro Evaluation of Chitosan-thioglycolic Acid Conjugates. *Sci Pharm.* 69: 109–18.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J. and Rinaudo, M. 2001. An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization. *Polymer*. 42(8): 3569-3580.

- Cai, J., Kimura, S., Wada, M., Kuga, S. and Zhang, L. 2008. Cellulose Aerogels from Aqueous Alkali Hydroxide–Urea. *ChemSusChem*. 1: 149–154.
- Carpenter, J. F. and Manning, M. C. 2002. Rational Design of Stable Protein Formulations. *Pharmaceutical Biotechnology*. 13. Theory and Practice, Springer-Verlag, New York.
- Chang, C. J., Day, C. Y., Ko, C. M. and Chiu, K. L. 1997. Densities and P–x–y Diagrams for Carbon Dioxide Dissolution in Methanol, Ethanol, and Acetone Mixtures. *Fluid Phase Equilibria*. 131(1–2): 243–258.
- Chavarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F.C., Marzo, F. and Villarán, M.C. 2010. Microencapsulation of a Probiotic and Prebiotic in Alginate-chitosan Capsules Improves Survival in Simulated Gastro-intestinal Conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 142: 185-189.
- Chourasia, M. K. and Jain, S. K. 2003. Pharmaceutical Approaches to Colon Targeted Drug Delivery Systems. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 6(1): 33-66.
- Chow, A. H. L., Tong, H. H. Y., Chattopadhyay, P. and Shekunov, B. Y. 2007. Particle Engineering for Pulmonary Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, 24(3), 411–437.
- Cocero, M. J., Martin, A., Mattea, F. and Varona, S. 2009. Encapsulation and Co-precipitation Processes with Supercritical Fluids: Fundamentals and Applications. *Journal of Supercritical Fluids*. 47(3): 546-555.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M. and Chiellini, E. 2011. Chitosan-A Versatile Semi-synthetic Polymer in Biomedical Applications. *Progress un Polymer Science*. 36(8): 981-1014.
- Desai, K. and Park, H. K. 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technol.* 23, 1361–1394.
- Diamond, L. W. and Akinfiev, N. N. 2003. Solubility of CO<sub>2</sub> in Water From –1.5 to 100 °C and From 0.1 to 100 MPa: Evaluation of Literature Data and Thermodynamic Modelling. *Fluid Phase Equilibria*. 208(1-2): 265-290.
- Dos Santos, Z. M., Caroni, A. L., Pereira, P. F., da Silva, M. R. and Fonseca, J. L. C. 2009. Determination of Deacetylation Degree of Chitosan: a

- Comparison between conductometric Titration and CHN Elemental Analysis. *Carbohydrate Research*. 344(18): 2591-2595.
- Dutta, P. K., Dutta, J. and Tripathi, V. S. 2004. Chitin and Chitosan: Chemistry, Properties and Applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 63: 20-31.
- El Kadib, A. E., Molvinger, K., Cacciaguerra, T., Bousmina, M. and Brunel, D. 2011. Chitosan Templated Synthesis of Porous Metal Oxide Microspheres with Filamentary Nanostructures. *Microporous and Mesoporous Materials*. 142(1): 301-307.
- El Kadib, A., Molvinger, K., Guimon, C., Quignard, F. and Brunel, D. 2008. Design of Stable Nanoporous Hybrid Chitosan/titania as Cooperative Bifunctional Catalysts. *Chemistry of Materials*, 20(6): 2198–2204.
- Elhag A., Hegazy E.A., Hendrib J., Katakai R., Maekawac Y., Kumec T. and Yoshidac M. 2000. Chitosan-crosslinked Gels Prepared by a Simultaneously Occurring Reaction of Radiationinduced Polymerization and Self-bridging of Acrylic Acid in Aqueous Solutions. *Takasaki Symposium on Radiation Processing of Natural Polymers*, Cairo, Egypt.
- Ennajih, H., Bouhfid, R., Essassi, E., Bousmina, M. and El Kadib, A. 2012. Chitosan-montmorillonite Bio-based Aerogel Hybrid Microspheres. *Microporous and Mesoporous Materials*. 152(0): 208-213.
- Franks, F. 1998. Freeze-drying of Bioproducts: Putting Principles into Practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45, 221–229.
- García-González C.A., Alnaief M. and Smirnova I. 2011. Polysaccharide-Based Aerogels—Promising Biodegradable Carriers for Drug Delivery Systems. *Carbohydrate Polymers*. 86: 1425–1438.
- García-Rivas L., García B., Antonio R.C., Zavala R.E., Granados M., Dadó I., Reyes J. y Luna J.G. 2010. Síntesis y Caracterización de Esferas de Quitosano-EDGE-PVA para Adsorción de Cu(II). *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 11: 541-549.

- Hamdine, M., Heuzey, M. C. and Bégin, A. 2005. Effect of Organic and Inorganic Acids on Concentrated Chitosan Solutions and Gels. *International Journal of Biological Macromolecules*. 37(3): 134-142.
- Hamid, E., Bouhfid, R., Essassi, El M., Bousmina, M and El Kadib, A. 2012. Chitosan-montmorillonite Bio-based Aerogel Hybrid Microspheres. *Microporous and Mesoporous Materials*. 152: 208-213.
- Hinojosa, Y. 2014. Efecto de la Estructura de Microesferas Porosas de Quitosano Sobre la Adsorción de Proteínas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Hirano, S., Yamaguchi, R., Fukui, N., Iwata, M. 1990. A Chitosan Oxalate Gel: its Conversion to an N-acetylchitosan Gel Via a Chitosan Gel. *Carbohydr Res*. 201: 145–9.
- Hussain, A., Majumunder, Q. H. and Ahsan, F. 2006. Inhaled Insulin is Better Absorbed when Administered as a Dry Powder Compared to Solution in the Presence or absence of alkyglycosides. *Pharm. Res*. 23: 138-147.
- Illum, L., Farraj, N.F. and Davis, S.S. 1994. Chitosan as a Novel Nasal delivery System for Peptide Drugs. *Pharm. Res*. 11: 1186–1189.
- Jiang, G. B., Lin, Z. T., Xu, X. J. and Song. K. 2012. Stable Nanomicells Based on Chitosan Derivative: In Vitro Antiplatelet Aggregation and Adhesion Properties. *Carbohydrate Polymers*. 88(1): 232-238.
- Kasaai, M. R. 2008. A Review of Several Reported Procedures to Determine the Degree of N-acetylation for Chitin and Chitosan Using Infrared Spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 71: 497–508.
- Kasaai, M. R. 2009. Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(5): 1667-1676.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H., 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J*. 14: 737–743.

- Kumbar, S.G., Kulkarni, A.R. and Aminabhavi, M., 2002. Crosslinked Chitosan Microspheres for Encapsulation of Diclofenac Sodium: Effect of Crosslinking Agent. *J. Microencapsul.* 19: 173–180.
- Lárez, C. 2003. Algunos Usos del Quitosano en Sistemas Acuosa. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 4.
- Lárez, C. 2006. Quitina y Quitosano: Materiales del Pasado para el Presente y el Futuro. *Avances en Química.* 2: 15-21.
- Lee, K. P. and Gould, G. L. 2006. Aerogel Powder Therapeutic Agents. Patent No. 6994842. Leventis, N., Aegerter, M., & Koebel, M. *Aerogels handbook.* New York, NY: Springer.
- Lee, Y., Charles, A. L., Kung, H., Ho, C. and Huang, T. 2010. Extraction of Nobiletin and Tangeretin from Citrus depressa Hayata by Supercritical Carbon Dioxide with Ethanol as Modifier. 31: 59-64.
- Lizardi-Mendoza, J. 2007. Structured Porous Materials of Chitin and Chitosan. Queen's University Belfast, Belfast, Northern Ireland, UK.
- Luque-Alcaraz, G., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., Acosta, A. L., Iloki, S. B., Higuera, I. and Argüelles W. 2012. Characterization and Antiproliferative Activity of Nobiletin-Loaded Chitosan Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials.* 7.
- Manning, M. C., Chow, D. K., Murphy, B. M., Payne, R. W. and Katayama, D. S. 1989. Stability of Protein Pharmaceuticals: an update. *Pharm. Res.* 6:903-918.
- Mao, J., Zhao, L., De Yao, K., Shang, Q., Yang, G. and Cao, Y. 2003. Study of Novel Chitosan-Gelatin Artificial Skin in Vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 64A(2): 301-308.
- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C. y Gutiérrez, E. 2011. Quitina y Quitosano Polímeros Amigables. Una Revisión de sus Aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU.* 1: 53-58.
- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Garciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., Burgos-Hernández, A., Ezquerro-Brauer, J. M. y Plascencia-Jatomea, M. 2010. Extruded Films

- of Blended Chitosan, Low Density Polyethylene and Ethylene Acrylic Acid. *Carbohydrate Polymer*. 91: 666-674.
- Mehling, T., Smirnova, I., Guenther, U. and Neubert, R. H. H. 2009. Polysaccharidebased Aerogels as Drug Carriers. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 355(50–51): 2472–2479.
- Mendiola, J. A., Herrero, M., Cifuentes, A. and Ibañez, E. 2007. Use of Compressed Fluids for Sample Preparation: Food Applications. *J. Chromatogr. A* 1152: 234–246.
- Mi, F. L., Sung, H. W., Shyu, S. S., Su, C. C. and Peng C. K. 2003. Synthesis and Characterization of Biodegradable TPP/Genipin co-Crosslinked Chitosan Gel Beads. *Polymer*. 44(21): 6521-6530.
- Miao, Z., Jing-xiao, L., Fei, S., Ji-hong, W., and Shuang, G. 2006. Preparation of SiO<sub>2</sub> Aerogel/chitosan Composite Material for Biomedical Applications. *Journal of Dalian Institute of Light Industry*, 25(2), 121-124.
- Molinaro, G., Leroux, J. C., Damas, J. and Adam A. 2002. Biocompatibility of Thermosensitive Chitosan Based Hydrogels: an In Vivo Experimental Approach to Injectable Biomaterials. *Biomaterials*. 23(13): 2717-2722.
- Molvinger, K., Quignard, F., Brunel, D., Boissière, M., and Devoisselle, J. M. 2004. Porous Chitosan–silica Hybrid Microspheres as a Potential Catalyst. *Chemistry of Materials*, 16(17), 3367–3372.
- Montembault, A., Viton, C. and Domard, A. 2005. Physico-chemical Studies of the Gelation of Chitosan in a Hydroalcoholic Medium. *Biomaterials*. 26: 933-943.
- Montero-Álvarez, J., Paredes, M.J. y Rivera, M.C. 2010. Utilización de Quitosana para la Remoción de Arsénico (As) del Agua. *Superficies y Vacío*. 23: 136-139.
- Moussaoui, Y., Mnasri, N., Elaloui, E., Ben Salem, R., Lagerge, S. and de Menorval, L. C. 2012 Preparation of Chitosan Gel. *EPJ Web Conferences*. 29:00034.

- Mukhopadhyay, M. and Rao, B. S. 2008. Modeling of Supercritical Drying of Ethanolsoaked Silica Aerogels with Carbon Dioxide. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83(8): 1101–1109.
- Nguyen, S., Winnik, F.M. and Buschmann M.D. 2009. Improved Reproducibility in the Determination of the Molecular Weight of Chitosan by Analytical Size Exclusion Chromatography. *Carbohydrate Polymers*. 75: 528–533
- Okamoto, H., Nishida, S., Todo, H., Sakakura, Y., Iida, K. and Danjo, K. 2003. Pulmonary Gene Delivery by Chitosan-pDNA Complex Powder Prepared by a Supercritical Carbon Dioxide Process. *Journal of Pharmaceutical Science*. 92: 371-380.
- Palma, M., Taylor, L. T., Zoecklein, B. W. and Douglas, L. S. 2000. Supercritical Fluid Extraction of Grape Glycosides. *J. Agric. Food Chem.* 48: 775-779.
- Parada, L. G., Crespín, G. D., Miranda, R. y Issa Katime. 2004. Caracterización de Quitosano por Viscosimetría Capilar y Valoración Potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5: 1-1.
- Peniche, C. and Argüelles-Monal, W. 2001. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes, Natural and Synthetic Polymers: Challenges and Perspectives. *Macromol. Symp.* 168: 103-116.
- Peppas, N. A. y Korsmeyer, R. W. 1987. Dynamically Swelling Hydrogels in Controlled Release Applications, *Hidrogels in Medicine and Pharmacy*, 3, N.A. Peppas editor (CRC, Boca Raton). 109-135 pp.
- Pierre, A. C. and Pajonk, G. M. 2002. Chemistry of Aerogels and Their Applications. *Chem. Rev.* 102: 4243-4265.
- Quignard, F., Valetin, R. y Di Renzo, F. 2008. Aerogels Materials From Marine Polysaccharides. *New Journal of Chemistry*. 32(8): 1300.
- Quirk, R. A., France, R. M., Shakesheff, K. M. and Howdle, S. M. 2004. Supercritical Fluid Technologies and Tissue Engineering Scaffolds. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 8: 313–321.
- Reyna, V. 2014. Evaluación de Propiedades Bioactivas de una Matriz Porosa Nanoestructurada de Quitosano. Tesis de Maestría. Centro de

- Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and Applications. Progress in Polymer Science. 31(7): 603-6032.
- Rinaudo, M., Milas, M. and Le Dung, P. 1993. Characterization of Chitosan. Influence of Ionic Strength and Degree of Acetylation on Chain Expansion. Int. J. Biomol. Macromol. 15(5): 281-285.
- Rinaudo, M., Pavlov, G. and Desbrieres, J. 1999. Influence of Acetic Acid Concentration on the Solubilization of Chitosan. Polymer. 40(25): 7029- 7032.
- Roberts, G. A. 1992. Chitin Chemistry. Macmillan Publishers Limited. 350 p.
- Robitzer, M. and Quignard, F. 2011. Marine Polysaccharides and their Conversion into Functional Materials. Chimia. 65(1-2): 81-4.
- Sánchez, A., Sibaja, M., Vega, J. y Madrigal, S. 2007. Síntesis y Caracterización de Hidrogeles de Quitosano Obtenidos a Partir de Camarón Langostino (*Pleuroncodes planipes*) con Potenciales Aplicaciones Biomédicas. Revista iberoamericana de Polímeros. 8: 4.
- Santos, G. 2013. Propiedades Funcionales Básicas de Materiales Porosos Nanoestructurados de Quitosano. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Sastre, R., de Aza, S., and San Román, J. 2004. Biomateriales. Italia: Faenza Editrice Ibérica s.l.
- Schatz, C., Viton, C., Delair. T., Pichot, C. and Domard, A. 2003. Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution. Biomacromolecules. 43(3): 641-648.
- Sechriest, V. F., Miao, Y. J., Niyibizi, C., Westerhausen-Larson, A., Matthew, H. W. and Evans, C. H. 2000. GAG-Augmented Polysaccharide Hydrogel: a Novel Biocompatible and Biodegradable Material to Support Chondrogenesis. J. Biomed. Mater. Res. 49(4): 534-541.

- Shah, S., Qaqish, R., Patel, V. and Amiji, M., 1999. Evaluation of the factors influencing stomach-specific delivery of antibacterial agents for *Helicobacter pylori* infection. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 667–672.
- Sing, K. S. W. 1982. Reporting Physisorption Data for Gas/solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure and Applied Chemistry.* 54(11): 2201-2218.
- Singla, A. K. and Chawla, M. 2001. Chitosan: Some Pharmaceutical and Biological Aspects-an Update. *J. Pharm. Pharmacol.* 53(8): 1047-1067.
- Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S., Kaushik, K., Kumria, R., Bansal, K. and Dhawan, S. 2004. Chitosan Microspheres as a Potential Carrier for Drugs. *International Journal of Pharmaceutics.* 274: 1–33.
- Smirnova, I., Mamic, J. and Arlt, W. 2003. Adsorption of Drugs on Silica Aerogels. *Langmuir.* 19(20): 8521–8525.
- Smirnova, I., Suttiruengwong, S. and Arlt, W. 2004. Feasibility Study of Hydrophilic and Hydrophobic Silica Aerogels as Drug Delivery Systems. *Journal of Non-Crystalline Solids.* 350: 54–60.
- Smirnova, I., Suttiruengwong, S., Seiler, M. and Arlt, W. 2004. Dissolution Rate Enhancement by Adsorption of Poorly Soluble Drugs on Hydrophilic Silica Aerogels. *Pharmaceutical Development and Technology.* 9(4): 443–452.
- Smirnova, I., Turk, M., Wischumerski, R. and Wahl, M. A. 2005. Comparison of Different Methods for Enhancing the Dissolution Rate of Poorly Soluble Drugs: Case of Griseofulvin. *Engineering in Life Sciences.* 5(3): 277–280.
- Stievano, M. and Elvassore, N. 2005. High-pressure Density and Vapor-liquid Equilibrium for the Binary Systems Carbon Dioxide–ethanol, Carbon Dioxide–acetone and Carbon Dioxide–dichloromethane. *Journal of Supercritical Fluids.* 33(1): 7–14.
- Temten, M., Solva, L., Andrade, P. Z., dos Santos, F., Lobato da Silva, C., Cabral, J., Abecasis, M. M. and Aguiar-Ricardo, A. 2009. Supercritical CO<sub>2</sub> Generating Chitosan Devices with Controlled Morphology.

- Potential Application for Drug Delivery and Mesenchymal Stem Cell Culture. *The Journal of Supercritical Fluids*. 48: 269-277.
- Toan, N. V. 2009. Production of Chitin and Chitosan from Partially Autolyzed Shrim Shell Material. *The Open Biomaterials Journal*. 1(1).
- Tsaih, M. L. and Chen R. H. 2003. Effect of Degree of Deacetylation of chitosan on the Kinetics of Ultrasonic Degradation of Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*. 90(13): 3526-3531.
- Tsiopias C., Michailof C., Staupoulos G. and Panayiotou C. 2009. Chitin and Carbon Aerogels from Chitin Alcohols. *Carbohydrate Polymers*. 76: 535-540.
- Tsiopias C., Paraskevopoulos M.K., Christofilos D., Andrieux P and Panayiotou C. 2011. Polymeric hydrogels and Supercritical Fluids: The Mechanism of Hydrogel Foaming. *Polymer*. 52: 2819-2826.
- Ulker, Z. and Erkey, C. 2014. An Emerging Platform for Drug Delivery: Aerogel Based Systems. *Journal of Controlled Release*. 177: 51-63.
- Valentin, R. 2005. PhD thesis. Université Montpellier 2. Montpellier, France.
- Valentín, R., Bonelli, B., Garrone, E., Di Renzo, F. and Quignard, F. 2007. Accessibility of the Functional Groups of Chitosan Aerogel Probed by FTIR-monitored Deuteration. *Biomacromolecules*. 8: 3646–3650.
- Vandamme, Th. F., Lenourry, A., Charrueau, C. and J. C. Chaumeil. 2002. The Use of Polysaccharides to Target Drugs to the Colon. *Carbohydr. Polymers*. 48: 219-231.
- Wei, W., Guang, M., Lian, W., Jie, W. and Zhi, S. 2010. Hollow Quaternized Chitosan Microspheres Increase the Therapeutic Effect of Orally Administered Insulin. *Acta Biomaterialia*. 6: 205–209.
- Win, P. P., Shin-Ya, Y., Hong, K. J. and Kajiuchi, T. 2003. Formulation and Characterization of pH Sensitive Drug Carrier Based on Phosphorylated Chitosan (PCS). *Carbohydr. Polym.* 53(3): 305-310.
- Win, P.P., Shin-Ya, Y., Hong, K.J. and Kajiuchi, T. 2003. Formulation and Characterization of Membranes from the Polyelectrolyte Complex

between Chitosan and Carboxymethyl Cellulose. Polym. Bull. 31:  
471-478.

Yamada, T., Onishi, H., Machida, Y., 2001. In Vitro and In Vivo Evaluation of Sustained Release Chitosan-coated Ketoprofen Microparticles. Yakugaku Zasshi 121, 239–245.