



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS TIOLADAS Y
SULFONATADAS DE QUITOSANO PARA LA FORMULACIÓN DE UNA
VACUNA ORAL CONTRA CIRCOVIRUS PORCINO TIPO II (PCV2)**

ANDREA PAZ CASTILLO RIVAS

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Cs. Biológicas Animales

PROYECTO FONDEF IT13I20021 & FONDECYT 1140660

SANTIAGO, CHILE

2017



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS TIOLADAS Y
SULFONATADAS DE QUITOSANO PARA LA FORMULACIÓN DE UNA
VACUNA ORAL CONTRA CIRCOVIRUS PORCINO TIPO II (PCV2)**

ANDREA PAZ CASTILLO RIVAS

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Cs. Biológicas Animales

Nota Final.....

Prof. Guía	ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO	Firma.....
Profesor Corrector	SERGIO BUCAREY	Firma.....
Profesor Corrector	LEONARDO SÁENZ	Firma.....

PROYECTO FONDEF IT13I20021 & FONDECYT 1140660

SANTIAGO, CHILE

2017

AGRADECIMIENTOS y DEDICATORIA

En primer lugar, quiero agradecer a todos los integrantes de los laboratorios POLYFORMS y BIOVETEC, por toda la colaboración y disposición tanto desinteresada como amigable.

En especial quiero agradecer a Yazmín, Patricio y mis profesores Andrónico Neira-Carrillo y Sergio Bucarey, cuyo apoyo, ánimo, consejos, confianza e infinita paciencia fueron fundamentales en todo este largo proceso, demostrándome siempre la excelente calidad de personas, profesionales y académicos que tuve a mi lado.

A mi familia, a mis hermanas, a Olga, pero en especial a mis padres Ximena y Manuel cuyo apoyo ha sido incondicional desde el principio. Todo lo que soy y tengo se los debo a ellos. Mi amor absoluto a estas hermosas personas.

A mis amigas y a todos los que de alguna u otra forma han estado presentes en estos años de universidad apoyándome sin cansancio y con mucha fe.

Y por supuesto a Dios, que siempre ha iluminado mi camino.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

	Páginas
RESUMEN	
SUMMARY	
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Micropartículas (MPs)	3
Microencapsulación en base a polímero quitosano (Qo)	4
Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) y Mucoadhesividad.	6
OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Funcionalización de Qo comercial con grupos tiol (-SH) y sulfonato (-SO ₃ ⁻)	9
Espectroscopía infrarroja transformada Fourier (FTIR).	10
Formulación de las MPs cargadas con el antígeno mediante gelificación iónica (ionotrópica) y secado por atomización.	10
Caracterización de las MPs mediante potencial Zeta y microscopía electrónica de barrido (SEM)	11

Determinación de la Eficiencia de Encapsulación (EE) y Rendimiento de producción (R) de las MPs.	12
Determinación de contenido del antígeno presente en las MPs.	13
Ensayos de mucoadhesividad in vitro	13
RESULTADOS	14
Caracterización espectroscópica FTIR <ul style="list-style-type: none"> • Caracterización espectroscópica de Qo funcionalizado • Caracterización espectroscópica de MPs: MPQC, MPQS y MPQT. 	14
Caracterización Físico-química de MPs mediante potencial Zeta (ζ): Tamaño y Carga. <ul style="list-style-type: none"> • MPQC, MPQS y MPQT • MPQC, MPQS y MPQT cargadas con antígeno 1X y 2X 	17
Análisis morfológico de MPs mediante SEM	18
Eficiencia de Encapsulación (EE) <ul style="list-style-type: none"> • MPQC, MPQS y MPQT cargadas con antígeno 1X y 2X 	20
Rendimientos de producción (R) <ul style="list-style-type: none"> • Qo tiolado (QT) y sulfonado (QS) • MPQC, MPQS y MPQT cargadas con antígeno 1X y 2X 	20
Determinación de contenido del antígeno presente en las MPs.	22

Ensayos de mucoadhesividad in vitro	24
DISCUSIÓN	24
CONCLUSION	26
BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXOS	31

RESUMEN

El uso de micropartículas (MPs) de polímeros naturales ha sido descrito como una innovadora técnica de formulación de adyuvantes para diversas vacunas. Para esta memoria de título se utilizó quitosano (Qo) como polímero natural el cual se funcionalizó con grupos azufrados para preparar quitosano tiolado (QT) y sulfonado (QS). Con estos quitosanos se formularon micropartículas de quitosano tioladas (MPQT) y de quitosano sulfonadas (MPQS) cargadas con el antígeno del circovirus porcino tipo II (PCV2). Las micropartículas de quitosano (MPQ) formuladas y cargadas fueron obtenidas mediante técnicas de gelificación iónica y secado por atomización. Se determinó la presencia de grupos azufrados en las MPQ mediante Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) y se caracterizaron en cuanto a morfología, tamaño y cantidad de carga mediante microscopía electrónica de barrido o *Scanning Electron Microscope* (SEM) y potencial Zeta. Por otro lado, además se evaluaron parámetros de Eficiencia de encapsulación (EE) y Rendimientos de la producción (R), se determinó también la presencia de antígeno mediante Dot Blot y se realizaron estudios *in vitro* de mucoadhesividad. Los resultados obtenidos por FTIR indicaron la aparición de nuevos picos de absorción que coinciden con los grupos -SH, con enlaces C-O-S y para grupos S=O. Mediante SEM se observó la formación de MPs de Qo con formas más o menos esféricas, bordes definidos, superficie lisa a rugosa, y tamaños que variaron entre 1 y 50 μm . Mediante potencial Zeta las MPQC y MPQT presentaron carga neta positiva mientras que las MPQS presentaron carga neta negativa. Todas las MPs poseen valores de EE superiores a 80%, R sobre 30% para MPs 1X y son positivas a la presencia de antígeno Cap de PCV2 al análisis por Dot Blot. Finalmente, los ensayos de mucoadhesividad mostraron que las MPQT y MPQS presentaron mejor mucoadhesividad respecto a MPQC. En conclusión, se logró preparar y caracterizar Qo funcionalizado con grupos tiol y sulfonato, formular tres tipos de MPs de Qo cargadas con antígeno Cap de PCV2 y caracterizadas en su totalidad.

ABSTRACT

The use of microparticles (MPs) of natural polymers has been described as an innovative technique of formulating adjuvants for various vaccines. For this title memory chitosan (Qo) was used as the natural polymer which was functionalized with sulfur groups to prepare thiolated (QT) and sulfonated chitosan (QS). With these chitosans, thiolated chitosan microparticles (MPQT) and sulphonated chitosan microparticles (MPQS) loaded with the porcine circovirus type II (PCV2) antigen were formulated. The formulated and loaded chitosan microparticles (MPQ) were obtained by ionic gelation and spray drying techniques. It was determined the presence of sulfur groups in the MPQ by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and these MPs were characterized in terms of morphology, size and amount of charge by means of Scanning Electron Microscope (SEM) and Zeta potential, besides evaluating such parameters such as encapsulation efficiency (EE) and yields of production (R), the presence of antigen was also evaluated by Dot Blot and finally in vitro mucoadhesivity studies were performed. The results obtained by FTIR indicate the occurrence of new absorption peaks that coincide with the groups -SH, with C-O-S bonds and for S = O groups. By SEM the formation of MPs of Qo with more or less spherical shapes, defined edges, smooth to rough surface, and sizes varying between 1 and 50 μm are observed. By means of zeta potential the MPQC and MPQT presented positive net load while the MPQS presented negative net load. All MPs have EE values higher than 80%, R about 30% for 1X MPs and are positive for the presence of PCV2 Cap antigen at Dot Blot analysis. Finally, mucoadhesivity assays show that MPQT and MPQS had better mucoadhesivity with respect to MPQC. In conclusion, it is possible to prepare and characterize Qo functionalized with thiol and sulfonate groups, to formulate three types of Qo MPs loaded with PCV2 Cap antigen and to characterize them in their entirety.

INTRODUCCIÓN

La utilización de polímeros naturales ha adquirido importancia en áreas como la industria agrícola, alimentaria, cosmética, farmacéutica, etc. Al mismo tiempo, ha destacado su desarrollo e innovadora utilización en el campo biomédico, en particular su uso como MPs transportadoras de agentes biológicos tales como: proteínas, antibióticos, drogas, antígenos vacunales, entre otros (Goycoolea *et al.*, 2009).

Entre estos polímeros naturales destaca el Qo, un polisacárido catiónico obtenido a partir de la desacetilación parcial de la quitina que está presente en el exoesqueleto de artrópodos (Goycoolea *et al.*, 2009). El Qo se ha utilizado en diversas áreas de la biomedicina tales como: regeneración de tejido óseo y dental, curación de heridas, transportador de fármacos y adyuvante de vacunas, etc. Su utilización se debe a sus múltiples propiedades físico-químicas, dentro de las cuales destacan: biocompatibilidad, mucoadhesividad, flexibilidad, baja toxicidad, biodegradabilidad y capacidad inmunopotenciadora. Esta última debido principalmente a la viscosidad, peso molecular y por la presencia de la unidad monomérica N-acetil-D-glucosamina en su estructura (Alves and Mano 2008; Sáenz *et al.*, 2009). El Qo debido a sus propiedades mucoadhesivas (Luana Perioli *et al.*, 2008) ha sido utilizado en sistemas específicos de la mucosa como la oral (Portero *et al.*, 2007). Es posible mejorar, el control sobre la liberación de antígenos y fármacos a nivel de mucosas, estabilidad, mucoadhesividad y permeabilidad del Qo mediante funcionalización (modificación química) con compuestos portadores de grupos químicos tales como sulfonato ($-\text{SO}_3^-$) y tiol ($-\text{SH}$), los cuales, entre otros efectos pueden incrementar la afinidad por la mucina (Islam *et al.*, 2012).

Entre las patologías que afectan la productividad de la industria porcina mundial se encuentran las enfermedades asociadas a circovirus porcino, provocando un enorme impacto económico. Además de mejorar la gestión y prácticas de manejo como mejor higiene, menor hacinamiento y mejor ventilación, la disponibilidad de vacunas anti circovirus porcino tipo 2 (PCV2) representa una opción inmunológica eficaz para paliar el impacto de estas enfermedades. En la actualidad, la mayoría de las vacunas anti-PCV2 se

producen como formulaciones inyectables, aunque eficaces, estas vacunas tienen ciertos inconvenientes, como el estrés con inmunosupresión concomitante, procedimientos laboriosos y consumo de una gran cantidad tiempo (Bucarey *et al.*, 2009).

En esta Memoria de Título se pretende funcionalizar Qo comercial con grupos tiol y sulfonato para formular un nuevo adyuvante a base de MPs a utilizarse en una vacuna oral contra PCV2, con el fin de mejorar sus propiedades mucoadhesivas, y que presente bajo costo y fácil administración; resultando por tanto en una oportunidad atractiva para fortalecer la productividad y competitividad de la industria porcina nacional.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Micropartículas

Las MPs corresponden a partículas de tamaño micrométrico (1-250 μm). La técnica que permite la obtención de MPs se conoce como “microencapsulación”, y consiste en la encapsulación o recubrimiento de materiales activos tales como antígenos, biomoléculas, fármacos, entre otros, con materiales bioactivos de distinta naturaleza. Existen varios métodos de microencapsulación, los cuales pueden clasificarse en tres grupos principales:

1. Procesos físicos. Secado por atomización (*spray dryer*); **2. Procesos químicos:** Polimerización interfacial e inclusión molecular, y **3. Procesos fisicoquímicos:** Coacervación compleja, coacervación simple, liposomas y gelificación iónica (ionotrópica) (Martín-Villena *et al.*, 2009).

La forma de las MPs puede ser esférica o irregular. También es posible obtener MPs con forma de espuma, en las cuales el material activo se encuentra distribuido en toda la MP, y la cubierta puede permanecer intacta o abierta (Martín-Villena *et al.*, 2009). Además, existen MPs en las que el material activo se encuentra disperso en la matriz de la MP de manera tal que puede estar tanto en el centro como hacia la periferia (Lozano, 2009).

Además, dependiendo de las características fisicoquímicas del material activo, de la composición de la pared de las MPs, interacciones polímero-material activo, y de la técnica de microencapsulación utilizada se podrán obtener diversos tipos de MPs (Lozano, 2009; Martín-Villena *et al.*, 2009).

Según su estructura las MPs pueden clasificarse en: **a. Sistema capsular o reservorio**, y **b. Sistema matricial**. En el sistema capsular, el material activo está incluido en un reservorio que puede ser de naturaleza líquida o sólida, el cual, a su vez, se haya envuelto por una película fina del material de recubrimiento. En el sistema matricial, el material activo se

encuentra disperso en la matriz. El propósito de la microencapsulación es producir partículas en las cuales el transporte de masa es controlado, siendo la pared de la MPs la que controla la difusión del componente activo desde la MP (Lozano, 2009).

Microencapsulación en base a polímero quitosano

En las últimas décadas se ha puesto énfasis en el estudio de la funcionalización (modificación química) del Qo, con el objetivo de explorar al máximo sus diversas propiedades y aplicaciones. Entre los principales quitosanos funcionalizados se encuentran: Qo NO-carboximetilado, trimetilado, tiolado, y Qo injertado con polietilenglicol (PEG) (Goycoolea *et al.*, 2009), entre otros. Algunos de los quitosanos anteriores exhiben propiedades mejoradas respecto al desarrollo de aplicaciones farmacéuticas. Por lo tanto, las modificaciones anteriores influyen no sólo en el patrón de solubilidad del Qo sino también sus propiedades biológicas y funcionales.

Existen diversos métodos de formulación y agentes químicos disponibles para la obtención de nano o micropartículas de Qo mediante procesos de auto-asociación (entrecruzamiento), en los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras micro o nanoscópicas, ya sea por interacciones inter o intra-moleculares de tipo covalente o no covalente. Sin embargo, es importante señalar que a pesar de la diversidad de métodos documentados y agentes químicos disponibles para obtener MPs a base de Qo, sólo pocos ofrecen potencial real para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas. Entre los que mayor atención han recibido, destacan aquellos basados fundamentalmente en el principio de la GI del Qo utilizando tripolifosfato pentasódico (TPP). Algunas de las ventajas que ofrece el uso de TPP es que evita el uso de altas temperaturas y solventes orgánicos, y procesos drásticos como la sonicación; lo que permite asociar de forma eficiente las cadenas poliméricas y preservar la bioactividad y estabilidad de macromoléculas terapéuticas. De esta forma la GI permite alta capacidad de carga de péptidos y proteínas hidrofílicas tales como insulina, albúmina sérica bovina y toxoide tetánico.

La capacidad de carga es influenciada por la solubilidad, la carga teórica de ésta, pH y peso molecular del Qo. El mecanismo propuesto para la formación de nano o

micropartículas de Qo con TPP, plantea que la GI del Qo ocurre por interacciones electrostáticas entre productos de la disociación del TPP en solución acuosa ($P_3O_{10}^{-5}$ y $HP_3O_{10}^{-4}$), con los grupos $-NH_3^+$ del Qo. El tamaño de partícula de este sistema es muy sensible al pH y a la fuerza iónica (Goycoolea *et al.*, 2009). El pH influye en las propiedades mucoadhesivas del Qo ya que a pH ácido el Qo se encuentra cargado positivamente debido al valor de su pKa 6,5 (Expósito, 2009). A su vez, el efecto de otras condiciones preparativas y de las características intrínsecas del Qo, ha sido estudiado con atención la composición; peso molecular y grado de acetilación del Qo (Goycoolea *et al.*, 2009). En general, el tamaño de nanopartícula en este sistema se ha observado que varía en un rango de 100 a 350 nm; el potencial Zeta entre +20 y +50 mV e invariablemente poseen una morfología esférica de acuerdo a evidencia de microscopía electrónica de transmisión y de fuerza atómica. Dichas características, confieren a las nanopartículas de Qo propiedades para la interacción con diversos epitelios (Goycoolea *et al.*, 2009).

Otro método de microencapsulación es el de secado por atomización. Es un proceso de evaporación de solvente que permite producir polvos secos, gránulos y aglomerados, a partir de soluciones y suspensiones, las cuales poseen los componentes de la matriz de las MPs y diversos compuestos activos, se convierten en polvo de flujo libre (Expósito, 2009). El secado por atomización implica la dispersión del material del núcleo en una solución polimérica, la cual puede ser una emulsión o dispersión. Posteriormente, esta solución es “atomizada” en la cámara de secado, etapa en la que ocurre evaporación del solvente, y por lo tanto formación de MPs en estado sólido (Flores-Belmont y Jimenez-Munguía, 2013).

El secado por atomización se considera un método apropiado para compuestos sensibles a altas temperaturas debido a que los tiempos de exposición son muy cortos (Martín-Villena *et al.*, 2009). Además, el secado por atomización implica sólo una etapa y es de bajo costo, permitiendo también re-formular las partículas como suspensiones, cápsulas o comprimidos. Algunos de los parámetros del proceso que se pueden controlar son: tipo de aguja, temperatura de entrada y salida, velocidad de la bomba y el flujo de aire comprimido. La manipulación de algunos de estos parámetros permite modular el

contenido de humedad, forma y tamaño de las partículas (Expósito, 2009).

Circovirus Porcino Tipo 2 (PCV2) y Mucoadhesividad

PCV2 pertenece a la familia Circoviridae. Es un virus sin envoltura, esférico, de simetría icosaédrica y con una cápside viral que mide 17 nm de diámetro. El PCV2 posee ADN circular simple (1.7 kpb), el cual codifica 2 marcos de lectura abiertos involucrados en la formación de la cápside (ORF2) y en un complejo de replicación viral (ORF1). El PCV2 es el principal agente etiológico del síndrome de desmedro multisistémico post-destete en cerdos (*post-weaning multisystemic wasting syndrome*, PMWS). El PMWS afecta comúnmente a cerdos entre 8 y 13 semanas de edad, y se caracteriza por generar inmunosupresión severa, pérdida progresiva de peso y muerte prematura del animal (Allan *et al.*, 2000).

Aun cuando existen vacunas contra PCV2, su aplicación es intravenosa o intramuscular, lo que dificulta enormemente su manejo a escala productiva. Bajo este contexto se plantea el desarrollo de una vacuna de administración oral contra PCV-2, utilizando una secuencia sintética del gen ORF2 de circovirus porcino (antígeno), optimizada para ser traducida y expresada en levaduras (Bucarey *et al.*, 2009).

La característica de la administración oral, está basada en la microencapsulación con Qo funcionalizado. Funcionalizar el Qo implica la incorporación de grupos azufrados y por ende el aumento de las propiedades mucoadhesivas que ya posee.

La mucoadhesión aumenta el tiempo de permanencia y el contacto entre la mucosa y la formulación, lo cual permite incrementar la respuesta inmune generada y una liberación del principio activo de forma sostenida en el tiempo, reduciendo así la necesidad de utilizar varias dosis (Expósito, 2009).

Las propiedades mucoadhesivas del Qo se deben principalmente a la interacción electrostática que se generan entre sus grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) y la capa de mucus, la cual presenta carga negativa debido a la presencia de cisteína (Cys) en su

estructura (He *et al.*, 1998). El pH a su vez también influye en las propiedades mucoadhesivas del Qo ya que a pH ácido el Qo se encuentra cargado positivamente debido al valor de su pKa 6,5 (Expósito,2009).

Al funcionalizar Qo con grupos azufrados se generan puentes disulfuro (enlaces covalentes) de entre la mucina y el quitosano, aumentando la mucoadhesividad. Este está compuesto por una glicoproteína, la mucina, que tiene cargas negativas debido a la presencia de residuos de ácido siálico. La unión depende de la cantidad de ácido siálico presente en la mucina y del grado de desacetilación del Qo o grupos amino libres (He *et al.*, 1998). En estudios de mucoadhesión de MPs de Qo se demostró que ésta aumentó con el número de grupos amino libres debido a los monómeros de glucosamina del Qo (Expósito, 2009).

En esta memoria de título se utilizarán GI y secado por atomización para la microencapsulación de antígeno Cap de PCV2 para la formulación de MPs de QC, QT y QS.

OBJETIVO GENERAL

Formular y caracterizar micropartículas de quitosano funcionalizado con grupos tiol y sulfonato para la elaboración de una vacuna oral contra circovirus porcino tipo 2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar y caracterizar quitosano funcionalizado con grupos tiol y sulfonato.
2. Formular micropartículas de quitosano comercial (MPQC), tiolado (MPQT) sulfonado (MPQS) y cargadas con el antígeno Cap de PCV2.
3. Caracterizar la morfología, tamaño, cantidad de carga, eficiencia de encapsulación del antígeno, rendimiento de producción y mucoadhesividad *in vitro* de las micropartículas formuladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó Qo comercial de bajo peso molecular (LMW) y grado de desacetilación > 75% (Sigma-Aldrich). El antígeno que se microencapsuló está contenido en un extracto crudo de levadura recombinante, enriquecido con *virus-like particles* (VLPs) de circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), provisto por el Laboratorio de Biotecnología Veterinaria (BIOVETEC), Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Los reactivos que se utilizaron son: ácido acético glacial (Merck), ácido clorhídrico fumante (HCl) 37% (Merck), ácido sulfúrico (H₂SO₄) 96% para análisis (Winkler), ácido tioglicólico (TGA) ≥ 99% (Sigma-Aldrich), cloruro de sodio (NaCl) (Merck), éter etílico 99,9% (Winkler), guanidina, hidróxido de sodio (NaOH) (Merck), mucina tipo I-S, (desde glándula submaxilar bovina con 9-17% de ácido siálico unido) (Sigma-Aldrich), mucina tipo III (desde estómago de cerdo con 0.5–1.5% de ácido siálico unido, parcialmente purificada) (Sigma-Aldrich), N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida hidrocloreto (EDAC) 37% (Sigma-Aldrich), y tripolifosfato de sodio (TPP) ≥ 99% (Sigma-Aldrich). Además, se utilizarán membranas de celulosa de 3,5 KDa (Spectra/Por). Finalmente, se utilizaron Kits BCA (ácido bicinconínico) (Sigma-Aldrich) y Bradford (Sigma-Aldrich).

1-Funcionalización de quitosano comercial con grupos tiol y sulfonato

La funcionalización de Qo con grupos tiol se realizó disolviendo 1g de Qo comercial en 100 ml de una solución de ácido acético al 1% y 2 ml de EDAC en solución acuosa 125 mM. Ambas soluciones se mezclaron mediante agitación magnética. Posteriormente, se agregó un 1g de TGA a la mezcla, la cual se ajustó a pH 5 mediante adición de NaOH 1M. Luego, la mezcla se incubó durante 4 horas en oscuridad por agitación magnética a 24°C. La mezcla se dializó en membranas, también en oscuridad, a 4°C con los siguientes medios: HCL 5 mM (1^{er} día), HCL 5 mM + NaCl 1% (2^{do} y 3^{er} día), HCL 5 mM (4^{to} día). Luego, la mezcla se vació en tubos Falcon para su liofilización

La funcionalización con grupos sulfonato se realizó disolviendo 1g de Qo comercial en 40 ml de ácido sulfúrico, previamente enfriado a 4 °C. La mezcla se agitó, en frío, durante 2

horas. Posteriormente, la solución se precipitó, gota a gota, en 250 ml de éter etílico frío, bajo agitación constante. La solución se filtró, el producto obtenido se disolvió en 100 ml de agua, y la mezcla fue ajustada a pH 7.6 con NaOH. Luego, esta mezcla se dializó en membranas durante 72 horas. Las membranas fueron dispuestas en agua nanopura, medio que fue removido 3 veces (1 vez por día). Finalmente, se removió la mezcla contenida en las membranas, y fue agregada en un evaporador rotatorio (Heidolph - Laborota 4001 Efficient) con presión reducida hasta obtener 10 ml, los cuales se liofilizaron (Christ Alpha1-4).

2- Espectroscopía infrarroja transformada Fourier

FTIR es una técnica espectroscópica que determina grupos funcionales químicos contenidos en un compuesto macromolecular. En esta memoria de título esta técnica permitió comprobar que las estructuras químicas esperadas para los Qo funcionalizados (sulfonatado y tiolado) concordaron con los productos esperados. Para analizar los espectros FTIR se comparó el patrón de absorción de luz infrarroja de enlaces representativos de los Qo funcionalizados con valores de absorción de bandas de enlaces ya conocidos y tabulados en literatura (Donato *et al.*, 2006). El instrumento que se utilizó fue un Interspectrum Interspec 200x.

3-Formulación de micropartículas con antígenos mediante gelificación iónica (ionotrópica) y secado por atomización (*spray dryer*)

Las MPQT y MPQC fueron preparadas mediante GI, mientras que las MPQS fueron preparadas por secado por atomización o *spray dryer*. Todos los materiales utilizados en la formulación de MPs fueron autoclavados. En la GI se utilizó TPP como agente entrecruzante. Se prepararon 30 ml de QT en solución acuosa al 1% y 30 ml de Qo comercial al 1% en ácido acético al 2,5% v/v. Luego, esta mezcla fue filtrada utilizando *Millipore*. Posterior a esto, se agregó el antígeno (375 mg extracto crudo de levadura).

Luego se agregó agua desionizada hasta completar los 70 ml. Esta mezcla fue tapada con gasa y parafilm para evitar contaminación y fue sometida a agitación en un homogenizador (Heidolph RZR 2051 Control) por 30 minutos (min), a 1.510 rpm, a T° ambiente.

Sin detener el vástago se tomó una alícuota (2 ml) de la mezcla, para posteriormente calcular la Eficiencia de Encapsulación de proteína. A continuación, se agregó 7 ml de TPP (15mg/7ml) previamente filtrado con filtro *Millipore* 0.22 µm. Se mantuvo la agitación por 10 min y nuevamente se incorporó 7 ml de la misma solución de TPP, transcurridos 10 min, se agregó 3 ml de una solución de TPP (300 mg/3ml) filtrado. Se esperó 10 min y se tomó una segunda alícuota (2 ml) post encapsulación. Finalmente se detuvo la agitación y se retiró el vástago bajo campana de bioseguridad. El contenido fue centrifugado a 4.500 rpm por 10 min. Se extrajo el sobrenadante y el precipitado se lavó con agua y etanol 70%. Finalmente se liofilizó y se almacenó a 4°C.

Para la formulación de MPQS se utilizó la técnica de secado por atomización utilizando un equipo Buchi Mini Spray Dryer B-290. Siguiendo las mismas condiciones de esterilidad del paso anterior, se preparó una solución de QS 1,5%, se incorporó la misma cantidad de antígeno y agua y se agitó bajo los parámetros descritos anteriormente por 1 hora, posteriormente, sin detener el vástago se extrajo una alícuota (2 ml) para posteriores estudios. El secado por atomización se realizó usando los siguientes parámetros: T° de entrada 140° C, T° de salida: 90 - 100 °C, P° de aspiración 100%, P° de atomización: 300 NI/h, Diámetro de boquilla: 0,7 m. Por último, se recolectó las MPs en tubos Eppendorf bajo campana de bioseguridad y se guardaron refrigeradas a 4°C.

4- Caracterización de las micropartículas

La morfología y tamaño de todas las MPs fue determinada mediante SEM. La observación al SEM (Hitachi Tabletop TM 3000) se realizó montando las muestras con las MPQC sobre un cubre objeto utilizando una cinta adhesiva doble faz sobre un soporte metálico que fue sombreado con oro en un equipo sombreador Electron Microscopy Sciences EMS-550 (Automated Sputter Coated) y observadas al SEM a 15 Kv. Además, se determinó el

tamaño y el potencial Zeta de las MPs usando un analizador de tamaño de partículas (90Plus/BI-MAS) y un instrumento de medición de potencial Zeta (ZetaPlus; Broekhaven Instruments), respectivamente. El potencial Zeta es un equipo que mide la movilidad electroforética de partículas cargadas dispersadas en un líquido a través de la conexión de un electrodo al contenedor de la muestra, al cual se aplica una determinada corriente creando un campo eléctrico que atraviesa una celda que contiene la muestra. Las partículas dispersadas con carga superficial migran en el campo eléctrico y su movimiento y dirección están dados de acuerdo a su potencial zeta. El analizador de tamaño de partículas emplea la técnica espectroscópica de correlación fotónica de luz dispersada, la cual está basada en la correlación de fluctuaciones de promedios de intensidad de láser dispersado. Permitiendo entregar valores de diámetro efectivo y polidispersidad de las MPs en solución.

5-Determinación de la Eficiencia de Encapsulación y Rendimiento de producción de las micropartículas

Para calcular el contenido proteico encapsulado en las MPs, se analizó las alícuotas pre y post encapsulación, utilizando el método colorimétrico de detección de proteínas Bradford. Para esto se centrifugó las alícuotas a 1470G por 10 min y se midió el sobrenadante mediante espectrofotometría (Espectrofotómetro UV/VIS de doble haz (Rayleigh UV-2601). Las mediciones de absorbancia fueron realizadas en triplicado. Para calcular el R se pesaron las partículas y se comparó con el peso de los reactantes utilizados. Se utilizaron las siguientes fórmulas para su cálculo:

$$EE\% = \frac{(\text{Cantidad de principio activo encapsulado})}{(\text{Cantidad total de principio activo})} * 100$$

$$R\% = \frac{\text{Peso final de las MPs}}{\text{Peso del polímero} + \text{Peso del principio activo}} * 100$$

6-Determinación de contenido del antígeno presente en las micropartículas

Para la determinación del antígeno cargado en las MPs se preparó una solución con una cantidad conocida (10 mg) de MPs cargadas, de Q comercial, con grupos tiol y sulfonato, en 1ml de una solución de HCL 1M, respectivamente. Luego se agitó en vórtex para homogenizar y de cada muestra se obtuvo 200 µl que se incubaron a 90 °C por 30 min y otros 200 µl que se incubaron a temperatura ambiente por 30 min, con la finalidad de romper las partículas y liberar el antígeno (exponiéndolas a un medio ácido y a altas temperaturas). Transcurridos los 30 min se centrifugó a 10.000 G por 2 min. Transcurrido este tiempo se extrajo el sobrenadante, el cual fue utilizado para realizar un Dot Blot, para determinar la presencia del antígeno.

7-Ensayos de mucoadhesividad

Se realizó un ensayo de mucoadhesividad con mucina tipo I (de glándula submaxilar de bovino) y tipo III (de estómago de cerdo). Para esto, se pesó 10 mg de MPs sin antígeno de MPQC, MPQT y MPQS, en tubos Eppendorf por duplicado, luego se preparó una solución con 2mg/1ml de ambas mucinas y se ajustó a pH 5 y se agregó 500 µl de cada solución de mucina a los tubos que contengan las MPs. Se incubaron a 37° C a movimiento constante (100 rpm) por una hora y se centrifugaron a 4.000 G por 2 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se midió mediante un método colorimétrico de detección de proteínas, BCA, por espectrofotometría (UV-VIS) la presencia de mucina presente en el sobrenadante, no adherida a las MPs.

En esta Memoria de Título no se realizó un análisis estadístico para evaluar la variación existente entre muestras formuladas de MPQC, MPQT y MPQS sin cargar y cargadas con el antígeno. Como parámetros cuantitativos se utilizaron EE y R. Todas las mediciones analizadas fueron realizadas en triplicado.

RESULTADOS

I. Espectrometría infrarroja transformada Fourier

La figura 1A corresponde al espectro FTIR obtenido para quitosano sulfatado liofilizado, en el cual se observan peaks de absorción a 1220 cm^{-1} y 807 cm^{-1} , correspondientes a los grupos C-O-S y S=O, respectivamente; lo que confirma que la reacción de sulfonación fue exitosa. Por su parte, la figura 1B muestra el espectro FTIR de quitosano tiolado liofilizado, el cual presenta bandas de absorción a 1628 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} y 1249 cm^{-1} , las cuales confirman la presencia de la amida I, amida II, y grupo tiol respectivamente; indicando que la tiolación se llevó a cabo con éxito.

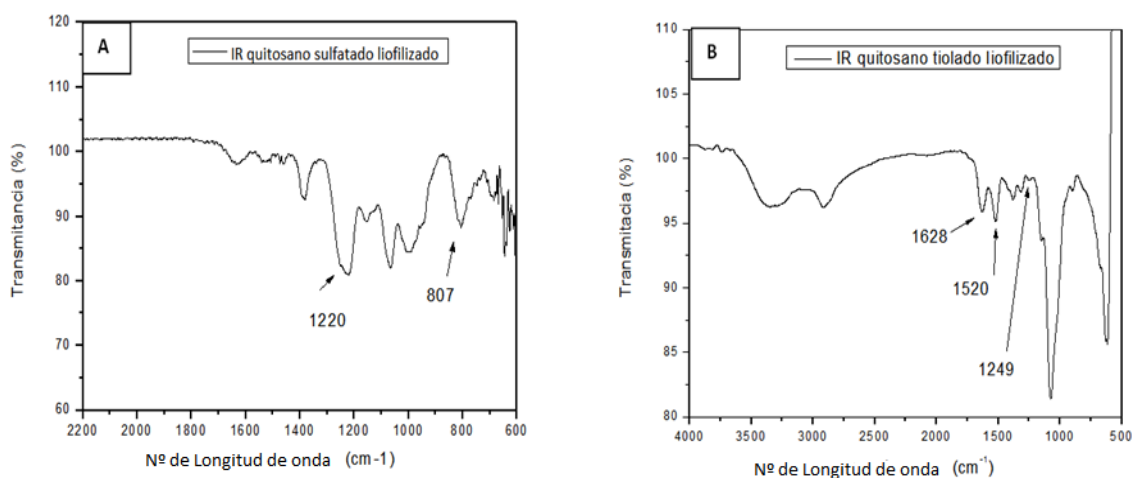


Fig. 1. Espectro FTIR. Quitosano sulfatado (A), y Quitosano tiolado (B).

Las MPs de Qo formuladas mediante GI y secado por atomización también fueron caracterizadas mediante FTIR. La figura 2A muestra el espectro FTIR de MPQC con dos concentraciones de antígeno (1X y 2X), y el espectro FTIR del extracto crudo de levaduras que contiene al antígeno Cap de PCV2. Se presentan bandas de absorción a 1628 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} las cuales indican la presencia de la amida I, amida II.

La figura 2B muestra el espectro FTIR de MPQT con dos concentraciones de antígeno (1X y 2X), y el espectro FTIR del extracto crudo de levaduras. El espectro de MPQT muestra banda de absorción a la longitud de onda 1249 cm^{-1} , resultado que coincide con el patrón FTIR descrito para el QT.

En la figura 2C se observan los espectros FTIR de MPQS, formuladas con dos concentraciones de antígeno (1X y 2X), y el espectro FTIR del extracto crudo de levaduras. El espectro de MPQS muestra bandas de absorción a las longitudes de onda 1220 y 807 cm^{-1} , resultado que coincide con el patrón FTIR descrito para el QS. Sin embargo, también se observa la aparición de nuevos peaks de absorción, a las longitudes de onda 1090 y 1400 cm^{-1} . El espectro FTIR del extracto crudo de levaduras se observan hasta seis peaks de baja intensidad.

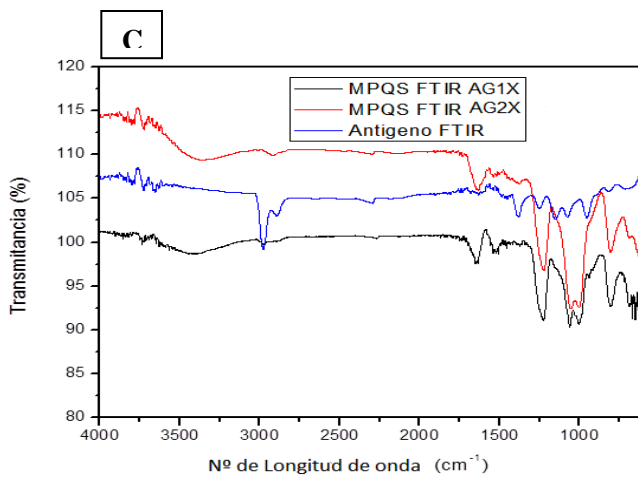
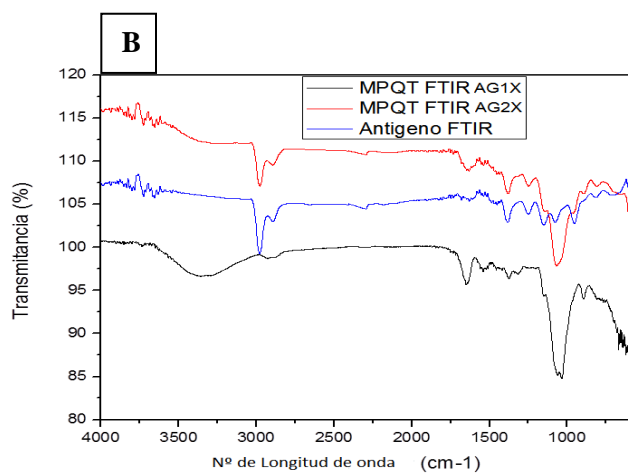
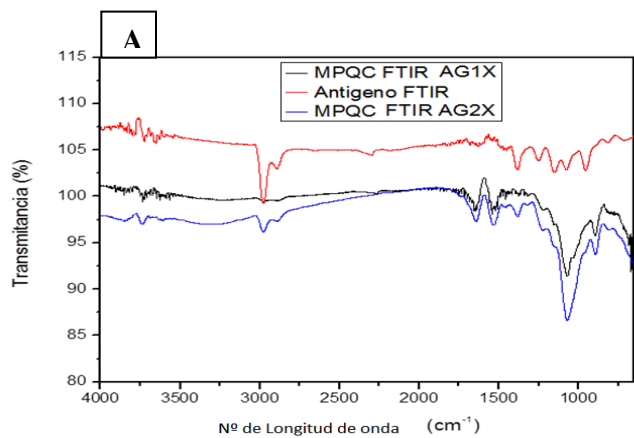


Fig.2. Espectro FTIR de micropartículas de quitosano. **A)** MPQC 1X, MPQC 2X y Extracto crudo de levadura. **B)** MPQT 1X, MPQT 2X y Extracto crudo de levadura. **C)** MPQS 1X, MPQS 2X y Extracto crudo de levadura

II. Determinación del tamaño y cantidad de carga superficial (potencial Zeta, ζ)

Las tablas 1A y 1B muestran el diámetro efectivo y el potencial zeta (ζ) para MPQC, MPQT y MPQS, formuladas con 375 mg del extracto crudo de levadura (1X), y 750 mg (2X), respectivamente.

Tabla 1a. Tamaño y cantidad de carga superficial de MPQC, MPQT, y MPQS. 1X.

Micropartículas de quitosano 1X	Diámetro efectivo (nm)	Z potencia (mv)
MPQC	2155,1	+ 5,81
MPQT	1907,7	+ 19,71
MPQS	2410,9	- 37,86

Tabla 1b. Tamaño y cantidad de carga superficial de MPQC, MPQT, y MPQS. 2X.

Micropartículas de quitosano 2X	Diámetro efectivo (nm)	Z potencia (mv)
MPQC	1965,5	+ 4.06
MPQT	2632,5	+ 12,18
MPQS	1610.8	- 29,82

El tamaño no presenta mayor variación dentro y entre formulaciones, y el potencial Zeta se modifica en función de la cantidad de antígeno incorporado en las MP. El antígeno presenta carga negativa (- 21,27 mV).

Por su parte, la tabla 2 muestra el diámetro efectivo y la cantidad de carga superficial del extracto crudo de levadura. En base a estos resultados se obtiene que las MPQT son más positivas que las MPQC mientras que las MPQS son negativas, tanto para 1X como en 2X. Por otro lado, MPQS poseen un diámetro efectivo ligeramente mayor que las otras micropartículas en 1X, mientras que las MPQT en 2X son mayores que otras MPs.

Tabla 2. Tamaño de las micropartículas de quitosano formuladas y potencial zeta del extracto crudo de levadura.

	Diámetro efectivo (nm)	Potencial z (mV)
Extracto crudo de levadura	4051.7	- 21.27

III. Análisis morfológico de micropartículas de quitosano mediante SEM.

MPs sin cargar y cargadas con el antígeno 2X fueron analizadas mediante SEM. Como se observa en la figura 3, se confirmó la formación de MPs de Qo. Todas las MPs Qo presentaron formas más o menos esféricas, bordes definidos, y tamaños que varían aproximadamente entre 1 a 20 μm . Se observa el “colapso” de algunas MPs de Qo, hecho que suele ocurrir durante la etapa de secado. Las formulaciones no cargadas con antígenos presentan una superficie más lisa en comparación a MPs cargadas con antígenos que tiende a ser rugosa a colapsada.

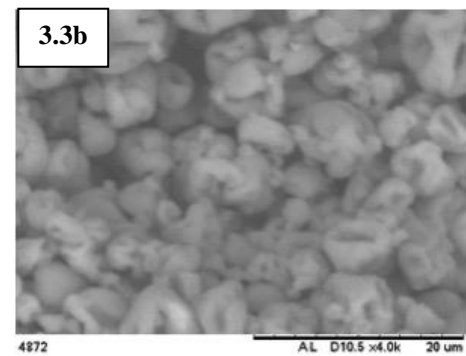
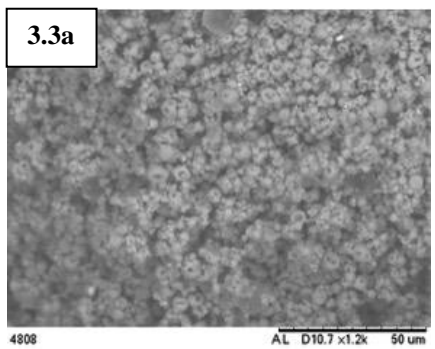
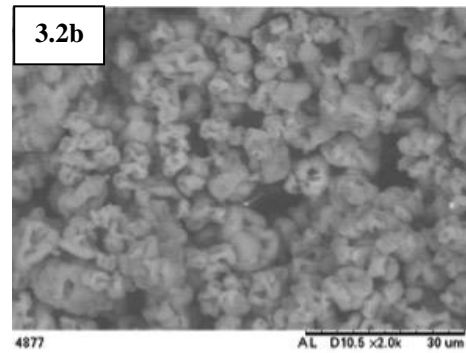
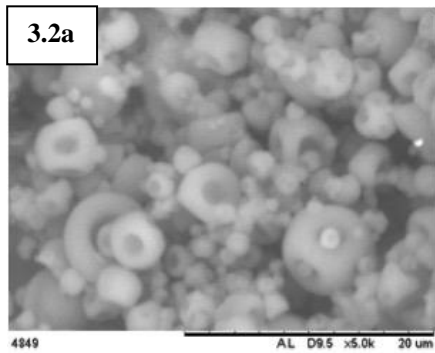
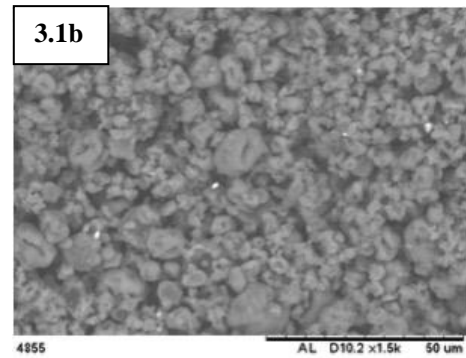
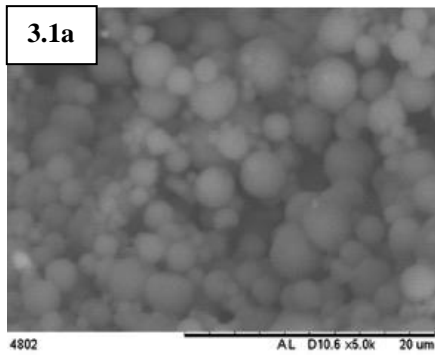


Fig.3. Imágenes SEM de MPs de QC, QT y QS formuladas mediante secado por atomización sin carga (a), y cargadas con extracto crudo de levadura (b).3.1 MPQC, 3.2 MPQT y 3.3MPQS.

IV. Determinación de la Eficiencia de Encapsulación

Para calcular el contenido de antígeno Cap de PCV2 encapsulado en las MPs de Qo se analizaron las alícuotas pre y post encapsulación, utilizando el método colorimétrico de detección de proteínas Bradford. Para ello, se centrifugaron las alícuotas a 1470 G durante 10 min, y se midió el sobrenadante del tubo mediante espectrofotometría UV/VIS. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3. Las mediciones de absorbancia fueron realizadas en triplicado. La EE fueron las esperadas para las distintas formulaciones de MPS de Qo, presentando valores entre 75.2 para MPQS (1X) y 85.6% para MPQT (1X).

Tabla 3. Eficiencia de encapsulación de MPQC, MPQT y MPQS, 1X y 2X.

Micropartículas	EE (%)
MPQC 1X	85.4
MPQT 1X	85.6
MPQS 1X	75.2
MPQC 2X	84.5
MPQT 2X	83
MPQS 2X	84.2

V. Determinación del Rendimiento de la producción

Los resultados son tanto de la síntesis de quitosano funcionalizado (tabla 4) como de las micropartículas formuladas (tabla 5). El Rendimiento de producción de las MP refleja el porcentaje de MP obtenidas respecto a la cantidad total de material empleado (principio activo + polímero).

Tabla 4. Rendimientos (%) de síntesis de quitosano tiolado y sulfatado.

Quitosano funcionalizado	R (%)
Quitosano tiolado	55
Quitosano sulfatado	52

Tabla 5. Rendimientos (%) de producción de MPs de Q comercial, tiolado y sulfatado

Micropartículas	R (%)
MPQC 1X	39
MPQT 1X	37
MPQS 1X	30
MPQC 2X	32
MPQT 2X	22
MPQS 2X	25

VI. Evaluación de la presencia de antígeno en micropartículas de quitosano.

En la figura 4 todas las MPs resultaron positivas para la presencia de antígeno. Las MPs expuestas a 90°C exhibieron una mayor intensidad de coloración que a las de T° ambiente (amb), por lo tanto, se deduce que en ellas hay una mayor concentración de antígeno.

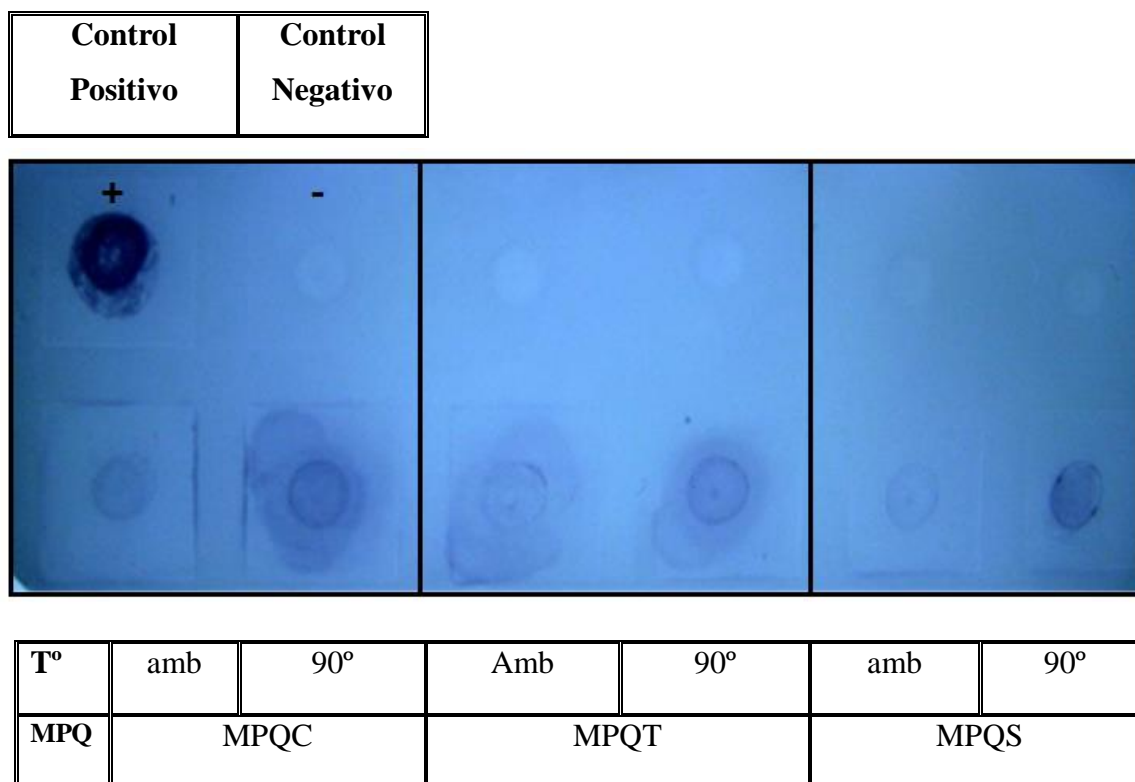


Fig.4. Dot Blot de MPQC, MPQT y MPQS.

VII. Ensayo de mucoadhesividad

La tabla 6 muestra la cantidad de mucina adherida a las MPs, expresada en ug/ml, detectada por el método BCA. Estos valores fueron calculados mediante la diferencia entre la cantidad de mucina detectada en la solución inicial (2mg/ ml) y la concentración de mucina libre en el sobrenadante.

Ambos tipos de mucina presentan distintos porcentajes de ácido siálico en su estructura: entre 9-17% para mucina 1, y 0,5-1% para mucina 3. La mucina es una glicoproteína que presenta un punto isoeléctrico en el rango 3 – 4.5, y el ácido siálico un pKa de 2,6. Por lo tanto, a un pH sobre 4.5 ambos presentarán carga neta negativa. Por su parte el Qo presenta un pKa entre 6 y 7, por lo que bajo pH 6 presentará carga positiva. Por el hecho anterior se decidió realizar los ensayos de mucoadhesividad a pH 5, para de esta forma maximizar la interacción electrostática entre mucinas y MPs (He *et al.* 1998).

Tabla 6. Resultados del test de mucoadhesividad

Tipo de micropartícula de quitosano	Concentración de mucina 1 (µg/ml)	Concentración de mucina 3 (µg/ml)
MPQT	120,00	36,92
MPQS	102,31	13,07
MPQC	88,47	32,30

La interacción de la mucina 1 con MPs de Qo fue más importante que la interacción entre MPs Qo y mucina 3. A su vez MPs funcionalizadas con grupos tiol, presentaron mayor mucoadhesividad que las MPs de Qo sin funcionalizar.

DISCUSIÓN

Los resultados de los picos de absorción mediante espectroscopía de FTIR corresponden a los grupos (amida I y amida II) esperados para las MPQ al igual que en otros estudios (Parize *et al.*, 2012). El espectro de MPQT muestra banda de absorción a la longitud de onda 1249 cm^{-1} , resultado que coincide con el patrón FTIR descrito para el QT. El espectro de MPQS mostró bandas de absorción a las longitudes de onda 1220 y 807 cm^{-1} , resultado que coincide con el espectrograma de FTIR descrito para el QS. Además de los patrones de FTIR esperados en cada medición y en especial en MPQS aparecieron nuevos picos de absorción.

El resultado de la determinación de potencial Zeta al analizar el diámetro no presentó mayor variación dentro y entre formulaciones. Sin embargo, el extracto crudo es mayor que las MPs y aun así se consigue de todas maneras la microencapsulación. Esto se debe a las técnicas utilizadas (en especial por secado) para la formulación de MPs en donde el extracto crudo colapsaría sobre sí mismo. Respecto de la variación de carga neta en formulaciones 1X y 2X, esto se explica por la cantidad de antígeno incorporado ya que como posee una gran carga negativa al ir aumentado en formulaciones 2X las partículas adquieren menos carga positiva, y transformando a las partículas altamente negativas menos negativas, acercándolas de esta manera al valor de potencial Zeta del antígeno.

Mediante SEM si bien los resultados indicaron formas esféricas y de superficies lisa a rugosa esto se puede contrarrestar con estudios previos (KO *et al.*, 2002) en donde MPs formuladas por GI con TPP a pH más bajos y de pesos moleculares más altos consiguen formas más esféricas y superficies más lisas.

En la evaluación de antígeno mediante Dot Blot determinó que las MPs expuestas a 90°C exhibieron una mayor intensidad de coloración que a las de T° ambiente, por lo tanto, se deduce que en ellas hay una mayor concentración de antígeno. La observación anterior se

explicaría por una degradación mayor de las MPs (evidente en las de Qo comercial) aumentando así la liberación del antígeno; esta degradación indica la estabilidad y permeabilidad de la MP formulada.

En cuanto al test de mucoadhesividad realizado, la mayor interacción de las MPQ con mucina 1 se explica debido al elevado porcentaje de ácido siálico el cual le otorga mayor electronegatividad, generándose una mayor interacción electrostática con las MPQ, las cuales presentan carga positiva. A su vez MPQT presentaron mayor mucoadhesividad que las sin funcionalizar, esto debido a la formación de enlaces covalentes, puentes disulfuro, entre la cisteína que presenta la mucina y los grupos azufrados de las MPs. En base a esto la mayor contribución de este estudio se puede decir que son sus ensayos de mucoadhesividad en los que comparando con diferentes mucinas se pudo extraer las MPs funcionalizadas con mejores resultados y que por ende tendrán mayor éxito en el uso de la vacuna contra PCV2.

Si bien para efectos de esta memoria no se hicieron otras caracterizaciones que pudieran complementar los resultados obtenidos los laboratorios involucrados Biovetec y Polyforms trabajan en esto. En resumen, como proyecciones es esperable que se puedan realizar futuras mediciones que permitan mejorar la capacidad de carga, el comportamiento de liberación de antígeno, formular MPs con quitosanos de pesos moleculares mayores, TPP a diferentes pH, entre otros.

CONCLUSIÓN

Se preparó y caracterizó Qo funcionalizado con grupos tiol y sulfonato. Los productos de ambas reacciones fueron confirmados mediante FTIR por la aparición de nuevos picos de absorción a 1249 cm^{-1} para grupos -SH, y 1220 cm^{-1} para enlaces C-O-S y 807 cm^{-1} para grupos S=O.

Se logró formular tres tipos MPs de Qo cargadas con antígeno Cap de PCV2: MPs de Qo comercial (MPQC), MPs de Qo funcionalizado con grupos tiol (MPQT), y de Qo funcionalizado con grupos sulfonados (MPQS). Las MPQC y MPQT fueron formuladas a través de gelificación iónica, en cambio las MPQS mediante secado por atomización o *spray dryer*. Mediante la técnica de FTIR se observaron bandas de absorción características para los grupos sulfonados y tiolados en las MPs de QS y QT, respectivamente.

Las imágenes obtenidas por SEM confirman la formación de MPs de Qo con formas más o menos esféricas, bordes definidos, superficie lisa a rugosa, y tamaños que varían entre 1 y $20\text{ }\mu\text{m}$. Además, la técnica de potencial zeta las MPQC y MPQT presentaron carga neta positiva (+5,81 y +19,71, respectivamente), mientras que las MPQS presentaron carga neta negativa (-37,86). Todas las MPs de Qo presentaron valores de EE superiores a 80% tanto para formulaciones con antígeno 1X y 2X. En cuanto a los valores de R para síntesis de Qo funcionalizado fueron sobre el 50% mientras que para las MPs cargadas fue de alrededor de 30% solo para formulaciones 1X.

Todas las MPs de Qo poseían antígeno Cap de PCV2 al análisis por Dot Blot. Finalmente, los ensayos con mucinas las MPQT y MPQS presentaron mejor mucoadhesividad respecto a MPQC y entre MPQT y MPQS presentó mejor mucoadhesividad las MPQT.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ALLAN, G. M.; MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARKE, E. G., ELLIS, J. A.; HAINES, D. M.; MEEHAN, B. M.; ADAIR, B. M. 1998.** Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with wasting disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10: 3-10.
2. **ALVES, N. M.; MANO, J. F. 2008.** Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int J Biol Macromol* 43: 401-414.
3. **BUCAREY, S. A.; NORIEGA, J.; REYES, P.; TAPIA, C.; SÁENZ, L.; ZUÑIGA, A.; TOBAR, J. A. 2009.** The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine* 27: 5781-5790.
4. **EXPÓSITO, H. R. 2009.** Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Memoria de tesis doctoral. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. 23, 28 p.
5. **FLORES-BELMONT, I. A.; JIMENEZ-MUNGUÍA, M. T. 2013.** Microencapsulación de compuestos activos con quitosano. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 7-1: 48-56.
6. **GOYCOOLEA, F.; REMUÑÁN LÓPEZ, C.; ALONSO, M. 2009.** Nanopartículas a base de polisacáridos: Quitosano. In: Vila Jato, J.L. ed. *Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. Pp. 103-13.

7. **HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. 1998.** *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 166: 75–68.
8. **ISLAM, M.; FIRDOUS, J.; CHOI, Y.; YUN, C. H.; CHO, C.H. 2012.** Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review. *International Journal of Nanomedicine* 7: 6077–6093.
9. **KO, J.A.; PARK, H.J.; HWANG, S.J.; PARK, J.B.; LEE, J.S. 2002.** Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*.249: 165-174.
10. **LOZANO, M. 2009.** Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de *Opuntia stricta* mediante secado por atomización. Proyecto fin de carrera. Cartagena, España. Universidad Politécnica de Cartagena. Escuela Técnica Superior de Ingeniería. 1-5 p.
11. **LUANA PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; VENEZIA, L.; PAGANO, C.; RICCI, M.; ROSSI, C. 2008.** Chitosan and a modified chitosan as agents to improve performances of mucoadhesive vaginal gels. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 66: 141-145.
12. **MARTÍN-VILLENA, M. J.; MORALES-HERNÁNDEZ, M.E.; GALLARDO-LARA, V.; RUÍZ MARTÍNEZ, M.S. 2009.** Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica* 50: 43-50.
13. **PARIZE, A.L.; STULZER, H.K.; LARANJEIRA, M.C.M.; COSTA BRIGHENTE, I.M.; ROZONE DE SOUZA, T.C. 2012.** Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray drying. *Artigo* 6: 1127-1132.

14. **PORTERO, A.; TEIJEIRO-OSORIO, D.; ALONSO, M.J.; REMUNAN-LOPEZ, C. 2007.** Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin. *Carbohydr Polymers* 68: 617-625.
15. **RÍOS DONATO, N.; NAVARRO MENDOZA, R.; ÁVILA RODRÍGUEZ, M.; MENDIZÁBAL MIJARES, E. 2006.** Obtención de sulfato de quitosano y su aplicación en el proceso de coagulación-floculación de suspensiones coloidales aniónicas de caolinita. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 7: 145-161.
16. **SÁENZ, L.; NEIRA-CARRILLO, A.; PAREDES, R.; CORTÉS, M.; BUCAREY, S.; ARIAS, J.L. 2009.** Chitosan formulations improve the immunogenicity of a GnRH-I peptide based vaccine. *International Journal of Pharmaceutics* 369: 64-71.

ANEXO 1: ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig.1. Espectro FTIR. Quitosano sulfatado (A), y Quitosano tiolado (B).	14
Fig.2. Espectro FTIR de micropartículas de quitosano. A) MPQC 1X, MPQC 2X y Extracto crudo de levadura. B) MPQT 1X, MPQT 2X y Extracto crudo de levadura. C) MPQS 1X, MPQS 2X y Extracto crudo de levadura.	16
Fig.3. Imágenes SEM de MPs de QC, QT y QS formuladas mediante secado por atomización sin carga (a), y cargadas con extracto crudo de levadura (b). 3.1 MPQC, 3.2 MPQT y 3.3MPQS.	19
Fig.4. Dot Blot de MPQC, MPQT y MPQS.	22

ANEXO 2: ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tamaño y cantidad de carga superficial de MPQC, MPQT, y MPQS 1X (A) y 2X (B).	17
Tabla 2. Tamaño de las micropartículas de quitosano formuladas y potencial zeta del extracto crudo de levadura.	18
Tabla 3. Eficiencia de encapsulación de MPQC, MPQT y MPQS, 1X y 2X.	20
Tabla 4. Rendimientos (%) de síntesis de quitosano tiolado y sulfatado.	21
Tabla 5. Rendimientos (%) de producción de MPs de Q comercial, tiolado y sulfatado.	21
Tabla 6. Resultados del test de mucoadhesividad.	23