



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO
ADYUVANTE POLIMÉRICO A BASE DE MICROPARTÍCULAS DE
QUITOSANO-CARRAGENINA PARA UNA VACUNA PEPTÍDICA
CONTRA LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS
(GNRH-I).”**

YAZMÍN ANDREA AMAR MARINI

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales.

PROFESOR GUÍA: ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO
Financiamiento: Proyecto FONDEF D08I1085

SANTIAGO, CHILE
2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“ OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO
ADYUVANTE POLIMÉRICO A BASE DE MICROPARTÍCULAS DE
QUITOSANO-CARRAGENINA PARA UNA VACUNA PEPTÍDICA
CONTRA LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS
(GNRH-I) ”**

YAZMIN ANDREA AMAR MARINI

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales.

PROFESOR GUÍA: ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ANDRÓNICO NEIRA- CARRILLO
PROFESOR CONSEJERO: LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA
PROFESOR CONSEJERO: OSCAR PERALTA TRONCOSO

**SANTIAGO, CHILE
2012**

“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO ADYUVANTE POLIMÉRICO A BASE DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO-CARRAGENINA PARA UNA VACUNA PEPTÍDICA CONTRA LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH-I)”

“OBTAINMENT AND CHARACTERIZATION OF A NEW ADJUVANT POLYMER BASED ON CHITOSAN-CARRAGEENAN MICROPARTICLES FOR A PEPTIDE VACCINE AGAINST THE GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE (GnRH-I)”

Yazmín Andrea Amar Marini

Laboratorio de Materiales Bio-relacionados (CIMAT) Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Financiamiento FONDEF N° D0811085

Resumen

El uso de micropartículas de polímeros naturales ha sido descrito como una innovadora técnica de formulación de adyuvantes para diversas vacunas. En este estudio se prepararon micropartículas de quitosano (MPQ) y de carragenina (MPC) como también de diferentes proporciones volumétricas (1:1; 1:3; 3:1) usando soluciones de quitosano de 0.1 a 1% (p/v) y carragenina al 0.83% (p/v), respectivamente, las cuales se utilizaron como adyuvantes en forma de micropartículas para una vacuna peptídica contra la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I). Las micropartículas de quitosano y carragenina (MPQC) fueron obtenidas mediante una técnica combinada de coacervación compleja, usando agitación mecánica y ultrasonificación y la técnica de secado por atomización. Lográndose un método optimizado de formación de micropartículas. Se determinó el porcentaje de rendimiento (R) de las micropartículas y se caracterizaron las propiedades de tamaño, morfología y potencial zeta. Adicionalmente, se evaluaron los parámetros de eficiencia de encapsulación (EE), capacidad de carga (CC) en estudios *in vitro* de encapsulación. Así mismo se estudió la cinética de liberación *in vitro* de las proteínas de albúmina sérica de bovino (BSA) y de un análogo de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH G/Q) en solución de buffer fosfato de pH 7.4 a 37 °C. Las micropartículas MPQC obtenidas por la técnica de ultrasonificación fueron elegidas para el presente estudio. El análisis morfológico mediante microscopia SEM de las MP mostró diversas morfologías y tamaños, siendo las MPQC (3:1) de forma elíptica, bordes definidos, superficie lisa, las características más constantes, cuyos tamaños fluctuaron entre 4 a 7 µm. Los resultados de Z potencial confirmaron la carga neta positiva del quitosano con valores promedios para las MPQ de +47,91 mV y de -52,86 mV para la carga negativa de carragenina. Los valores de Z potencial de las micropartículas MPQC fueron +49,89, + 27,88 y -41,79 para las relaciones de 3:1, 1:1 y 1:3. Los tamaños obtenidos por el analizador de tamaño de partículas fluctuó entre 1495,9 nm y 13302,6 nm, siendo mayor para las MPQC. El valor de R mayor fue de las MPQ. Los valores de EE y CC fue mayor en MP compuestas por complejos poliiónicos cargadas con GnRH G/Q. La cinética de liberación *in vitro* presentó dos picos de liberación a los 7 y 14 días aprox. de estudio. En conclusión, fue posible la obtención de MP en base a quitosano-carragenina con diferentes formas, tamaños y potencial zeta. A su vez las MP compuestas por complejos poliiónicos presentaron valores elevados de EE y CC, como también una sostenida y prolongada cinética de liberación *in vitro*, concluyéndose que esta formulación de complejos poliiónicos podría utilizarse como una nueva opción de adyuvante para la vacuna peptídica contra GnRH-I.

Palabras claves

Micropartículas, quitosano, carragenina, gelificación iónica, hormona liberadora de gonadotrofina, eficiencia de encapsulación, capacidad de carga.

Abstract

The use of microparticles of natural polymer has been described as an innovative technique of adjuvants formulation for various vaccines. In this study, chitosan (MPQ) and carrageenan (MPC) microparticles were prepared as well as different volumetric (1:1, 1:3, 3:1) ratios by using solutions of chitosan from 0.1 to 1% (w/v) and carrageenan 0.83% (w/v), respectively. These polymers were used as microparticles adjuvants for a peptide vaccine against gonadotropin releasing hormone (GnRH-I). The microparticles of chitosan and carrageenan (MPQC) were obtained by a combination of ionic gelation technique, using mechanical stirring and ultrasonication, and the spray drying technique of the solutions of microparticles achieving an optimized method for the formation of microparticles. We determined the percentage yield (R) of the MPQC and it is was characterized the size, morphology and zeta potential properties. Additionally, we evaluated the parameters of encapsulation efficiency (EE), capacity (CC) of the *in vitro* encapsulation studies. We also determined the kinetics *in vitro* release of the proteins of bovine serum albumin (BSA) and an analog of gonadotropin releasing hormone (GnRH G/Q) both in phosphate buffer solution pH 7.4 at 37 °C. The MPQC microparticles obtained by ultrasonication technique were chosen for this study. Morphological analysis by SEM microscopy of MP showed various morphologies and sizes, with the MPQC (3:1) of elliptical shape, sharp edges, smooth surface, the most constant features, whose sizes ranged from 4-7 µm. The Z potential results confirmed the net positive charge of chitosan with values for the MPQ of +47.91 and -52.86 mV mV values for the negative charge of carrageenan. The values of Z potential of the microparticles MPQC were 49.89, 27.88 nm and -41.79 nm for ratios of 3:1, 1:1 and 1:3. The sizes obtained by the particle size analyzer fluctuated between 13302.6 nm and 1495.9 nm, being higher for MPQC. The higher R value was to the MPQ. The values of EE and CC were higher for MP composed of polyionic complexes loaded with GnRH G/Q. The *in vitro* kinetics release had two peaks at 7 and 14 days approx. study. In conclusion it was possible to obtain a chitosan-carrageenan MP with different shapes, sizes and zeta potential. Moreover, the composed of polyion complexes showed high values of CC and EE, as well as a sustained and prolonged *in vitro* kinetics release, concluding that the formulation based on polyionic complexes could be used as a new alternative of adjuvant for the vaccine against GnRH-I.

Keywords

Microparticles, chitosan, carrageenan, ionic complexation, gonadotrophin releasing hormone, encapsulation efficiency, loading capacity.

INTRODUCCIÓN

La utilización de polímeros naturales ha adquirido importancia en múltiples áreas como la industria cosmética, agrícola, alimentaria, farmacéutica, etc. Al mismo tiempo, ha destacado su desarrollo e innovadora utilización en el campo biomédico, en particular su uso como transportadores de agentes biológicos tales como proteínas, antibióticos, drogas y adyuvantes en vacunas de diferentes clases (1). Dentro de estos polímeros naturales destaca el quitosano (Q), un polisacárido catiónico derivado de la desacetilación parcial de la quitina, el cual se ha utilizado en diversas áreas de la biomedicina, tales como la regeneración de tejido óseo y dental, curación de heridas, transportador de fármacos y adyuvante de vacunas, entre otras. Sus aplicaciones se deben a sus múltiples propiedades físico-químicas, dentro de las cuales destacan la biocompatibilidad, bioadhesividad, flexibilidad, ausencia de toxicidad, biodegradabilidad y capacidad inmunopotenciadora. Esta última se explica principalmente por la viscosidad, peso molecular y por la presencia de la unidad monomérica N-acetil-D-glucosamina en su estructura (2). Sus propiedades como adyuvante, se describen con variados antígenos de naturaleza proteica, como por ejemplo con la β galactosidasa, logrando aumentar su inmunogenicidad al

incorporarla por vía sub cutánea, superando la acción de adyuvantes tradicionales (3).

Por otra parte, la carragenina (C) corresponde también a un polisacárido natural pero de naturaleza aniónica. La carragenina es obtenida desde algas rojas marinas, que en conjunto a ciertos cationes divalentes y poliiones de carga opuesta, tiene la capacidad de formar geles y presentar también propiedades muy requeridas en aplicaciones biomédicas tales como: ser biocompatible, hidrosoluble, no presentar toxicidad y poseer excelentes propiedades como adyuvante de vacunas. Se describen tres tipos de carragenina comercial de acuerdo a la presencia de grupos sulfato en su estructura; *iota*, *kappa*, y *lambda*. (4, 5, 6). La *iota*-carragenina (ι -C) se ha utilizado como adyuvante en vacunas para aves, siendo administradas por las vías intranasal, intratraqueal, intracelómica e intrabursal; estimulando la respuesta inmune a nivel de la mucosa y dando mejores resultados en la inmunización contra micoplasma en comparación con otros adyuvantes (7). La *kappa*-carragenina (κ -C) ha sido utilizada en una vacuna peptídica contra el virus del papiloma humano tipo 16 inoculada en ratones, mejorando significativamente la respuesta inmune específica mediante la activación de la vía receptores tipo toll 4 (TLR4) (5).

La presencia de cargas opuestas de ambos polisacáridos permite su uso combinado mediante la formación de complejos poliónicos, en forma de micro o nanopartículas. (8). La utilización de micropartículas (MP) de polímeros naturales ha sido descrita como una reciente e innovadora técnica de formulación de adyuvantes para diversas vacunas, entre las cuales destacan las vacunas peptídicas, las que poseen una baja inmunogenicidad por sí solas. La formulación de estos adyuvantes a base de micropartículas ofrece múltiples ventajas y beneficios tanto de la respuesta inmune generada por el individuo, al ser captadas por las células del sistema inmune, como en la cantidad y número de dosis empleadas. Además da la posibilidad de utilizarlos por diferentes vías de administración y brindar protección al antígeno en diversos medios. (9).

La utilización de MP de biopolímeros combinados a la forma de complejos poliónicos en la encapsulación de principios activos produce un aumento de la biodisponibilidad del agente encapsulado dado que se retrasa la erosión de las partículas debido a las interacciones electrostáticas que se generan entre los polímeros, mejorando la estabilidad del agente al prevenir su difusión a través de la matriz y su degradación o hidrólisis en un medio, por ejemplo gastrointestinal. Además mejora la captación del agente por parte de

las partículas, de acuerdo a las cargas netas y a las interacciones electrostáticas entre sus componentes lo cual permite la aplicación de éstas MP por diferentes vías de administración, logrando una liberación sostenida y controlada del principio activo en el tiempo, permitiendo la disminución del número de dosis a administrar (11). Al mismo tiempo, las MP adquieren nuevas propiedades físico-químicas específicas que posean ambos polímeros (10).

En esta memoria de título se prepararon y caracterizaron micropartículas (MP) obtenidas desde complejos poliónicos usando dos polisacáridos naturales, carragenina y quitosano, como adyuvantes para la formulación de una vacuna peptídica contra GnRH-I desarrollada en el laboratorio Biovetec de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, la cual tiene por finalidad suprimir la función reproductiva en mamíferos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó quitosano comercial (Aldrich-Sigma) de peso molecular 70 KDa y grado de desacetilación > 75% y carragenina tipo I comercial (Aldrich-Sigma) (predomina kappa carragenina, en menor cantidad lambda carragenina). La albúmina sérica de

bovino (BSA) se empleó como proteína modelo en los ensayos de encapsulación y liberación *in vitro*. Por otro lado, el antígeno GnRX G/Q fue provisto por el laboratorio Biovetec de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Todos los reactivos utilizados fueron de alta pureza.

Preparación de las micropartículas de quitosano-carragenina usando GnRX G/Q (MPQC/GnRX) y BSA (MPQC/BSA)

Las micropartículas de quitosano-carragenina (MPQC) se obtuvieron mediante la técnica de coacervación compleja, basada en la interacción electrostática entre moléculas de carga opuesta, en donde la carga positiva de los grupos amino ($-\text{NH}_3^+$) protonados del Q interactúan con la carga negativa de los grupos sulfatos ($-\text{SO}_4^-$) de la C formando por consiguiente complejos poliiónicos microparticulados (11). Se utilizaron diferentes tipos y velocidades de agitación de la suspensión de MP, con el fin de obtener un método adecuado y óptimo para la obtención de las MP. Finalmente la suspensión de MP fue sometida a secado por atomización.

La preparación de las MPQC se realizó mediante una solución de Q en concentraciones desde 1 a 0,1 % (p/v), disuelto en ácido acético al 1 % (v/v). La

solución de Q se denominó solución A. Por otro lado, se preparó una solución acuosa de C a 60°C en concentración de 0,83% (p/v). Esta solución se denominó solución B. Se midió el pH de las soluciones A y B, las cuales se fijaron a valores cercanos de pH 4 y 6, respectivamente. Luego, se disolvió la proteína BSA y/o GnRX G/Q a concentración de 0,1 % (p/p) en la solución A. La proteína GnRX G/Q al poseer un elevado punto isoeléctrico ($pI \sim 11$), presenta una carga neta positiva en un medio con pH fisiológico, agregándose primero a la solución A, de carga positiva, con el objeto de evitar interacciones electrostáticas de esta proteína, previo a la formación de las partículas MPQC, con una solución de carga opuesta (Solución B). Posteriormente, se mezclaron las soluciones A y B con relaciones volumétricas constantes en las siguientes razones estequiométricas (1:1; 1:3; 3:1). Las soluciones resultantes se sonicaron usando 80 Watt de potencia por 5 minutos en un instrumento Branson digital sonifier. La solución de MPQC cargadas con GnRX G/Q y con BSA se centrifugó a 3.915 xg por 30 minutos. Finalmente, el sobrenadante se separó y fue sometido a secado por atomización en un equipo Büchi Mini Spray-Dryer B-290.

El secado por atomización o Spray Dryer es una técnica de secado y elaboración de preparados como polvos, gránulos y

micropartículas. En esta técnica de secado se describen cuatro etapas: 1) atomización del producto en una boquilla, 2) contacto con aerosoles, 3) secado de las gotas de rocío y 4) colección del producto sólido.

Sus principales ventajas son mantener las propiedades físico-químicas de los productos en solución, es de fácil manejo y reproducción, permitir el control del tamaño de las partículas y funcionar independiente de la solubilidad de las sustancias a atomizar (12).

La preparación de las MPQC/GnRX y MPQC/BSA se realizó pulverizando la solución sobrenadante que contenía las MPQC cargadas con el antígeno. Se utilizaron los siguientes parámetros en la formación de las MP: temperatura de entrada de 130 °C, temperatura de salida entre 80 a 90 °C, presión de aspiración 100%, presión de atomización 300 NI/h y un diámetro de boquilla 0,7 mm.

Preparación de las micropartículas de quitosano-GnRX G/Q (MPQ/GnRX) y de quitosano-BSA (MPQ/BSA)

La preparación de las MPQ se realizó aplicando una solución de Q en concentración de 1 % (p/v), disuelto en ácido acético al 1 % (v/v). Luego, se disolvió la proteína BSA y/o GnRX G/Q al 0,1 % (p/p). Esta solución fue sometida a secado

por atomización utilizando los mismos parámetros mencionados anteriormente.

Preparación de las micropartículas de carragenina-GnRX G/Q (MPC/GnRX) y de carragenina-BSA (MPC/BSA)

La preparación de las MPC se realizó aplicando una solución de C en concentración de 0,83 % (p/v), disuelta en agua destilada a 60 °C. Una vez que la temperatura de la solución descendió bajo los 38°C se agregó la proteína BSA y/o GnRX G/Q al 0,1 % (p/p). La atomización de esta solución se realizó usando los mismos parámetros descritos anteriormente.

Determinación del contenido de las proteínas GnRX G/Q y BSA

Para la determinación de la proteína GnRX G/Q y de BSA cargada en las MPQC se preparó una solución con una cantidad conocida de MPQC cargadas obtenidas por secado de atomización en 5 ml de una solución de buffer fosfato salino (PBS). Esta solución se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y se filtró. Luego, se centrifugó a 3.915 xg durante 30 minutos. La cantidad de proteína incubada en las MP fue calculada usando el valor diferencial entre el total de proteína incorporada a la solución de carga y la cantidad de proteína remanente en el sobrenadante, mediante

espectrofotometría utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA) (Biowave DNA). El método BCA es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. Esta reacción produce la reducción del ion cobre a Cu^{1+} , el cual reacciona con el reactivo del método BCA formando un complejo ternario de color púrpura. La estructura total de la proteína y el número de enlaces peptídicos como también la presencia de los aminoácidos cisteína, cistina, triptófano y tirosina son los responsables de la formación del complejo coloreado de BCA.

De los ensayos *in vitro* de determinación de proteínas se calcularon los parámetros de capacidad de carga (CC), eficiencia de encapsulación (EE) y el rendimiento (R) utilizando las siguientes relaciones (10):

$$CC (\%) = \frac{\text{Cantidad de principio activo encapsulado}}{\text{Peso final de microparticulas}} \otimes 100$$

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

$$R (\%) = \frac{\text{Peso final de la microparticulas}}{\text{Peso del polímero + peso principio activo}} \otimes 100$$

Análisis de la morfología y tamaño de las micropartículas

La forma y tamaño de todas las MP se determinó usando microscopía electrónica de barrido (SEM) en un instrumento Tesla BS 343A. La observación al SEM se realizó montando las muestras con las MP en una cinta adhesiva doble faz sobre un soporte metálico el cual fue recubierto con oro (EMS - 550) y observadas al SEM a 15 Kv. Se observaron tanto las MP obtenidas en suspensión previo al proceso de secado y a las sometidas al secado por atomización.

Análisis del tamaño y potencial Zeta de las micropartículas

El tamaño y el potencial zeta de las MP fueron evaluadas usando un analizador de tamaño de partículas (90Plus/BI-MAS) y un instrumento de medición de potencial zeta (ZetaPlus; Brokehaven Instruments). El ZetaPlus 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 corriente determinada creando con esto 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 (PCS) 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 partículas en solución. El diámetro efectivo representa el tamaño promedio de las partículas en la muestra y la polidispersidad es una medida no uniforme de la intensidad de láser dispersado que existe en esta distribución de tamaños de partículas.

Estudios de liberación *in vitro* de las proteínas GnRX G/Q y BSA

Para el estudio de liberación *in vitro* de la proteína GnRX G/Q y BSA, se preparó una solución que contenía 30 mg de MP incubadas en 2 ml de la solución de PBS a pH 7,4 en un baño de agua termorregulado a 37 °C con movimientos constantes a 135 rpm por 20 días. A diferentes tiempos conocidos las MP en suspensión fueron centrifugadas a 3400 xg por 20 minutos. Luego de la centrifugación el contenido de la proteína en el sobrenadante se determinó según el método BCA mediante espectrofotometría (Biowave Dna). Estas MP fueron sumergidas en el baño termorregulado nuevamente hasta la próxima toma de muestra. El volumen total de esta solución se mantuvo constante mediante la adición de un volumen equivalente de la solución de PBS al sistema. La determinación de la cantidad

acumulativa de la proteína GnRX G/Q y BSA liberada desde las MP se realizó utilizando una curva de calibración estándar de la determinada proteína. La concentración promedio de la proteína GnRX G/Q y BSA liberada se expresó en unidades de concentración de µg/ml.

En esta Memoria de Título no se realizó un análisis estadístico para evaluar la variación existente entre muestras de una misma formulación de MPQ, MPC y MPQC (1:1; 1.3; 3:1), en ausencia y presencia de las proteínas GnRX G/Q y BSA. Sin embargo, es importante destacar que en cada formulación existe una alta variabilidad en cuanto a las diferentes propiedades de todas las MP formadas. Por otro lado, se considera que la razón estequiométrica 3:1 representa un exceso de un componente en la formulación y que además se utilizaron altos volúmenes de biopolímeros durante la formulación de las MP. Adicionalmente, un factor limitante en el análisis estadístico de estas formulaciones es que el antígeno peptídico GnRX G/Q no se encuentra comercialmente disponible y es extraído gradualmente y en pequeñas cantidades en el laboratorio Biovetec, limitando su disponibilidad. Teniendo en cuenta estas consideraciones, las mediciones analizadas fueron realizadas en triplicado sólo para las formulaciones descritas (13).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación y caracterización de las micropartículas

Se logró formular MP de quitosano-carragenina (MPQC) mediante la técnica de coacervación compleja utilizando diferentes tipos y velocidad de agitación de la suspensión de MP. Para desarrollar este procedimiento se prepararon MPQC en relación 3:1 ya que según se reporta se obtienen MP con formas, tamaños y números regulares (14). Las metodologías de agitación se efectuaron mediante agitación mecánica en un homogeneizador mecánico (Heidolph R2R 2051 Control), vórtex y agitación de la suspensión por ultrasonido o sonicación.

La formación, morfología y tamaño de las MP sometidas a los diferentes métodos de agitación se observa en la figura 1. Al someter soluciones de Q y C en relación 3:1 a agitación mecánica con 500, 1250 y 2000 r.p.m. se observó la formación de un menor número y tamaños de MP, los cuales fluctuaron entre valores de nanómetros hasta $\sim 5 \mu\text{m}$ y con formas irregulares. Además, se observó una solución de polímeros dispersa, no particulada. Al someter esta solución a agitación baja con vórtex hubo formación de MP de tamaños variables desde 0,5 a $2 \mu\text{m}$, con formas cuadrangular a esférica, los cuales

mostraron una superficie lisa y bordes no definidos. Por otro lado, cuando las soluciones de Q y C fueron sometidas a sonicación con valor de potencia de 80 watt formaron un mayor número de MP de tamaños homogéneos desde 2 a $5 \mu\text{m}$ aproximadamente, con formas esféricas a elíptica y con una superficie lisa y bordes definidos. Es importante mencionar que cuando las soluciones de Q y de C no son agitadas no hubo formación de MP.

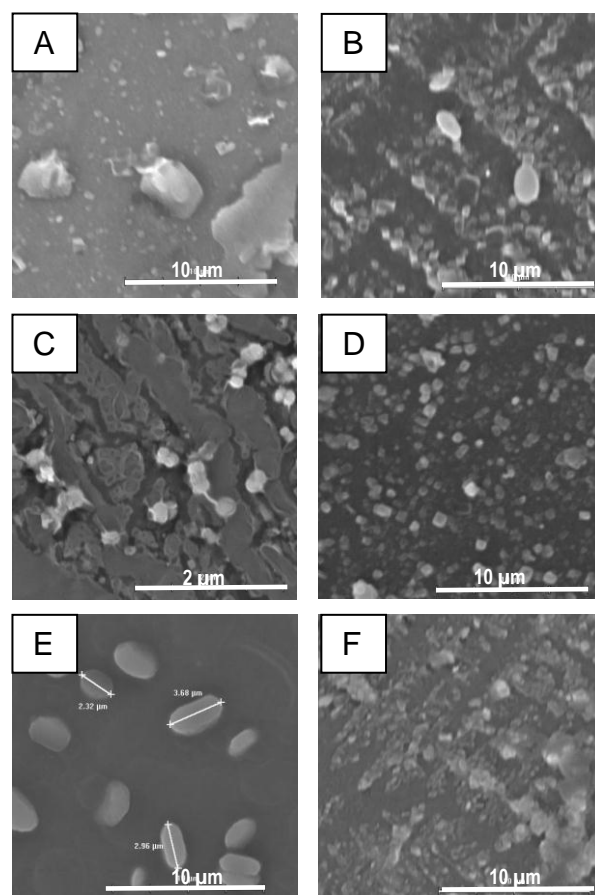


Fig. 1. SEM de micropartículas de quitosano-carragenina. A) Agitación mecánica 500 r.p.m.; B) Agitación mecánica 1250 r.p.m.; C) Agitación mecánicas 2000 r.p.m.; D) Vortex; E) Sonicación 80 Watt; F) Sin agitación.

Como se describe, al mezclar ciertos compuestos de cargas opuestas como es el caso del Q y C hay formación espontánea de complejos poliónicos (11,15). Para que estos compuestos formen MP mediante la técnica de coacervación compleja es necesario someter la mezcla de polímeros a una determinada velocidad de agitación, con el objeto de favorecer la interacción electrostática entre ellos y permitir la formación de partículas de tamaños micrométricos. La metodología que resultó más adecuada en cuanto a la generación de MP de formas y tamaños regulares, fue la técnica de sonicación. Esto puede explicarse debido a un valor de energía que transmiten las ondas ultrasónicas a la solución las cuales favorecen la interacción entre las moléculas de carga opuesta, permitiendo una mayor formación de MP y la dispersión uniforme de éstas.

Análisis de la morfología y tamaño de las micropartículas

Las MP fueron preparadas mediante la técnica de coacervación compleja utilizando la sonicación como método de agitación. A su vez se emplearon diferentes relaciones estequiométricas 1:1, 1:3 y 3:1 de los polímeros Q y C, respectivamente. La morfología y tamaño de las diferentes MP atomizadas y en suspensión se analizaron mediante microscopía electrónica como se ilustra en la figura 2.

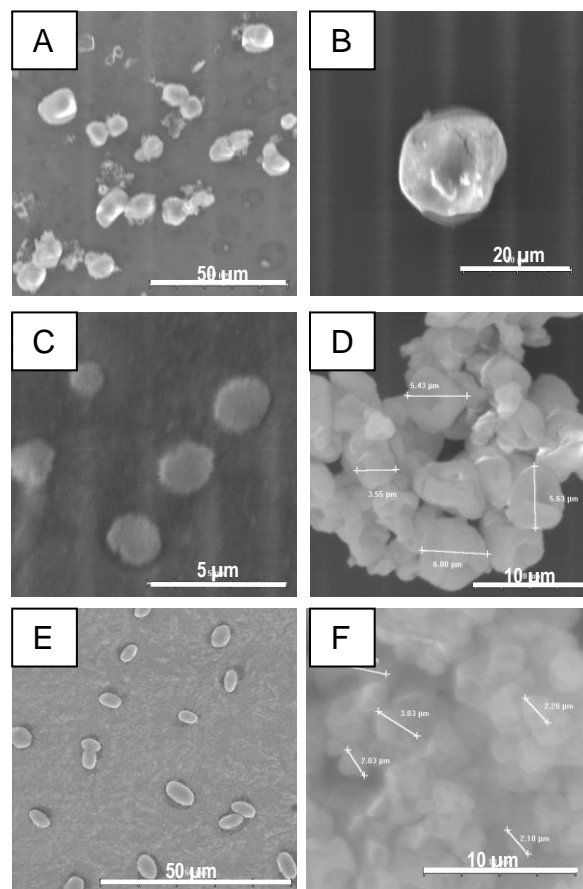


Fig. 2. SEM de micropartículas de quitosano-carragenina. A) MPQC 1:1 en solución; B) MPQC 1:1 atomizadas; C) MPQC 1:3 en solución; D) MPQC 1:3 atomizadas; E) MPQC 3:1 en solución; F) MPQC 3:1 atomizadas.

Las MP de Q y C observadas en la figura 2 A, B para las preparaciones tanto en solución como atomizadas, presentaron una forma irregular con una superficie lisa y bordes no definidos y sus tamaños fluctuaron entre 8 a 15 µm. Además, fue posible observar material polimérico disperso sin formar partículas. Las MP de Q y C obtenidas con una relación 1:3 en solución (Figura 2C) presentaron una forma esférica, bordes no definidos y tamaños

fluctuantes entre 1 a 3 μm . En la figura 2D las MP de Q y C presentaron forma esférica, algunas con el centro colapsado con bordes definidos y tamaños entre 2 a 6 μm . Por otro lado, las MP de Q y C obtenidas con la relación de 3:1 en suspensión (Figura 2E) presentaron forma elíptica, bordes definidos y superficie lisa con tamaños entre 4 a 7 μm . Cuando esta solución fue sometida a secado por atomización se obtuvo MP con forma esférica, bordes definidos, superficie lisa y los tamaños fluctuaron entre 2 a 5 μm .

Si bien en todas las formulaciones hubo formación de MP, no todas presentaron formas y tamaños similares. Las MP obtenidas con un mayor contenido de Q respecto al polímero de C (Figuras 2E y 2F) obtenidas tanto en solución como después del secado por atomización mostraron características favorables respecto a sus morfologías y tamaños. Se cree que esto es debido a que el número de grupos sulfatos presente en las *C kappa* y *lambda* es elevado y permitiría una mayor eficiencia de interacción con los grupos amino ($-\text{NH}_3^+$) disponibles en el Q. Por lo tanto, resultaría más apropiado incorporar mayores proporciones de Q respecto de C en la mezcla de ambos biopolímeros, ya que esto favorecería una adecuada interacción entre ambos, logrando una mayor formación de MPQC con formas regulares, bordes

definidos, superficies lisas y tamaños pequeños(14).

En la figura 3 (A, B) se muestran MP formadas sólo por Q y sólo por C.

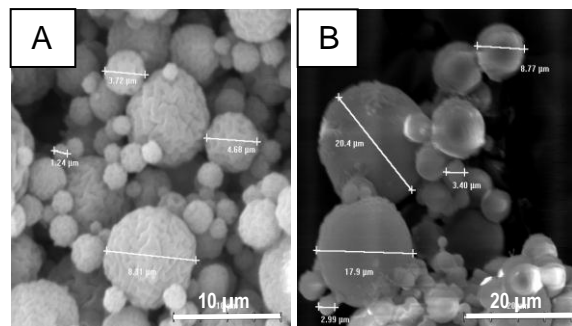


Fig. 3. SEM de micropartículas de quitosano y carragenina. A: MPQ atomizadas; B: MPC atomizadas.

En la figura 3A se observan las MP de Q atomizadas, las cuales presentaron una forma esférica con una superficie rugosa y bordes definidos, sus tamaños fluctuaron entre 1 a 10 μm . La figura. 3B se muestra las MP de C las que presentaron forma esférica y bordes definidos, con tamaños que fluctuaron entre 2 a 20 μm . Las MPC presentaron tamaños en general mayores a las MPQ y con superficies más lisa.

Análisis del tamaño y potencial zeta de las micropartículas

El tamaño y potencial zeta de las MP atomizadas de Q y C como también de sus respectivas relaciones se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Tamaño y potencial zeta de MPQ, MPC y MPQC atomizadas.

Formulación	Tamaño (nm)	Potencial Zeta (mV)
MPQ	2829,1 ±125,6	47,9 ±2,7
MPC	1495,9 ±597,2	-52,9 ±2,3
MPQC 1:1	10403,9 ±1078,6	27,9 ±1,6
MPQC 1:3	5513,0 ±200,9	-41,8 ±0,7
MPQC 3:1	13302,6 ±1480,2	49,9 ±3,1

La tabla 1 mostró que las MPQC obtenidas desde soluciones de mezclas de Q-C son más grandes que las MP compuestas por los polímeros individuales. Esto se explica debido a la interacción que existe entre ambos compuestos poliméricos, formando redes tridimensionales de mayor tamaño que los compuestos por separado (16). Así, las MPQC con una mayor relación de Q (MPQC 3:1) presentaron el mayor tamaño con un diámetro promedio de ~13,302 μm ; luego las MPQC con una relación de 1:1 un diámetro promedio de ~10,403 μm , y las MPQC con un mayor contenido de C (MPQC 1:3) presentaron valores de diámetro promedio de ~5,513 μm . Los tamaños de las MP preparadas usando los polímeros individuales presentaron valores muy por debajo de sus mezclas, siendo las MPC las más pequeñas ~1,495 μm seguida de las MPQ con valores de ~2,829 μm .

Las mediciones obtenidas por Z potencia variaron con el análisis morfológico

realizado por SEM según las partículas analizadas, ya que el campo visual observado en las muestras de MP no necesariamente representa el tamaño promedio de todas las MP.

Si bien podría esperarse que MP con mayor proporción de C presentaran mayores tamaños debido a su mayor peso molecular (200 Kda) respecto de Q (70 Kda) (14), esto no resultó de esta manera, lo que podría explicarse porque la carga neta que presenta el complejo es altamente positiva, provocando repulsión entre las cadenas poliméricas, llevando a que el tamaño macromolecular del polímero sea mayor. Otro factor a considerar es la polidispersidad de los pesos moleculares que presentan los polímeros, los valores fueron elevados para todas las formulaciones presentando valores entre 0,2 a 0,4. La polidispersidad representa la variación estadística promedio en peso de los largos de cadenas en un polímero, variando de acuerdo al medio en que se encuentren y a la presencia de otros compuestos.

Por otro lado, la tabla 1 muestra los valores de la carga superficial catiónica (+47,9) y aniónica (-52,9) de las MP obtenidas con Q y C, respectivamente. Así, la carga superficial de las MPQC que contienen mayor proporción (3:1) de Q presentaron un valor positivo +49,9 levemente superior con

respecto del valor de las MPQ debido a la presencia de grupos amino en las cadenas de Q. Por su parte las MPQC obtenidas desde una relación volumétrica 1:1 también presentaron una carga neta positiva en promedio de +27,88. Cuando el contenido de C es mucho mayor que Q el valor de potencial zeta de las MPQC fue de -41,8 debido a la presencia de grupos sulfatos. Este valor negativo de las MPQC menor que las MPC se debe a que son formadas exclusivamente por cargas negativas en ausencia de grupos aminos del Q. Este mismo mecanismo es aplicable al valor positivo de potencial de las MPQ respecto de las MPQC.

Determinación de los parámetros cuantitativos *in-vitro*.

Para determinar el contenido de proteínas en las MPQC mediante espectrofotometría se incubaron y centrifugaron como se describió anteriormente. Los parámetros de eficiencia de encapsulación (EE), capacidad de carga (CC) y rendimiento de producción (R) se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de eficiencia de encapsulación (EE), capacidad de carga (CC) y rendimiento de producción (R) de micropartículas de quitosano y carragenina y de quitosano-carragenina.

Formulación	EE (%)	CC (%)	R (%)
MPQ-BSA	16,6	2,5	66,9
MPQ-GnRX G/Q	72,2	10,8	87,6
MPC-BSA	45,5	8,3	31,0
MPC-GnRX G/Q	83,3	12,5	31,8
MPQC 1:1-BSA	55,4	15,6	56,2
MPQC 1:1-GnRX G/Q	22,4	4,0	41,3
MPQC 1:3-BSA	48,7	15,8	26,1
MPQC 1:3-GnRX G/Q	73,0	90,0	23,6
MPQC 3:1-BSA	49,5	12,3	42,1
MPQC 3:1-GnRX G/Q	90,0	53,0	34,4

La EE difiere según el tipo de MP y de la proteína utilizada. Los valores obtenidos variaron entre un 16,6% a un 90% como se observan en la figura 4. En general MP cargadas con BSA presentaron menor EE que MP cargadas con GnRX G/Q. Esto se explica debido al menor peso molecular que presenta la proteína GnRX G/Q respecto a la BSA, así un mayor número de moléculas de GnRXG/Q se encuentran disponibles para interactuar con los polímeros que conforman las partículas.

Al mismo tiempo, las MP cargadas con BSA formadas por polímeros únicos presentaron

una menor EE que MP formadas por la mezcla de polímeros. Esto se puede explicar porque la asociación entre estos polímeros genera una interacción electrostática dando lugar a la formación de complejos poliónicos, los que poseen ventajas en la encapsulación del agente, por sobre las MP individuales (4). Las MPQC en relación 1:1 capturaron la mayor cantidad de BSA con una EE de 55,4% seguidas por MPQC 3:1 con un 49,5%. Esto puede atribuirse a la interacción electrostática que se establece entre la BSA que posee carga superficial negativa y estas MP que poseen carga neta positiva (10). Razón por la cual, MPQC 1:3 con carga neta negativa igual que la BSA presentaron una EE de 48,7% y similares al porcentaje de las MPC de 45,5%, esto explicado por una disminuida capacidad de interacción entre ambos debido a la repulsión que generan moléculas de cargas similares. Finalmente MPQ presentaron el menor porcentaje de EE de 16,6% para la proteína de BSA, esto puede deberse a la carga positiva de Q al pH de solución de BSA de 4.5, el cual tiene un punto isoeléctrico pI de 4,7.

Todo lo descrito no ocurre con MP cargadas con la proteína GnRXG/Q, contradiciendo lo que plantean autores por ejemplo Briones y Sato (2010) quienes observaron un incremento en la EE de la glucosa oxidasa en todas las partículas compuestas por

diferentes mezclas de polímeros de C y Q en comparación con MP compuestas por estos polímeros individuales (16).

Por otro lado, las MPQC en relación 3:1 presentó la mayor EE de 90% respecto del 72% de las MPQ para la proteína GnRX G/Q a pesar de la carga neta positiva de ambas MP. Sin embargo, la presencia de cadenas negativas de la carragenina en el complejo poliónico favorece la interacción con esta proteína. Esta interacción inicial se ve favorecida en la proteína BSA debido al menor peso molecular de GnRX G/Q respecto de BSA. Sin embargo, se cree que existe un compromiso al mismo tiempo con la presencia de cadenas negativas de la C, la cual podría desestabilizar el complejo poliónico explicando la menor EE de las MPQ respecto de las MPQC desde 72% a un 22% sólo en la relación 1:1. Así, cuando la presencia de cadenas de carga negativa no es suficiente como en la relación de 1:1 las MPQC presentaron un valor de EE de 22,4%, siendo incluso menor que la EE de ambas MP obtenidas por ambos polímeros individuales para GnRX G/Q. Los valores de EE de la proteína GnRX G/Q con las MPC y MPQC 1:3 fueron de 83,3% y 73%, respectivamente. Luego, la presencia de cadenas con carga neta negativas de -52,86 en las MPC y de -41,79 en las MPQC obtenidas desde mezclas de polímeros favoreció la interacción con la GnRX G/Q de carga neta positiva.

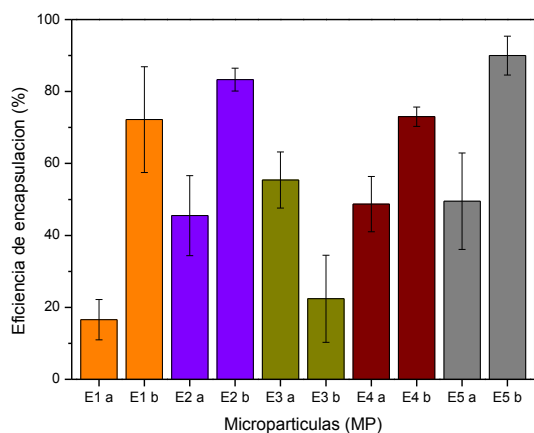


Fig. 4. Eficiencia de encapsulación de las micropartículas de quitosano (MPQ) y carragenina (MPC) y de MP de quitosano-carragenina (MPQC) con BSA y GnRX G/Q. E1a: MPQ-BSA, E1b: MPQ-GnRX G/Q, E2a: MPC-BSA, E2b: MPC-GnRX G/Q, E3a: MPQC1:1-BSA, E3b: MPQC1:1-GnRX G/Q, E4a: MPQC1:3-BSA, E4b: MPQC1:3-GnRX G/Q, E5a: MPQC3:1-BSA, E5b: MPQC3:1-GnRX G/Q.

Con respecto a la capacidad de carga (CC) o cantidad de agente encapsulado en las diferentes MP, de ambas proteínas mostradas en la tabla 2, se observaron valores que fluctuaron entre los 2-15 % para BSA y de 4-90% para GnRX G/Q. La figura 5 muestra los valores de CC de MPQ, MPC y de MPQC con las proteínas BSA y GnRX G/Q. En general las MP cargadas con BSA presentaron menores porcentajes de CC que las cargadas con GnRXG/Q, pudiendo ser explicado por el menor peso molecular de GnRXG/Q respecto a BSA. Además, independiente de la carga neta de las MP, las cargadas con BSA a base de complejos poliiónicos presentaron una mayor CC que las formadas por polímeros individuales, debido a las ventajas que poseen respecto

a estos últimos (4). Por su parte las MP cargadas con GnRXG/Q en relación 1:3 y 3:1 presentaron los valores de CC más elevados, seguidas de MPQ, MPQC 1:1 y MPC.

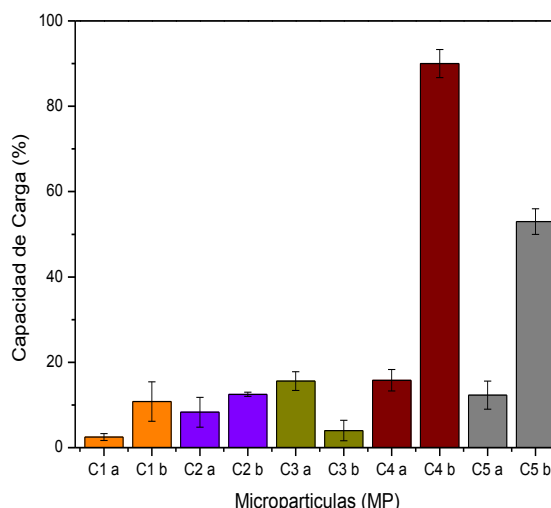


Fig. 5. Capacidad de carga de micropartículas de las quitosano (MPQ) y carragenina (MPC) y de MP de quitosano-carragenina (MPQC) con BSA y GnRX G/Q. C1a: MPQ-BSA, C1b: MPQ-GnRX G/Q, C2a: MPC-BSA, C2b: MPC-GnRX G/Q, C3a: MPQC1:1-BSA, C3b: MPQC1:1-GnRX G/Q, C4a: MPQC1:3-BSA, C4b: MPQC1:3-GnRX G/Q, C5a: MPQC3:1-BSA, C5b: MPQC3:1-GnRX G/Q.

El rendimiento (R) de producción de las MP refleja el porcentaje de MP obtenidas respecto a la cantidad total de material empleado (principio activo + polímero).

Como se observa en la figura 6, los pares de MP compuestas por las mismas concentraciones de polímeros y diferentes proteínas presentaron diferentes valores de R, a pesar de que se utilizó la misma

cantidad total de polímeros e iguales procedimientos. Esto puede explicarse debido a la variabilidad presente en la preparación de las MP de cada compuesto, como la ejecución de la atomización, el polvo resultado luego de la atomización, las condiciones de los instrumentos, etc. En general las MP de Q presentaron el mayor valor de R con valores para MPQ-BSA de 66,9% y para MPQ-GnRX G/Q de un 87,6%, respectivamente. Estos valores de R podrían explicarse debido la concentración en la que se usó el Q (1%), mayor respecto del polímero de C (0,83%).

Por otro lado, las MPQC en relación 1:1 y 3:1, las cuales presentan una mayor proporción de Q en su composición mostraron valores más altos en comparación con MPC y MPQC 1:3, que presentaron los valores más bajos de R.

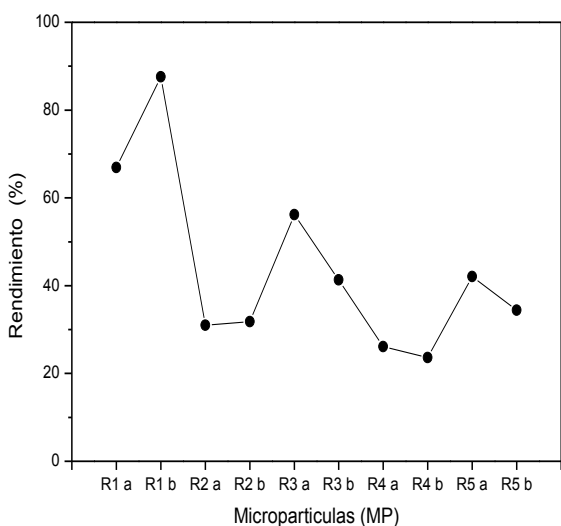


Fig. 6. Porcentajes de rendimiento (R) en la producción de las micropartículas de quitosano (MPQ)

y carragenina (MPC) y de las MP de quitosano-carragenina (MPQC) con BSA y GnRX G/Q. R1a: MPQ-BSA, R1b: MPQ-GnRX G/Q, R2a: MPC-BSA, R2b: MPC-GnRX G/Q, R3a: MPQC1:1-BSA, R3b: MPQC1:1-GnRX G/Q, R4a: MPQC1:3-BSA, R4b: MPQC1:3-GnRX G/Q, R5a: MPQC3:1-BSA, R5b: MPQC3:1-GnRX G/Q.

Estudio de liberación *in-vitro*

Los resultados obtenidos en el estudio de liberación *in vitro* de las proteínas BSA y GnRX G/Q se muestran en las figuras 7 y 8, respectivamente. Como se observa en ambas figuras, al tiempo cero existe una pequeña cantidad de proteína adherida a la superficie de las MP, explicándose por la interacción electrostática entre estos compuestos, la cual es debilitada en el tiempo pudiendo ser incluso removida de la superficie de las MP en un medio iónico(14).

Si bien las curvas de liberación son independientes ya que todas las MP presentaron diferentes valores de CC, con distintas cantidades de proteína incorporada en su matriz, en general la cinética de liberación de proteínas desde las diferentes MP presentaron un comportamiento similar, un primer pico de liberación del agente encapsulado ocurre al séptimo día del estudio y un segundo pico, de menor amplitud, tiene lugar al día catorce.

Las MP con potencial zeta positivo que fueron cargadas con la proteína BSA

presentaron las curvas de liberación más altas tanto en el primer como en el segundo pico. Esto puede ser explicado porque estas MP presentan mayor proporción de Q, el cual al encontrarse en un medio alcalino (7,4) pierde la carga de sus grupos aminos, a diferencia de los grupos sulfatos de la C que continúan ionizados manteniendo en general la carga negativa. Este proceso debilita la unión electrostática entre las MP y la proteína, facilitando la difusión proteica desde la matriz de las MP al medio. Así, las MP con potencial zeta negativo liberaron menores cantidades de BSA al sistema (16)

Por otro lado las MP cargadas con GnRX G/Q compuestas sólo por Q y C presentaron las curvas con mayor amplitud en ambos picos. Esto se puede atribuir a la conformación simple de las MP, compuestas por una sola capa. Esto facilita la difusión de la proteína al medio y favorece la degradación de la matriz de las MP (10, 17). Además se observó que desde el día 14 del estudio hasta el día 20, se presentó una disminución en la liberación de la proteína desde estas MP, siendo superadas por las MPQC en relación 1:3, 1:1 y finalmente por MPQC 3:1 para MP compuestas por Q, y por MPQC 1:3 y 1:1 para MP compuestas por C. Lo anterior se puede atribuir a que las MP compuestas por complejos poliiónicos retardan la liberación del principio activo debido a las

interacciones entre ambos componentes de las MP (16).

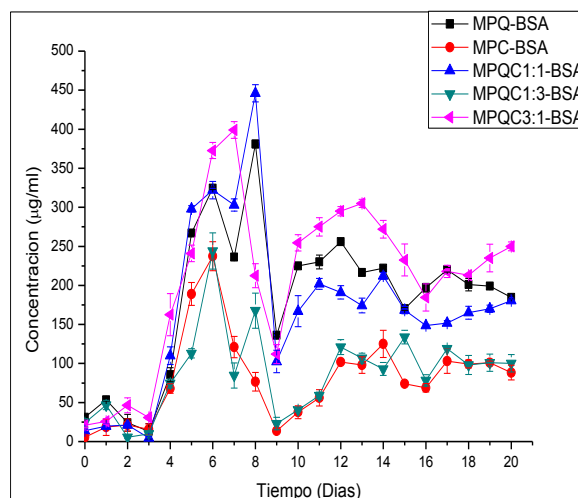


Fig. 7. Cinética de liberación de BSA desde las micropartículas de quitosano (MPQ) y carragenina (MPC) y de MP de quitosano-carragenina (MPQC), en PBS a pH 7,4 a 37°C.

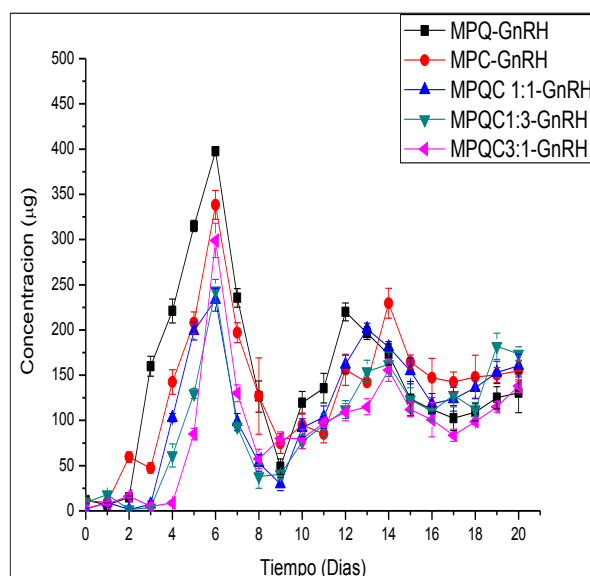


Fig. 8. Cinética de liberación de GnRX G/Q desde las micropartículas de quitosano (MPQ) y carragenina (MPC) y de MP de quitosano-carragenina (MPQC), en PBS a pH 7,4 a 37°C

CONCLUSIÓN

En este estudio se logró formular diferentes tipos de MP compuestas por Q y C mediante la técnica de coacervación compleja y secado por atomización.

Los valores obtenidos en cuanto a tamaño, características morfológicas y potencial zeta variaron de acuerdo al tipo de MP y sus componentes.

Las proteínas BSA y GnRX G/Q utilizadas en este estudio se encapsularon de manera eficiente a las MP, dependiendo de la carga neta, composición y relaciones de los componentes de las MP. En general las MP compuestas por complejos poliiónicos presentaron valores elevados, confirmando lo esperado en este estudio.

El ensayo de liberación *in vitro* demostró que las MP presentaron una liberación sostenida para ambas proteínas durante los 20 días del estudio, mostrando dos picos de liberación a la primera y segunda semana, siendo el primer pico de mayor amplitud.

En general el desarrollo de MP de Q y C es adecuado para ser utilizado en la liberación controlada y sostenida de ambas proteínas. Si bien no se observó un patrón continuo en los resultados para poder seleccionar que tipo de MP es la más adecuada para estos fines, se puede

afirmar que en la mayor parte del estudio los resultados demostraron que las MP compuestas por mezclas de polímeros superaron a las MP compuestas por polímeros simples.

Estos resultados demuestran que las MPQC son una nueva opción de adyuvante de la vacuna peptídica contra la hormona liberadora de gonadotrofinas. Finalmente, creemos que este protocolo debería además considerar las variables de pH, temperatura, fuerza iónica, para una mejor comprensión de la mayor interacción de las MPQC con alguna proteína en particular.

AGRACEDIMIENTOS

Agradezco a todos los integrantes de los laboratorios CIMAT y BIOVETEC, por su colaboración y disposición, son un excelente grupo humano y profesional.

Quiero agradecer en especial a mi profesor guía Andrónico Neira-Carrillo no sólo por su apoyo y paciencia sino también porque creo que muy pocas personas logran desempeñarse bien en el área académica sin dejar de lado el aspecto humano, gracias por su ejemplo, persistencia, consejos y confianza.

Agradezco también a mis amigos, quienes me dieron la fuerza en los momentos de flaqueza y el impulso para continuar.

Finalmente quiero agradecer a mi familia, quienes conforman mi pilar, al recuerdo de mi padre, a mis hermanas y en especial a mi madre, gracias por su apoyo y amor incondicional, por creer en mí, aconsejarme e impulsarme en esta etapa de mi vida.

REFERENCIAS

1. **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.
2. **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. *Int. J. Pharm.* 369: 64-71.
3. **ZAHAROFF, D., ROGERS, C., HANCE, K., SCHLOM, J., GREINER, J.** 2007. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine* 25 (11) 2085-2094.
4. **PIYAKULAWAT, P., PRAPHAIRAKSIT, N., CHANTARASIRI, N., MUANGSIN, N.** 2007. Preparation and Evaluation of Chitosan/Carrageenan Beads for Controlled Release of Sodium Diclofenac. *AAPS PharmSciTech* 8 (4):120-130.
5. **ZHANG, Y., TSAI, Y., MONIE, A., HUNG, C.** 2010. Carrageenan as an adjuvant to enhance peptide-based vaccine potency. *Vaccine* 28 (2010): 5212-5219.
6. **SANKALIA, M., SANKALIA, J.M., SUTARIYA, V., MASHRU, R.** 2007. Pepsina capturada en gránulos gelificados de κ -carragenato reticulados mediante actividad ionotrópica para una mejora de la estabilidad: Optimización y caracterización fisicoquímica mediante el diseño de Box-Behnken. *Ars. Pharmaceutica* 48 (3): 213-247.
7. **RAGLAND, W., ELFAKI, M.** 1991. Patente estadounidense número 5004607. University of Georgia research.
8. **HAMMAN, J.** 2010. Chitosan Based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar. Drugs* 8(4): 1305-1322.

9. **FRANCO, D., GIRALDO, M., PATIÑO, P.** 2004. Papel de los adyuvantes en la modulación de la respuesta inmune. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 17(3): 280-289.
10. **LI, X.L., KONG, X.Y., SHI, S., ZHENG, X.L., GANG, G., WEI, Y.Q., QIAN, Z.Y.** 2008. Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. *BMC Biotechnol.* 8 (1): 89-99.
11. **ZHENG, X., HUANG, Y., ZHENG, C., DONG, S., LIANG, W.** 2010. Alginate-Chitosan-PLGA composite microspheres enabling single-shot hepatitis B vaccination. *AAPS J.* 12(4): 519-524.
12. **BENCHABANE, S., SUBIRADE, M., W. VANDENBERG, G.** 2007. Production of BSA-loaded alginate microcapsules: Influence of spray dryer parameters on the microcapsule characteristics and BSA release. *J. Microencapsul.* 24(7): 647-658.
13. **NIU, X., FENG, Q., WANG, M., GUO, X., ZHENG, Q.** 2008. Preparation and characterization of chitosan microspheres for controlled release of synthetic oligopeptide derived from BMP-2. *J. Microencapsul.* 26: 297-305.
14. **GRENHA, A., GOMES, M., RODRIGUES, M., SANTO, V., MANO, J., NEVES, N., REIS, R.** 2009. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications [En línea] (www.interscience.wiley.com).
15. **MARTIN-VILLENA, M.J., MORALES-HERNANDEZ, M.E., GALLARDO-LARA, V., RUIZ-MARTINEZ, M.A.** 2009. Técnicas de Microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars. Pharmaceutica* 50(1): 43-50.
16. **BRIONES, A., SATO, T.** 2010. Encapsulation of glucose oxidase (GOD) in polyelectrolyte complexes of chitosan–carrageenan. *React. Funct. Polym.* 70: 19-27.