



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



“PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO  
PARA MICROENCAPSULACIÓN DE BIOMOLÉCULAS”

**PAULA JAVIERA AGUIRRE ZAZZALI**

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

PROFESOR GUÍA: ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO

SANTIAGO, CHILE  
2011



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



**“PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO  
 PARA MICROENCAPSULACIÓN DE BIOMOLÉCULAS”**

**PAULA JAVIERA AGUIRRE ZAZZALI**

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

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ANDRÓNICO NEIRA CARRILLO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ LUIS ARIAS	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
 2011

## “PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO PARA MICROENCAPSULACIÓN DE BIOMOLÉCULAS”

## “PREPARATION OF CHITOSAN MICROPARTICLES FOR MICROENCAPSULATION OF BIOMOLECULES”

**Paula Javiera Aguirre Zazzali**

Laboratorio de Materiales Bio-relacionados (CIMAT), Departamento de Ciencias Biológicas y Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Financiamiento Fondecyt N° 1080185

---

### Resumen

Micropartículas desarrolladas a partir de materiales poliméricos han sido ampliamente investigados en los últimos años por diferentes protocolos de fabricación como transportadores de agentes terapéuticos (biomoléculas). En este estudio micropartículas de quitosano se prepararon usando una modificación del método de coacervación de van der Lubben, quien utiliza sulfato de sodio como agente entrecruzante. Albúmina sérica bovina (BSA) se usó como proteína modelo, siendo encapsulada por el método de incubación en las micropartículas de quitosano. Las micropartículas fueron caracterizadas por su tamaño y morfología, y se determinaron los parámetros de eficiencia de encapsulación (EE), capacidad de carga (CC) y se estudió la cinética de liberación *in vitro* de BSA usando una solución tampón fosfato (PBS) 5 mM de pH 7,4 a 37 °C. Se obtuvieron micropartículas esféricas con una superficie lisa y tamaños que fluctuaron entre los 5 y 14 µm, tanto para las micropartículas vacías como las cargadas con BSA, el cual fue independiente de la concentración de BSA. Nuestros resultados mostraron que una mayor concentración de proteínas presentó mayores valores de EE y de CC. Los patrones de liberación de la proteína desde las micropartículas cargadas con BSA a diferentes concentraciones mostraron mayores valores de liberación de ésta a mayores concentraciones de BSA. En conclusión, este nuevo protocolo resultó ser adecuado en la formación de micropartículas de quitosano con valores de parámetros de liberación *in vitro* adecuados de biomoléculas.

### Palabras claves

Micropartículas, quitosano, microencapsulación, albúmina sérica bovina (BSA), eficiencia de encapsulación (EE), capacidad de carga (CC), cinética de liberación.

---

### Abstract

Microparticles developed from polymeric materials have been widely investigated in recent years by different preparation protocols as carriers of therapeutic agents (biomolecules). In this study, chitosan microparticles were prepared by using a modified coacervation method of van der Lubben, who utilizes sulphate sodium as a crosslinking agent. Bovine serum albumin (BSA) was used as a model protein, being encapsulated by the method of incubation in the chitosan microparticles. The microparticles were characterized by their size and morphology, and determined the parameters of encapsulation efficiency (EE), load capacity (CC) and the release kinetics *in vitro* of BSA was studied by using a 5 mM solution of phosphate buffer saline (PBS) of pH 7.4 at 37°C. We obtained spherical microparticles with a smooth surface and sizes ranged from 5 to 14 µm for both, the empty microparticles and the loaded with BSA, this result was independent of the concentration of BSA used. Our results showed that a higher concentration of protein they presented higher EE and CC. The patterns release of protein from microparticles loaded with BSA at different concentrations showed higher values of release of it at higher concentrations of BSA encapsulated. In conclusion, this new protocol proved to be useful in the formation of microparticles of chitosan with parameter values appropriate *in vitro* release of biomolecules.

### Keywords

Microparticles, chitosan, microencapsulation, bovine serum albumin (BSA), encapsulation efficiency (EE), loading capacity (CC), release kinetics.

## INTRODUCCIÓN

El gran interés por los materiales poliméricos ha permitido un constante y vertiginoso crecimiento en la última década. Esto se debe a la versatilidad que ellos poseen y la gran diversidad de compuestos existentes como también por ofrecer una variedad de formas de fabricación tales como: fibras, tejidos, películas, esponjas o micropartículas las cuales poseen características bien determinadas (1,2).

Estos materiales son clasificados como naturales, artificiales y sintéticos, siendo los polímeros naturales, especialmente los polisacáridos, uno de los más ampliamente estudiados. Aunque se describen múltiples usos a estos polímeros en variados campos aplicativos como tecnológicos, industriales, farmacéuticos, etc., una de las aplicaciones más novedosas han sido sus aportes médicos. En esta área los polímeros presentan un amplio rango de aplicaciones: inhibe el desarrollo de células tumorales, mejora la cicatrización tanto de heridas como quemaduras y reduce los niveles de colesterol sanguíneos, entre otros (2,3,4). Adicionalmente, se les ha utilizado como sistemas de liberación controlada, destacando su función de encapsulante y transportadores de diversas biomoléculas como agentes terapéuticos.

Cualquiera sea la aplicación de los polímeros naturales, un importante desafío a sido incorporar moléculas biológicamente activas mediante microencapsulación como

agentes terapéuticos en el diseño de nuevos biomateriales con el objeto de mejorar sus propiedades y respuestas biológicas (5).

Si bien el proceso de encapsulación fue desarrollado hace varias décadas por la National Cash Register (NCR), en Ohio, EEUU para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante, y a pesar de existir numerosos métodos tanto químicos como físicos, su principio se basa en encapsular un agente usando micro o nano-partículas de una matriz polimérica (6). Así, la microencapsulación representa una técnica multi- e interdisciplinaria muy usada en diversos campos aplicativos. Estas partículas pueden ser desarrolladas a partir de polímeros naturales o sintéticos, siendo el quitosano uno de los polímeros naturales más empleado debido a sus propiedades de: biocompatibilidad, baja toxicidad, bioadhesividad y bioactividad (2,5), y la capacidad de inmovilización de compuestos por acción química y por atrapamiento físico (1).

El quitosano, es un polímero biodegradable lineal formado por unidades D-glucosamina desacetiladas y unidades N-acetil-D-glucosamina distribuidas al azar obtenido de la desacetilación alcalina de la quitina. La quitina es el segundo polisacárido en abundancia después de la celulosa, la cual se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza formando parte de conchas de crustáceos y del exoesqueleto de insectos,

de paredes celulares de muchos hongos, levaduras, algas y exoesqueleto de crustáceos (2,7).

Dado que el uso de biomateriales derivados de origen animal posee un riesgo de contaminación de proteínas, el proceso de remoción de proteínas mediante su purificación es frecuentemente requerido y crucial para asegurar que éste posea la más alta pureza e integridad. Por tal razón, el quitosano comercial utilizado fue purificado antes de su uso (8).

La presente Memoria de Título tiene como objetivo desarrollar una técnica adecuada para obtener micropartículas esféricas y regulares de quitosano y estudiar tanto la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga como también la cinética de liberación *in vitro* usando albúmina sérica bovina (BSA) como proteína modelo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales**

Se utilizó un quitosano comercial (Aldrich-Sigma) de peso molecular 70 kDa y grado de desacetilación > 75% y como detergente polisorbato 80 (Tween 80) (Aldrich-Sigma). Además, los siguientes reactivos pro-análisis fueron empleados ácido acético y sulfato de sodio (Merck), los cuales se utilizaron sin previa purificación. La proteína modelo albúmina sérica de bovino (BSA) se obtuvo desde Sigma.

### **Purificación del quitosano**

El quitosano fue purificado según lo reportado por nuestro laboratorio (9). Brevemente, este quitosano fue lavado con acetona varias veces y secado a 70 °C durante 24 horas bajo vacío. Luego, una solución de quitosano al 2% en ácido acético al 5% fue precipitado lentamente con solución de NaOH al 4% (p/v). Posteriormente, el quitosano precipitado fue lavado con soluciones de etanol de concentraciones crecientes desde 50-100 % y secado a 37 °C a presión reducida hasta peso constante.

### **Preparación de las micropartículas de quitosano**

La formación de micropartículas se basó en el método de coacervación (10). Para esto, se preparó una solución de quitosano al 1% (p/v) en ácido acético al 2% (v/v) y Tween 80 al 1% (p/v). Se agregó gota a gota 2 ml de la solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% (p/v) (en aprox.5 min.) a 50 ml de la solución de quitosano controlando su flujo mediante una bomba peristáltica (Mini-Pump Variable Flow) bajo agitación mecánica de 1000 rpm (RZR 2051 Control, Heidolph) y sonicación continua a 30 % de amplitud con un Tip adecuado para este volumen. (Branson Digital Sonifier, Merck). Una vez agregado todo el volumen de sulfato de sodio, se continuó agitando y sonicando la solución resultante por 20 min. Transcurrido este

tiempo, la solución final fue secada mediante aspersión en un equipo de secado por atomización (Mini spray dryer B-290, Büchi).

El secado por aspersión de la solución final para obtener las micropartículas de quitosano se realizó mediante un bombeo peristáltico con una boquilla de diámetro interior de 0,5 mm y usando los siguientes parámetros: velocidad de flujo volumétrico entre los 473-536  $l\ h^{-1}$  y un aspirador de 0,41-0,55 bares, temperatura de entrada del aire de secado de 180 °C.

### **Incorporación de albúmina sérica bovina (BSA) a las micropartículas de quitosano**

La incorporación de BSA a las micropartículas de quitosano se realizó mediante el proceso de incubación, dado que las micropartículas catiónicas de quitosano pueden fácilmente adsorber electrostáticamente proteínas aniónicas como el BSA. La incorporación de BSA se llevó a cabo incubando 1% (p/v) de micropartículas de quitosano con BSA en concentraciones entre 0,5 - 2,5% en PBS a pH 7,4 bajo agitación de 100 rpm por 180 min a temperatura de 37°C. Finalizado el proceso de incubación la suspensión fue centrifugada a 3000 xg durante 15 min para remover todo BSA no incubado. La cantidad de proteína incubada en las micropartículas de quitosano 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 (11), según el método Bradford en un espectrofotómetro Biowave Dna.

El cálculo de los parámetros de la capacidad de carga (CC) y la eficiencia de encapsulación (EE) fueron determinadas usando las siguientes relaciones (10):

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

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

### **Morfología y tamaño de las micropartículas**

La forma y tamaño de las micropartículas se determinó usando microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio Tesla BS 343A. La observación al SEM se realizó montando las micropartículas de quitosano en una cinta adhesiva doble faz sobre un soporte metálico usado como porta muestra. Se observaron micropartículas de quitosano obtenidas directamente desde el equipo de secado por atomización como también resuspendidas en etanol y montadas en un papel filtro cromatogénico de superficie lisa (Seraphore® III, Gelman Sciences Inc). Para esto las micropartículas fueron sonicadas por 15 min (Power Sonica 410, MundoLab) y secadas en una estufa a 40°C por 1 min. Finalmente, todas las

micropartículas de quitosano fueron sombreadas con oro (EMS - 550) y observadas al SEM a 15 Kv.

### **Estudios de liberación *in vitro* de BSA**

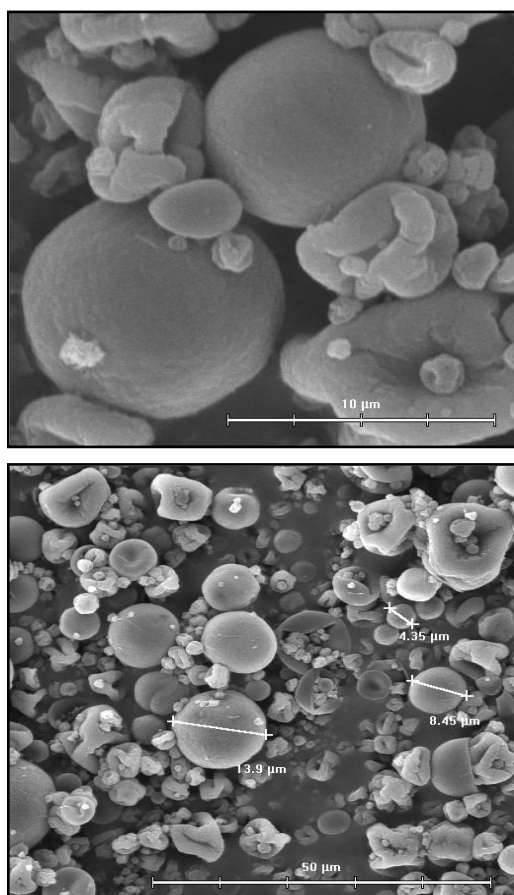
Una cantidad de 50 mg de micropartículas de quitosano fueron incubadas en 10 ml de una solución de PBS a pH 7,4 en un baño de agua termostático a 37°C con movimientos de 100 rpm hasta las 96 horas. A tiempos determinados las micropartículas de quitosano en suspensión fueron centrifugadas a 2000 xg por 10 min, recolectado el sobrenadante para la determinación de BSA. Luego, estas micropartículas fueron sumergidas en el baño termostático nuevamente hasta la próxima toma de muestra. La cantidad de BSA liberada desde las micropartículas de quitosano se determinó usando también el método Bradford. Para conocer la concentración de BSA aún encapsulado en las micropartículas de quitosano, éstas fueron disueltas en una solución de ácido acético al 0,5% y analizadas según el método descrito. La determinación de la proteína BSA tanto en los ensayos de incubación como de liberación *in vitro* se realizó usando una curva de calibración estándar de BSA en un rango de concentración conocida. La concentración promedio de BSA se expresó en mg/ml. Todos estos experimentos se realizaron en triplicado (5).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

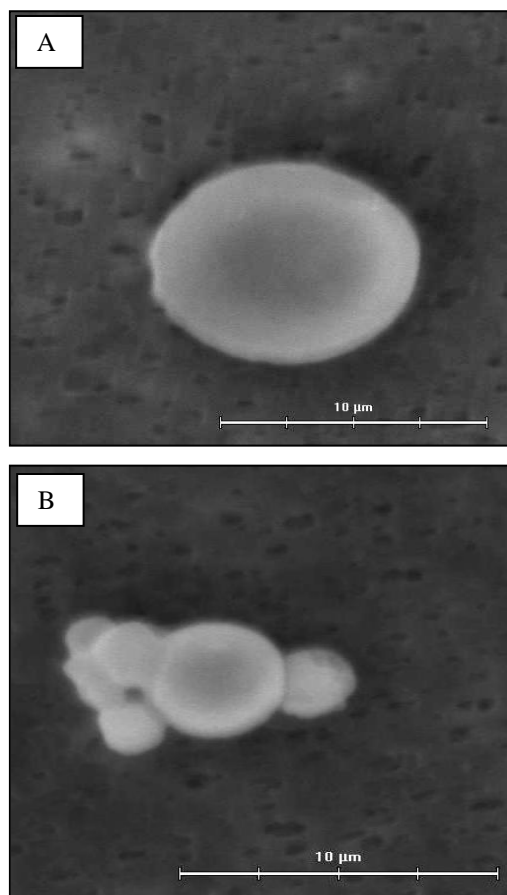
### **Morfología y tamaño de las micropartículas**

Las micropartículas de quitosano fueron preparadas mediante una modificación del método de conservación (10). La morfología de las micropartículas de quitosano son mostradas en la Figura 1. Las micropartículas presentan una forma esférica con una superficie lisa y sus tamaños fluctuaron entre los 5 y 14  $\mu\text{m}$ . Además, se observaron micropartículas de quitosano colapsadas, las cuales no presentan forma esférica pero con tamaños similares. Cuando el BSA fue encapsulado en las micropartículas de quitosano se obtuvieron tamaños similares a las micropartículas vacías, no afectando por tanto el proceso de incubación ni la distribución de sus tamaños ni la forma de las micropartículas. Es importante destacar que este resultado fue obtenido independiente de la concentración de BSA cargado (Figura 2). Incluso cuando las micropartículas de quitosano fueron sometidas a concentraciones de BSA del orden de 2,5 mg/ml conservaron éstas tanto su esfericidad como su superficie lisa. En la literatura se ha encontrado que la incorporación de BSA en las micropartículas no presenta un comportamiento único sobre los tamaños promedios de éstas. Así, Kim y colaboradores (12) reportaron que el tamaño de las micropartículas disminuye al

introducir la proteína, mientras que el tipo de proteína no afecta la morfología de las micropartículas. Estos resultados indican que la proteína, compuesta por diferentes tipos de aminoácidos, juega un rol como agente emulsificador. Kusunwiriawong y colaboradores (13) reportaron que al incorporar BSA en las micropartículas de quitosano se obtiene un mayor tamaño de partícula promedio, en comparación con las micropartículas de quitosano sin encapsular. Además, micropartículas de quitosano cargadas con BSA pierden esfericidad y presentan una superficie rugosa, siendo el efecto más pronunciado al aumentar la concentración de BSA.



**Fig. 1. SEM de micropartículas de quitosano sin incubar a distintas magnificaciones.**



**Fig.2. SEM de micropartículas de quitosano incubadas a distintas concentración de BSA. A) 1.5%, B) 0.5%.**

### **Determinación contenido de BSA**

Para determinar el contenido de proteínas en las micropartículas de quitosano, mediante el método de incubación, se usaron soluciones de BSA con concentraciones de 0,5% a 2,5%. Los parámetros de eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC) se muestran en la tabla N° 1.



**Tabla 1.**

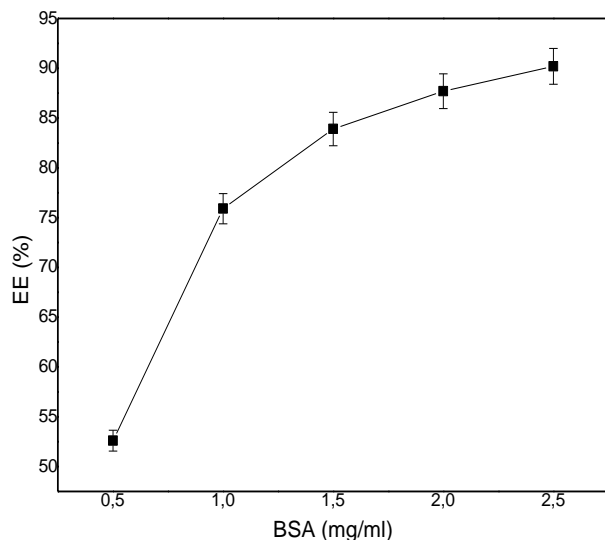
Valores de eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC) determinadas a diferentes concentraciones de BSA.

<b>BSA</b> (mg/ml)	<b>EE</b> %	<b>CC</b> %
0,5	52,5	26,2
1,0	75,9	75,9
1,5	83,9	125,7
2,0	87,7	175,5
2,5	90,2	225,6

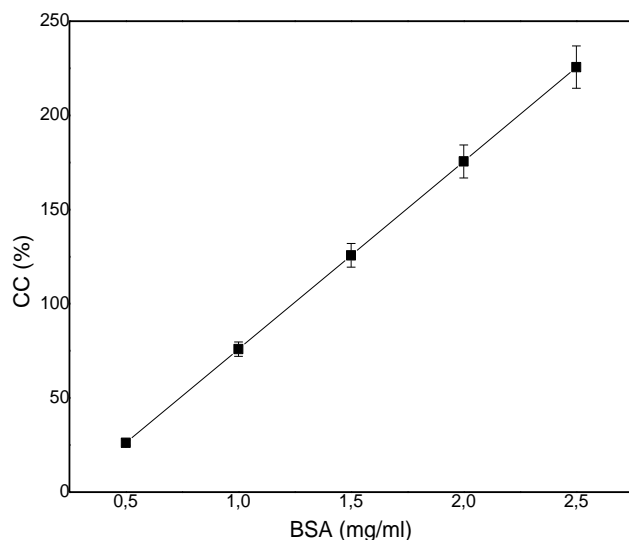
Los resultados obtenidos mostraron que cuando la concentración de BSA aumenta de 0,5 a 2,5 mg/ml durante la incubación, la eficiencia de encapsulación (EE) aumentó de 52,5% a 90,2% (Figura 3). Estudios previos sobre el efecto de la concentración de proteína sobre la EE son variados y muchas veces contradictorios. Nuestros resultados están en concordancia con lo reportado por Gan *et al* (8), el cual informó que la EE aumenta al aumentar la incorporación de la proteína BSA en micropartículas de quitosano usando el tripolifosfato de sodio (TPP) como agente entrecruzante. Por otro lado al aumentar la concentración de BSA la capacidad de carga (CC) también se incrementó de 26,2% a 225,6% (Figura 4), estos resultados indican que la proteína BSA no sólo se encuentra al interior de la micropartícula de quitosano sino también podría estar adherida a su superficie (11).

Creemos que dada la naturaleza catiónica de las micropartículas de quitosano preparadas en este trabajo, las cuales presentaron valores de superficie de carga de +17 mV, tienen la capacidad de interactuar molecularmente en una solución acuosa vía interacción electrostática y adsorber a la proteína BSA, la cual presenta un carácter aniónico de - 20 mV. Es conocido que la naturaleza aniónica del BSA se debe a la presencia de sus aminoácidos de carga negativa como el ácido aspártico y el ácido glutámico. Dado que la soluciones de BSA fueron mantenidas a pH de 7,3, mayor que el punto isoeléctrico del BSA (PI = 4,7), la proteína se encuentra cargada negativamente (14), permitiendo una interacción óptima entre ésta y los grupos aminos protonados ( $\text{NH}_3^+$ ) presente en el quitosano. El grado de adsorción del BSA en la superficie de las micropartículas depende no sólo de la concentración de proteína, su naturaleza química, el pH de la solución y de la matriz polimérica encapsulante empleada, sino también de la cantidad de proteína utilizada. Adicionalmente, se ha reportado que la adsorción de BSA aumenta con la disminución del peso molecular del quitosano (15). Creemos que el aumento de los parámetros de EE y CC obtenidos en nuestro protocolo modificado para la preparación de micropartículas de quitosano puede ser explicado por una menor cantidad de sulfato de sodio requerido en su formación lo que permitió que un mayor

número de grupos aminos protonados del quitosano se encuentren disponibles para la interacción electrostática entre BSA y quitosano (15).



**Fig. 3. Efecto de la concentración de BSA en la EE de las micropartículas de quitosano. Los datos fueron expresados como  $\pm$  Desviación Standard (DS <5% ; n=3)**



**Fig. 4. Efecto de la concentración de BSA en la CC de las micropartículas de quitosano. Los datos fueron expresados como  $\pm$  Desviación Standard (DS <5% ; n=3)**

## Estudios de liberación *in vitro* de la proteína BSA

Los resultados obtenidos de la liberación *in vitro* de BSA desde las micropartículas de quitosano fueron realizadas en una solución de PBS a pH 7,4 a temperatura de 37°C, como se muestran en la figura 5. La liberación de BSA a tiempo cero mostró que existe BSA adherida a la superficie de las micropartículas de quitosano, atribuido a la interacción electrostática entre las micropartículas y el BSA, la cual es debilitada en el tiempo pudiendo ser incluso removida de la superficie de las micropartículas en un medio iónico. La mayor concentración de BSA liberada para todas las concentraciones ensayadas se logró aproximadamente a las tres horas. El estudio de liberación *in vitro* de BSA desde las micropartículas de quitosano fue evaluado hasta las 96 horas. Otro aspecto que pudo ser observado fue que en general la concentración de BSA determinada en todas las concentraciones evaluadas fue disminuyendo levemente con el tiempo, esto puede ser atribuido a la difusión de la proteína dispersa en la matriz polimérica como también a la erosión que las micropartículas sufren en diferentes soluciones acuosas (16,17). Nuestros resultados mostraron que los patrones de liberación de BSA desde las micropartículas de quitosano cargadas con BSA entre 0,5 - 2,5% en PBS a pH 7,4 bajo agitación constante mostraron una mayor liberación a

mayores concentraciones de BSA encapsulado. Se sabe que la naturaleza catiónica del quitosano es dependiente del pH de la solución en la cual se encuentra, lo que lleva al quitosano a formar complejos iónicos con varias moléculas aniónicas en un medio ácido y disociar una parte de los complejos en una solución fisiológica (pH 7,4). Estas propiedades fisicoquímicas del quitosano resultan muy beneficiosas para retener o acumular biomoléculas y dado a la matriz polimérica biodegradable de éste es capaz de liberar en forma controlada moléculas biológicamente activas para alguna función en particular en el organismo. La liberación sostenida de proteínas desde estas micropartículas puede lograrse debido a que la proteína es atrapada dentro de la matriz polimérica del

quitosano vía, no sólo, formación de complejos iónicos entre el grupo amino del quitosano y la carga negativa de los aminoácidos de la proteína, sino también debido a las interacciones físicas que ocurren entre la proteína y la estructura molecular del quitosano (11).

Por otro lado, se ha reportado que los patrones de liberación están íntimamente relacionados con las concentraciones iniciales de BSA cargadas. Es conocido que mayores concentraciones de BSA causan en general un aumento del tamaño de las micropartículas, aumentando la superficie de éstas para la liberación inicial de proteínas, explicando la mayor concentración de BSA y el comportamiento cinético de liberación en las micropartículas de quitosano durante las primeras tres

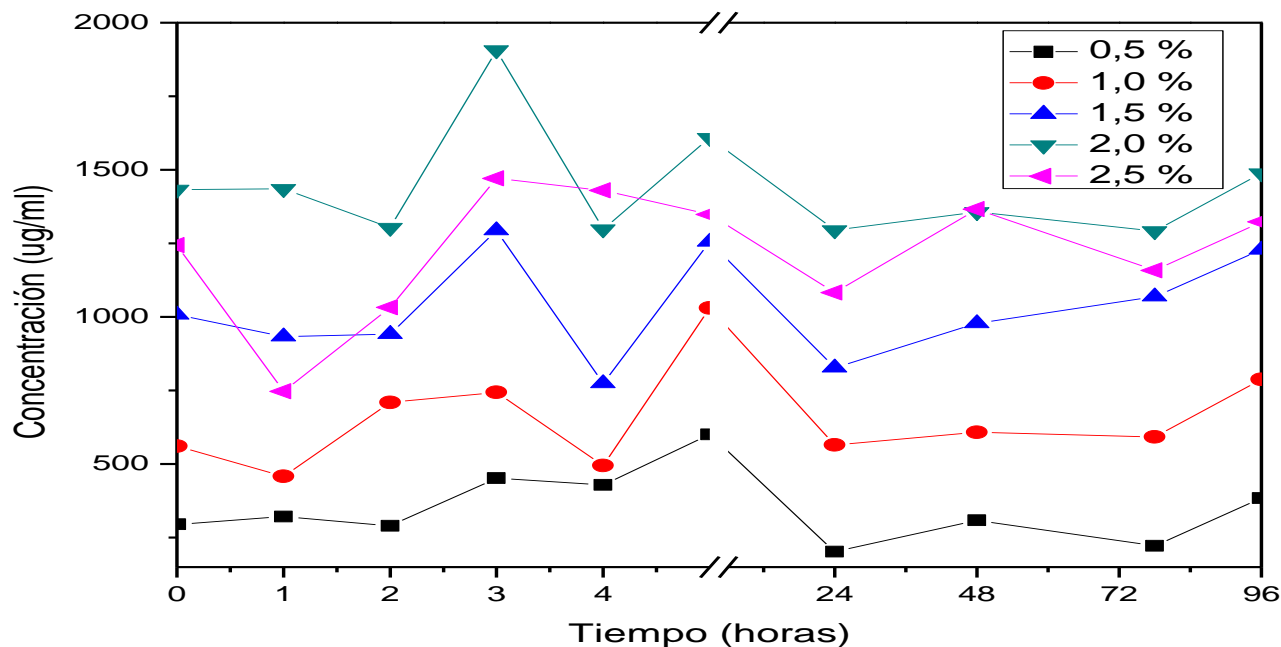


Fig 5. Cinética de liberación de las diferentes concentraciones de BSA desde las micropartículas de quitosano, en PBS a pH 7,4 a una temperatura de 37°C.

horas. Así también, a una mayor liberación de BSA desde las micropartículas de quitosano también ocurre a mayores concentraciones, esto puede ser explicado porque a mayor concentración de BSA se generan uniones más débiles de ésta con las moléculas de quitosano, debido a una menor formación de uniones de hidrógeno, en donde mayores concentraciones de BSA compiten por los grupos amino de la unidad N-acetil-D-glucosamina de la estructura del quitosano, produciéndose en las micropartículas un efecto de impedimento estérico entre las moléculas de BSA (7).

## **CONCLUSIÓN**

En este trabajo, micropartículas de quitosano fueron preparadas usando una modificación del método de coacervación de van der Lubben (10) y caracterizadas mediante microscopía SEM. Estas micropartículas fueron usadas para la microencapsulación de BSA y se estudió su liberación *in vitro* determinando los parámetros de eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC). Las micropartículas resultaron ser esféricas con una superficie lisa y tamaños que fluctuaron entre los 5 y 14  $\mu\text{m}$ , tanto para las micropartículas vacías como las cargadas con BSA, el cual fue independiente de la concentración de BSA. Las micropartículas presentaron excelentes valores de EE de la proteína BSA que fluctuaron desde los 52,5% hasta los 90,2%

y una liberación sostenida en el tiempo de ésta. Así, una mayor concentración de BSA presentó mayores valores de EE y de CC. Los patrones de liberación de esta proteína a diferentes concentraciones mostraron mayores valores de liberación a mayores concentraciones de BSA. En resumen nuestro nuevo protocolo de formación de micropartículas de quitosano resultó ser adecuado para un sistema de transporte de BSA con valores de EE y CC *in vitro* prometedores para ser utilizadas con otras biomoléculas en algún propósito en particular. Sin embargo, creemos que para lograr parámetros de EE y CC adecuados para una determinada biomolécula usando este protocolo se requiere una mejor comprensión de cómo esta biomolécula cambia su interacción a diferentes valores de pH, temperatura y fuerza iónica como también a altas concentraciones de formación de complejos iónicos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A cada uno de los integrantes del Laboratorio de Biología, quienes fueron una gran ayuda, gracias por su amistad y estímulo.

Deseo agradecer especialmente al Dr. Andrónico Neira-Carrillo, por su incondicional apoyo y su inagotable paciencia, por su disposición a entregarme su ayuda y por su confianza.

Quiero agradecer a mis amigas por ser un pilar fundamental en mi carrera, gracias por hacer de estos años los mejores.

A mis tíos por permitirme vivir con ellos, por su enorme paciencia y por confiar en mi.

A mi familia, especialmente mis padres a quienes jamás encontraré la forma de agradecer el cariño, comprensión y apoyo, y sabiendo que no existirá forma de agradecer sus esfuerzos y amor, quiero que sientan que los logros alcanzados también son de ustedes.

## REFERENCIAS

1. **ABARRATEGUI, A.** 2008. Estudio del quitosano como biomaterial Portador de rhBMP-2: Desarrollo, caracterización y Aplicabilidad en regeneración de tejido Óseo. Universidad complutense de Madrid. Facultad de Biológicas. Departamento de bioquímica y biología molecular.
2. **GOYCOOLEA F.M., REMUÑÁN C., ALONSO M.J.** 2009. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano En: Vila Jato, J.L. (Ed.) Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España. pp. 103-131.
3. **AHONKHAI E., ARHEWOH, I. M., OKHAMAFE, A. O.** Effect of solvent type and drying method on protein retention in chitosan-alginate microcapsules. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5 (2): 583-588
4. **MANCA, M.L.** 2009. Chitosan and PLGA microspheres as drug delivery system against pulmonary mycobacteria infections. University of Cagliari. Department Farmaco Chimico Tecnologico.
5. **NIU, X., FENG, Q., WANG, M., GUO, X., ZHENG, Q.** 2009. Preparation and characterization of chitosan microspheres for controlled release of synthetic oligopeptide derived from BMP-2. *Journal of Microencapsulation* 26: 297-305.
6. **YÁÑEZ, J., SALAZAR, J.A., CHAIRES, L., JIMÉNEZ, J., MÁRQUEZ, M., RAMOS E.G.** 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva* 21: 313-319.
7. **MUZZARELLI, R.** 1974. Chitin. 1ª Ed. Editorial Pergamon Press. Inglaterra. 309 p.
8. **GAN, Q., WANG, T.N.** 2007. Chitosan nanoparticles as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 59: 24-34.
9. **NEIRA-CARRILLO, A., YAZDANI-PEDRAM, M., RETUERT, J., DIAZ-DOSQUE, M., GALLOIS, S., ARIAS, J.L.** 2005. Selective crystallization of calcium salts by poly(acrylate)-grafted chitosan. *Journal of Colloid and Interface Science* 286: 134-141.
10. **VAN DER LUBBEN, I.M., VERHOEF, J.C., VAN AELST, A.C., BORCHARD,**

- G., JUNGINGER, H.E.** 2001. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary *in vivo* uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials* 22: 687-694.
11. **AMIDI, M., ROMEIJN, S.G., BORCHARD, G., JUNGINGER, H.E., HENNINK, W.E., JISKOOT, W.** 2006. Preparation and characterization of protein-loaded *N*-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release* 111: 107-116.
  12. **KIM, S. E., PARK, J. H., CHO, Y. W., CHUNG, H., JEONG, S. Y., LEE, E. B., KWON, I. C.** 2003. Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor- $\beta$ 1: Implications for cartilage tissue engineering. *Journal of Controlled Release* 91: 365-374.
  13. **KUSONWIRIYAWONG, C., PICHAYAKORN, W., LIPIPUN, V., RITTHIDEJ, G.** 2009. Retained integrity of protein encapsulated in spray-dried chitosan microparticles. *Journal of Microencapsulation* 26 (2):111-121.
  14. **COPPI, G., IANNUCELLI, V., LEO, E., BERNABEI, M. T., CAMERONI, R.** 2001. Chitosan-Alginate microparticles as protein carrier. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 27(5): 393-400.
  15. **BERTHOLD, A., CREMER, K., KREUTER, J.** 1996. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carriers for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *Journal of Controlled Release* 39:17-25.
  16. **ZHANG, H.L., WU, S.H., TAO, Y., ZANG, L.Q., SU, Z.Q.** 2010. Preparation and Characterization of Water-Soluble Chitosan Nanoparticles as Protein Delivery System. *Journal of Nanomaterials* vol 2010: 1-6.
  17. **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 Biotechnology* 8 (1):89-99

