Propiedad Intelectual de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTIN

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE MATERIALES

FACULTAD DE PROCESOS

"OBTENCION Y CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS DE QUITOSANO POR EL METODO DE GELACION IONICA"

TESIS PRESENTADA POR LA BACHILLER:

NATALY ELIZABETH CALDERON PEREA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO DE MATERIALES

AREQUIPA – PERÚ

2015

PROYECTO

"OBTENCION Y CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS DE QUITOSANO POR EL METODO DE GELACION IONICA"

DEDICATORIA:

Doy gracias a Dios, mi Padre celestial por su amor, cuidado y fidelidad desde siempre y para siempre. A mis padres Maritza y Fidel quienes son la mayor motivación en mi vida, y a mi hermano Fidel. A quienes amo demasiado y agradezco a Dios por sus vidas.

Gracias a Dios y a mi familia porque en todo tiempo han permanecido firmes para sostenerme, apoyarme incondicionalmente, y aconsejarme sabiamente..

Los amo.

Nataly Elizabeth Calderon Perea

"Canta, oh hija de Sion; da voces de júbilo, oh Israel; gózate y regocíjate de todo corazón, hija de Jerusalén.
Jehová ha apartado tus juicios, ha echado fuera tus enemigos; Jehová es Rey de Israel en medio de ti; nunca más veras el mal.
En aquel tiempo se dirá a Jerusalén: No temas; Sion, no se debiliten tus manos.
Jehová está en medio de ti, poderoso, El salvara; se gozara sobre ti con canticos."

Sofonías 3: 14-17

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi total agradecimiento a:

- *Mg. Cesar La Rosa, gracias tío por tu apoyo incondicional en el transcurso de la carrera, por tu tiempo dedicado a ayudarme en las materias, por tus consejos y guía espiritual. Enteramente agradecida.*
- *CONCYTEC, por el financiamiento brindado en la ejecución de este proyecto de tesis permitiendo que toda la parte experimental se desarrollara en el laboratorio del departamento UMET de la Universidad de Lille 1 en Francia.*
- *Dr. Alejandro Silva de la escuela profesional de Ingeniería de Materiales por su predisposición permanente e incondicional, apoyo, impulso y asesoramiento para culminar la tesis.*
- *Dr. Bernard Martel del departamento UMET de la Universidad de Lille 1-Francia, por permitirme realizar toda la parte experimental de este proyecto en las instalaciones de su laboratorio, por su asesoramiento, predisposición y apoyo incondicional para llevar a cabo este proyecto.*
- *Dres. Stephanie Degoutine, Nicolas Tavary, y a todo el equipo del laboratorio del departamento UMET, por su colaboración y apoyo durante mi estadía en el laboratorio.*
- *Mg. Jonathan Almirón y Dr. Hugo Canahua de la escuela profesional de Ingeniería de Materiales - UNSA por su apoyo y contribución en la realización de esta tesis.*
- *Dr. Corina Vera de la escuela profesional de Química- UNSA por su apoyo y contribución en la realización de esta tesis.*
- *Mg. Octavio Nino de la Pontificia Universidad Católica del Perú, quien facilito la obtención del Quitosano utilizado en este proyecto de tesis.*
- *Marco Huaracha por compartir conmigo tus conocimientos en cómo elaborar una tesis. Gracias.*
- *Amigos que me han acompañado en el transcurso de la carrera y realización de la tesis. Muchas gracias Solange, Maria, Nanto, Mariano, Eduardo, Renzo.*

RESUMEN

Recientemente hay un marcado incremento en el interés por los materiales poliméricos biodegradables para su uso en fármacos y tratamientos de aguas. El Quitosano es un polisacárido lineal biodegradable, antibacterial, biocompatible y con una gran capacidad de adsorción de iones metálicos con la propiedad de formar películas e hidrogeles resultando atractivo su empleo como adsorbente de metales pesados en tratamientos de aguas y como liberador de fármacos.

En la presente investigación se desea obtener y caracterizar nanopartículas de Quitosano preparadas mediante el método de gelación iónica que permita mejorar las propiedades del Quitosano. Como bien se conoce al lograr que una partícula sea más pequeña esta incrementa su área superficial permitiendo un cambio en sus propiedades.

De acuerdo a la metodología planteada, la investigación se iniciara con la preparación de las nanopartículas mediante una disolución del Quitosano en ácido acético seguido por la adición de TPP (Tripolifosfato de sodio) bajo agitación constante y posteriormente llevado a centrifugación.

Para la caracterización de las nanopartículas obtenidas se empleó un Microscopio electrónico de barrido SEM, light scattering y Espectroscopia infrarroja – Fourier FTIR.

Los resultados obtenidos de las nanopartículas fueron posteriormente analizados.

ABSTRACT

Recently there is a remarkable interest in biodegradable polymer materials for applications on pharmacy, biomedicine and waste water treatments. Chitosan is a lineal polysaccharide, biodegradable, antibacterial, biocompatible, and it has the capacity to adsorb metallic ions with the property to form films and hydrogel. Therefore Chitosan is very attractive to use as adsorbent of heavy metals in waste waters treatments and as a drug delivery release.

It is the purpose of this research to obtain and characterize Chitosan nanoparticles, these prepared by ionic gelation method which can improve the properties of Chitosan. It is known that when a particle is becoming small its superficial area increase generating changes in its properties.

According to the methodology mentioned before, Chitosan is dissolved in acetic acid followed by the addition of TPP (sodium tripolyphosphate) under stirring and finally centrifuged.

The characterizations of the nanoparticles were carried out on an Electron microscopy (SEM), Dynamic light scattering (DLS) and Fourier-infrared spectroscopy (FTIR)

Finally, the obtained results of nanoparticles were analyzed.

INDICE

CAPITULO I.- GENERALIDADES DEL PROYECTO

1.1. INTRODUCCIÓN 14

1.2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA 15

1.3. HIPOTESIS 15

1.4. JUSTIFICACIÓN 15

1.5. OBJETIVOS 15

1.5.1. Objetivo general 16

1.5.2. Objetivos específicos 16

CAPITULO II.- FUNDAMENTO TEORICO

2.1. MARCO TEORICO 17

2.2. GENERALIDADES DEL QUITOSANO 18

2.3. PROPIEDADES DEL QUITOSANO 19

2.3.1. Propiedades físico-químicas del quitosano 19

2.3.2. Propiedades biológicas del quitosano 20

2.4. FUENTES Y METODOS DE OBTENCION 23

2.5. APLICACIONES DEL QUITOSANO 28

2.6. NANOPARTICULAS: CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS NANOMATERIALES 31

2.6.1. Tamaño 32

2.6.2. Superficie 32

2.6.3. Forma 33

2.6.4. Composición y pureza 33

2.6.5. Potencial Zeta 33

2.7. FORMACION DE NANOPARTICULAS DE QUITOSANO 34

2.7.1. Gelación iónica 35

2.8. METODOS DE CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS 36

2.8.1. Dynamic light scattering (DLS) – Dispersión de luz dinámica..... 37

2.8.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM) 38

2.8.3. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) ... 40

CAPITULO III.- MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES 42

3.1.1. Materia prima..... 42

3.1.2. Insumos y utensilios 42

3.2. METODOS..... 43

3.2.1. Acondicionamiento de las hojuelas de quitosano 43

3.2.2. Preparación de las nanopartículas de quitosano 44

3.2.3. Caracterizaciones 46

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL 49

3.3.1. Variables estudiadas 49

3.3.2. Tratamiento estadístico de datos..... 50

CAPITULO IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO..... 51

4.2. GRADO DE ENTRECRUZAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR..... 53

4.3. TAMAÑO DE NANOPARTICULA - DLS..... 55

4.4. MORFOLOGIA DE LAS NANOPARTICULAS..... 62

4.5. ANALISIS ESTADISTICO – TABLA ANOVA..... 64

CAPITULO V.- CONCLUSIONES……68

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS……70

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO II.- FUNDAMENTO TEORICO

- ***Figura 2.1*** Estructura esquemática representación de una cadena de quitosano conteniendo residuos de monosacáridos 2-acetamido-2-deoxi-β-d-glucopiranosa (residuos a) y 2-amino-2-deoxi-β-d-glucopiranosa (residuos d), ambos unidos por enlaces β(1→4).19

- ***Figura 2.2*** Flujograma de producción de quitosano. 27

- ***Figura2.3*** Métodos para preparar nanopartículas de quitosano (adaptado de goycoolea). 34

- ***Figura 2.4*** Esquema del método de gelación (quitosano-tpp) – adaptado de Ana Grhena. 36

- ***Figura 2.5*** Esquema del aparato DLS (1 - laser; 2 - lente; 3 - muestra; 4 - apertura; 5 - cámara; 6 - computadora) 38

- ***Figura 2.6*** Esquema del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido. 39

- ***Figura 2.7*** Esquema de funcionamiento de un espectrofotómetro FTIR. 40

CAPITULO III.- MATERIALES Y METODOS

- ***Figura 3.1*** Quitosano pulverizado (pulverizadora fritsch 14 – UMET Universidad de Lille 1-Francia) 44

- ***Figura 3.2*** Esquema de la preparación de nanopartículas de quitosano. (1) 20ml de solución de quitosano, (2) incorporación de 10ml de tpp a la solución de quitosano, (3) solución opalescente por la interacción de quitosano y tpp que indica la formación de nanopartículas. 45

- ***Figura 3.3*** (1) Recuperación de nanopartículas después de la centrifugación, (2) nanopartículas durante la liofilización, (3) nanopartículas en polvo después de la liofilización. Instalaciones UMET Universidad de Lille 1-Francia 46

- ***Figura 3.4*** Espectrofotómetro FTIR – perkin elmer spectrum one 47

- ***Figura 3.5*** Equipo de dispersión de luz dinámica DLS, Dynapro nanostar – wyatt technology, UMET Universidad de Lille 1-Francia 47

- ***Figura 3.6*** Microscopio electrónico de barrido SEM, Hitachi S-4700, UMET Universidad de Lille 1-Francia 48

- ***Figura 3.7*** (1) muestra liofilizada, (2) muestra no liofilizada, secada a temperatura ambiente por 2 días en lámina de aluminio. 48

CAPITULO IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

- ***Figura 4.1*** Aspecto opalescente de la solución quitosano-tpp indicando la presencia de nanopartículas. 52

- ***Figura 4.2*** Espectro FTIR para quitosano y nanopartículas de quitosano (NP-1.1). **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

- ***Figura 4.3*** Distribución de tamaño e histograma monomodal monodisperso de las muestras NP–1.1 y NP-1.2 (0,1%CS; 0,14%TPP) 156,27nm y 199nm. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

- ***Figura 4.4*** Distribución de tamaño e histograma monomodal monodisperso de las muestras NP–2.1 y NP-2.2 (0,3%CS; 0,14%TPP) 185nm y 238nm. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**

- ***Figura 4.5*** Distribución de tamaño e histograma monomodal monodisperso de las muestras NP–3.1 y NP-3.2 (0,1%CS; 0,2%TPP) 167,8nm y 179,4nm. 60

- ***Figura 4.6*** Distribución de tamaño e histograma monomodal monodisperso de las muestras NP–4.1 y NP-4.2 (0,3%CS; 0,2%TPP) 191,9nm y 240,5nm. 60

- ***Figura 4.7*** Fotografías SEM (a) nanopartículas liofilizadas y (b) nanopartículas no liofilizadas secadas a temperatura ambiente por 2 días. 63

- ***Figura 4.8*** Diagrama de pareto estandarizada para NPS. 66

- ***Figura 4.9*** Grafica de efectos principales para NPS 67

- ***Figura 4.10*** Grafica de interacción para NPS 67

CAPITULO I

GENERALIDADES DEL PROYECTO

1.1. INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas en el aire, agua y tierra siempre han existido en una cercana armonía con la naturaleza y están involucradas en varias interacciones que afectan de diferente forma a la vida del ser humano.

En los últimos años la nanotecnología ha mostrado logros significativos en diversas disciplinas como la electrónica, fotónica, química de materiales y área médica(1) siendo esta ultima la de mayor interés.

Las nanopartículas poliméricas a partir de polímeros biodegradables y biocompatibles son buenos candidatos como portadores y administradores de fármacos, ya que se espera que sean absorbidos en forma intacta en tracto gastrointestinal tras su administración oral(2).

El Quitosano (CS), poli B-(1-4)-2 amino-2-desoxi-D-glucosa obtenido a partir de quitina, es el segundo polisacárido más abundante y un polielectrolito catiónico presente en la naturaleza(2).

El Quitosano tiene gran significancia en sus propiedades biológicas y químicas: Es biodegradable, biocompatible, bioactivo y policatiónico. Por ello el Quitosano ha sido enormemente utilizado en varios aspectos industriales y biomédicos incluyéndose en tratamientos de aguas residuales, soporte cromatográfico, inmovilización de enzimas y como vehículo para el transporte de fármacos(3).

También se tienen grandes aplicaciones del Quitosano en teñido y acabado de textiles como un substituto de varios químicos utilizados en la industria textil. Así mismo se ha indicado que derivados del Quitosano como carboximetilquitosano soluble en agua pueden desarrollar propiedades antimicrobiales en el algodón(4). Las nanopartículas de Quitosano pueden ser sintetizadas mediante un número de técnicas. Estas incluyen electrospray, microemulsión, gelación iónica, emulsificación de difusión disolvente, etc. Entre todas, gelación iónica con tripolifosfato (TPP) como reticulador es la técnica

más adoptada para fabricar nanopartículas de Quitosano, ya que este método es simple, moderado, menos toxica y adecuado para ampliar(5).

1.2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Se desea identificar las condiciones de concentración de componentes del sistema Solución de Quitosano (CS) y Tripolifosfato (TPP) que permite obtener nanopartículas de Quitosano siguiendo el método de gelación iónica.

1.3. HIPOTESIS

Es posible obtener diferentes distribuciones de tamaño y morfología de nanopartículas de Quitosano empleando el método de gelación iónica, en relación a parámetros controlados de concentración de Quitosano y TPP.

1.4. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo del proyecto permitirá disponer de tecnología para la producción de nanopartículas de Quitosano de amplio espectro de aplicación en los campos de remediación ambiental, sistemas de liberación de drogas y control fúngico y fungistático que representa un gran avance de la nanotecnología.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo general

Obtención y caracterización de nanopartículas de Quitosano por el método de gelación iónica.

1.5.2. Objetivos específicos

- Preparar las nanopartículas de Quitosano añadiendo TPP bajo agitación constante.
- Hacer un estudio del tamaño y morfología de las nanopartículas mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) y dispersión de luz dinámica (dynamic light scattering – DLS)
- Analizar el grado de entrecruzamiento del Quitosano y TPP mediante espectroscopia infrarroja – transformada de Fourier (FTIR)
- Comparar los datos obtenidos con investigaciones realizadas anteriormente.

CAPITULO II

FUNDAMENTO TEORICO

2.1. MARCO TEORICO

Las industrias americana y japonesa han investigado, en las últimas décadas, el uso de Quitosano en sistemas de liberación controlada de fármacos, donde la biocompatibilidad y biodegradabilidad del Quitosano han sido claramente establecidas y son cualidades sumamente importantes para esos objetivos (6).

Desde un punto de vista biofarmaceutico, el Quitosano tiene un gran potencial de servir como potenciador de la absorción a través del epitelio intestinal para mejorar sus propiedades mucoadhesivas y de permeabilidad (2), como también de inmovilizar enzimas (6).

Sin embargo el Quitosano es macromolecular, lo cual significativamente afecta sus aplicaciones, por lo cual Tang (3) afirma que el uso de Quitosano a una escala manométrica es mucho más efectivo en su trabajo realizado a la inmovilización de enzimas.

El uso de quitina y Quitosano en el tratamiento de aguas residuales se ha documentado en los últimos veinte años proponiendo mecanismos de coagulación y floculación para aguas contaminadas con residuos orgánicos; y decoloración de aguas residuales provenientes de la industria minera e industria química inorgánica (6)

En el trabajo de M.S. Sivakami (7) afirma que el uso de Quitosano a una escala nanométrica es mucho más efectiva en la adsorción de iones Cr en su trabajo de tratamiento de aguas residuales.

En estudios de funcionalización de textiles con nanopartículas de plata para el mejoramiento de las propiedades antimicrobianas y antifungicas, se ha reportado que el Quitosano y su derivado carboximetil-quitosano actúan como reductor y estabilizador de las nanopartículas de plata y además presentan grupos funcionales como el grupo carboxilo (-COOH) que permite una unión más estable y por ende un efecto antimicrobiano más prolongado.

Gracias a las propiedades y amplias aplicaciones del Quitosano, actualmente un grupo de docentes de la Universidad Nacional de San Agustín ha ganado un financiamiento FINCyT para desarrollar un trabajo de investigación en "Funcionalizaciones de textiles de algodón con NPAg- carboximetilquitosano vía síntesis verde, para mejorar las propiedades antibacterianas y anti fúngicas de larga duración, con potencial aplicación en la fabricación de prendas asépticas de uso hospitalario."

En nuestro país aún no se cuenta con una tecnología que permita estudiar ampliamente los efectos y aplicaciones de las nanopartículas pero a pesar de ello existen investigadores que han dado una iniciativa de estudios en este campo lo cual es motivador a poder direccionarse en la investigación a la escala nanométrica.

2.2. GENERALIDADES DEL QUITOSANO

El quitosano es un aminopolisacarido obtenido por N-desacetilación termoalcalina de la quitina aislada de los deshechos de crustáceos. Químicamente, el termino quitosano define a una familia de heteropolisacaridos lineales que están formados por 2-amino-2-deoxi-β-D-glucosa (unidades D) Y 2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucosa (unidades A) unidas en (1→4) (Figura 2.1). Las unidades de tipo A a menudo están presentes en menor proporción que las de tipo D, y su contenido, expresado como la relación molar de unidades A frente al total (A+D), se conoce como el grado de acetilación que se expresa como porcentaje (GA) o como una fracción (F_A). Junto al grado de polimerización, el GA es un parámetro fundamental que determina directamente las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano (8).

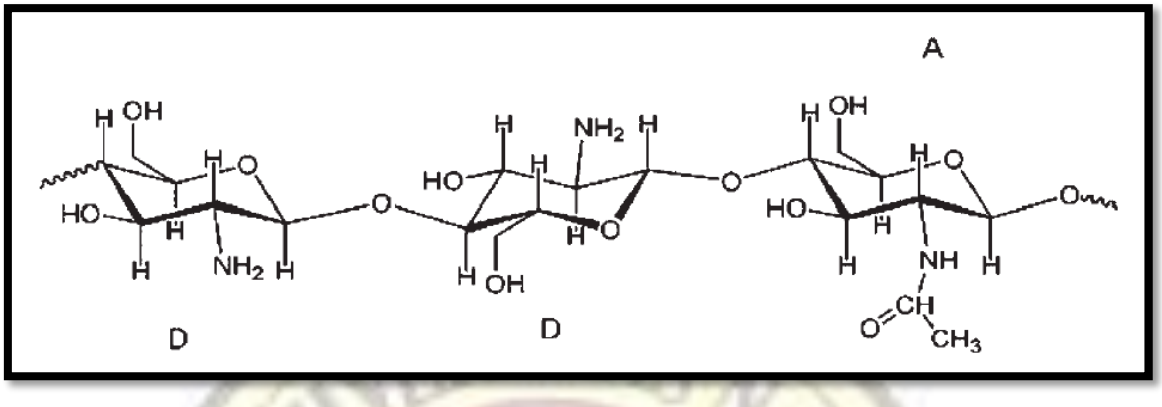


Figura 2.1 Estructura esquemática representación de una cadena de quitosano conteniendo residuos de monosacáridos 2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucopiranosa (residuos A) y 2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranosa (residuos D), ambos unidos por enlaces β(1→4)

Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano en estado sólido es un polímero semicristalino y un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio acido suaves(9). El quitosano es soluble en soluciones acidas pero insoluble a Ph>6,5 y en su mayoría insoluble en solventes orgánicos.

2.3. PROPIEDADES DEL QUITOSANO

2.3.1. Propiedades físico-químicas del quitosano

Las propiedades químicas del quitosano son las siguientes(10):

- Contienen poliaminas lineales.
- Existen grupos amino reactivo.
- Existen grupos hidroxilos reactivos disponibles.
- Quelante de muchos iones metálicos de transición.

2.3.2. Propiedades biológicas del quitosano

Las propiedades biológicas del quitosano son las siguientes(10):

- Biocompatible
  - Polímero natural.
  - Biodegradable a componentes normales de un cuerpo.
  - No toxico.
- Enlaza agresivamente las células mamíferas y microbiales.
- Efecto regenerativo en el tejido gingival.
- Acelera la formación de osteoblastos responsable de la formación de huesos.
- Hemostático
- Antibacterial
- Agente anticancerígeno
- Anticoagulante
- Fungistático
- Anti colesterol
- Acelerador de formación de huesos
- Antidepresivo para el sistema central nervioso

Peso Molecular

Es de conocimiento que el peso molecular de los polisacáridos es de fundamental importancia para determinar sus aplicaciones y el rol en los sistemas vivientes. El peso molecular del quitosano depende de las condiciones de desacetilación y puede ser determinada por métodos tales como cromatografía(11), light scattering(12), y viscosimetría(13).

Viscosidad

La viscosidad del quitosano se incrementa dependientemente a su peso molecular. Incrementando el grado de desacetilación (DD) también se incrementa la viscosidad. Un quitosano con mayor grado de desacetilación (%DD) tiene una estructura más extensa con una mayor flexibilidad en sus cadenas debido a la carga de repulsión en sus moléculas. La viscosidad de una solución de quitosano también se ve afectada por las concentraciones y temperatura, cuando la concentración de quitosano se incrementa y la temperatura disminuye la viscosidad aumenta. La viscosidad del quitosano disminuye con un incremento en el tiempo de desmineralización y despolimerización(14).

Solubilidad

La solubilidad del quitosano depende del grado de desacetilación. Un alto grado de desacetilación presenta una mayor solubilidad, y un bajo grado de desacetilación presenta una baja solubilidad(15). La solubilidad del quitosano se basa en la cantidad de grupos amino protonados en la cadena polimérica y, por lo tanto, en la proporción de grupos D-glucosamina acetiladas y no acetiladas. El pH de la solución altera el estado de las cargas y las propiedades del quitosano(16). A un nivel bajo de pH, las aminas se cargan positivamente y esto resulta en un quitosano policatiónico soluble en agua. Por otro lado si el nivel de pH se incrementa por encima de 6, las aminas del quitosano no llegan a protonarse y el polímero pierde su carga convirtiéndose en un quitosano

insoluble(17). La transición de solubilidad e insolubilidad del quitosano ocurre un intervalo de pH entre 6 y 6.5.

El solvente comúnmente utilizado para el quitosano es 1%ácido acético con un pH alrededor de 4.0(18). El quitosano también es soluble en 1%acido hidroclórico y ácido nítrico pero insoluble en ácidos sulfúrico y fosfórico.

Por consiguiente, la solubilidad del quitosano está relacionada con el grado de desacetilación, concentración iónica, pH, la naturaleza del ácido usado para protonarse y la distribución de los grupos acetilo en la cadena, así como también las condiciones de aislamiento y secado del polisacárido.

Grado de desacetilación

El grado de desacetilación (%DD) ha sido siempre un parámetro muy importante que determina algunas de las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano tales como cristalinidad, hidroafinidad, degradación y respuesta celular(17). El grado de desacetilación del quitosano es generalmente controlado por el proceso alcalino y el incremento en el tiempo de temperatura para obtener un alto grado de desacetilación (>90). Durante la reacción de desacetilación, el grupo acetil de la quitina reacciona con NaOH para producir grupos amino. A mayor incremento en la concentración de NaOH la reacción tiende hacia la producción de más quitosano, y como resultado se obtiene un mayor grado de desacetilación. El biopolímero es caracterizado ya sea como quitina o quitosano de acuerdo al grado de desacetilación la cual se determina por la proporción de D-glucosamina y N-acetil D-glucosamina.

Los métodos más utilizados para la determinación del grado de desacetilación son espectroscopia (infrarroja, ultravioleta y resonancia magnética nuclear), métodos convencionales (titulación, conductimetría, potenciometría,), métodos destructivos (análisis elemental o hidrolisis enzymatica de la quitina o quitosano) y otros tales como colorimetría, cromatografía, análisis térmico.

Cristalinidad

Una de las mayores características físicas que determina la funcionalidad de las propiedades del quitosano es la cristalinidad(19). La cristalinidad es considerada por tener un efecto en la adsorción de metales. La cristalinidad del polímero puede también controlar la accesibilidad de los grupos amina(20).

Complejo de formación con metales

El quitosano contiene una mayor concentración de iones metales en comparación a la quitina. El quitosano tiene grupos amino y grupos hidroxilos reactivos, también tiene quelatos con considerables iones metales de transición. Varios procesos tales como la adsorción, cambio de iones, y quelacion han sido considerados como los mecanismos responsables del complejo de formación entre los iones metálicos y el quitosano.

2.4. FUENTES Y METODOS DE OBTENCION

El quitosano puede ser extraído de los insectos, hongos, y crustáceos tales como cangrejo, langostas, langostinos, camarón, calamares. En los crustáceos, la quitina forma parte de la capa protectora como un enlace covalente conteniendo proteínas, algunos metales y pigmentos naturales (carotenoide). Los caparazones de los crustáceos consisten en un 30-40% de proteínas, 30-50% de carbonato de calcio, y 20%-30% de quitina en compañía de pigmentos(17). Camarones, cangrejos y langostas son los principales recursos comerciales en producción de quitina y quitosano. El incremento en el consumo de crustáceos y en la expansión de la acuacultura ha llevado a un gran incremento en la cantidad de camarones y langostas a ser procesador y por lo tanto en la cantidad de residuos disponibles para la producción de quitina/quitosano. A continuación se presenta un listado de los géneros y especies de crustáceos y moluscos, así como los nombres comunes locales y

la distribución geográfica de cada uno según lo descrito por Ana Pastor de Abraham(6).

Camarones

- *Litopenaueus vannamei* —anteriormente *Penaeus vannamei*— (camaron blanco del pacifico, camaron patiblanco, langostino rojo). Se distribuye en el Pacifico Centro Oriental desde Sonora (México) hasta el norte del Perú. Es, además, una de las principales especies cultivadas.
- *Litopenaeus stylirostris* —anteriormente *Penaeus stylirostris*— (camaron azul, langostino blanco). Se extiende en el Pacifico Centro Oriental desde México hasta Perú.
- Farfantepaneus californiensis —anteriormente Penaeus californiensis— (camaron café). Se encuentra en el Pacifico Centro Oriental en Mexico.
- Farfantepaneus aztecus —anteriormente Panaeus aztecus— (camaron café). Se encuentra en el Atlantico Centro Occidental en el Golfo de México.
- Farfantepaneus duorarum —anteriormente Panaeus duorarum— (camaron rosado). Se distribuye en el Atlantico Centro Occidental en el Golfo de México.
- Farfantepaneus brevirostris —anteriormente Panaeus brevirostris— (camaron rojo). Se distribuye en el Pacifico Centro Oriental desde el sur de Mexico hasta Peru.
- Litopenaeus setiferus —anteriormente Penaeus setiferus— (camaron blanco del atlántico). Se encuentra en el Atlantico Centro Occidental en el Golfo de Mexico.
- Farfantepaneus brasiliensis —anteriormente Penaeus brasiliensis— (camarón rosado con manchas). Se encuentra en el Atlántico Occidental en Brasil.

- Xiphopenaus reedi (tití). Se encuentra en el Pacifico Centro Occidental en Panama.
- Xiphopenaeus kroyeri (camarón siete barbas). Se encuentra en el Atlantico Sur y Occidental en Brasil, Venezuela, Colombia, Honduras y en el Golfo de Mexico.
- Heterocarpus reedi (camaron nailon). Se encuentra en el Pacifico Sur Oriental, en Chile.
- Pleoticus muelleri (camaron, camaron pelágico). Se encuentra en el Atlantico Sur Occidental, desde Rio de Janeiro hasta Santa Cruz en Argentina.
- Paraoenaeus longirostris (gamba). Se encuentra en el Mar Mediterraneo, en España.
- Crangon crangon (quisquilla, cabra, camarao mouro). Se encuentra en el atlántico Nororiental desde Noruega hasta Marruecos y en el Mar Mediterráneo, en España y Portugal.

Cangrejos

- Callinectes sapidus (jaiba azul del Atlántico). Se encuentra en el Atlantico Centro Occidental desde el Golfo de Mexico hasta el norte de Argentina.
- Callinectes arcuatos (jaiba azul del Pacifico, cangrejo). Se distribuye en el Pacifico Centro y Sur Oriental desde Baja California hasta Perú. Llega a encontrarse en Chile durante el Fenómeno de El Niño.
- Calliectes danae (jaiba dana). Se encuentra en el Atlantico Centro Occidental desde el Golfo de Mexico hasta el Sur de Brasil.
- Geryons quinquedens. Se encuentra en el Atlantico Sur Occidental.

- Lithodes antartica (centolla). Se encuentra en el Pacifico Sur Oriental y en el Atlantico Sur Occidental, en Chile y Argentina.
- Paralomis granulosa (centollon). Se encuentra en el Pacifico Sur Oriental y en el Atlantico Sur Occidental, en Chile y Argentina.
- Cancer pagurus (buey). Se halla ampliamente distribuido en la costa del Atlantico Oriental europea y en el Mar Mediterráneo, en España y Portugal.

Langostas y langostinos

- Panulirus argus (langosta). Se encuentra en el Atlantico Centro y Sur Occidental desde el Golfo de Mexico hasta Rios de Janeiro —incluido el Mar Caribe—, en Cuba, Mexico, Honduras, Nicaragua y Brasil.
- Panulirus gracilis (langosta verde). Se encuentra en el Pacifico Centro Oriental desde Baja California y Mexico hasta Panama.
- Pleuroncodes monodon (langostino colorado). Se encuentra en el Pacifico Sur Oriental, en Chile.
- Cervimunida johni (langostino amarillo). Se distribuye en el Pacifico Sur Oriental, en Chile.

Calamares

- Dosidicus gigas (calamar gigante, pota). Se encuentra en el Pacifico Centro y Sur Oriental desde el Golfo de California hasta Peru.
- Illex argentinus (calamar). Se encuentra en el Atlantico Sur Occidental (aproximadamente entre los 30° a 50° S), En Brasil, Uruguay y Argentina.

- Sepia Offinalis (choco, jibia, choco). Se encuentra en el Atlántico Nor Oriental y el Mar Mediterráneo, en España y Portugal.

La mayoría de quitosano globalmente disponible es producido en USA, Japón, Noruega, Tailandia, India, Australia y Polonia, Italia y Rusia(21). Usualmente el quitosano se encuentra comercialmente en solución, hojuelas, como un polvo fino y recientemente en forma de fibras. La producción de quitosano involucra una serie de pasos tales como la preparación de la quitina proveniente del material biológico seguido por la desacetilación que resultara en quitosano. Así, la producción típica de quitosano desde los caparazones de crustáceos consiste en cuatro pasos básicos: desmineralización, desproteinización, decoloración y desacetilación.

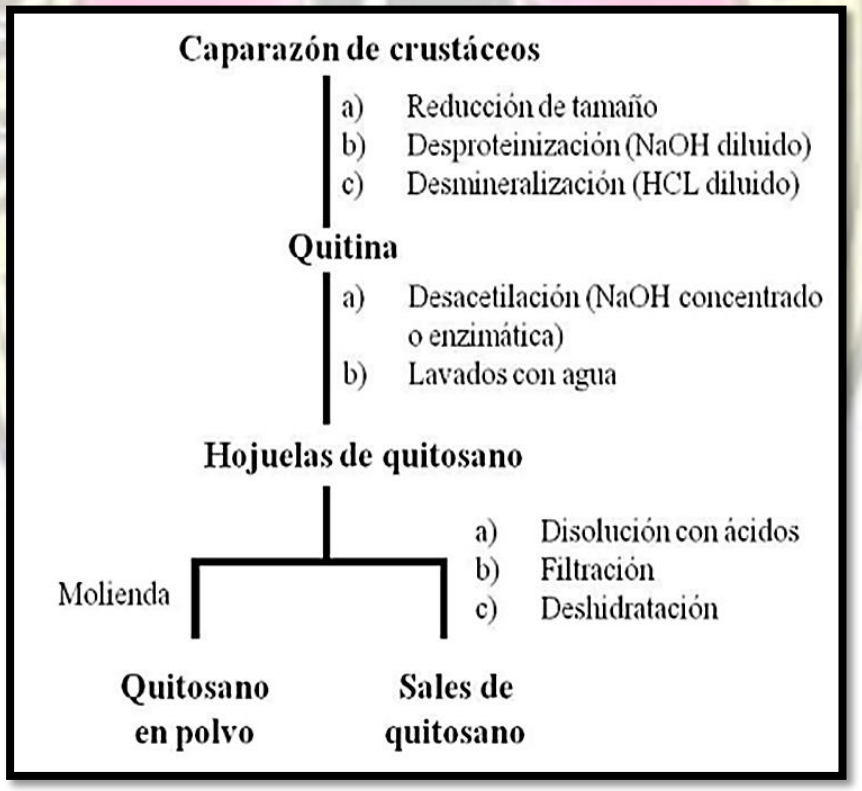


Figura 2.2 Flujograma de producción de quitosano

2.5. APLICACIONES DEL QUITOSANO

Las aplicaciones del quitosano son muy diversas. Sus aplicaciones han sido publicadas en el *"International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences."* Esto se debe a que su potencial aplicación como nanopartícula se encuentra desarrollada en las áreas biomédica y farmacéutica. Así mismo una gran parte de su aplicación también está destinada a lo que se le conoce como área comercial (agricultura, tratamiento de aguas residuales, industria de alimentos, cosméticos, y productos biofarmaceuticos).

A continuación se puede apreciar de manera resumida las aplicaciones del quitosano de acuerdo a lo antes mencionado(9)(22)(23).

Tabla 2.1

Principales propiedades del quitosano en relación a su uso en las aplicaciones biomédicas-farmacéuticas

Aplicaciones Biomédicas - farmacéuticas	**Características principales**
Suturas quirúrgicas	Biocompatible
Implantes dentales	Biodegradable
Piel artificial	Renovable
Reconstrucción de huesos	Formación de films
Lentes de contacto corneales	Agente hidratante
Tiempo de liberación de fármacos para animales y humanos	No toxico Biológicamente tolerante
Encapsulación de material	Hidrolizado por lisosomas, Propiedades de curación de heridas Eficiencia contra las bacterias, virus, fungí.
Producción de tabletas, geles, membranas, emulsiones.	Unificador, desintegrador, recubrimiento, lubricante. Sostenibilidad y control de la liberación de fármacos. Estabilizador

Tabla 2.2

Principales aplicaciones del quitosano en el área comercial

Sector Comercial	Aplicación
Agricultura	Mecanismo de defensa en plantas Estimulación para el crecimiento de plantas Recubrimiento de semillas, protección anticongelante Tiempo de liberación de fertilizantes y nutrientes en la tierra.
Tratamiento de aguas/residuales	Floculante para aclarar el agua (agua potable, piscinas) Remoción de iones metálicos Polímero ecológico (eliminación de polímeros sintéticos) Reducción de olores
Alimentación/Bebidas	Fibras dietéticas Unión de lípidos (reducción de colesterol) Preservativo Espesador y estabilizador de salsas Protección, fungistático, y recubrimiento antibacterial para frutas.
Cosméticos/aseo	Mantenimiento para la hidratación de piel Tratamiento contra el acné Mejoramiento en la flexibilidad del cabello

	Reduce la electricidad estática en el cabello Recupera el tono de piel Cuidado oral (pasta dental,
Productos biofarmaceuticos	Inmunológicos, antitumoral Hemostáticos y anticoagulante Curación, bacteriostático

2.6. NANOPARTICULAS: CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LOS NANOMATERIALES

Los materiales reducidos a la nanoescala pueden mostrar propiedades muy diferentes a las que exhiben en una macroescala, posibilitando aplicaciones únicas. Por ejemplo, sustancias opacas se vuelven transparentes (cobre); materiales inertes se transforman en catalizadores (platino); materiales estables se transforman en combustibles (aluminio); sólidos se vuelven líquidos a temperatura ambiente (oro); aislantes se vuelven conductores (silicona). Materiales como el oro, que es químicamente inerte en escalas normales, pueden servir como catalizadores a nanoescalas(24).

Las propiedades de los nanomateriales tales como el tamaño, superficie, forma, composición, peso molecular, identidad, pureza, estabilidad y solubilidad soy muy importantes a las interacciones fisiológicas. Estas interacciones fisiológicas pueden beneficiar la aplicación de los nanomateriales en la medicina, incluyendo mejoras en la eficiencia, reducción de efectos adversos, prevención y tratamiento(25).

2.6.1. Tamaño

El tamaño es un parámetro muy importante ya que manipula la relación de área de superficie/volumen. Esto significa que al disminuir el tamaño se incrementa el porcentaje de átomos en la superficie(26). En términos generales, el tamaño de un nanomaterial esférico está definido como al diámetro equivalente de una partícula esférica cuyas propiedades físicas como la difusividad, son equivalentes a las de un nanomaterial en el mismo entorno(27). Uno de los ejemplos frecuentemente adoptados es el del diámetro hidrodinámico de una molécula, el cual efectivamente es el tamaño calculado del coeficiente de difusión proveniente de la relación de Stokes-Einstein(28). En los nanomateriales, el tamaño es un factor crucial que regula la circulación y navegación de los nanomateriales en el flujo sanguíneo y la penetración a través de las barreras fisiológicas del fármaco(29).

2.6.2. Superficie

Muchas de las características interfaciales de los nanomateriales están en función de la composición atómica o molecular y de las estructuras físicas de la superficie que responden a las interacciones de los nanomateriales con las especies a su alrededor(28). En la nanomedicina, estas características son consideradas los elementos de las propiedades de superficie en el ambiente de un fluido biológico(28). Entre las diferentes propiedades de superficies, composición de superficie, energía de superficie, mojabilidad superficial, carga de superficies y especies de absorbancia o adhesión son considerados parámetros importantes. Donde la composición de superficie es relevante a la capa superficial. La energía de superficies es importante para la disolución, agregación y acumulación del nanomaterial. La carga superficial, tiene un gran efecto en la unión de receptores y penetración de las barreras fisiológicas, estabilidad de dispersión o agregación de nanomateriales. Finalmente las especies de absorbancia o adhesión alteran la superficie del nanomaterial

como también la conformación y actividad de las especies adherentes(28)(30)(31).

2.6.3. Forma

La forma de un nanomaterial tiene un rol muy importante en la liberación, degradación, transporte, tratamiento e internalización de fármacos(32). También afecta la absorción celular, biocompatiblidad y retención en tejidos y órganos(33). Adicionalmente, la disposición y ubicación de nanomateriales en el organismo puede ser influenciado por su forma conjuntamente con el tamaño y estado de aglomeración(34).

2.6.4. Composición y pureza

La composición de un nanomaterial afecta el transporte, liberación y biodistribucion de fármacos. También hay varios estudios que se enfocan a la importancia toxicológica de las nanopartículas de diferente composición(35). Adicionalmente al tamaño y forma, la composición química es otro factor importante en la determinación de la toxicidad de nanopartículas.

2.6.5. Potencial Z

El potencial Z es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Su medida proporciona una idea detallada de los mecanismos de dispersión y es la clave del control de dispersión electrostático. El potencial Z es una herramienta importante para el entendimiento del estado de la superficie de las nanopartículas y predice la estabilidad a largo plazo de la nanopartícula(36)

2.7. FORMACION DE NANOPARTICULAS DE QUITOSANO

Las nanopartículas a base de quitosano se forman de acuerdo a una aproximación de tipo bottom-up como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscopicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente(8). Las metodologías más comunes mediante las cuales es posible preparar nanopartículas a base de quitosano se presentan en la Figura 2.3.

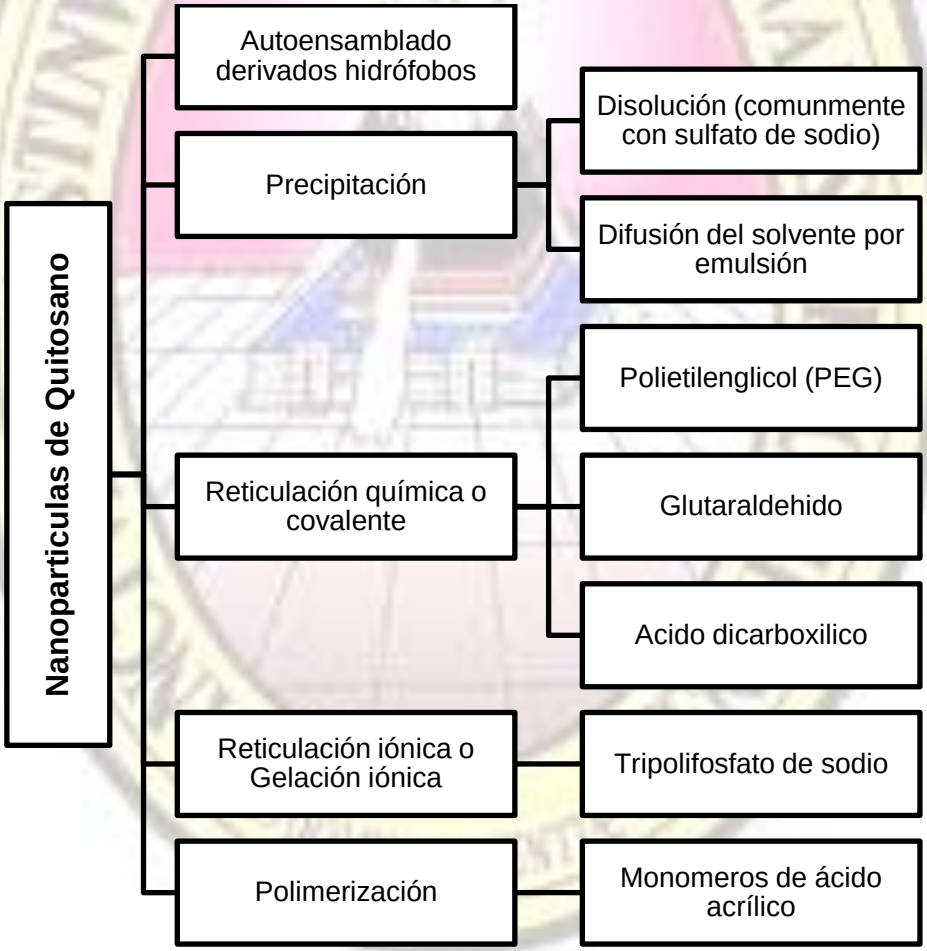


Figura 2.3 Métodos para preparar nanopartículas de quitosano (adaptado de Goycoolea)

Dentro de los que mayor atención han recibido, destacan aquellos basados fundamentalmente en el principio de la gelificación iónica utilizando tripolifosfato de sodio (TPP) (37).

2.7.1. Gelación iónica

El método de gelación iónica es un método ampliamente usado para la preparación de nanopartículas de quitosano. También se le conoce como reticulación iónica, este es generado por una auto agregación entre el quitosano o sus derivados y macromoléculas de carga opuesta, o cuando existe un agente reticulante(38). El agente reticulante más usado es tripolifosfato de sodio (TPP). Cuando el agente TPP se añade continuamente a una solución de quitosano bajo agitación constante y a una temperatura moderada (temperatura ambiente), dos componentes con cargas opuestas se combinaran para formar nanopartículas(39), Figura 2.4.

El mecanismo de este método para la formación de nanopartículas de quitosano plantea que la gelificación iónica del quitosano 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 quitosano(37). El tamaño de nanopartícula de este sistema es muy sensible al pH y la fuerza iónica(40).

Entre las ventajas de este método cabe destacar que evita el uso de altas temperaturas, solventes orgánicos o procesos drásticos como la sonicación, que unido a la naturaleza poli catiónica del quitosano le confieren a estos sistemas la capacidad para asociar de forma eficiente y preservar la estabilidad y bioactividad de macromoléculas terapéuticas contra su degradación.

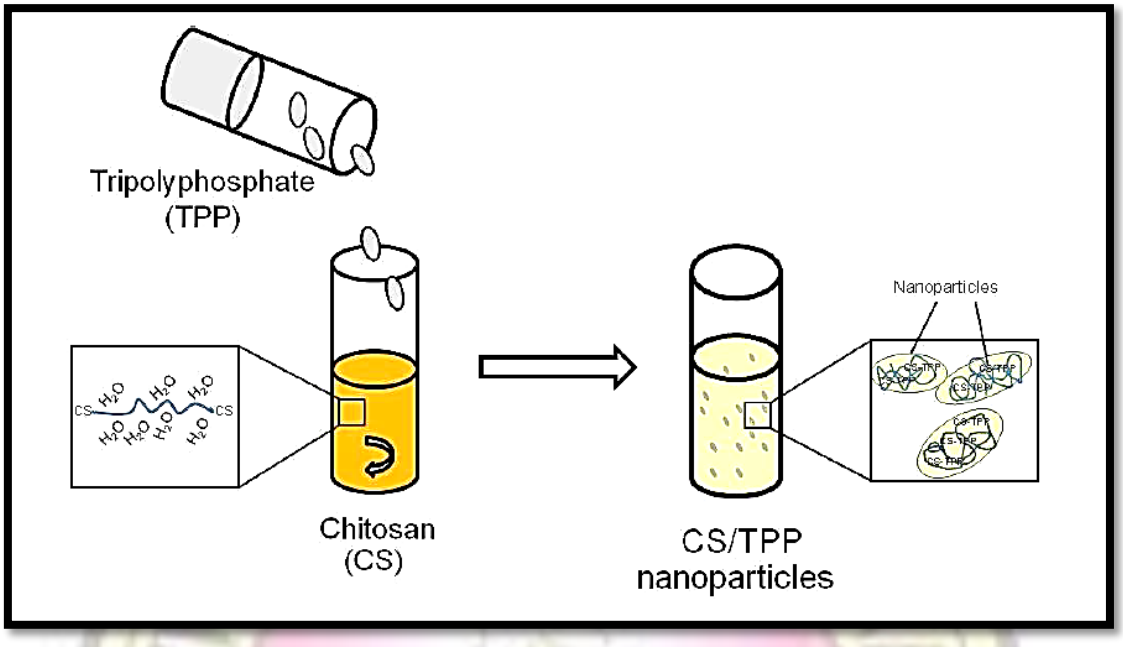


Figura 2.4 Esquema del método de gelación (quitosano-TPP) – adaptado de Ana Grhena

2.8. METODOS DE CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS

Las nanopartículas son generalmente caracterizadas por su tamaño, morfología y superficies de carga, usando técnicas avanzadas de microscopia tales como microscopia electrónica de barrido (SEM), microscopia de transmisión de electrones (TEM) y microscopia de fuerza atómica (AFM). El promedio del diámetro de las nanopartículas, la distribución de tamaño y la carga afectan la estabilidad física y la distribución in vivo de las nanopartículas(41). Las técnicas de microscopia son muy útiles en la determinación de la forma de las nanopartículas poliméricas.

La distribución de tamaño y morfología de las nanopartículas son los parámetros más importantes de caracterización. La morfología y tamaño pueden ser caracterizados por microscopia electrónica.

La mayor aplicación de las nanopartículas está en el transporte y liberación de fármacos. Partículas de menor tamaño ofrecen una amplia área superficial.

Como resultado los fármacos cargados en las nanopartículas serán expuestas a la superficie produciendo así una rápida liberación del fármaco(42). La degradación del polímero también puede ser afectada por el tamaño de nanopartícula.

A continuación se detallan algunas herramientas para la determinación de la distribución y tamaño, morfología y entrecruzamiento de las nanopartículas.

2.8.1. Dynamic light scattering (DLS) – Dispersión de luz dinámica

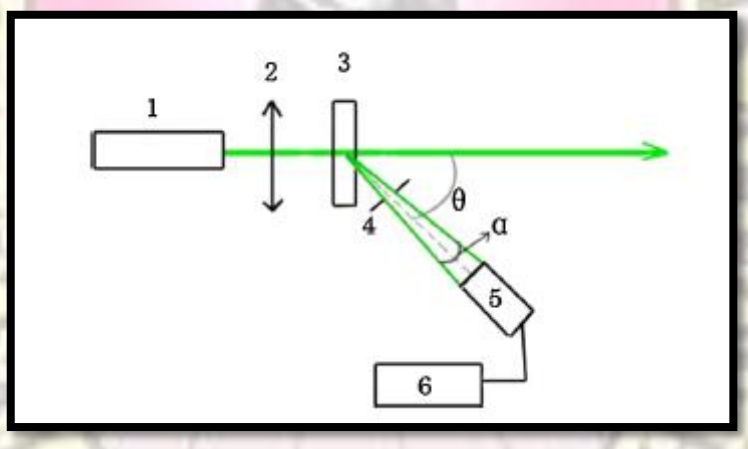
Actualmente es el más rápido y más popular método para la determinación del tamaño de partícula, también conocido como espectroscopia de correlación de fotones (PCS). DLS es ampliamente usado para determinar el tamaño Browniano (o hidrodinámico) de las nanopartículas en suspensiones coloidales en los rangos nano y submicrones. La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de la luz dispersados por distintas partículas interfieren entre si y se obtiene una intensidad de dispersión determinada(43). El escáner de partículas pequeñas fluctúa rápidamente y en el caso de partículas grandes esta fluctúa lentamente(44). El coeficiente de difusión de la partícula puede ser determinada por la intensidad de la función de auto correlación, de la cual se obtiene la información del tamaño de partícula(44).

Para partículas esféricas bajo el movimiento browniano, la ecuación de Stokes-Einstein relaciona el coeficiente de difusión D_T de traslado de las partículas al diámetro hidrodinámico *d* de las partículas de la siguiente manera:

$$D_T = \frac{k_b\ T}{3\pi n d} \qquad [1]$$

Donde k_b es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta, y n es la viscosidad dinámica del medio suspendido. Cuando el rayo láser viaja a través de la muestra, las nanopartículas suspendidas dispersan al laser en todas las direcciones(45).

Como se muestra en la Figura 2.5 la distribución espacial de los haces de luz es capturado por una cámara digital y luego es transmitida a un software en la computadora, donde se podrá apreciar la información correspondiente al tamaño y distribución de las nanopartículas.



.

Figura 2.5 Esquema del aparato DLS (1 - laser; 2 - lente; 3 - muestra; 4 - apertura; 5 - cámara; 6 - computadora)

2.8.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Microscopia electrónica de barrido (SEM) provee de una examinación morfológica con visualización directa. Las técnicas basadas en microscopia electrónica ofrecen diversas ventajas en el análisis morfológico y de tamaño;

sin embargo proveen información limitada acerca de la distribución y del verdadero promedio de población. Para la caracterización SEM, se requiere que las nanopartículas se encuentren en un estado sólido (polvo seco), el cual es luego colocado en un soporte y seguido por un recubrimiento con metal que puede ser oro, plata, cromo o carbono usando una máquina de pulverización. La muestra es escaneada con una haz de electrones(46) ver Figura 2.6. Las características de la superficie de la muestra se obtienen de unos electrones secundarios emitidos desde la superficie de la muestra. Las nanopartículas deben ser capaces de resistir al vacío ya que el haz de electrones puede dañar la muestra. El tamaño de partícula obtenido por SEM se debe comparar con los resultados obtenidos por DLS.

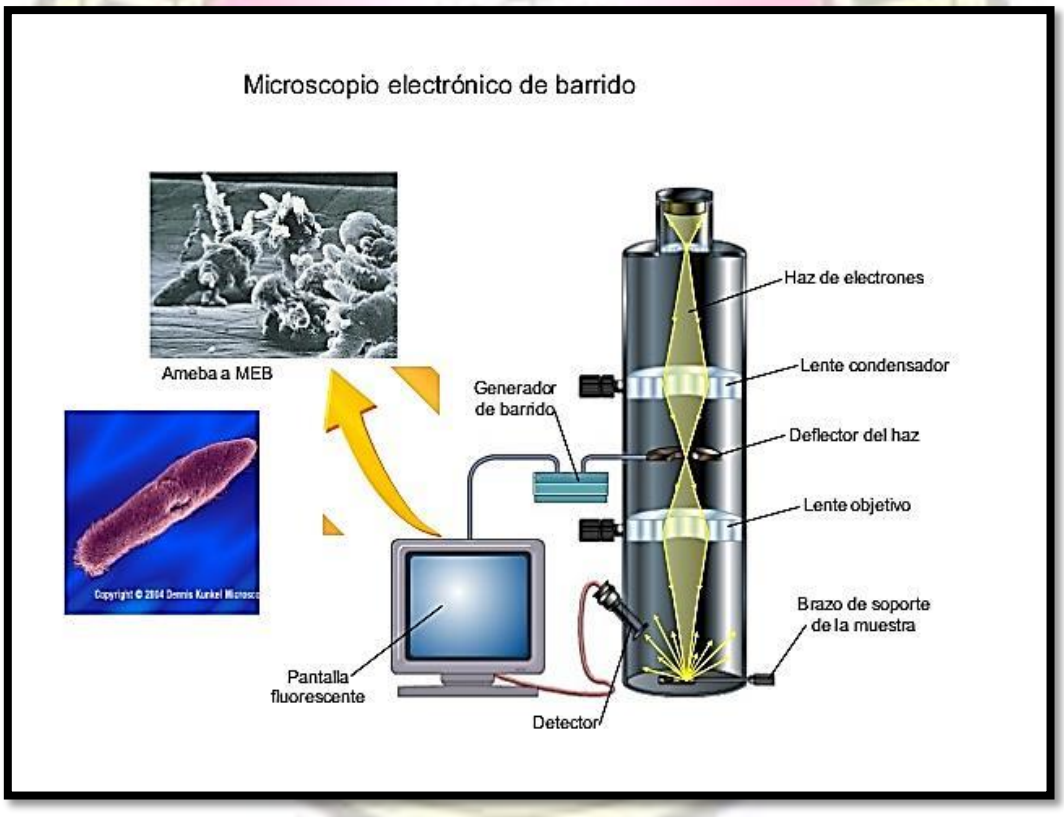


Figura 2.6 Esquema del funcionamiento de un Microscopio electrónico de barrido.

2.8.3. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas por lo cual es posible realizar una identificación de los materiales, calidad o consistencia de una muestra y la cantidad de componentes en una mixtura. En la espectroscopia FT-IR, la radiación IR pasa a través de la muestra. Una parte de la radiación IR es absorbida por la muestra y otra pasa a través de ella (transmitancia) siendo detectada y enlazada a un software en la computadora que posteriormente mostrara el espectro de la muestra, Figura 2.6.

Por lo tanto el espectro IR ilustra la absorción o transmisión versus la incidencia de la frecuencia ilustrando la huella de la estructura molecular de la sustancia(47).

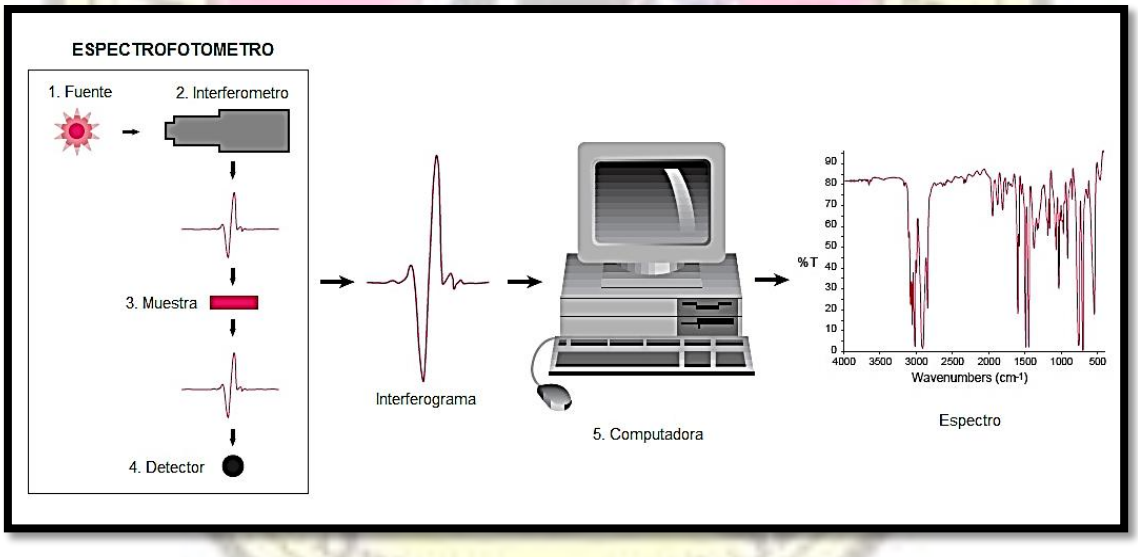


Figura 2.7 Esquema de funcionamiento de un espectrofotómetro FTIR

Para las aplicaciones en nanomateriales, la espectroscopia FTIR es comúnmente empleada para determinar el espectro de banda que revela una conjugación de nanomaterial - biomolecula (ej. las proteínas enlazadas a una

superficie de nanopartículas), y para ilustrar el estado conformacional de las proteínas unidas(48).

Una técnica recientemente desarrollada llamada espectroscopia de reflexión total atenuada (ATR)-FTIR usa la propiedad de una reflexión interna total en conjunto con la espectroscopia IR para probar las estructuras de especies depositadas/absorbidas en una interface solido/aire o solido/liquido(49). El ATR-FTIR provee espectros de absorción IR para investigar, por ejemplo, cambios en las propiedades de la superficie como también identificación de propiedades químicas en la superficie del polímero(49).

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

Para el desarrollo de este proyecto, se utilizó los siguientes materiales y recursos:

3.1.1. Materia prima

- Quitosano de cabeza de langostino, fue proporcionado por la Pontificia Universidad Católica del Perú. Cuenta con un DD de 93.1%y un peso molecular de 720KDa.
- Tripolifosfato de Sodio (TPP)
- Ácido acético al 95%
- Agua ultra pura

3.1.2. Insumos y utensilios

- Máquina trituradora
- Pulverizador
- Agitador magnético
- Centrifugadora
- Liofilizadora

- Sonicador
- Balanza de precisión
- Matraz
- Micropipetas
- Magnetos
- Espátulas
- Parafilm
- Papel aluminio
- Tubos para centrifuga
- Frascos de vidrio y plástico con volúmenes de 50ml, 100ml y 200ml
- Jeringas
- Filtros de 0,45µm

3.2. METODOS

3.2.1. Acondicionamiento de las hojuelas de quitosano

Las hojuelas de quitosano provisionadas por la PUCP fueron trituradas y pulverizadas para reducir su tamaño y facilitar su uso en la preparación de nanopartículas. Figura 3.1

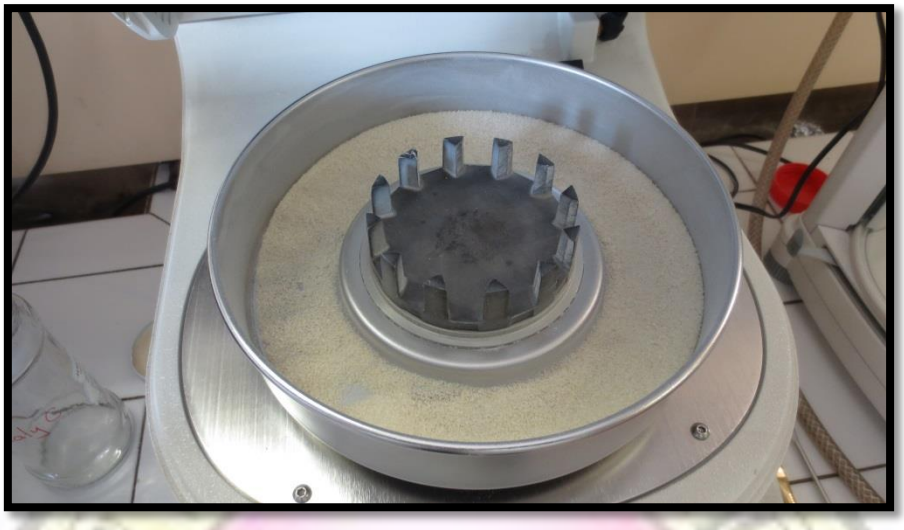


Figura 3.1 Quitosano pulverizado (Pulverizadora Fritsch 14 – UMET Universidad de Lille 1)

3.2.2. Preparación de las nanopartículas de quitosano

El método adoptado para la preparación de las nanopartículas de quitosano fue el de gelación iónica basado según lo reportado por Calvo. 1997(37). Quitosano fue disuelto en una solución de ácido acético a dos concentraciones diferentes, 0.1% y 0.3%, por 3 horas bajo agitación constante a 1000rpm. Este fue luego filtrado al vacio para eliminar impurezas. La concentración de ácido acético fue de 1.75 veces mayor a la concentración de quitosano.

El tripolifosfato de sodio (TPP) se disolvió en agua ultra pura a dos concentraciones, 0.14% y 0.2%. Luego 10 ml de la solución de TPP fueron incorporados gota a gota con la ayuda de una jeringa a 20ml de la solución de quitosano bajo agitación a una velocidad de 1000rpm dejándola así por 1 hora, Figura 3.2.

(1) (2)

(3)

Figura 3.2 Esquema de la preparación de nanopartículas de quitosano. (1) 20ml de solución de quitosano, (2) incorporación de 10ml de TPP a la solución de quitosano, (3) solución opalescente por la interacción de quitosano y TPP que indica la formación de nanopartículas.

Finalmente la solución fue centrifugada a 3000rpm por 30 minutos, se eliminó el líquido flotante y el sedimento fue almacenado en una congeladora para luego ser liofilizado, Figura 3.3.

(1)

(2

(3

Figura 3.3 (1) Recuperación de nanopartículas después de la centrifugación, (2) nanopartículas durante la liofilización, (3) nanopartículas en polvo después de la liofilización. Instalaciones UMET- Lille 1

3.2.3. Caracterizaciones

3.2.3.1. Grado de entrecruzamiento de las nanopartículas por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier – FTIR.

Para obtener el espectro IR (rango de 4000 – 650 cm^{-1}) se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum One, Figura 3.4. Se usaron las nanopartículas de quitosano liofilizadas, estas fueron depositadas en la superficie de cristal y aseguradas con alta presión.

Figura 3.4 Espectrofotómetro FTIR – Perkin Elmer Spectrum One

3.2.3.2. Tamaño de nanoparticulas – DLS

El tamaño de las nanopartículas fue analizado usando un equipo de dispersión de luz dinámica (DLS) DynaPro NanoStar – Wyatt Technology, Figura 3.5. Las muestras liofilizadas fueron diluidas en agua ultra pura con una concentración 1mg/ml, sonicadas por 10min y colocadas en la celda plástica.

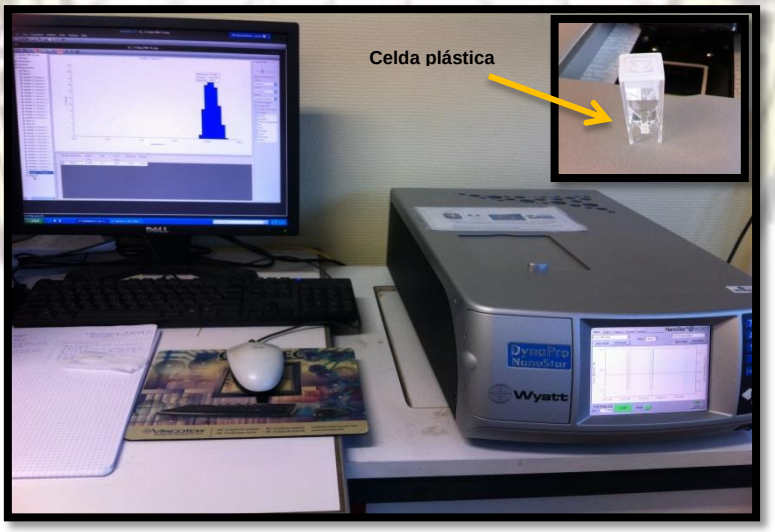


Figura 3.5 Equipo de dispersión de luz dinámica DLS,
DynaPro NanoStar – Wyatt Technology

3.2.3.3. Morfología por microscopio electrónico de barrido – SEM

La morfología de las nanopartículas fue determinada por un microscopio electrónico de barrido SEM Hitachi S-4700 con un voltaje de 5kV y una corriente de 10µA, Figura 3.6. Se prepararon dos tipos de muestras, (1) liofilizadas y (2) no liofilizadas, Figura 3.7. Las muestras no liofilizadas son las soluciones que no se centrifugaron y fueron secadas a temperatura ambiente sobre una lámina de aluminio por 2 días. Ambas muestras, liofilizadas y no liofilizadas, fueron cubiertas por cromo.

Figura 3.6 Microscopio electrónico de barrido SEM, Hitachi S-4700

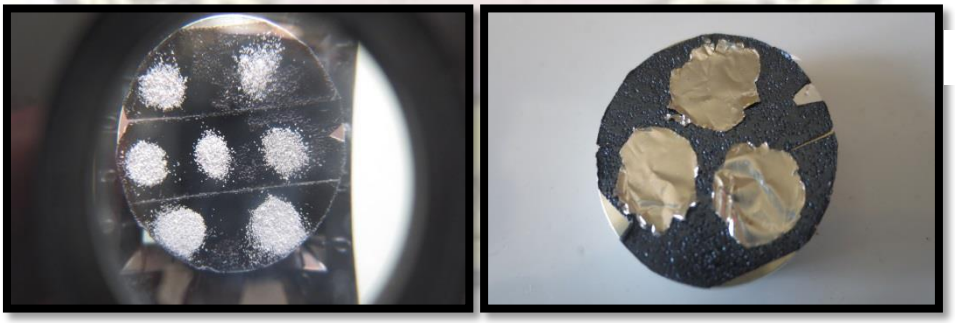
(1)  (2)

Figura 3.7 (1) Muestra liofilizada, (2) muestra no liofilizada, secada a temperatura ambiente por 2 días en lámina de aluminio.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

La investigación se desarrollará basándose en un arreglo factorial con dos factores, modelo ampliamente utilizado en investigaciones similares. Ya que este arreglo permite obtener un estudio exploratorio completo del proyecto.

El arreglo factorial con dos factores relaciona las variables independientes con las dependientes, encontrándose así, el número total de corridas a elaborar; y se representa de la siguiente forma:

$$2^K$$

Dónde:

- 2 = nivel de las variables (mínimo / máximo)
- K = número de variables a estudiar

3.3.1. Variables estudiadas

Variables independientes

- Concentración de quitosano (%)
- Concentración de TPP (%)

Variable dependiente

- Tamaño de las nanopartículas

Tabla 3.1

Factores a estudiar

Factores (Concentración)	Nivel -1	Nivel +1
1. Quitosano	0.1%	0.3%
2. TPP	0.14%	0.2%

Tabla 3.2

Matriz de experimentos del diseño factorial completo 2^k

No de Muestra	Factores		Respuesta
	X1	X2	
1	-	-	Y_1
2	+	-	Y_2
3	-	+	Y_3
4	+	+	Y_4

3.3.2. Tratamiento estadístico de datos

Para poder realizar los análisis estadísticos de este diseño experimental se utilizó el software denominado Statgraphics Centurion, el cual también permite determinar el análisis de varianza ANOVA.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO

Las nanopartículas preparadas se codificaron de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla 4. 1

Codificación de nanopartículas de quitosano – NPs

No de Muestra	% Quitosano (20ml)	% TPP (10ml)	Código de NPs de quitosano
1	0,1	0,14	NP-1.1
2	0,3	0,14	NP-2.1
3	0,1	0,2	NP-3.1
4	0,3	0,2	NP-4.1
5	0,1	0,14	NP-1.2
6	0,3	0,14	NP-2.2
7	0,1	0,2	NP-3.2
8	0,3	0,2	NP-4.2

El método de preparación, gelación iónica, es relativamente simple y a condiciones suaves. Donde el quitosano se disuelve en una solución acuosa de ácido acético para obtener el catión quitosano

$$R - NH_{2(S)} + H_3O^+_{(ac)} \leftrightarrow R - NH^+_{3\,(ac)} + H_2O_{(l)} \qquad [2]$$

La eficiencia del método de gelación iónica es dependiente de la masa molecular y grado de desacetilación del quitosano. Cuanto mayor es el peso molecular del quitosano, existe mayor número de grupos amino protonados en una solución acida de quitosano. De este modo hay un mayor número de cargas positivas que pueden interaccionar con las cargas negativas del TPP. Adicionalmente, cuanto mayor es el grado de desacetilación del quitosano, se presentaran mayor cantidad de grupos amino para protonarse, así mayor interacción iónica con el TPP, obteniendo una mayor eficiencia de gelificación y mayor grado de entrecruzamiento(2).

El quitosano empleado tiene un alto peso molecular y % DD, 720kDa y 93,1% respectivamente. Por lo tanto el método de gelación iónica ha actuado de manera efectiva en la interacción de quitosano y TPP resultando en la formación de nanopartículas.

Una de las características visibles que indican la presencia de nanopartículas es el color opalescente de la solución al instante en que el TPP tiene contacto con la solución de quitosano, Figura 4.1.

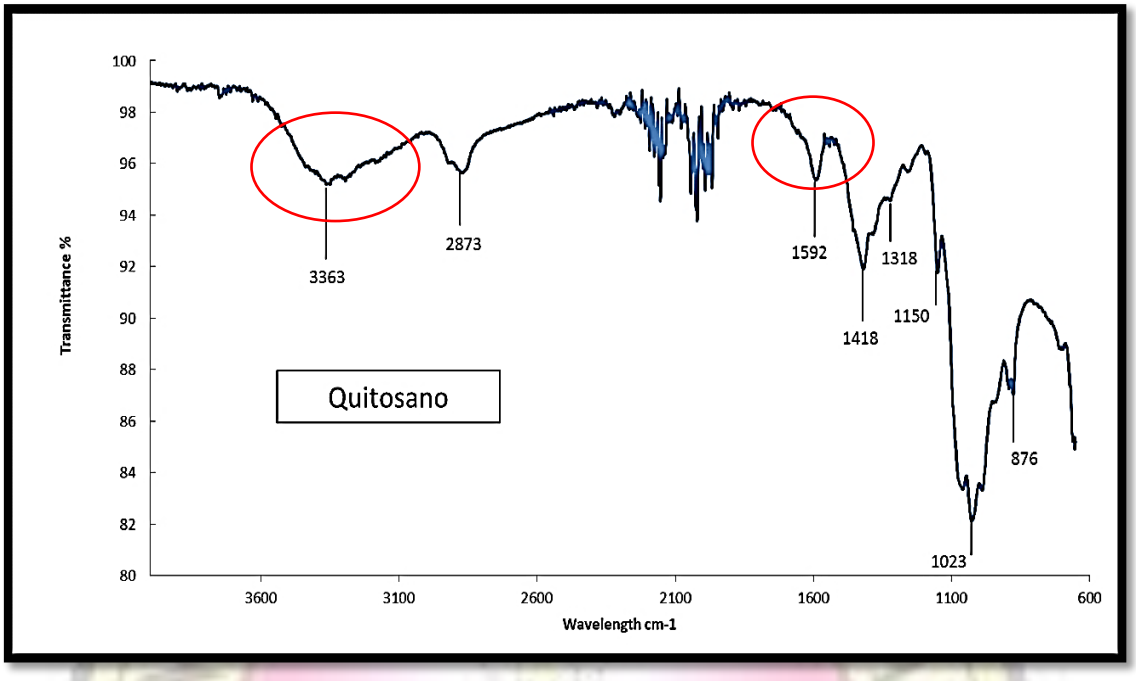
Figura 4.1 Aspecto opalescente de la solución quitosano-TPP indicando la presencia de nanopartículas.

4.2. GRADO DE ENTRECRUZAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR

Los estudios FTIR de las nanopartículas de quitosano se desarrollaron para caracterizar la estructura química. Los espectros del quitosano y nanopartículas de quitosano se muestran en la Figura 4.2. El pico a 3363cm^{-1} corresponde a una combinación de los grupos de NH_2 y a las vibraciones de estiramiento del grupo OH del quitosano. La banda a 1592cm^{-1} se le atribuye a los grupos NH_2, los cuales muestran un alto grado de desacetilación del quitosano.

En el espectro de las nanopartículas de quitosano, el pico a 3363cm^{-1} del quitosano se ha expandido en 3174cm^{-1}, probablemente a la formación de enlaces hidrogeno entre el oxígeno del tripolifosfato de sodio y el hidrogeno de los grupos amino del quitosano. La intensidad de NH_2 en el pico de 1592cm^{-1}, el cual puede observarse claramente en el espectro de quitosano puro, disminuye y dos nuevos picos a 1620cm^{-1} y 1529cm^{-1} aparecen indicando así el entrecruzamiento de los grupos amino del quitosano con el tripolifosfato de sodio.

Así mismo en la Tabla 4.2 se aprecia el grado de entrecruzamiento obtenido por una relación de las áreas 1 y 2, A_1 y A_2, que se indican en el espectro de las nanopartículas de quitosano de la Figura 4.2. Donde el área A_1 representa el área del pico correspondiente a la interacción del grupo de las aminas con los grupos fosfatos del tpp mientras que el área A_2 representa al grupo de aminas restantes. El cálculo de cada área fue realizada en el equipo FTIR. Como se aprecia en la Tabla 4.2, el mayor grado de entrecruzamiento es de 73,78% que corresponde a las concentraciones de 0,1%para el quitosano y 0,2% para el TPP por lo que se puede indicar que 26,22% de aminas no interaccionaron con los grupos fosfatos.



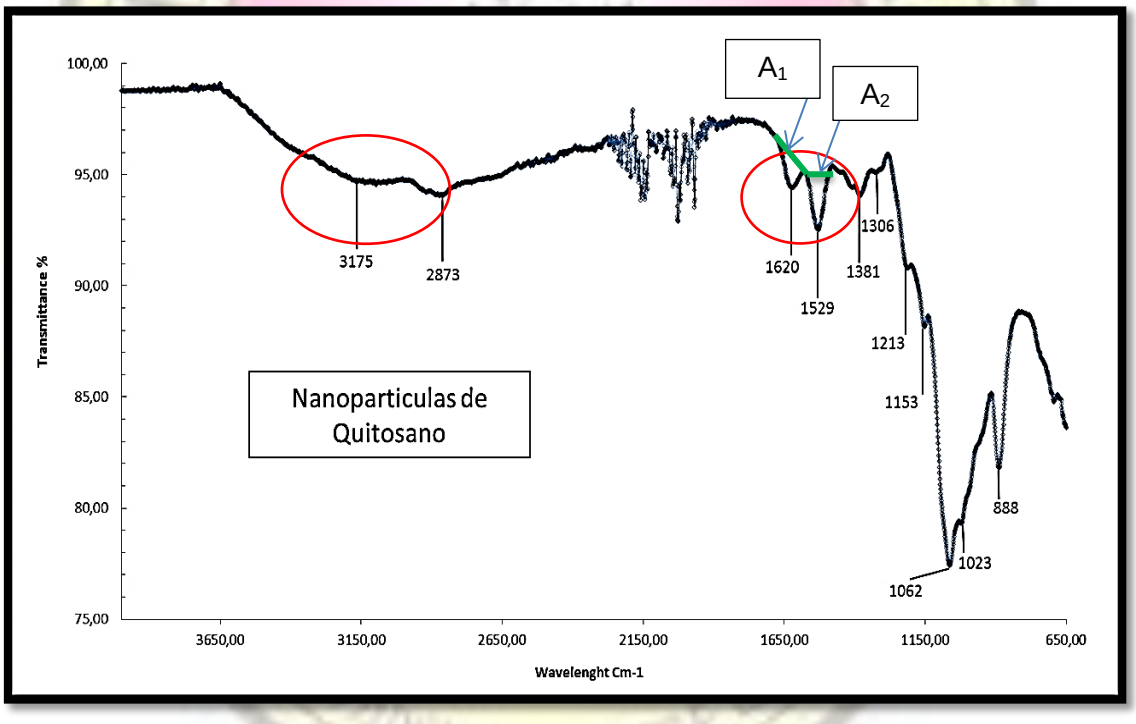


Figura 4.2 Espectro FTIR para quitosano y nanopartículas de quitosano (NP-1.1).

Tabla 4.2

Grado de entrecruzamiento de las nanopartículas en base a la relación de los grupos amino que reaccionaron con los fosfatos del TPP (A_1) y los aminos que no reaccionaron (A_2).

N° Muestra	Concentraciones (%)		Áreas (Tcm-1)		Grado de entrecruzamiento (A1/A2) %
	Quitosano	TPP	A1	A2	
NP-1.1	0,1	0,14	0,3778	0,6013	62,83
NP-1.2	0,1	0,14	0,3444	0,5652	60,93
NP-2.1	0,3	0,14	0,5601	0,8006	69,96
NP-2.2	0,3	0,14	0,4223	0,7961	53,05
NP-3.1	0,1	0,2	0,5026	0,6812	73,78
NP-3.2	0,1	0,2	0,3712	0,5154	72,02
NP-4.1	0,3	0,2	0,3496	0,7256	48,18
NP-4.2	0,3	0,2	0,4493	0,895	50,20

4.3. TAMAÑO DE NANOPARTICULA - DLS

Las nanopartículas preparadas luego de la liofilización se muestran como un polvo de color blanco. En la Tabla 4.3 se muestra el principal tamaño del diámetro hidrodinámico (tamaño promedio calculado por el equipo DLS) de las nanopartículas con su respectivo grado de polidispersidad (%Pd) a las concentraciones de quitosano y TPP utilizados.

Los diferentes tamaños obtenidos del análisis DLS son homogéneos de acuerdo al porcentaje de polidispersidad (≤15%)(50). As mismo los datos

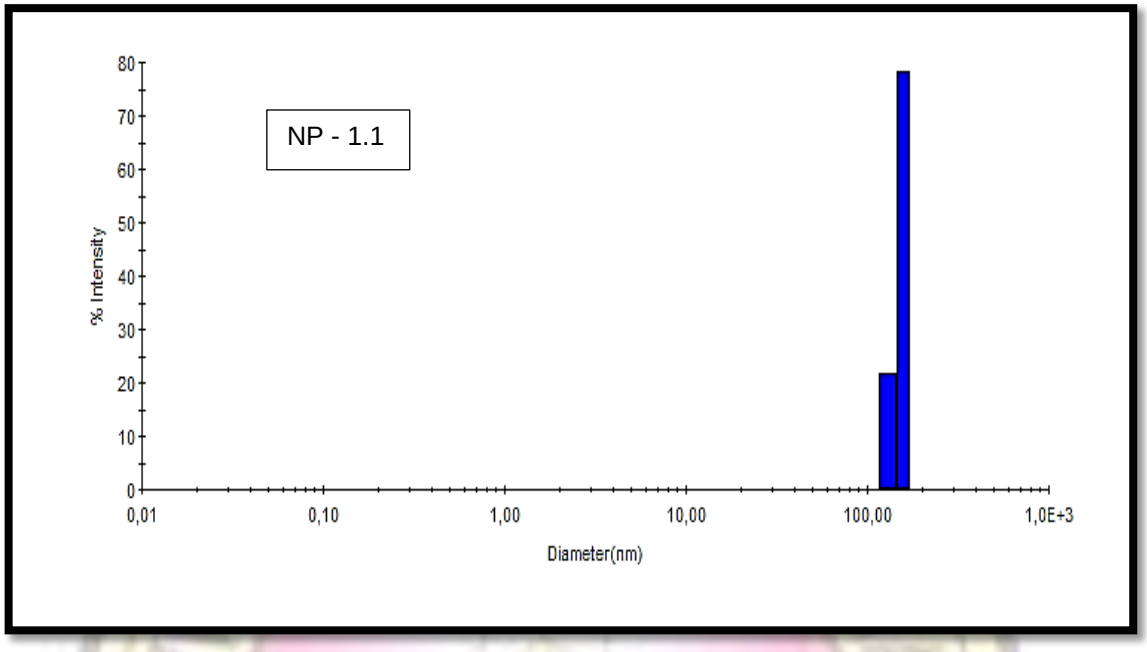
mostrados en la tabla indican que el tamaño de las nanopartículas se encuentran en un rango de 120nm – 252nm.

En las figuras 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6 se pueden apreciar la distribución de las nanopartículas. De acuerdo a la representación gráfica del equipo DLS estas distribuciones presentan un comportamiento monomodal monodisperso, lo cual quiere decir que existe un solo conjunto de tamaños de nanopartículas virtualmente idénticos en su tamaño.

Tabla 4. 3

Tamaño de nanopartículas a las diferentes concentraciones de CS y TPP

No de Muestra	%CS	%TPP	Diámetro (nm)									
				%Pd		%Pd		%Pd		%Pd		%Pd
NP-1.1	0,1	0,14	**156,27 ± 7,1**	9,1	**206,9 ± 12,1**	11,7	**198,4 ± 14,4**	14,5	**189,8 ± 10,8**	11,4	**185,2 ± 12,6**	13,6
NP-2.1	0,3	0,14	**185 ± 11**	11,9	**187,8 ± 11,4**	12,1	**193,7 ± 10,5**	10,5	**190 ± 10,8**	11,3	**198 ± 9**	9
NP-3.1	0,1	0,2	**179,4 ± 10,5**	11,7	**222 ± 13,7**	12,3	**199,8 ± 8,39**	8,4	**177,6 ± 10,2**	11,5	**185,6 ± 11**	11,8
NP-4.1	0,3	0,2	**191,9 ± 10,5**	11	**239,4 ± 13,8**	11,5	**222,6 ± 12,4**	11,1	**252,2 ± 11,1**	8,8	**234,9 ± 13,9**	11,8
NP-1.2	0,1	0,14	**199 ± 16,5**	16,6	**224 ± 12,8**	11,4	**218 ± 13,7**	12,5	**214 ± 12,6**	11,9	**216 ± 13,2**	13,2
NP-2.2	0,3	0,14	**194,8 ± 10,9**	10,2	**120 ± 13,8**	11,5	**238 ± 13,9**	11,7	**240 ± 13,7**	11,3	**236 ± 13,9**	11,8
NP-3.2	0,1	0,2	**167,8 ± 6,34**	7,6	**182 ± 10,8**	11,9	**171 ± 8,18**	9,6	**167,8 ± 6,9**	8,2	**161,6 ± 4,14**	5,1
NP-4.2	0,3	0,2	**192,9 ± 10,4**	10,7	**238,2 ± 13,8**	11,6	**236 ± 13,9**	11,8	**240,5 ± 13,7**	11,4	**237 ± 13,9**	11,7



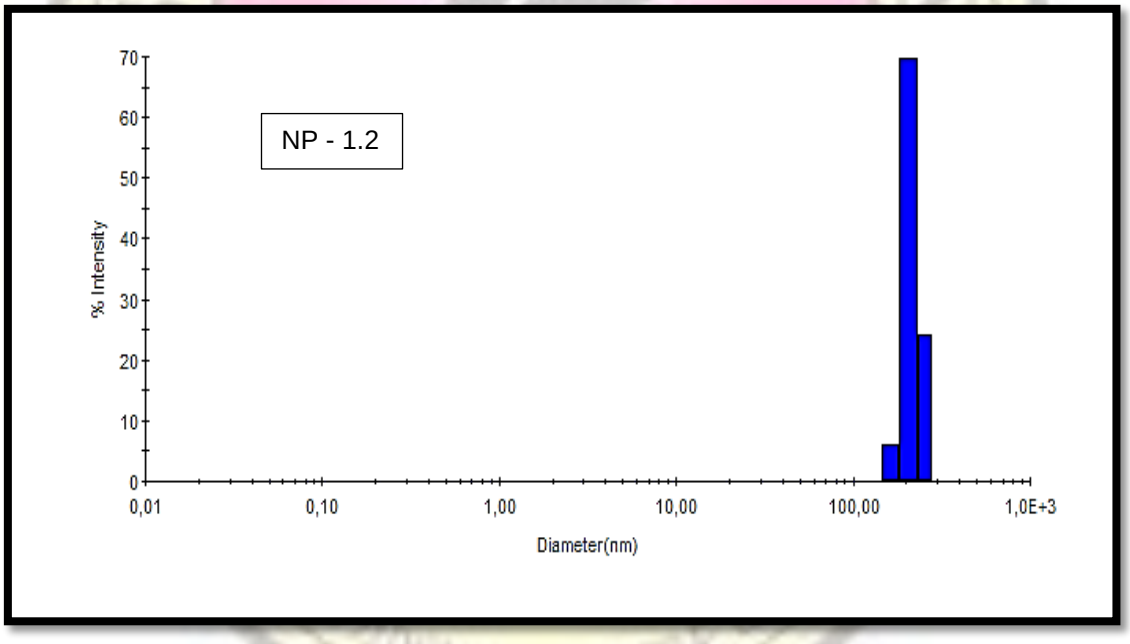
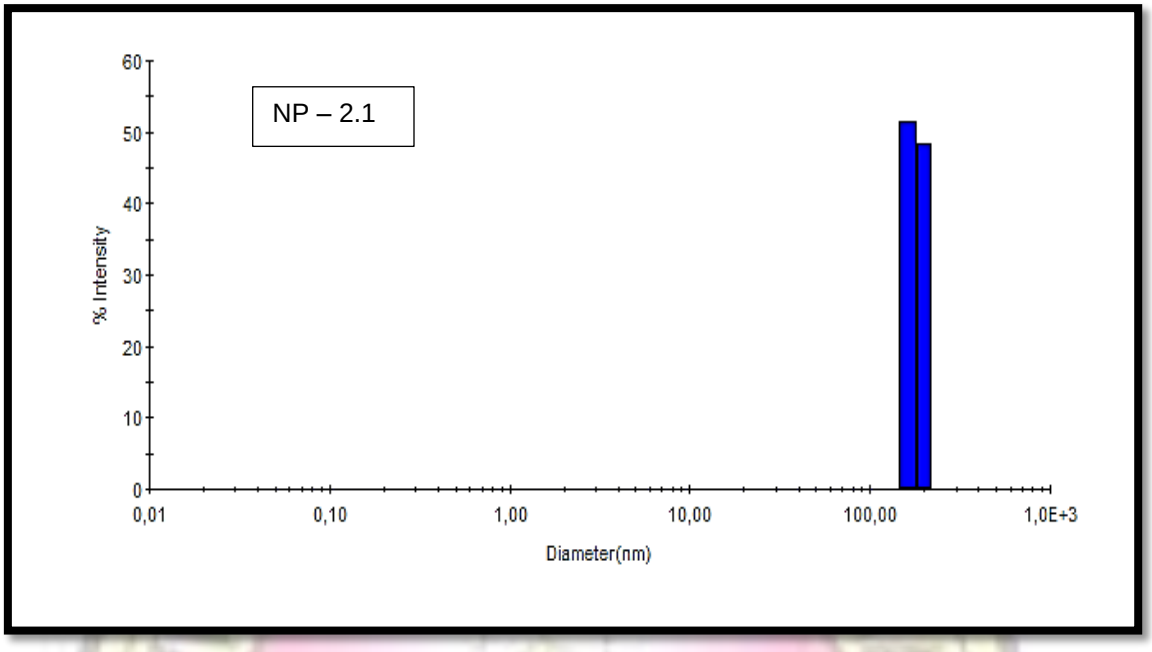


Figura 4. 3 Distribución de tamaño e histograma monomodal monodisperso de las muestras NP–1.1 y NP-1.2 (0,1%CS; 0,14%TPP) 156,27nm y 199nm



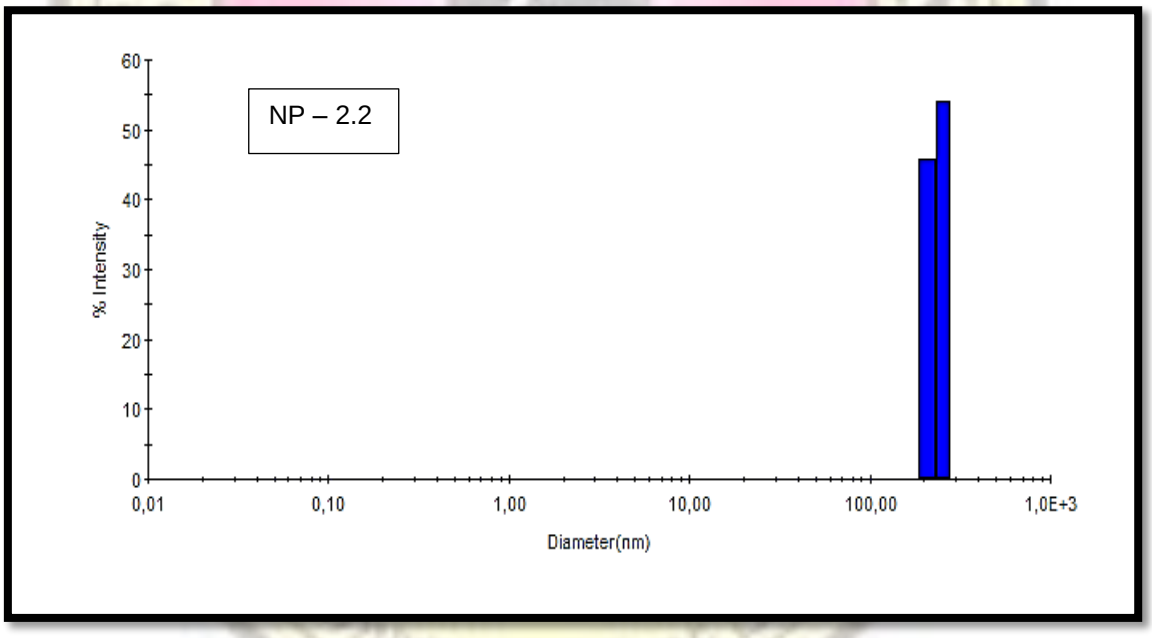
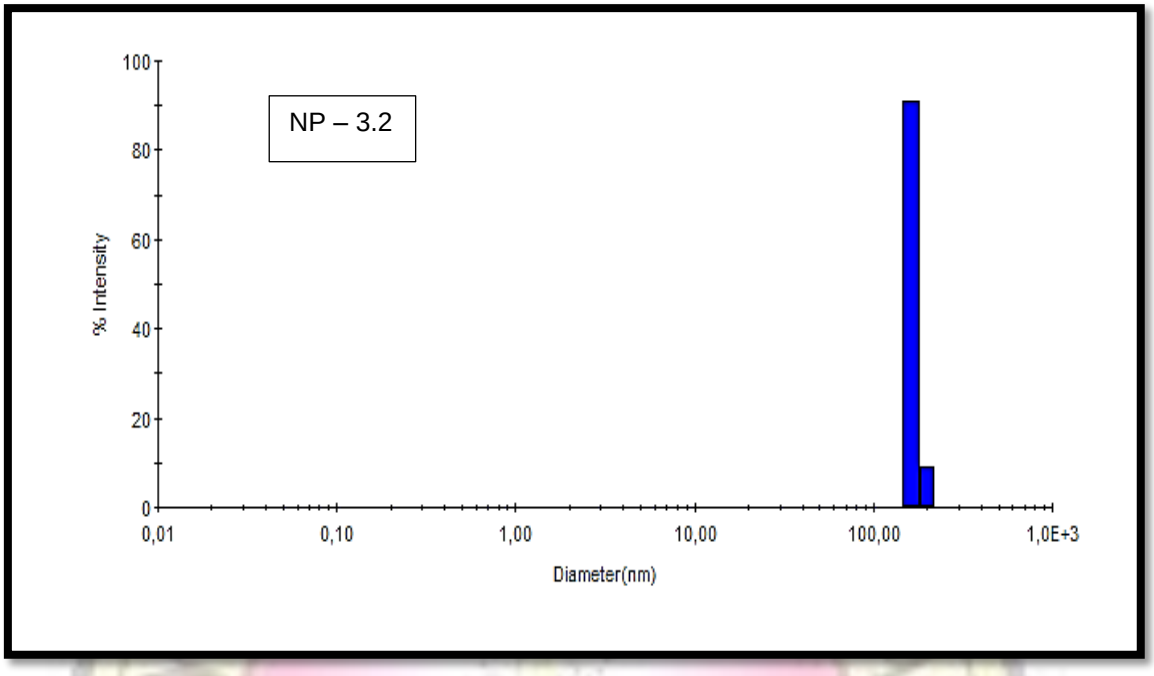


Figura 4. 4 Distribución de tamaño e histograma monomodal monodisperso de las muestras NP–2.1 y NP-2.2 (0,3%CS; 0,14%TPP) 185nm y 238nm



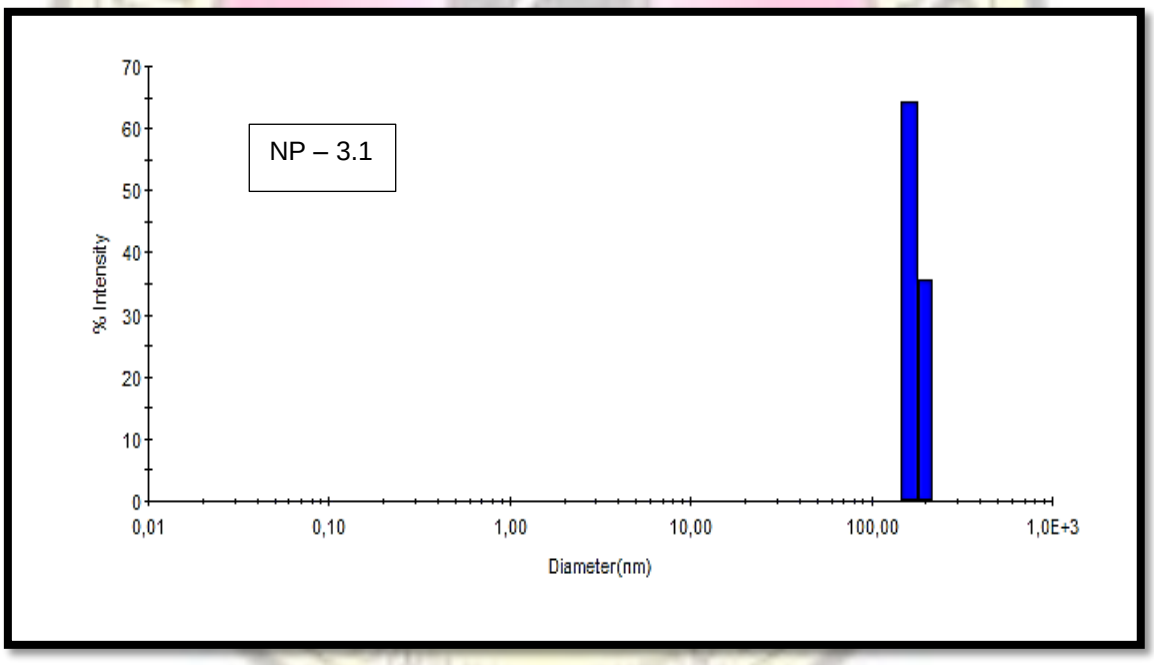
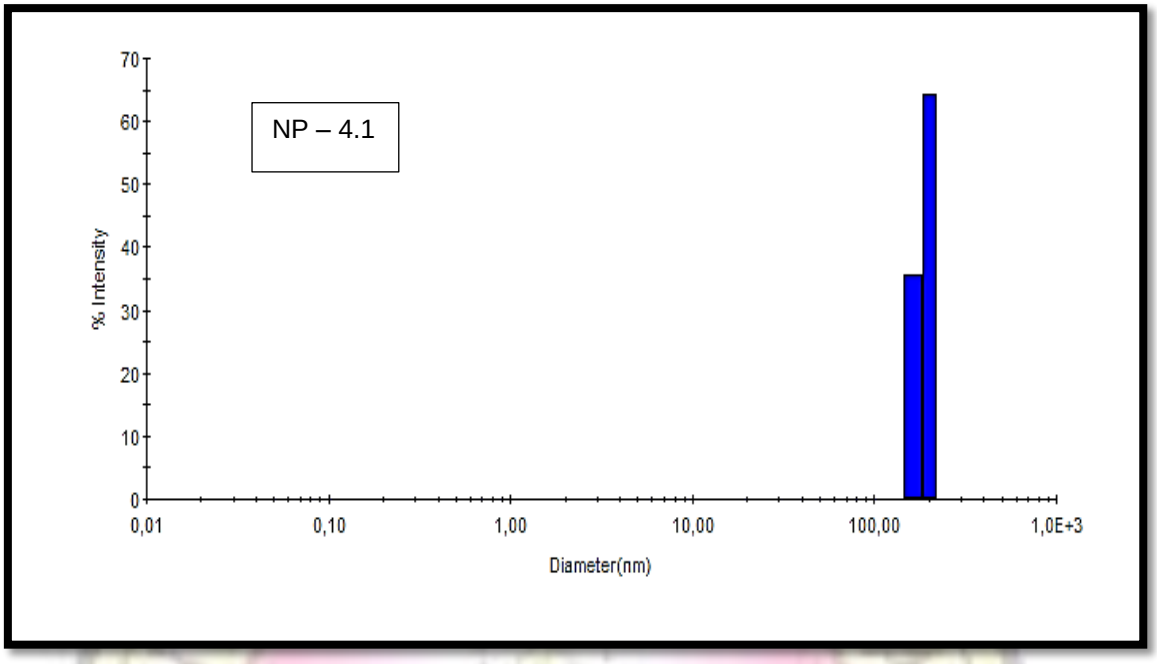


Figura 4. 5 Distribución de tamaño e histograma monomodal monodisperso de las muestras NP–3.1 y NP-3.2 (0,1%CS; 0,2%TPP) 167,8nm y 179,4nm



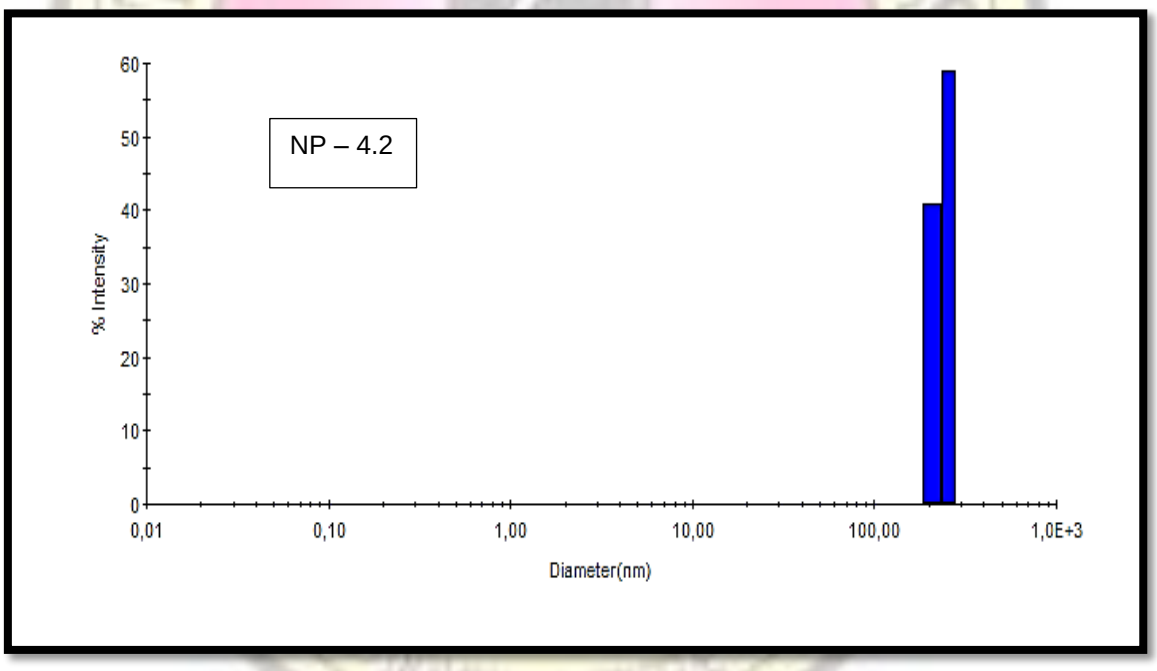


Figura 4. 6 Distribución de tamaño e histograma monomodal monodisperso de las muestras NP–4.1 y NP-4.2 (0,3%CS; 0,2%TPP) 191,9nm y 240,5nm

En relación al tamaño de nanoparticula mostrada en la tabla e histogramas se puede indicar que a mayor concentración de TPP el tamaño de nanoparticula aumenta.

4.4. MORFOLOGIA DE LAS NANOPARTICULAS

Las características morfológicas de las nanopartículas de quitosano fueron examinadas usando el microscopio electrónico de barrido SEM. La figura 4.7 muestra la morfología de las nanopartículas según los dos métodos de preparación de muestra utilizados. Las nanopartículas liofilizadas muestran una forma esférica y se encuentran aglomeradas, esto último es probable a las condiciones experimentales en el uso de las muestras durante la preparación donde la presencia de agua luego de la liofilización es considerada(51). Las nanopartículas no liofilizadas que fueron secadas a temperatura ambiente durante 2 días muestran al igual que las liofilizadas una forma esférica con la diferencia que estas pueden estar aglomeradas y aisladas.

Es importante indicar que el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas medidas por DLS muestran un tamaño mayor en comparación al tamaño en las fotografías tomadas por SEM debido a la alta capacidad de hinchazón (absorción) de las nanopartículas de quitosano(52). SEM provee un tamaño de partículas deshidratadas mientras que las medidas en DLS se realizan en nanopartículas en suspensión (humectadas).

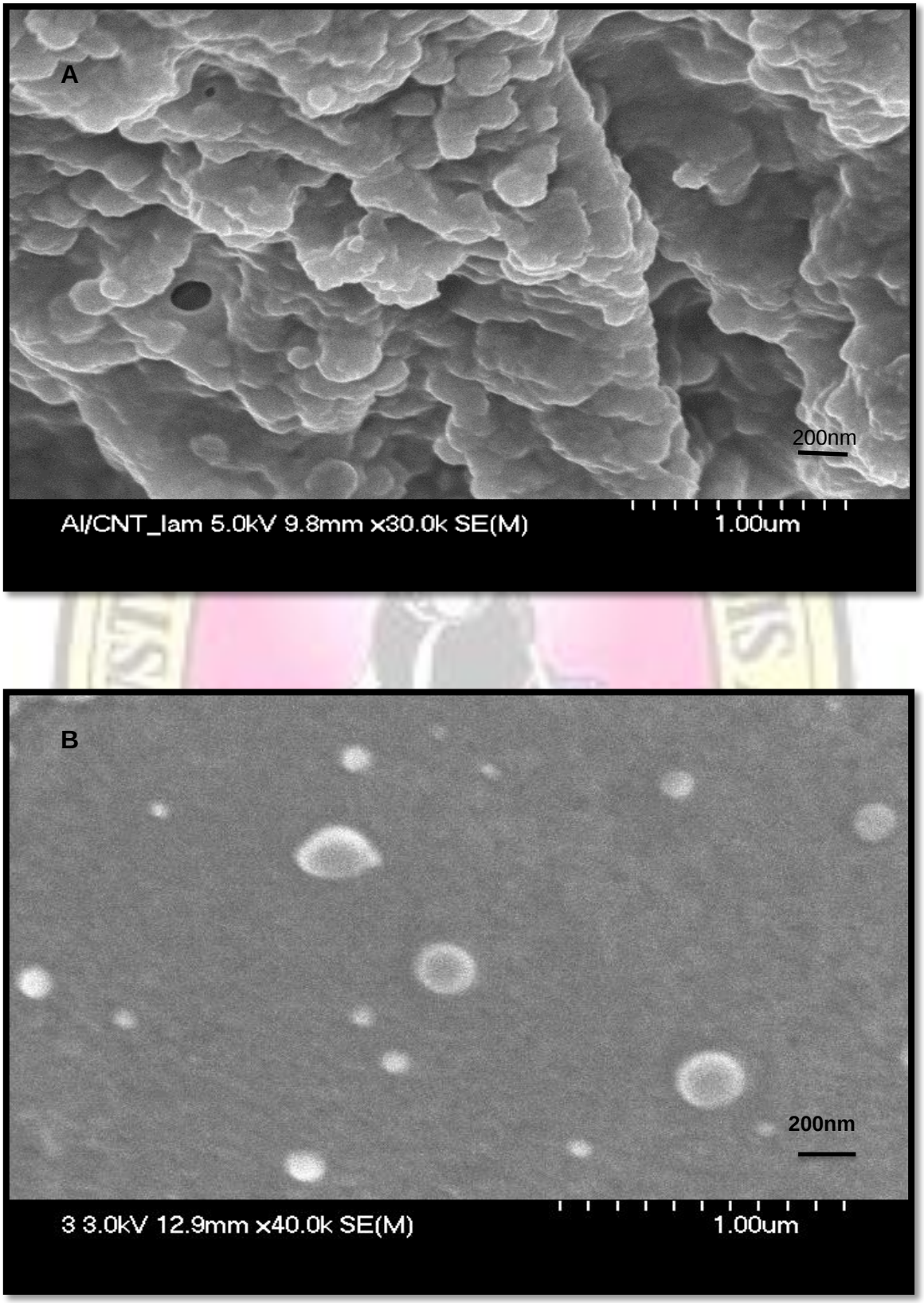


Figura 4.7 Fotografías SEM (A) Nanopartículas liofilizadas y (B) Nanopartículas no liofilizadas secadas a temperatura ambiente por 2 días.

4.5. ANALISIS ESTADISTICO – TABLA ANOVA

El análisis estadístico realizado en el programa STATGRAPHICS Centurion considera los datos que se muestran en la Tabla 4.4 y 4.5. También se consideraron 10 repeticiones para cada combinación y el análisis se realizó a un nivel de confianza de 95%.

Tabla 4. 4

Atributos del diseño

Factores	Bajo	Alto	Unidades	Continuo
Quitosano	0,1	0,3	%	Sí
TPP	0,14	0,2	%	Sí
Respuestas	**Unidades**			
NPs	nm			

Tabla 4. 5

Matriz de datos para un diseño 2^2 con 10 repeticiones.

N°	%CS	%TPP	Diámetro (nm)									
1	0,1	0,14	156,27	206,9	198,4	189,8	185,2	199	224	218	214	216
2	0,3	0,14	185	187,8	193,7	190	198	194,8	120	238	240	236
3	0,1	0,2	179,4	222	199,8	177,6	185,6	167,8	182	171	167,8	161,6
4	0,3	0,2	191,9	239,4	222,6	252,2	234,9	192,9	238,2	236	240,5	237

Luego de introducidos los datos se obtuvo la siguiente información:

Tabla 4. 6

Análisis de varianza ANOVA para las nanopartículas (NPs)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Quitosano	9120,4	1	9120,4	22,54	0,0000
B:TPP	48,4	1	48,4	0,12	0,7315
AB	2856,1	1	2856,1	7,06	0,0117
Error total	14566,6	36	404,628		
Total (corr.)	26591,5	39			

R-cuadrada = **45,2208** porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 40,6559 porciento

Error estándar del est. = 20,1154

Error absoluto medio = 15,76

Estadístico Durbin-Watson = 1,78713 (P=0,3112)

Auto correlación residual de Lag 1 = 0,035486

Donde claramente en la Tabla 4.6 se puede apreciar que la influencia del quitosano en el tamaño de las nanopartículas tiene una gran significancia (Valor P <0,05), seguida por la influencia de la interacción de quitosano y TPP (Valor P <0,05), ambos en color rojo. En el caso del TPP no se puede decir la mismo, su influencia no es tan significativa (Valor P > 0,05). En la Tabla 4.7 se puede apreciar los efectos estimados en nm a las nanopartículas (NPs) de cada uno de los factores. Para el quitosano, este influye en 30,2 el tamaño de nanopartícula, es decir que a mayor concentración de quitosano mayor tamaño de nanopartícula. Para el TPP, su influencia es negativa -2,2, la cual puede interpretarse que a mayor concentración de TPP menor será el tamaño de nanopartícula. Y por último, la interacción de quitosano y TPP influye en 16,9 el tamaño de nanopartícula.

Cabe indicar que de acuerdo al R-cuadrada, 45,2208, existen otros factores que influyen en el tamaño de nanopartícula (Ph, agitación, etc.) ya que lo ideal es que R-cuadrado sea mayor a 90 para considerar estos factores como los potencialmente influyentes.

Tabla 4. 7

Efectos estimados para las nanopartículas (NPs nm)

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	206,25	3,18052	
A:Quitosano	30,2	6,36104	1,0
B:TPP	-2,2	6,36104	1,0
AB	16,9	6,36104	1,0

En las Figuras 4.8, 4.9 y 4.10, se muestran los gráficos de Pareto, efectos principales y de interacción para las NPs. Donde en la figura 4.8 se muestra al quitosano e interacción de quitosano y TPP como los factores de mayor significancia en las NPs. En la figura 4.9 se aprecia gráficamente lo explicado en el párrafo anterior acerca de las influencias de quitosano y TPP en el tamaño de NPs; a mayor concentración de quitosano mayor tamaño de nanopartícula y a menor concentración menor tamaño de nanopartícula, a mayor concentración de TPP menor será el tamaño de nanopartícula y menor concentración mayor tamaño. Y en la figura 4.10 se muestra la significancia de la interacción de quitosano y TPP en el tamaño de nanopartículas.

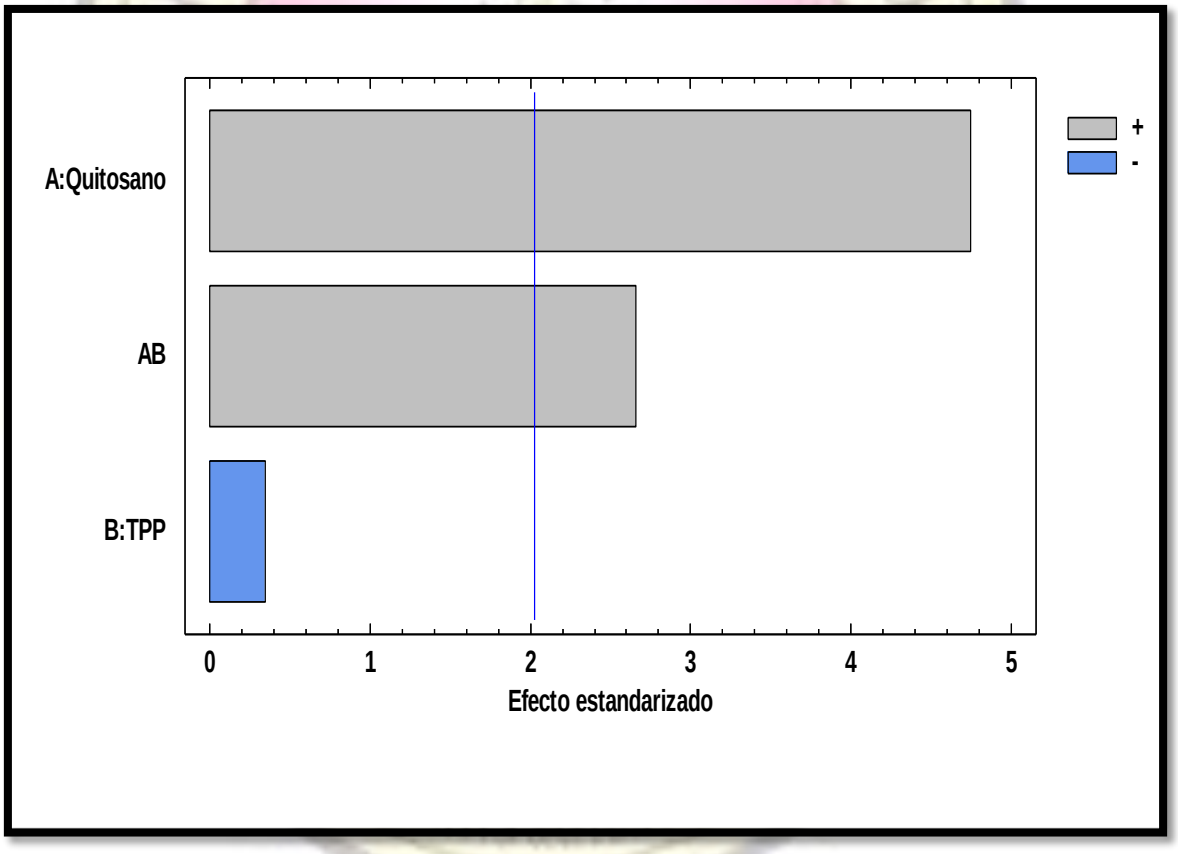


Figura 4.8 Diagrama de Pareto estandarizada para NPs

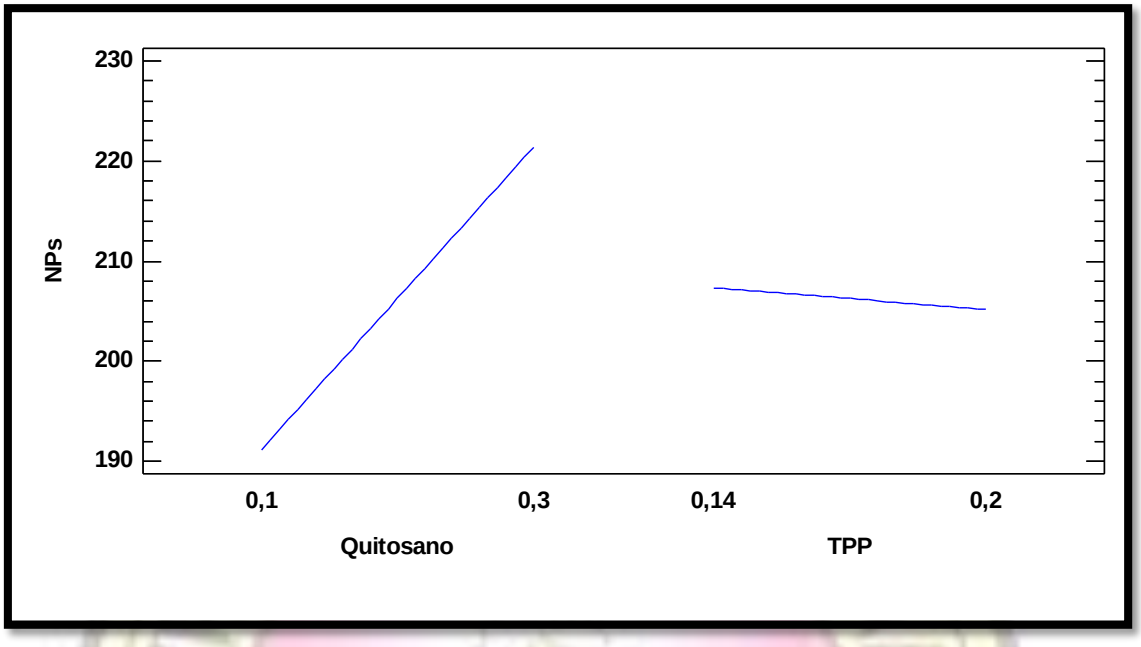


Figura 4.9 Grafica de efectos principales para NPs

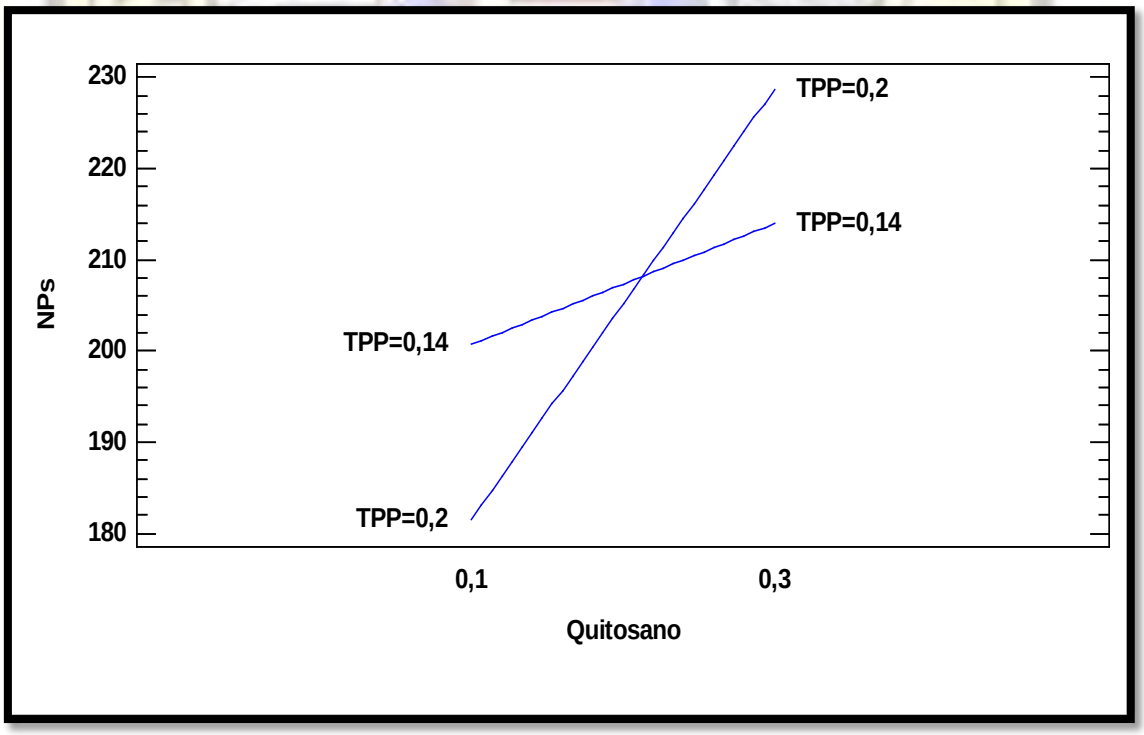


Figura 4.10 Grafica de interacción para NPs

Por último los valores óptimos de concentración de quitosano y TPP en la formación de nanopartículas para obtener el menor tamaño según lo desarrollado en este proyecto se aprecian en la Tabla 4.8. El tamaño óptimo de nanopartícula alcanzado según las concentraciones optimas de quitosano y TPP es de **181,6nm**.

Tabla 4. 8

Optimización de la concentración de quitosano y TPP para un menor tamaño de nanopartícula.

Factor	***% Concentración Bajo***	***%Concentración Alto***	**Óptimo**
Quitosano	0,1	0,3	0,1
TPP	0,14	0,2	0,2

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- Se comprobó la hipótesis de trabajo ya que es posible obtener nanopartículas de quitosano con diferentes distribuciones de tamaño y morfología empleando el método de gelación iónica en relación a parámetros controlados de concentración de quitosano y tripolifosfato de sodio.
- Respecto a la síntesis de las nanopartículas de quitosano se comprobó la eficacia y simplicidad del método de gelación iónica. Así mismo se atribuye el alto grado de desacetilación del quitosano (93,1%) como principal característica que contribuye en la eficacia del método de gelación iónica.
- El análisis de espectroscopia infrarroja indica un comportamiento adecuado en la interacción de los grupos amino del quitosano con los grupos fosfato del tripolifosfato según lo reportado en los trabajos de Ana Valderrama(2), T. Cerchiara(51), Emmanuel Chinedum(53). Se obtuvo un grado de entrecruzamiento de 73,78% con las concentraciones de 0,1% para el quitosano y 0,2% para el TPP.
- Se determinaron los tamaños y distribución de tamaño de las nanopartículas entre los cuales se encontró un rango de 120nm – 252nm como principal diámetro, con una polidispersidad bastante buena (<15%) y una homogeneidad en la distribución de tamaño.
- La morfología de las nanopartículas pueden ser manipuladas de acuerdo al tipo de preparación de la muestra para su análisis por SEM, estas pueden encontrase en forma aglomerada si se aplica una liofilización

bajo presión o como nanopartículas aisladas si estas se dejan secar a temperatura ambiente (no liofilización)

- Del análisis estadístico se puede concluir que el factor más influyente en el tamaño de las nanopartículas de este trabajo es la concentración de quitosano. A mayor concentración de quitosano mayor será el tamaño de nanopartícula y a menor concentración menor será el tamaño de nanopartícula.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Carolina Gomez - Gaete. Nanoparticulas polimericas: Tecnologia y aplicaciones farmaceuticas. Soc Farmacol Chile. abril de 2014;7:7-16.

2. Rodríguez Hamamura N, Valderrama Negrón A, Alarcón Cavero H, López Milla A. Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. Rev Soc Quím Perú. octubre de 2010;76(4):336-54.

3. Tang Z-X, Qian J-Q, Shi L-E. Preparation of chitosan nanoparticles as carrier for immobilized enzyme. Appl Biochem Biotechnol. enero de 2007;136(1):77-96.

4. Gupta D, Haile A. Multifunctional properties of cotton fabric treated with chitosan and carboxymethyl chitosan. Carbohydr Polym. 1 de mayo de 2007;69(1):164-71.

5. Dong Y, Ng WK, Shen S, Kim S, Tan RBH. Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. Carbohydr Polym. 15 de mayo de 2013;94(2):940-5.

6. Pastor de Abram, Ana. Quitina y quitosano: Obtencion, carcaterizacion y aplicaciones. 1a. ed. Lima-Peru: Fondo editorial de la Pontificia Universidad Catolica del Peru; 2004. 312 p.

7. Sivakami MS, Gomathi T, Venkatesan J, Jeong H-S, Kim S-K, Sudha PN. Preparation and characterization of nano chitosan for treatment wastewaters. Int J Biol Macromol. junio de 2013;57:204-12.

8. Goycoolea F. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. Monogr Real Acad Nac Farm [Internet]. 21 de octubre de 2009 [citado 27 de agosto

de 2015];0(0). Recuperado a partir de: http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/990

9. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Prog Polym Sci. julio de 2006;31(7):603-32.

10. Dutta, Pradip Kumar, Dutta, Joydeep, Tripathi, VS. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. J Sci Ind Res. enero de 2004;63:20-31.

11. Bough WA, Salter WL, Wu ACM, Perkins BE. Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. I. Chemical composition, viscosity, and molecular-weight distribution of chitosan products. Biotechnol Bioeng. 1 de diciembre de 1978;20(12):1931-43.

12. Muzarelli R.A.A. Chitin. Pergamon Press Oxf. 1977;

13. Maghami GG, Roberts GAF. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. Makromol Chem. 1 de enero de 1988;189(1):195-200.

14. Moorjani MN. Parameters affecting the viscosity of chitosan from prawn waste.

15. Heux L, Chauve G, Bonini C. Nonflocculating and Chiral-Nematic Self-ordering of Cellulose Microcrystals Suspensions in Nonpolar Solvents. Langmuir. 1 de octubre de 2000;16(21):8210-2.

16. Yi H, Wu L-Q, Bentley WE, Ghodssi R, Rubloff GW, Culver JN, et al. Biofabrication with chitosan. Biomacromolecules. diciembre de 2005;6(6):2881-94.

17. Chawla SP, Kanatt SR, Sharma AK. Chitosan. En: Ramawat KG, Mérillon J-M, editores. Polysaccharides [Internet]. Springer International Publishing; 2014 [citado 27 de agosto de 2015]. p. 1-24. Recuperado a partir de: http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-319-03751-6_13-1

18. M. Rinaudo GP. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. Polymer. 1999;40(25):7029-32.

19. Trang Si Trung WWT-H. Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation. Bioresour Technol. 2006;97(4):659-63.

20. Guibal E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. Sep Purif Technol. 15 de julio de 2004;38(1):43-74.

21. Kas HS. Chitosan: Properties, preparations and application to microparticulate systems. J Microencapsul. 1 de enero de 1997;14(6):689-711.

22. Gavhane Yogeshkumar N., Gurav Atul S., Yadav Adhikrao V. Chitosan and Its Applications: A review of Literature. Int J Res Pharm Biomed Sci. marzo de 2013;4:312-31.

23. Raafat D, Sahl H-G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. Microb Biotechnol. 1 de marzo de 2009;2(2):186-201.

24. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. ArXiv08013280 Phys [Internet]. 21 de enero de 2008 [citado 8 de septiembre de 2015]; Recuperado a partir de: http://arxiv.org/abs/0801.3280

25. Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. Adv Drug Deliv Rev. 1 de diciembre de 2006;58(14):1456-9.

26. Fahlman BD. Materials Chemistry [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2011 [citado 8 de septiembre de 2015]. Recuperado a partir de: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-0693-4

27. Shekunov BY, Chattopadhyay P, Tong HHY, Chow AHL. Particle size analysis in pharmaceutics: principles, methods and applications. Pharm Res. febrero de 2007;24(2):203-27.

28. Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. Toxicol Sci Off J Soc Toxicol. abril de 2006;90(2):296-303.

29. Feng S-S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. Expert Rev Med Devices. septiembre de 2004;1(1):115-25.

30. Brodbeck WG, Shive MS, Colton E, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson JM. Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells. J Biomed Mater Res. 15 de junio de 2001;55(4):661-8.

31. StephanT Stern, ScottE McNeil, AnilK Patri, MarinaA Dobrovolskaia. Preclinical Characterization of Engineered Nanoparticles Intended for Cancer Therapeutics. En: Nanotechnology for Cancer Therapy [Internet]. CRC Press; 2006 [citado 8 de septiembre de 2015]. p. 105-37. Recuperado a partir de: http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420006636.ch7

32. Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. J Controlled Release. 16 de agosto de 2007;121(1–2):3-9.

33. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 15 de marzo de 2007;73(6):1712-20.

34. Powers KW, Palazuelos M, Brown SC, Roberts SM. Characterization of Nanomaterials for Toxicological Evaluation. En: Sahu SC, Casciano DA, editores. Nanotoxicity [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2009 [citado 8 de septiembre de 2015]. p. 1-27. Recuperado a partir de: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470747803.ch1/summary

35. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. Environ Health Perspect. febrero de 2006;114(2):165-72.

36. HUNTER RJ. Chapter 2 - Charge and Potential Distribution at Interfaces. En: HUNTER RJ, editor. Zeta Potential in Colloid Science [Internet]. Academic Press; 1981 [citado 13 de noviembre de 2015]. p. 11-58. Recuperado a partir de: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123619617500067

37. Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. J Appl Polym Sci. 3 de enero de 1997;63(1):125-32.

38. Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, Xie T, Zhou GL, Zhan XR, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. Int J Nanomedicine. 2011;6:765-74.

39. Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. Adv Drug Deliv Rev. 31 de enero de 2010;62(1):59-82.

40. López-León T, Carvalho ELS, Seijo B, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. J Colloid Interface Sci. 15 de marzo de 2005;283(2):344-51.

41. Sovan Lal Pal, Utpal Jana, P. K. Manna, G.P. Mohanta, R. Manavalan. Nanoparticle: An overview of preparation and characteriztion. J Appl Pharm Sci. 6 de agosto de 2011;1:228-34.

42. Redhead HM, Davis SS, Illum L. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. J Control Release Off J Control Release Soc. 23 de febrero de 2001;70(3):353-63.

43. A. Cuadros-Moreno, R. Casañas Pimentel, E. San Martin-Martinez, J. Yañes Fernandez. Dispersión de luz dinámica en la determinacián de tamaño de nanoparticulas poliméricas. Lati-Am J Phys Educ. 4 de diciembre de 2014;8:4314,1-4314,5.

44. Liu L, Cai X, Zhang J, Xu C. Particle-size Measurements in a Micro-channel with Image Dynamic Light Scattering Method. Procedia Eng. 2015;102:904-10.

45. Xu C, Cai X, Zhang J, Liu L. Fast nanoparticle sizing by image dynamic light scattering. Particuology. abril de 2015;19:82-5.

46. Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mäder K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. J Control Release Off J Control Release Soc. 5 de marzo de 2004;95(2):217-27.

47. Cantor CR., Schimmel PR. Biophysical chemistry: Part II 'Techniques for the study of biological structure and function'. Biochem Educ. 1 de octubre de 1981;9(4):157-157.

48. Jiang X, Jiang J, Jin Y, Wang E, Dong S. Effect of colloidal gold size on the conformational changes of adsorbed cytochrome c: probing by circular dichroism, UV-visible, and infrared spectroscopy. Biomacromolecules. febrero de 2005;6(1):46-53.

49. Lin P-C, Lin S, Wang PC, Sridhar R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. Biotechnol Adv. julio de 2014;32(4):711-26.

50. Wyatt Technology Corporation. DYNAMICS User's Guide.

51. Cerchiara T, Abruzzo A, di Cagno M, Bigucci F, Bauer-Brandl A, Parolin C, et al. Chitosan based micro- and nanoparticles for colon-targeted delivery of

vancomycin prepared by alternative processing methods. Eur J Pharm Biopharm. mayo de 2015;92:112-9.

52. Aktaş Y, Andrieux K, Alonso MJ, Calvo P, Gürsoy RN, Couvreur P, et al. Preparation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor. Int J Pharm. 25 de julio de 2005;298(2):378-83.

53. Odimegwu DC. IONICALLY CROSS-LINKED CHITOSAN/TRIPOLYPHOSPHATE MICROPARTICLES FOR THE CONTROLLED DELIVERY OF PYRIMETHAMINE, AN ANTIPROTOZOAL. Ibnosina J Med Biomed Sci. 20 de abril de 2011;3(3):77-88.