

Encapsulación de Biomoléculas Usando Polímeros Naturales: “Un Nuevo Enfoque en la Entrega de Fármacos en Medicina”

Dr. Andrónico Neira-Carrillo¹ (BQ; PhD), Diego Yáñez Muñoz¹ (DVM), Paula Aguirre Zazzali¹ (DVM), Yazmín Amar Marini¹ (DVM), Sonia Vidal Vilches¹ (IBM), Rodrigo Egaña Palma¹ (DVM).

¹Laboratorios de Materiales Bio-relacionados (CIMAT) y Síntesis y Caracterización de Polímeros Funcionalizados y Biomoléculas (POLYFORMS), Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Avda. Santa Rosa 11.735, La Pintana, Santiago, Chile.
Email: aneira@uchile.cl

Resumen

El uso de polímeros naturales en el área biomédica ha sido empleado por décadas en diferentes aplicaciones. En este artículo se destaca la importancia del desarrollo de la formulación de micropartículas como un nuevo sistema de entrega de fármacos, agentes encapsulantes de drogas, células, tejidos y/o diversas biomoléculas, sus perspectivas como futuros biomateriales y sistemas de liberación controlada de fármacos. Estas propiedades se basan en las múltiples y favorables propiedades que poseen los polímeros naturales dentro de las cuales destaca la biocompatibilidad, biodegradabilidad y ausencia de toxicidad, entre otras. Presentamos un resumen de resultados parciales obtenidos por algunos estudiantes durante sus memorias de título de pregrado y/o tesis de posgrado desarrollados en los laboratorios de Materiales Bio-relacionados (CIMAT) y de Síntesis y Caracterización de Polímeros Funcionalizados y Biomoléculas (POLYFORMS) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Palabras clave: Polímeros naturales, quitosano, alginato, micropartículas, encapsulación.

1. Introducción

Los polímeros son macromoléculas formadas por cientos o miles de unidades básicas funcionales denominadas monómeros. Los polímeros pueden ser de naturaleza sintética, artificial y/o natural; estos últimos, provenientes directamente del reino animal o vegetal, presentan variadas propiedades y usos, destacándose en el sector farmacéutico, agrícola, alimenticio y textil. En los últimos años, los polímeros naturales o biopolímeros han adquirido gran importancia en el área biomédica, especialmente en el desarrollo de nuevas terapias celulares (Cabané y cols. 2011), donde se utilizan para proteger y contener células y/o tejidos viables en membranas semipermeables o como agentes

encapsulantes y transportadores de diversos fármacos y principios activos.

Un polímero es apto para cumplir estas funciones cuando reúne ciertas características tales como: biocompatibilidad, biodegradabilidad, resistencia mecánica, estabilidad química, baja toxicidad, etc. Estas propiedades físico-químicas en conjunto con la aprobación por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de América (FDA, por su sigla en inglés) han permitido en la última década un aumento en la tendencia de la encapsulación utilizando polímeros naturales. Entre la gran gama de polímeros naturales existentes y utilizados, dos destacan por sus características, usos y su potencial: el quitosano y el alginato.

El quitosano es un biopolímero catiónico lineal obtenido por la desacetilación parcial de la quitina mediante hidrólisis alcalina a altas temperaturas. La quitina, segundo biopolímero en abundancia después de la celulosa a nivel mundial, es un polisacárido estructural del exoesqueleto de los crustáceos, presente también en insectos, hongos, levaduras y moluscos. El quitosano posee un número variado de aplicaciones en diversas áreas, especialmente en el área biomédica, dada su alta biocompatibilidad y baja toxicidad (Mena y cols. 2013, Fernández y cols. 2012, Alburquenque y cols. 2010, Sáenz y cols. 2009, Neira-Carrillo y cols. 2008, Gómez y cols. 2006, Neira-Carrillo y cols. 2005).

Por su parte, los alginatos son sales copoliméricas de ácido algínico, un polisacárido natural formado por cadenas lineales constituidas por dos unidades repetitivas agrupadas en bloques derivadas de los ácidos α -L-gulurónico (G) y β -D-manurónico (M) unidos por enlaces α y β (1 \rightarrow 4) glucosídicos, proveniente de especies de algas marinas pardas como: *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pirifera*. La importancia de los alginatos viene dada por su capacidad para formar hidrocoloides, es decir la capacidad de hidratarse en agua caliente o fría dando lugar a soluciones muy viscosas, dispersiones o geles. Luego, son muy útiles como espesantes, estabilizantes, gelificantes y formadoras de películas. Una de las principales características del alginato es su naturaleza aniónica, es decir, presenta numerosos grupos químicos cargados negativamente, los cuales le permiten formar geles en presencia de cationes divalentes como: calcio, bario y estroncio. En los últimos años, los alginatos han sido estudiados en diferentes campos de aplicación, tales como: sistemas para la liberación de fármacos, remoción de metales pesados, biomineralización de carbonato cálcico, entre otros. Recientemente, en nuestro Laboratorio se ha extraído y purificado alginato desde dos algas marinas presentes en Chile: *Lessonia nigrescens* y *Lessonia trabeculata* (Egaña 2013). Resultados preliminares de encapsulación usando esferas de alginato purificado desde *L. nigrescens* con tejido humano trasplantado de glándula paratiroides (TGPTTh) mostraron excelentes resultados de proliferación celular (viabilidad celular) y de funcionalidad del tejido encapsulado respecto de alginatos comerciales (Egaña 2013).

Tanto el quitosano como el alginato, debido a su alta biocompatibilidad y baja toxicidad son buenos candidatos como agentes encapsuladores y transportadores de fármacos y principios bioactivos.

La Figura 1 a,b muestra la estructura química de los polímeros quitosano y alginato (incluyendo sus relaciones co-monoméricas y formación de los bloques MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4) y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos α (1 \rightarrow 4) según las proporciones de las unidades ácidas α -L-gulurónico (G) y β -D-manurónico (M)(Matsushiro 2001). La forma que adopta el alginato depende de su composición, los bloques MM originan zonas más planas, con estructura semejante a una cinta, mientras que las de GG son diametralmente opuestas.

La encapsulación consiste en el recubrimiento de un compuesto por un material que en la mayoría de los casos es de naturaleza polimérica. Se han descrito diversas metodologías para encapsular, destacándose: el secado por atomización, la gelificación iónica (Figura 2), la polimerización interfacial, la coacervación (Figura 3), entre otras.

La Figura 3 muestra micropartículas de quitosano preparadas por nuestro grupo mediante una modificación del método de coacervación (Van der Lubben y cols. 2001). Las micropartículas presentan una forma esférica, superficie lisa y tamaños entre 5 y 14 μ m (Figura 3a). Además, se observan micropartículas colapsadas, las cuales se forman comúnmente durante el proceso de secado por atomización. Al encapsular la proteína BSA, las micropartículas de quitosano presentan tamaños similares a las micropartículas vacías, por lo tanto no se afecta el proceso de incubación, distribución de tamaño ni la forma de las micropartículas (Figura 3b). Este resultado fue independiente de la concentración de BSA cargada, como se muestra en la Figura 3b, el mismo resultado se obtuvo a una concentración de BSA de 2,5 mg/ml, conservando éstas tanto su esfericidad como su superficie lisa.

En la elección de la técnica de encapsulación a utilizar se debe considerar algunos factores tales como: el agente biológico a encapsular, las aplicaciones del compuesto encapsulado, el tamaño de partícula

requerido, el mecanismo de liberación deseado, el costo, entre otros.

Figura 1. Estructura química de a) quitosano y b) alginato de sodio.

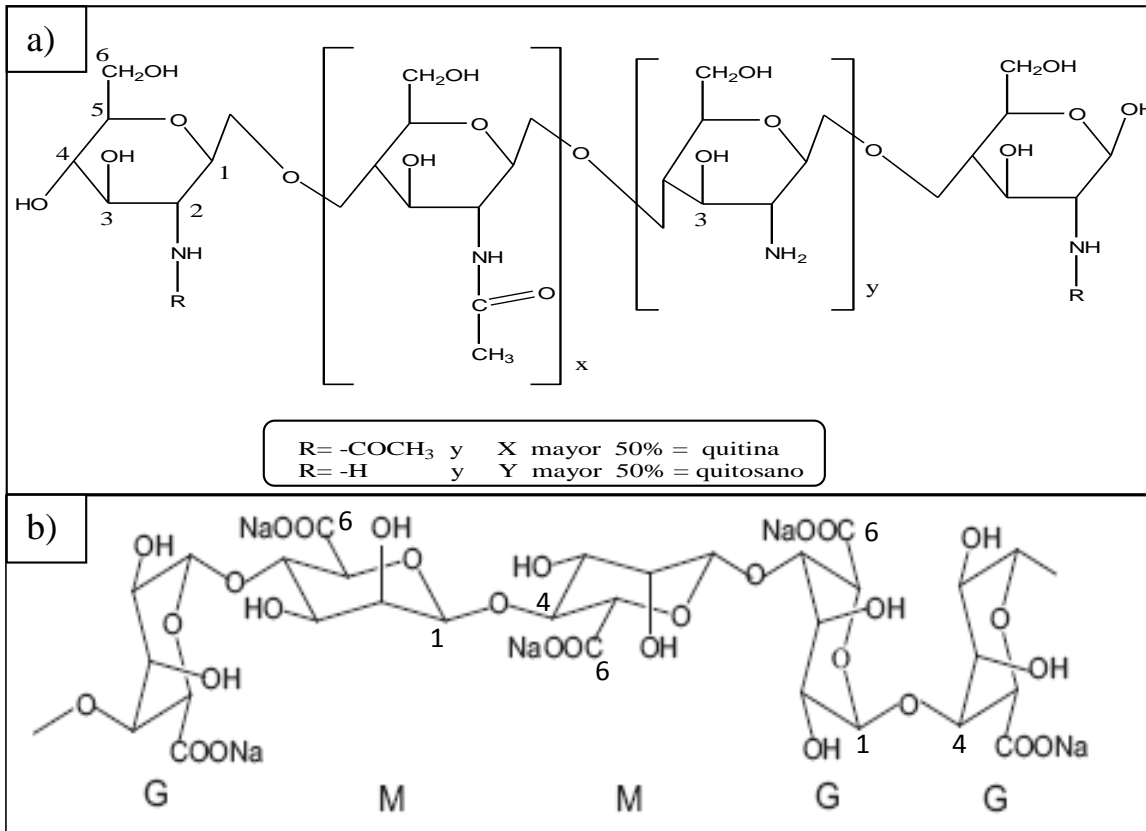


Figura 2. SEM de micropartículas alginato-quitosano obtenidas mediante gelificación iónica y secado por atomización. a) partículas alginato-quitosano cargadas con albúmina sérica bovina (BSA), b) y c) partículas multicapas alginato-quitosano-alginato cargadas con BSA.

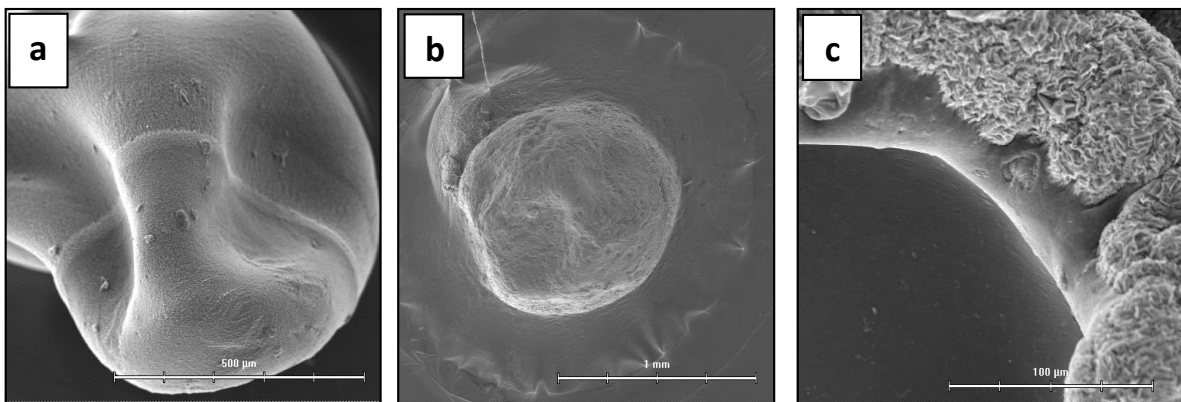
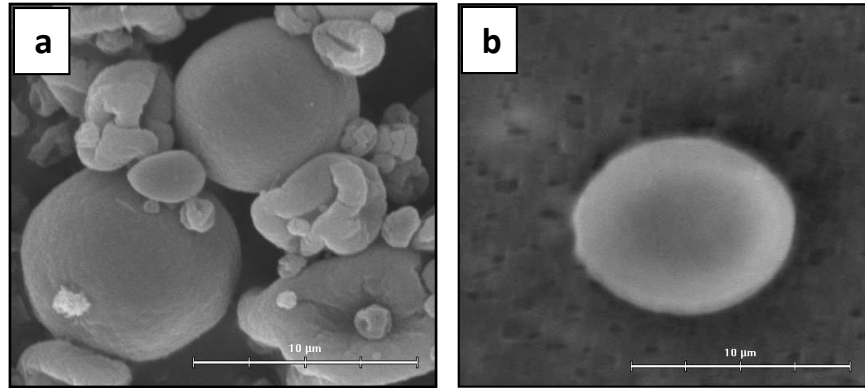


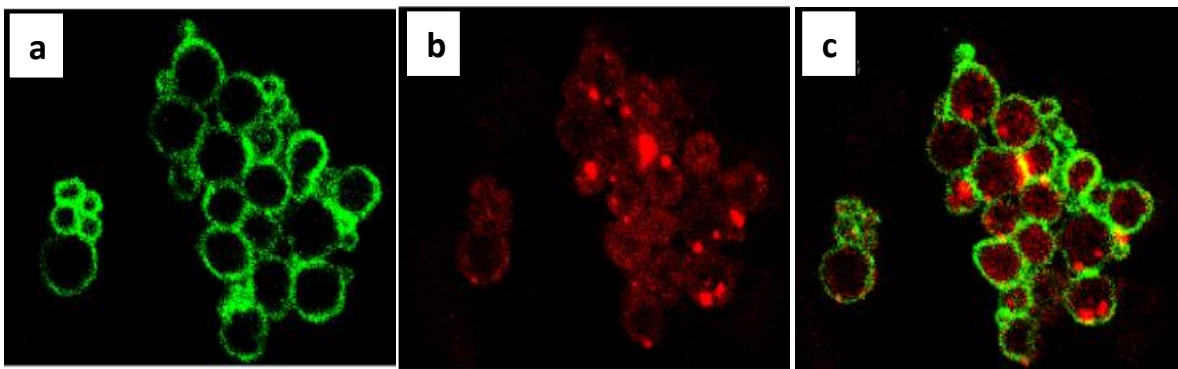
Figura 3. SEM de micropartículas quitosano obtenidas mediante coacervación y secado por atomización. a) partículas quitosano, y b) partículas quitosano cargadas con BSA al 1,5% (Aguirre 2011).



.Últimamente ha existido un gran aumento en el uso de fármacos basados de naturaleza proteica y peptídica (hormonas, vacunas), lo que constituye un gran problema en la ruta de administración a usar, ya que las proteínas son muy sensibles a las condiciones fisiológicas, no recomendándose administrarlas por vía oral. De esta manera, la administración vía oral es la más común pero la baja biodisponibilidad que exhibe del principio activo obliga a aplicar sucesivas dosis, lo cual presenta una alta probabilidad de generar efectos colaterales en el individuo tratado. Esto ha impulsado la búsqueda de sistemas novedosos para la entrega

controlada de principios activos que permitan superar estas barreras. La técnica de encapsulación de fármacos o principio activo se ha diversificado al incorporar nuevos reactivos y métodos como: el uso combinado de biopolímeros, marcaje del agente bioactivo con moléculas fluorescentes y posterior uso de microscopía óptica de fluorescencia y/o confocal (Figura 4), permitiendo superar algunas de las dificultades descritas y transformándose en una línea de investigación altamente requerida en diferentes laboratorios.

Figura 4. Micropartículas de quitosano-Ca-alginato cargadas con ácido 5-aminosalicílico (5-ASA). quitosano. a) quitosano marcado con fluoresceína isotiocianato (FITC), b) alginato marcado con rodamina B isotiocianato (RBITC), c) Imagen de superposición de las micropartículas. Figura tomada de referencia (Mladenovska y cols. 2007).



2. Micropartículas como nuevo sistema de entrega de fármacos

Por mucho tiempo la búsqueda de nuevos métodos de liberación de fármacos o principios activos basados en polímeros se centró en la formación de partículas de poliésteres alifáticos a base de ácidos láctico (PLA) y glicólico (PGA), sus combinaciones como poli (láctico-co-glicólido) (PLG), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), entre otros, los cuales fueron muy utilizados como biomateriales, suturas y soportes de los sistemas de administración de fármacos. Hoy, nuevas investigaciones apuntan al uso de otros biopolímeros como alginato y quitosano, en la forma de micro o nanopartículas como nuevos métodos para la entrega de éstos.

Las partículas de tamaño controlado a micro o nano-escala, compuestas de una cubierta mono o multicapa del biopolímero de alginato y/o quitosano, obtenidas por la deposición electrostática de forma secuencial tienen las siguientes características: otorgan protección al principio activo encapsulado, aumentan su biodisponibilidad, ofrecen mayor facilidad en la incorporación y permiten disponer de diferentes vías de administración, etc. A su vez, la creación de partículas con múltiples capas se proyecta como un sistema de encapsulación aún más interesante de explorar ya que aumentaría la biodisponibilidad del compuesto encapsulado, mejoraría la capacidad de carga y

eficiencia de encapsulación del agente y retrasaría la erosión de las partículas en el medioambiente gastrointestinal.

Todas estas ventajas se explicarían por la estabilización de la partícula proporcionada por la unión electrostática de un polímero catiónico (como el quitosano) con uno aniónico (como el alginato) y por el control alcanzado de la porosidad en las capas depositadas. Lo anterior proporciona una liberación sostenida y controlada a lo largo del tiempo según el tamaño de las capas subyacentes. De este modo la obtención de partículas basadas en estos biopolímeros o en combinación con otros, abre nuevas oportunidades para la administración de fármacos o principios activos sensibles al medio biológico, permitiendo por ejemplo la administración de proteínas por vía oral, lo cual mejora de manera sustancial su estabilidad y por consiguiente, su biodisponibilidad, disminuyendo la frecuencia de administración de estos fármacos.

Las cápsulas de otros biopolímeros como agarosa y carragenina (Figura 5) pueden ser obtenidas usando o no diferentes agentes entrecruzantes y/o cargadas con distintos tipos de fármacos o principios activos, entre los cuales se incluyen: biomoléculas, polipéptidos (Figura 6), antígenos vacunales, antineoplásicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antirretrovirales, etc.

Figura 5. SEM de micropartículas quitosano:carragenina (3:1) obtenidas mediante vórtex y ultrasonificación para uso como adyuvante de una vacuna peptídica contra la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I). a) micropartículas obtenidas por vórtex durante 10 min. b) micropartículas obtenidas por ultrasonificación con amplitud 10x, y c) amplitud de 50x (Amar 2013).

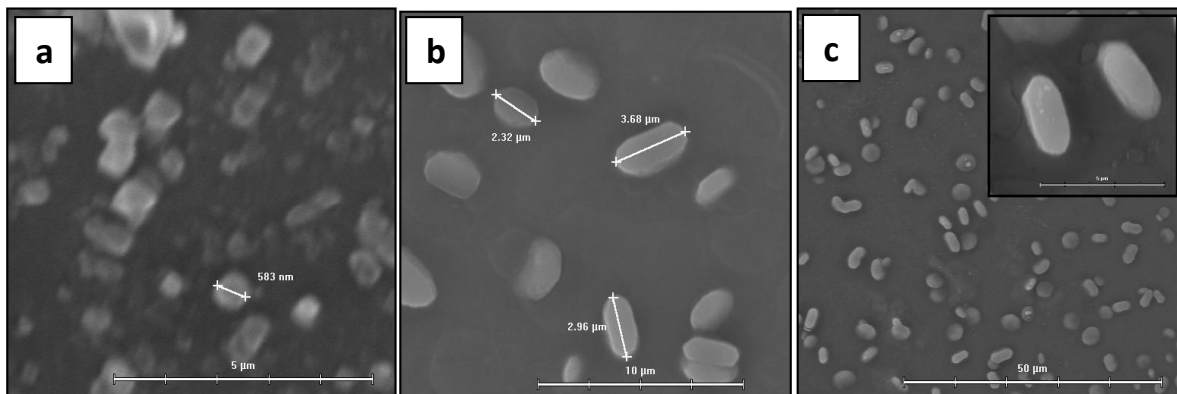
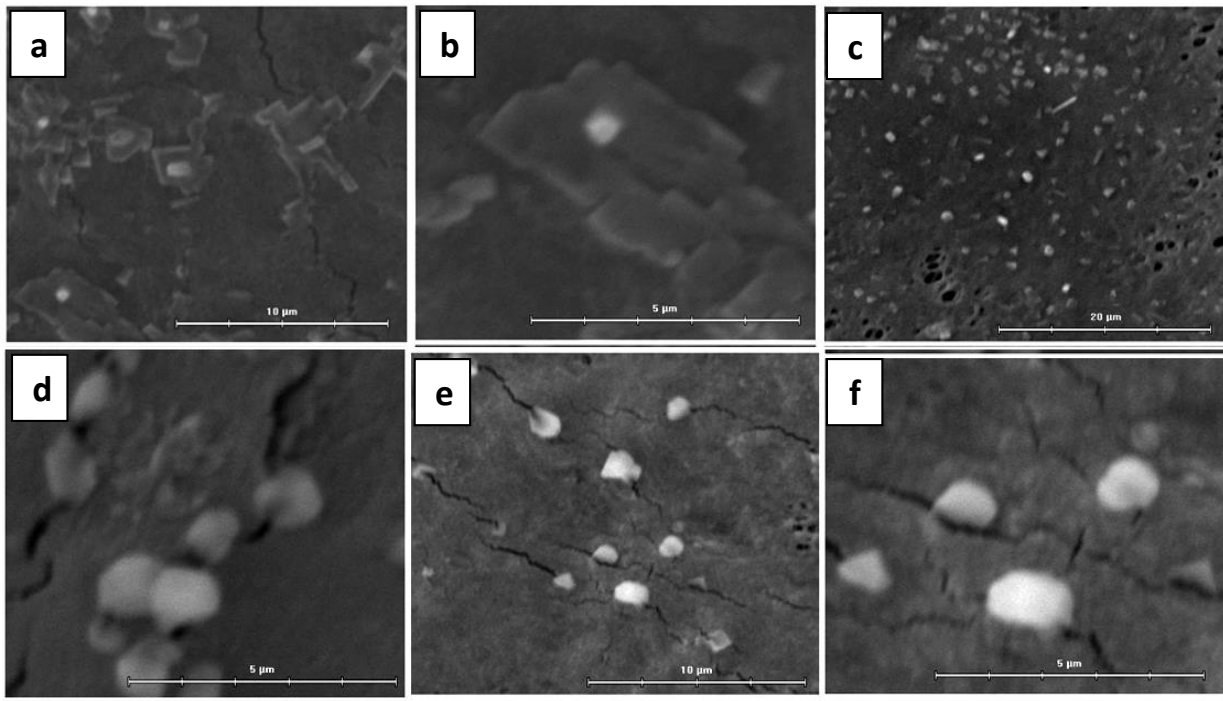


Figura 6. SEM de micropartículas quitosano: SSX1 (polipéptido recombinante de somatostatina) obtenidas por gelificación iónica. Se usaron quitosanos con diferentes pesos moleculares (PM) y agentes entrecruzantes: 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida (EDC) y tripolifosfato (TPP) mediante gelificación iónica. Micropartículas de quitosano: SSX1 con quitosano de bajo (a) y alto (b) PM usando EDC. Micropartículas de quitosano de bajo PM usando TPP (c,d). Micropartículas de quitosano:SSX1 con quitosano de alto (d,e) y bajo (f y g) PM usando TPP (Vidal 2011).



3. Perspectivas de nuevos materiales en la entrega de fármacos.

3.1. Biopolímeros

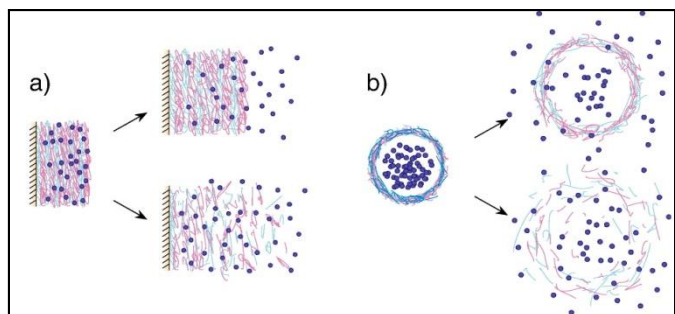
La variación del pH a través del tracto gastrointestinal es bien conocida y no ha sido completamente considerada en el desarrollo de administraciones orales. El estómago tiene un pH fuertemente ácido alrededor de 1.5, mientras que el pH en el intestino delgado y colon es casi neutro. Por lo tanto, fármacos o principios activos sensibles a ácidos tales como péptidos y proteínas no debieran ser administrados por vía oral. El pH extracelular de células tumorales se desvía levemente a la región ácida a partir de 7.4, por lo cual es posible desarrollar sistemas de liberación de agentes bioactivos anti-cáncer sensibles a pH. El

pH de tejidos inflamatorios también presenta una tendencia a la acidez. La variación de pH en los diferentes compartimentos celulares es la base de la liberación intracelular de fármacos o principios activos sensibles a pH, especialmente para liberación de ADN (Sato y cols. 2011).

Por lo tanto, sería posible diseñar sistemas de liberación de fármacos o principios activos gatillados por variaciones de pH. Dos rutas diferentes están disponibles para liberación de fármacos a partir de películas (films) capa por capa (LbL, por su sigla en inglés Layer-by-Layer) y microcápsulas. La Figura 7 muestra una ilustración esquemática de liberación de fármacos a partir de films LbL (a) y desde microcápsulas (b) gatillada por cambio de pH (cambios en la permeabilidad de la membrana de la cápsula o por descomposición completa de ésta). Un fármaco puede ser embebido

en films LbL y liberado ante un cambio de pH, a través de un aumento en la permeabilidad del film o descomposición de éste. En este tipo de liberación, es posible construir dispositivos de liberación de pulso en los cuales la liberación del fármaco es acelerada y suprimida alternativamente en un modo on-off en respuesta a cambios de pH. Por otra parte, en el caso de las microcápsulas, la descomposición del film también podría resultar de una liberación de total del fármaco por efecto “estallido”. En este aspecto, uno de los aspectos claves en el desarrollo de films LbL y microcápsulas sensibles a pH es diseñar materiales poliméricos sensibles a pH apropiados y ocupar combinaciones idóneas para estos depósitos (Sato y cols. 2011).

Figura 7. Rutas posibles para la entrega de fármacos sensibles a pH a partir de: a) film LbL, y b) microcápsulas.



Por otro lado, un área en constante desarrollo es el uso de biopolímeros como sistemas de transporte de fármacos o principios activos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer. La idea surge ya que las principales dificultades de la quimioterapia antineoplásica convencional podrían verse superadas y disminuidas por el uso de biopolímeros “inteligentes”, los cuales permitirían que el fármaco, al ser encapsulado se libere en forma controlada, sólo al pH ácido que presentan los tumores, de manera continua, lográndose altas concentraciones del fármaco antitumoral. Esto permite, a su vez, disminución en la frecuencia de administración de los fármacos antineoplásicos.

Por tanto, el uso de cápsulas a base de biopolímeros permitiría la acumulación de los fármacos de forma selectiva en las neoplasias

debido a la mayor irrigación y número de vasos sanguíneos permeables que presentan estos tejidos. Además, se disminuye simultáneamente los efectos secundarios, producto de la alta citotoxicidad y baja especificidad de los fármacos o principios activos utilizados. Para formular distintos tipos de partículas y/o cápsulas que contengan fármacos antineoplásicos, por ejemplo, ciclofosfamida, doxorubicina, paclitaxel, vincristina, entre otros. Al comparar la cinética de liberación y el efecto citotóxico, las partículas cargadas con fármacos ofrecen ventajas en comparación con las formulaciones farmacéuticas comúnmente usadas, lo que avala la formulación y uso de estas cápsulas en la terapéutica antineoplásica incluyendo, a su vez, el uso de otros fármacos que pudieran administrarse solas o en conjunto, a fin de mejorar aún más las propiedades beneficiosas del tratamiento indicado.

Por otra parte, existen alternativas aún más avanzadas como por ejemplo, el uso de cápsulas a base de polímeros naturales y/o sintéticos funcionalizados, que posteriormente son “decoradas” con anticuerpos que son capaces de reconocer en forma específica a antígenos superficiales o receptores presentes en la membrana de células neoplásicas. Estas modificaciones pueden llevar a una mayor especificidad en el ingreso de las microcápsulas a las células, que bien pueden estar cargadas con uno o más fármacos antineoplásicos, las cuales pueden además ser cargadas con compuestos que detectarían por ejemplo mediante la emisión de radiación o fluorescencia, las neoplasias en fases muy precoces de su desarrollo. Estos sistemas a bases de biopolímeros mejorarían no sólo la eficiencia diagnóstica sino que también el pronóstico de vida de los pacientes. Así el uso de biopolímeros en el diagnóstico y terapéutica simultánea del cáncer (teranosis), es una herramienta promisoriosa que requiere sin duda un desarrollo interdisciplinario aún mayor.

Otra área que está adquiriendo cada vez mayor realce es el uso de polímeros como adyuvantes vacunales. Todas las características físico-químicas mencionadas, tanto para quitosano como para alginato, y su probada capacidad

inmuno-estimulante nos instan a desarrollar métodos aún más sofisticados en la síntesis de derivados inteligentes a base de biopolímeros o polímeros sintéticos como polianilinas con funcionalidades químicas ácidas, como un área a fascinante a desarrollar en el campo de la biomedicina.

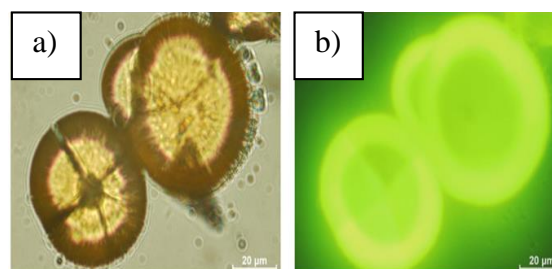
3.2. Biomateriales inorgánicos

Para el desarrollo de estos biomateriales en la entrega de fármacos y/o agentes bioactivos diversos autores han utilizado alginato y quitosano de manera individual o combinados con otros compuestos inorgánicos tales como: alúmina nanoporosa (Al_2O_3) (Kwak y cols. 2010), cementos de fosfato conteniendo calcio (hidroxiapatita, fosfato tricálcico y fosfato de calcio bifásico) (Ginebra y cols. 2006), oro coloidal (Paciotti y cols. 2006), nanopartículas de óxido de titanio (TiO_2) (McMaster y cols. 2012), nanotubos de carbón (Bianco y cols. 2005), partículas mesoporosas de dióxido de silicio (SiO_2) (Anglin y cols. 2008), vidrio bioactivo (Li y cols. 2013), etc.

Entre las propiedades de los materiales inorgánicos para su uso en encapsulación de agentes bioactivos destacan: gran área de superficie específica, volumen de poro óptimo, se pueden cargar y liberar eficientemente diferentes categorías de fármacos y/o principios activos, estructura jerárquica o mesoporosa, la eficiencia de carga y cinética de liberación, la cual puede ser controlada ajustando la composición del material inorgánico, presencia de grupos químicos que pueden funcionalizarse con moléculas bioactivas, etc (Wu y cols. 2013). En este contexto, Qiu y cols. (2012) describieron que el uso de microesferas de carbonato de calcio (CaCO_3) no presentó toxicidad al realizar un estudio de viabilidad celular y citotoxicidad, en el cual no se observó apoptosis ni inhibición de la proliferación de células. Neira-Carrillo y cols. (2012) obtuvo cristales esféricos tipo vaterita, un poliformo de CaCO_3 , estabilizado en presencia de un polimetilsiloxano (silicona) con grupos carboxílicos, un polímero aniónico sintético, capaz de contener biomoléculas para la entrega de agentes bioactivos. Microcápsulas a

base de cristales de CaCO_3 también pueden ser marcados mediante moléculas fluorescentes. A su vez, Wei y cols. (2008) demostraron que la liberación de doxorubicina desde micropartículas híbridas de CaCO_3 aumenta gradualmente de acuerdo a la disminución del pH del medio, coincidiendo con el pH que presentan tejidos neoplásicos (pH 6.0) y lisosomas de células tumorales (pH 5.0).

Figura 8. Imagen óptica de CaCO_3 fluorescente obtenido con silicona aniónica con 2.6 mM



4. Conclusiones.

El uso de polímeros naturales en el área biomédica está llamado a convertirse en una disciplina revolucionaria dado sus múltiples aplicaciones a escala macro, micro y nano tanto en medicina humana como veterinaria, las cuales que dependen de la naturaleza de los polímeros, sus funcionalidades químicas reactivas, su nano-estructura, morfología, técnica utilizada y propiedades físico-químicas.

5. Agradecimientos.

El Dr. A. Neira-Carrillo agradece a los proyectos Fondecyt 1110194, Fondef D08I1085, Conicyt-Mincyt PCCI-12038, Proyecto interno OIAC415/10 y al Programa U-Redes -VID de la Universidad de Chile, por el apoyo financiero otorgado en estas investigaciones

6. Referencias

1. Aguirre P. 2011. Encapsulación de biomoléculas en esferas de quitosano mediante técnica de emulsión para mejorar la respuesta biológica de biomateriales en implantes óseos. Tesis de pregrado para optar al título de Médico Veterinario (MDV).
2. Albuquerque C., Bucarey S.A., Neira-Carrillo A., Urzúa B., Hermosilla G., Tapia C.V. 2010. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of candida spp. *Medical Mycology* 48: 1018-1023.
3. Amar Y. 2013. Obtención y caracterización de un nuevo adyuvante polimérico a base de micropartículas de quitosano-carragenina para una vacuna peptídica contra la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-I). Tesis de pregrado para optar al título de Médico Veterinario (MDV).
4. Anglin E. J., Cheng L., Freeman W. R., Sailor M. J. 2008. Porous silicon in drug delivery devices and materials. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 1266-1277.
5. Bianco A., Kostarelos K., Prato M. 2005. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* 9: 674-679.
6. Cabané P., Alvo A., Neira-Carrillo A., Caviedes P., Gac P. 2011. Microencapsulación de células y tejido para terapia celular. *Revista Chilena de Cirugía* 63: 110-113.
7. Egaña R. 2013. Preparación de esferas de alginato purificado de origen comercial y desde algas chilenas *Lessonia nigrescens* como implante para terapia celular. Tesis de pregrado para optar al título de Médico Veterinario (MDV).
8. Fernández M.S., Arias J.I., Martínez M.J., Sáenz L., Neira-Carrillo A., Yazdani-Pedram M., Arias J.L. 2012. Evaluation of a multilayered chitosan-hydroxyapatite porous composite enriched with fibronectin or an in vitro generated bone-like extracellular matrix on proliferation and differentiation of osteoblasts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 6: 497-504.
9. Ginebra M. P., Traykova T., Planell J. A. 2006. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *Journal of Controlled Release* 113: 102-110.
10. Gómez L., Ramírez H. L., Neira-Carrillo A., Villalonga R. 2006. Polyelectrolyte complex formation mediated immobilization of chitosan-invertase neoglycoconjugate on pectin-coated chitin. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 28: 387-395.
11. Kwak D. H., Yoo J. B., Kim D. J. 2010. Drug release behavior from nanoporous anodic aluminum oxide. *J Nanosci Nanotechnol.* 10: 345-348.
12. Li Y., Liu Y. Z., Long T., Yu X. B., Tang T. T., Dai K. R., Tian B., Guo Y. P., Zhu Z. A. 2013. Mesoporous bioactive glass as a drug delivery system: fabrication, bactericidal properties and biocompatibility. *J Mater Sci Mater Med.* 24: 1951-1961.
13. Matsuhiro B. 2001. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 46: 81-87.
14. McMaster W. A., Wang X., Caruso R. A. 2012. Collagen-templated bioactive titanium dioxide porous networks for drug delivery. *ACS Appl Mater Interfaces.* 26: 4717-4725.
15. Mena J., Neira-Carrillo A., Yazdani-Pedram M., Kogan M. 2013. Capping gold nanoparticles with modified chitosan polymers for biomedical applications.

- Journal of Biomaterials and Tissue Engineering 3: 135-140.
16. Mladenovska K., Cruaud O., Richommed P., Belamie E., Raicki R.S., Venier-Julienne M.-C., Popovski E., Benoit J.P., Goracinova K. 2007. 5-ASA loaded chitosan-Ca-alginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 345: 59-69.
 17. Neira-Carrillo A., Retuert J., Martínez F., Arias J.L. 2008. Effect of crosslinked chitosan as a constrained volume on the in vitro calcium carbonate crystallization. *Journal of the Chilean Chem. Soc.* 53: 1367-1372.
 18. 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. *J. Colloid and Interface Science* 286: 134-141.
 19. Neira-Carrillo A., Vasquez-Quitral P., Paz Díaz M., Fernandez M.S., Arias J.L., Yazdani-Pedram M. 2012. Control of calcium carbonate crystallization by using anionic polymethylsiloxanes as templates. *J. of Solid State Chemistry* 194: 400-408.
 20. Paciotti G.F., Kingston D.G.I., Tamarkin L. 2006. Colloidal gold nanoparticles: A novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Nanobiotechnology, Drug Development Research* 67: 47-54.
 21. Qiu N., Yin H., Ji B., Klauke N., Glidle A., Zhang Y., Song H., Cai L., Ma, G. L. Wang, L. Chen, W. Wang. 2012. Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin. *Materials Science and Engineering C* 32: 2634-2640.
 22. Sáenz L., Neira-Carrillo A., Paredes R., Cortés M., Bucarey S., Arias J. L. 2009. Chitosan formulations improve the immunogenicity of a GnRH-I peptide based vaccine. *International Journal of Pharmaceutics* 369: 64-71.
 23. Sato K., Yoshida K., Takahashi S., Anzai J.I. 2011. pH- and sugar-sensitive layer-by-layer films and microcapsules for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63: 809-821.
 24. Van der Lubben I.M., Verhoef J.C., Van Aelst A. C., Borchrad 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.
 25. Vidal S. 2011. Obtención y evaluación de la respuesta inmune generada por vacunas de subunidad, utilizando micropartículas quitosano-SSX1. Tesis de pregrado para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular (IBM).
 26. Wei W., Ma G.H., Hu G., Yu D., Mcleish T., Su Z.G., Shen Z.Y. 2008. Preparation of hierarchical hollow CaCO₃ particles and the application as anticancer drug carrier. *Journal of The American Chemical Society* 130: 15808-15810.
 27. Wu C., Chang J., Xiao Y. 2013. Advanced bioactive inorganic materials for bone regeneration and drug delivery. CRS Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL (USA). 222 p.