

# Eubacteria

***Buscando alternativas a los suplementos clásicos de DHA para embarazadas***

***Caracterización de nanoestructuras de quitosano, fibroína de seda y oro como liberadores de fármacos***

***Mecanismo de Doble Diana de las Proteínas Periféricas de Membrana***

***Biomarcadores de restos óseos humanos en la investigación antropológica***

***Estudiando insectos desde una perspectiva poco habitual***

## Revista Eubacteria

Revista universitaria de divulgación científica  
[www.um.es/eubacteria](http://www.um.es/eubacteria)

ISSN 1697-0071  
 Depósito Legal MU-329-2001  
 Nº 38. Diciembre 2018

Revista editada gracias al Colegio Oficial de Biólogos de la Región de Murcia, en colaboración con la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia.

## Edición número 38

**José Pedro Marín Murcia**  
 Editor y director de la revista Eubacteria [jpmurcia@um.es](mailto:jpmurcia@um.es)

**Fuensanta Marín**  
 Codirectora y coordinadora de contenidos

**Ginés Luengo Gil**  
 Decano del Colegio Oficial de Biólogos de la Región de Murcia

**María del Mar Collado González**  
 Revisión de textos y coordinación de contenidos

**María Teresa Coronado Parra**  
 Revisión de textos y coordinación de contenidos

## Sumario:

### Introducción al número

Ginés Luego Gil.

*Página 3*

### Buscando alternativas a los suplementos clásicos de DHA para embarazadas

Antonio Gázquez García y Elvira Larqué Daza.

*Página 4-6*

### Caracterización de nanoestructuras de quitosano, fibroína de seda y oro como liberadores de fármacos

Mar Collado-González, Gloria Vllora y Francisco Guillermo Díaz Baños.

*Página 7-12*

### Mecanismo de Doble Diana de las Proteínas Periféricas de Membrana

Teresa Coronado-Parra y Senena Corbalán-García.

*Página 13-19*

### Biomarcadores de restos óseos humanos en la investigación antropológica

Cristina Pérez Martínez.

*Página 20-25*

### Estudiando insectos desde una perspectiva poco habitual

María Pérez-Marcos, M<sup>a</sup> Isabel Arnaldos, M<sup>a</sup> Dolores García.

*Página 26-29*



La revista Eubacteria es editada bajo una licencia Creative Commons: Acceso universal y gratuito, uso no comercial, no se pueden manipular los trabajos y se requiere la citación de los autores, artículo y revista.



UNIVERSIDAD DE MURCIA



Fotografía de la portada realizada por María del Mar Collado González

# Caracterización de nanoestructuras de quitosano, fibroína de seda y oro como liberadores de fármacos

Mar Collado-González<sup>1</sup>, Gloria Villora<sup>2</sup> y Francisco Guillermo Díaz Baños<sup>3</sup>

1 y 3. Departamento de Química Física, Facultad de Química, Universidad de Murcia

2. Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Murcia

<sup>1</sup>mdmcg1@um.es, <sup>2</sup>gvillora@um.es, <sup>3</sup>fgb@um.es

## RESUMEN

En las últimas décadas la nanomedicina ha experimentado un avance significativo en la síntesis de sistemas de liberación de fármacos; ya que mejoran la eficacia terapéutica de los tratamientos aplicados<sup>1</sup>. Un aspecto de especial relevancia es la agregación que experimentan algunos nanosistemas al ser expuestos a condiciones fisiológicas, ya que la baja estabilidad coloidal modifica su actividad biológica y, si tienen que viajar a través del torrente sanguíneo hasta llegar a su sitio de acción, los agregados pueden provocar situaciones que desemboquen en la formación de trombos o embolias. En esta Tesis Doctoral se utiliza quitosano como agente estabilizador de diferentes nanosistemas que agregan al ser expuestos a condiciones fisiológicas.

## INTRODUCCIÓN

Entre las bondades de los sistemas poliméricos de liberación de fármacos podemos citar su biocompatibilidad<sup>2</sup> y fácil síntesis, ya que se pueden obtener mediante interacción electrostática entre los diferentes polímeros o partículas que componen las nanoestructuras<sup>3</sup>. Esto es, los componentes que presentan diferente carga se atraen. Y son estas fuerzas contrapuestas las que conllevan a la formación de las nanoestructuras. Otra propiedad ventajosa del uso de los nanosistemas poliméricos es que pueden cargar fármacos tanto en la superficie como en el interior de las nanoestructuras que forman. Existen diferentes tipos de nanosistemas poliméricos, entre ellos encontramos las nanopartículas polisacáridicas que, además de las propiedades previamente indicadas, presentan ventajas como el hecho de permanecer largo tiempo en circulación en el organismo y de ser lentamente eliminadas por el organismo<sup>3</sup>.

Las características de los sistemas de liberación, que regirán el comportamiento de los mismos, varían como consecuencia de las propiedades intrínsecas de los nanosistemas, tales como el tamaño, la forma o la carga y

también debido a las condiciones del medio en el que se encuentran, entre otras el pH y la fuerza iónica<sup>4</sup>.

Por las razones explicadas más arriba, es necesario estudiar la capacidad de agregación de las nanoestructuras en condiciones fisiológicas. Este aspecto es especialmente importante ya que los capilares más estrechos del cuerpo humano presentan un diámetro de, aproximadamente, 4 micras. Por lo que si al ser expuesto a condiciones fisiológicas, los nanosistemas sintetizados agregan dando lugar a estructuras de tamaño micrométrico, se prohibirá su uso para ser utilizado como sistema de liberación de fármacos<sup>5</sup>.

Para estudiar la agregación de los sistemas poliméricos, se recurre a la teoría DLVO (en honor a sus autores: Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek). Esta teoría establece que las nanoestructuras se van a mantener alejadas mientras que existan entre ellas, fuerzas repulsivas que las obliguen a estar alejadas del resto de nanoestructuras del sistema<sup>6</sup>.

Para la realización de esta Tesis Doctoral se utilizaron nanopartículas de oro de 10 nm recubiertas de citrato (AuNP)<sup>7</sup> y nanopartículas de fibroína de la seda (SFN)<sup>8</sup> preparadas siguiendo la metodología desarrollada en nuestro grupo de investigación<sup>9</sup>. En dicha metodología, se utilizan líquidos iónicos para obtener SFN, que se consideran disolventes verdes, y con un rendimiento del proceso mayor. Ambos tipos de nanopartículas, las SFN y las AuNP tienen en común que agregan al exponerse a condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica<sup>10,11</sup>.

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la biosfera<sup>12</sup>. Es un polímero lineal, biocompatible e insoluble en disolventes acuosos<sup>13</sup>. Para aumentar la solubilidad de este polímero y facilitar su manipulación, se desacetila y como resultado se obtiene una familia de polisacáridos que recibe el nombre de quitosano<sup>14</sup>.

Los quitosanos varían entre sí en función del grado y el patrón de desacetilación<sup>15</sup>. En cada posición desacetilada, el quitosano presenta un grupo amina que puede protonarse y adquirir carga positiva. De modo que, a pH ácido, la cadena presenta cargas positivas en distintos puntos de la cadena. Como consecuencia, aparecen fuerzas electrostáticas de repulsión intracatenarias e intercatenarias<sup>16</sup>. Como resultado de las primeras, las cadenas de quitosano están estiradas y como consecuencia de las segundas, dichas cadenas se mantienen separadas unas de otras<sup>17</sup>.

De esta forma, las cadenas van a experimentar un cambio en la conformación en función del pH, debido a la presencia de cargas superficiales. Si añadimos una sal a la disolución, los iones se disponen alrededor de las cargas y se produce un apantallamiento de las mismas, dando lugar a cambios en la conformación de los polímeros<sup>18</sup>. Otro factor a tener en cuenta para conseguir la disolución del biopolímero es la concentración del mismo. Se sabe que el quitosano puede formar estructuras tridimensionales simplemente por el enredamiento de las cadenas. La concentración por debajo de la cual las cadenas de quitosano no se entrecruzan entre ellas se denomina concentración crítica. De modo que, si trabajamos a una concentración inferior a la concentración crítica y a unas condiciones de pH y fuerza iónica que produzcan fuerzas inter e intracatenarias de repulsión, conseguiremos una disolución de cadenas libres de quitosano<sup>19</sup>.

El quitosano ha sido calificado como generalmente seguro para su uso en alimentación y farmacia<sup>16,20</sup>. Y se incluyó en la farmacopea europea. Además, el quitosano se ha utilizado para la síntesis de gran variedad de nanoestructuras metálicas y no metálicas<sup>21,22</sup>.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

1. Estudiar las propiedades del quitosano de peso molecular medio en disolución.
2. Sintetizar y caracterizar nanocomposites de quitosano-AuNP.
3. Sintetizar y caracterizar nanocomposites de quitosano-SFN.
4. Estudiar la citotoxicidad de las nanoestructuras sintetizadas, mediante el uso de cultivos celulares.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El quitosano utilizado tiene un peso molecular aproximado de 105±57 kDa, según medidas de esparcimiento estático de luz (SLS, del inglés static light scattering) y un grado de acetilación en torno al 25% según medidas de espectroscopía infrarroja por la transformada de

Fourier (FTIR Fourier-transform infrared spectroscopy) y titulación conductimétrica.

Para llevar a cabo la caracterización propuesta, realizamos medidas de dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés dynamic light scattering). Esta técnica permite determinar el tamaño de una partícula analizando la luz dispersada por la misma. Para completar la caracterización, realizamos medidas de potencial Z, para determinar la carga superficial de las estructuras formadas y medidas de espectrofotometría para analizar el plasmón del oro. El plasmón es la longitud de onda a la cual se registra el máximo de absorbancia en el espectro. Las nanopartículas de oro libres utilizadas presentan un máximo en 521 nm y se desplaza a valores mayores conforme se van agregando. Se usaron también técnicas de microscopía para visualizar las nanoestructuras desarrolladas, fotocentrifugación analítica para comprobar la estabilidad de las nanoestructuras al ser expuestas a centrifugación y cromatografía líquida de alta resolución para comprobar la liberación de fármacos cargados en los nanocomposites. Finalmente, estudiamos la citotoxicidad de las nanoestructuras usando cultivos celulares usando cultivos de células HeLa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La disolución de quitosano de peso molecular medio a una concentración de 10<sup>-3</sup> g/mL presenta estructuras micrométricas, tal como se puede observar en la curva negra de la Figura 1. Al diluir la suspensión hasta 10<sup>-5</sup> g/mL y agitar durante 24 h, se observa (línea roja, Figura 1) que la población de microestructuras disminuye y aparece una población de nanoestructuras. Si se diluye nuevamente hasta 10<sup>-7</sup> g/mL y se agita durante 24 h más, se observa (línea verde en la Figura 1) que las microestructuras han desaparecido por completo de la disolución y el contenido en nanoestructuras ha aumentado. Estos resultados indican que las interacciones entre las cadenas de quitosano son débiles, ya que conforme diluimos y agitamos, las estructuras grandes desaparecen de la suspensión. De esta forma se puede estimar que si la concentración de quitosano utilizado en las condiciones de medida es igual o inferior a 10<sup>-5</sup> g/mL, solo se encuentran estructuras nanométricas en la disolución.

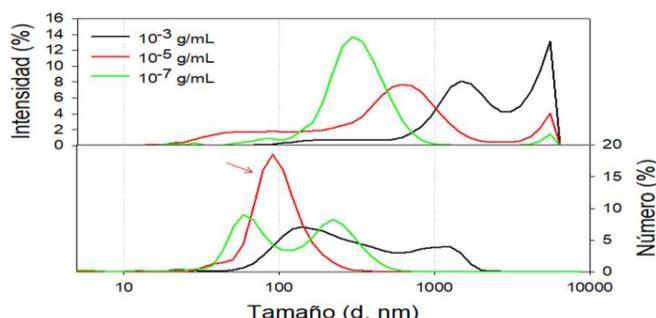


Figura 1. Distribución del tamaño de las estructuras de quitosano en disolución a concentración  $10^{-3}$  g/mL (negro),  $10^{-5}$  g/mL (rojo) y  $10^{-7}$  g/mL (verde).

Para comprobar el efecto del pH, disolvimos el quitosano a una concentración igual a  $10^{-5}$  g/mL a pH 3.6 y se agitó durante 24 h. Pasado este tiempo, se filtró y se ajustó el pH a diferentes valores finales. Como puede verse en la Figura 2, a pH 3.6 obtenemos una distribución monodispersa debida a la presencia de cadenas libres del polímero (línea negra). Al subir el pH hasta el valor del punto isoeléctrico (pI), en torno a 6.5, se observa una distribución muy amplia de diámetros hidrodinámicos (línea roja, Figura 2). Posiblemente debido a la pérdida de las fuerzas intra e intercatenarias, lo que daría lugar a la interacción de las cadenas. Al aumentar el pH por encima del pI, el tamaño de las estructuras aumenta. Este encaja bien con la hipótesis de interacción de las cadenas de quitosano y la hipótesis de la pérdida de repulsiones intracatenarias, de forma que lo que vemos muy probablemente es la formación de estructuras globulares, que agregan entre sí.

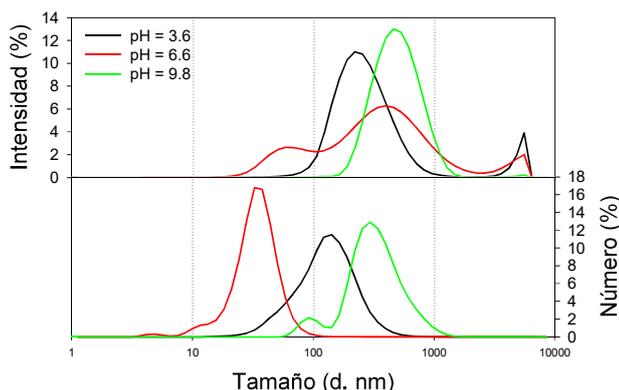


Figura 2. Distribución del tamaño de las estructuras de quitosano en disolución a pH 3.6 (negro), 6.6 (rojo) y 9.8 (verde).

Para analizar el efecto de un incremento en la fuerza iónica, se preparó a una disolución de quitosano a concentración  $10^{-3}$  g/mL y  $\text{pH} \sim 4$  y se mantuvo en agitación durante 24 h. La Figura 3 muestra la distribución de

tamaños de estructuras presentes en la disolución inicial (en verde) y la disolución a la que se adicionó una sal para aumentar la fuerza iónica, respecto a la disolución inicial, que se designó como 0 M. En la Figura 3 se aprecia que un incremento en la fuerza iónica del medio da lugar a la reducción del tamaño de las estructuras de quitosano como resultado del efecto pantalla que tiene lugar en la superficie de las estructuras.

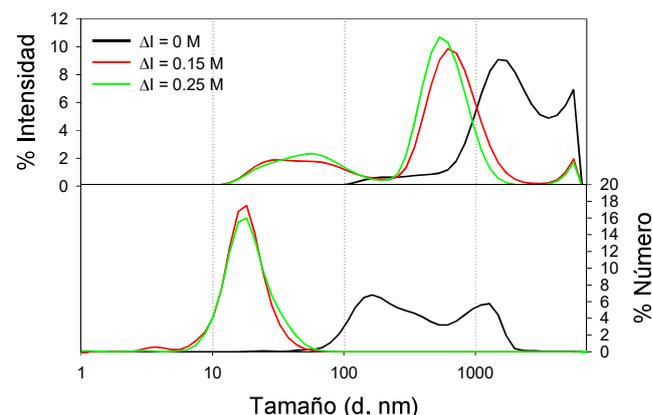


Figura 3. Distribución del tamaño de las estructuras de quitosano en disolución con un incremento en la fuerza iónica 0M (negro), 0.15M (rojo) y 0.25M (verde), respecto de la situación inicial.

En cuanto al estudio de la agregación de AuNP en presencia de quitosano. Se mezcló quitosano preparado a pH 4 y sin adicionar sal al medio y las AuNP. Como puede observarse en la Figura 4, la interacción de ambas especies, quitosano (en rojo) y AuNP (en verde), se obtienen unas estructuras de tamaño intermedio (en negro), que son el resultado de la interacción de los componentes de la suspensión. Además, las imágenes de microscopía (Figura 5) revelaron que las AuNP se localizan en la superficie del quitosano. A estas estructuras las denominamos nanocomposites.

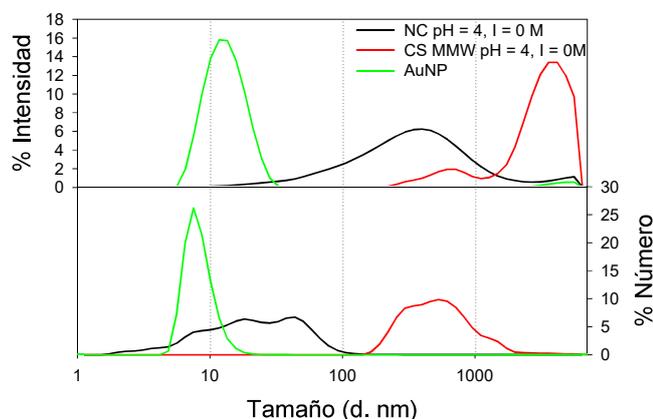


Figura 4. Distribución de tamaños de AuNP (verde), quitosano (rojo) y nanoestructuras compuestas de AuNP y quitosano (negro).

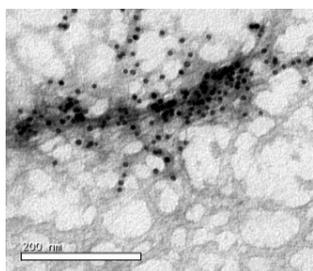


Figura 5. Imagen de microscopía electrónica de transmisión. El quitosano aparece de un color grisáceo y las AuNP como puntos negros.

Al exponer estos nanocomposites a diferentes valores de pH, el tamaño de las estructuras obtenidas no varía de forma significativa al llegar a valores próximos al pI, sino que mantiene una distribución monodispersa de estructuras. Por otra parte, al incrementar la fuerza iónica de la suspensión, se obtiene un resultado similar al obtenido cuando se incrementa la fuerza iónica de una disolución de quitosano. Esto es, se produce la reducción del tamaño de los nanocomposites. La hipótesis más plausible es que el efecto que estamos viendo sea el apantallamiento de cargas debido a la presencia no solo de las AuNP, sino también de los iones adicionados al incrementar la fuerza iónica. Cabe destacar que el incremento en la fuerza iónica da lugar a que las AuNP se sitúen más cerca unas de otras debido a la reducción del tamaño de los nanocomposites, pero no se produce la agregación de las AuNP que quedan adsorbidas en la superficie de las nanoestructuras formadas.

Para estudiar la cinética de interacción entre el quitosano y las AuNP, se prepararon dos suspensiones de idéntica composición final. En ambos casos se partía de 1 mL de la suspensión de AuNP y se adicionaba un volumen de una disolución de quitosano preparado a  $10^{-3}$  g/mL. La diferencia entre las dos suspensiones era el tiempo en el

que se permitía la interacción de ambas especies antes de una nueva adición del biopolímero. Así, el experimento duró 4 h, en el caso en el que se permitió tiempos de interacción cortos y 192 h, en el caso en el que los tiempos de interacción permitidos eran largos. El procedimiento de 4 h rindió nanopartículas que tenían un potencial Z negativo y junto con las imágenes de microscopía electrónica (Figura 6) confirmaban la presencia de las AuNP en la superficie de las estructuras formadas, en las que el quitosano actuaba de andamio. Por otra parte, el experimento de 192 h rindió micropartículas y partículas milimétricas.

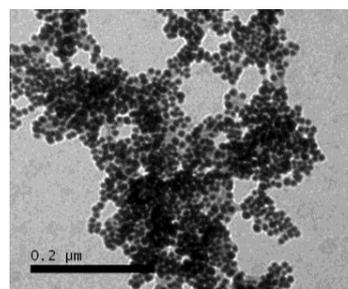


Figura 6. Imagen de microscopía electrónica de nanocomposites de quitosano (grisáceo) y AuNP (puntos negros)

El análisis espectrofotométrico de los nanocomposites (Tabla 1) mostró que el máximo de absorbancia de las AuNP libres que se sitúa en 521 nm, se había desplazado hasta el valor de 547 nm al interactuar con el quitosano. Este resultado indicó que las AuNP se situaban más cerca unas de otras que en el caso de las nanopartículas libres. Sin embargo, no indicaba que estuvieran agregadas, ya que en ese caso el máximo de absorbancia debería verse a un valor de 700 nm o incluso no verse un pico de absorbancia<sup>23</sup>.

Tabla 1. Longitud de onda a la que se observa la máxima absorbancia de las AuNP libres, agregadas o los nanocomposites que las contienen.

	$\lambda_{max}$ (nm)
AuNP libres	521.57
AuNP agregadas	> 700
Nanocomposites quitosano-AuNP	547.37

Para estudiar la estequiometría de la interacción entre quitosano y las AuNP, se prepararon disoluciones con distintas proporciones entre los componentes en las suspensiones finales. Como resultado obtuvimos nanocomposites de diferente tamaño, pero siempre en el rango nanométrico. Al incrementar la fuerza iónica del medio, comprobamos que aquellas condiciones en las que la presencia de quitosano era baja, se producía la agregación de AuNP de forma rápida e incluso no se observaban partículas a las 24 h debido a que habían sedimentado (Tabla 2). Así, podemos concluir que existe una proporción

óptima de quitosano y AuNP que da lugar a la obtención de nanocomposites que muestran tamaño nanométrico y son estables frente a variaciones en la fuerza iónica.

**Tabla 2.** Diámetro hidrodinámico, en nm, de los nanocomposites sintetizados con diferentes proporciones de AuNP y quitosano, indicados como partícula:partícula.

Proporción AuNP:CS	t=0, ΔI= 0 M	t=0, ΔI = 0.15 M	t=24 h, ΔI= 0.15 M
1:10 <sup>3</sup>	319 ± 273	177 ± 125	164 ± 70
1:10 <sup>2</sup>	99 ± 55	111 ± 58	140 ± 114
1:10	230 ± 131	138 ± 54	146 ± 52
1:1	68 ± 139	509 ± 228	0 ± 0

Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral es comprobar el efecto estabilizador del quitosano sobre nanoestructuras con potencial Z negativo. Por ello, además de utilizar las AuNP, utilizamos también SFN. Estas nanopartículas muestran una clara agregación al incrementar la fuerza iónica hasta un valor de 24 mM. De nuevo, preparamos suspensiones con diferentes proporciones de quitosano y SFN. Posteriormente, se incrementó la fuerza iónica de la suspensión, respecto al valor del disolvente, hasta 24 mM. Como resultado, encontramos que existe una proporción óptima entre ambas especies que permite obtener nanocomposites estables frente al incremento de la fuerza iónica, concretamente las proporciones CS:SFN 1:12.7 y 1:6.35 mg:mg (Tabla 3). Además, el estudio del potencial Z indicó que, en ese caso, el quitosano se disponía sobre las SFN para conseguir su estabilización.

**Tabla 3.** Diámetro hidrodinámico, en nm, de los nanocomposites de quitosano y SFN en un medio con un incremento de la fuerza iónica igual a 0.024M, respecto a la fuerza iónica de la disolución inicial.

Proporción CS:SFN	t=0, ΔI= 0 M	t=0, ΔI = 0.024 M	Potencial Z (24 h)
1:50.8	190 ± 56	1086 ± 380	-3 ± 4
1:12.7	195 ± 77	339 ± 129	20 ± 2
1:6.35	210 ± 91	300 ± 110	43 ± 8
1:0.2	979 ± 610	490 ± 228	27 ± 2

El quitosano consigue estabilizar las SFN a una fuerza iónica muy baja. Para incrementar la estabilidad frente a la fuerza iónica de las SFN en disolución, usamos glicol-quitosano, un derivado del quitosano con mayor solubilidad en disolventes acuosos gracias a la presencia de unidades de glicol. Como resultado, obtenemos estructuras que son estables frente a un incremento de fuerza iónica hasta 0.1 M. Este valor es próximo al valor de la fuerza iónica de la sangre y cuadruplica el valor de la fuerza iónica a la cual los nanocomposites eran estables cuando se preparaban con quitosano. Este resultado se consigue gracias a la variación de la condición de lióforo a liófilo al usar el glicol quitosano.

Por último, se estudió la citotoxicidad de los nanocomposites obtenidos mediante el ensayo de reducción de una sal de tetrazolio utilizando células HeLa. El análisis de citotoxicidad reveló que el quitosano, las AuNP y las SFN son componentes biocompatibles. Los nanocomposites compuestos de quitosano-AuNP mostraron biocompatibilidad, mientras que los nanocomposites compuestos de quitosano-SFN mostraron un efecto dosis-dependiente.

## CONCLUSIONES

De la realización de esta Tesis Doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

Se pueden obtener estructuras de quitosano de diferentes tamaños como consecuencia de las características intrínsecas, como grado de desacetilación o peso molecular, y características extrínsecas como pH, fuerza iónica o concentración del polímero en la disolución.

El quitosano en disolución ácida puede interactuar electrostáticamente con AuNP. Las estructuras resultantes presentan diferentes tamaños y conformaciones en función de la proporción de las especies en la suspensión final y del tiempo de interacción.

El quitosano a concentración 10<sup>-3</sup> g/mL, pH 4 y fuerza iónica igual a 0.25 M estabiliza nanopartículas de oro recubiertas de citrato de forma eficiente.

Los nanocomposites compuestos de quitosano y SFN muestran el quitosano en la superficie de las nanoestructuras, mientras que las SFN se encuentran en el interior. Las nanoestructuras preparadas con la proporción quitosano:SFN 1:12.7 y 1:6.35 mg:mg son estables frente a un incremento en la fuerza iónica igual a 24 mM. Esta estabilidad aumenta al usar glicol-quitosano en lugar del quitosano.

Los nanocomposites compuestos de quitosano y AuNP mostraron un carácter biocompatible, mientras que los nanocomposites compuestos de quitosano y SFN mostraron un efecto dosis dependiente sobre el metabolismo celular.

María del Mar Collado González es becaria posdoctoral de la Fundación Séneca de la Región de Murcia (20381/PD/17). Realiza su estancia posdoctoral en la Universidad de Leeds, Reino Unido.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA, et al. Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano*. 2017;11(3):2313-2381. doi:10.1021/acsnano.6b06040.
2. Zhao Z, Li Y, Xie M Bin. Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):4880-4903. doi:10.3390/ijms16034880.
3. Yang N, Li WH. Preparation of gold nanoparticles using chitosan oligosaccharide as a reducing and capping reagent and their in vitro cytotoxic effect on Human fibroblasts cells. *Mater Lett*. 2015;138:154-157. doi:10.1016/j.matlet.2014.09.078.
4. Wang D, Qing Y, Yang X, et al. Microarray analysis of DNA damage repair gene expression profiles in cervical cancer cells radioresistant to 252Cf ... Microarray analysis of DNA damage repair gene expression profiles in cervical cancer cells radioresistant to 252 Cf neutron and X-rays. 2010;(January 2014). doi:10.1186/1471-2407-10-71.
5. Wang S, Xu T, Yang Y, Shao Z. Colloidal Stability of Silk Fibroin Nanoparticles Coated with Cationic Polymer for Effective Drug Delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015.
6. Zakaria HM, Shah A, Konieczny M, Hoffmann JA, Nijdam AJ, Reeves ME. Small Molecule- and Amino Acid-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles. *Langmuir*. 2013;29(25):7661-7673. doi:10.1021/la400582v.
7. Baygazieva EK, Yesmurzayeva NN, Tatykhanova G, Mun G, Khutoryanskiy V, Kudaivergenov S. Polymer protected gold nanoparticles: Synthesis, characterization and application in catalysis. *Int J Biol Chem*. 2014;7(1):14-23.
8. Jastrzebska K, Kucharczyk K, Florczak A, Dondajewska E, Mackiewicz A, Dams-Kozłowska H. Silk as an innovative biomaterial for cancer therapy. Y., Li, Z., Hu, L., Shi, X., Guan, W., & Du, Y. (2013). Synthesis of chitosan-stabilized gold nanoparticles by atmospheric plasma. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.carbp.2015.02.020>. doi:10.1016/j.rpor.2014.11.010.
9. Lozano-Pérez AA, Montalbán MG, Aznar-Cervantes SD, Cragolini F, Cenis JL, Villora G. Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds. *J Appl Polym Sci*. 2014;132(12):n/a-n/a. doi:10.1002/app.41702.
10. Basu S, Pande S, Jana S, Bolisetty S, Pal T. Controlled Interparticle Spacing for Surface-Modified Gold Nanoparticle Aggregates. *Langmuir*. 2008;24(10):5562-5568. doi:10.1021/la8000784.
11. Mottaghitalab F, Farokhi M, Shokrgozar MA, Atyabi F, Hosseinkhani H. Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. *J Control Release*. 2015;206:161-176. doi:10.1016/j.jconrel.2015.03.020.
12. Silva SS, Mano JF, Reis RL. Ionic liquids in the processing and chemical modification of chitin and chitosan for biomedical applications. *Green Chem*. 2017;19(5):1208-1220. doi:10.1039/C6GC02827F.
13. Kadokawa JI. Dissolution, gelation, functionalization, and material preparation of chitin using ionic liquids. *Pure Appl Chem*. 2016;88(6):621-629. doi:10.1515/pac-2016-0503.
14. Leiva A, Bonarrrd S, Pino M, Saldías C, Kortaberria G, Radić D. Improving the performance of chitosan in the synthesis and stabilization of gold nanoparticles. *Eur Polym J*. 2015;68:419-431. doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.04.032.
15. Rinaudo M, Milas M, Le Dung P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int J Biol Macromol*. 1993;15:281-285.
16. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol*. 2009;3:203-230.
17. Delmar K, Bianco-Peled H. The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. *Carbohydr Polym*. 2015;127:28-37. doi:10.1016/j.carbp.2015.03.039.
18. Boucard N, Viton C, Domard A. New aspects of the formation of physical hydrogels of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomacromolecules*. 2005;6(6):3227-3237. doi:10.1021/bm050653d.
19. Mushi NE, Kochumalayil J, Cervin NT, Zhou Q, Berglund LA. Nanostructurally Controlled Hydrogel Based on Small-Diameter Native Chitin Nanofibers: Preparation, Structure, and Properties. *ChemSusChem*. 2016;9(9):989-995. doi:10.1002/cssc.201501697.
20. Jana S, Maji N, Nayak AK, Sen KK, Basu SK. Development of chitosan-based nanoparticles through inter-polymeric complexation for oral drug delivery. *Carbohydr Polym*. 2013;98(1):870-876. doi:10.1016/j.carbp.2013.06.064.
21. Madhusudhan A, Reddy GB, Venkatesham M, et al. Efficient pH dependent drug delivery to target cancer cells by gold nanoparticles capped with carboxymethyl chitosan. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):8216-8234. doi:10.3390/ijms15058216.
22. Liu L, Zhang X, Chaudhuri J. Size control in the synthesis of 1-6nm gold nanoparticles using folic acid-chitosan conjugate as a stabilizer. *Mater Res Express*. 2014;1(3). doi:10.1088/2053-1591/1/3/035033.
23. He Y, Zhang X, Yu H. Gold nanoparticles-based colorimetric and visual creatinine assay. *Microchim Acta*. 2015;182(11-12):2037-2043. doi:10.1007/s00604-015-1546-0.