**SIMPOSIO INTERNACIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**Obtención de sales de quitosana por secado por aspersión con calidad farmacéutica**

***Obtaining chitosan salts by spray drying with pharmaceutical quality***

Antonio Nogueira Mendoza1, Nilia de la Paz Martín-Viaña2, Orestes Darío López Hernández3, Mirna Fernández Cervera4, Caridad Margarita García Peña5, Yanet Montes de Oca Porto1

1- Antonio Nogueira Mendoza. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Cuba. E-mail: antonio.nogueira@cidem.cu

2-Nilia de la Paz Martín-Viaña. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Cuba. E-mail: nilia.delapaz@cidem.cu

3-Orestes Darío López Hernández. Universidad de Ambato, Ecuador. E-mail: od.lopez@uta.edu.ec

4-Mirna Fernández Cervera. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba. E-mail: mirnafc@ifal.uh.cu

5-Caridad Margarita García Peña. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Cuba. E-mail: caridad.garcia@cidem.cu

6-Yanet Montes de Oca Porto. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Cuba. E-mail: yanet.montesdeoca@cidem.cu

**Resumen:**

La quitosana es considerada el polímero del siglo XXI, por la variedad de aplicaciones que tienen sus derivados. La **problemática** que se presenta en este trabajo científico es cómo disponer de sales de quitosana obtenidas por secado por aspersión con adecuada reproducibilidad y calidad. El trabajo tuvo como **objetivo** establecer un proceso tecnológico a escala industrial para la obtención de sales de quitosana para aplicaciones biomédicas. **Metodología**: Se realizó un diseño factorial 22 a escala de laboratorio, los factores de estudio fueron la masa molecular del ácido y la diferencia de temperatura de entrada y salida del equipo y como variable de respuesta el rendimiento de las sales de quitosana. Se desarrolló y validó un método espectrofotométrico UV-Vis para la determinación del grado de desacetilación. Se llevó a cabo la evaluación física, química y microbiológica, así como el estudio de estabilidad acelerado y en vida de estante para establecer la vida útil de las sales de quitosana. **Resultados y discusión**: La evaluación confirmó la formación de las sales del biopolímero solubles en agua, como resultado de la reacción de la quitosana con el ácido orgánico. Se demostró la homogeneidad de las propiedades de los productos obtenidos en los lotes escalados y la reproducibilidad de los procesos tecnológicos establecidos, en las condiciones de la industria nacional. Se comprobó la estabilidad física, química y microbiológica de las sales durante 24 meses a temperatura ambiente, empleando para ello métodos validados. **Conclusiones**: El acetato y lactato de quitosana pueden ser empleados como nuevas materias primas de uso farmacéutico en Cuba.

***Abstract:***

*Chitosan is considered the polymer of the 21st century, due to the variety of applications that its derivatives have. The* ***problem*** *that arises in this scientific work is how to dispose of chitosan salts obtained by spray drying with adequate reproducibility and quality. The* ***objective*** *of the work was to establish a technological process on an industrial scale to obtain chitosan salts for biomedical applications.* ***Methodology****: A 22 factorial design was carried out on a laboratory scale, the study factors were the molecular mass of the acid and the difference in temperature at the entrance and exit of the equipment and the performance of the chitosan salts as a response variable. A UV-Vis spectrophotometric method was developed and validated for the determination of the degree of deacetylation. The physical, chemical and microbiological evaluation was carried out, as well as the accelerated stability study and in shelf life to establish the useful life of the chitosan salts.* ***Results and discussion****: The evaluation confirmed the formation of the water-soluble salts of the biopolymer, as a result of the reaction of chitosan with organic acid. The homogeneity of the properties of the products obtained in the scaled batches and the reproducibility of the established technological processes, under the conditions of the national industry, were demonstrated. The physical, chemical and microbiological stability of the salts was verified for 24 months at room temperature, using validated methods.* ***Conclusions****: Chitosan acetate and lactate can be used as new raw materials for pharmaceutical use in Cuba.*

**Palabras Clave:** Derivados de quitosana; Solubilidad, Escalado, Secado por aspersión.

***Keywords:*** *Chitosan derivatives; Solubility, Scaling, Spray drying.*

**1. Introducción**

La quitosana es una poliamina catiónica y un derivado, parcialmente, desacetilado de quitina, es el segundo polímero más abundante en la naturaleza y un material de soporte de crustáceos, insectos y micelios fúngicos. Para aplicaciones comerciales, la quitina es aislada de las conchas de crustáceos marinos, camarones y cangrejos. La quitosana es escasamente soluble en agua, pero es soluble en soluciones acuosas diluidas de la mayoría de los ácidos orgánicos, es capaz de formar sales solubles en agua, como las de acetato, ascorbato, lactato y malato. Hoy en día, este biopolímero es de gran importancia en la industria farmacéutica y alimentaria, por sus excelentes propiedades, como biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, absorción y características antimicrobianas (Perinelli y col., 2018). En la literatura científica se ha destacado la quitosana como nuevo excipiente farmacéutico con amplias aplicaciones (Mohammed y col., 2017). Además, las autoridades reguladoras han aprobado su uso, así como una monografía relacionada con el hidrocloruro de quitosana, se incluyó en la cuarta edición de la Farmacopea Europea (2011) y en el Manual de excipientes farmacéuticos (Rowe y col., 2009).

El método de secado por aspersión es un proceso tecnológico térmico avanzado de preparación de micropartículas, nanopartículas y derivados de quitosana, muy utilizado en la tecnología farmacéutica. Para obtener micro o nanopartículas de quitosana con las propiedades deseables, se requiere la comprensión del proceso y el ajuste cuidadoso de las condiciones de secado por pulverización, por ejemplo, la temperatura de entrada puede variar entre 120 y 170 °C (Prata y Grosso, 2015). Aunque la disolución que contiene la quitosana está expuesta a altas temperaturas durante un período de tiempo muy corto, no se puede excluir la influencia de este parámetro en el rendimiento final y las propiedades del derivado de quitosana obtenido. La presencia de grupos amino a lo largo de la cadena de la quitosana permite la disolución de esta macromolécula en disoluciones de ácidos diluidos, por medio de la protonación de esos grupos. Al adquirir carga positiva la amina, la quitosana aumenta su capacidad hidrofílica y pasa a ser soluble en disoluciones ácidas diluidas formando sales.

El secado por aspersión es un método rápido y reproducible con buen potencial para ser escalado (Ziaee y col., 2019). Sin embargo, la dependencia de muchas variables de proceso en el secado por aspersión puede convertirse en un desafío en términos de reproducibilidad y capacidad de escalado del proceso. Además, el secado por aspersión se puede adaptar bien a escala industrial, lo que es una gran ventaja sobre otros métodos de fabricación relacionados, que solo son aplicables en una escala de laboratorio. El secado por aspersión se ha aplicado con éxito en la preparación de suspensiones de quitosana, sales y varios tipos de microesferas y matrices para aplicaciones de liberación controlada (Aranaz y col., 2017). Hasta la fecha, prácticamente, todas las sales de quitosana secadas por aspersión se han obtenido a partir de quitina de camarones o cangrejos.

**Problema de la investigación**

¿Cómo establecer un proceso reproducible de obtención de sales de quitosana a escala industrial, para aplicaciones farmacéuticas?

**Objetivo general**

Establecer un proceso tecnológico a escala industrial para la obtención de sales de quitosana, para aplicaciones biomédicas.

**Objetivos específicos**

1. Desarrollar el proceso de obtención por secado por aspersión de sales de quitosana.
2. Validar el método analítico para el control de la calidad y estudio de estabilidad de las sales de quitosana.
3. Evaluar la estabilidad física, química y microbiológica de los lotes escalados de sales de quitosana.

**2. Metodología**

**2.1 Proceso de obtención del acetato y lactato de quitosana a escala de laboratorio**

Se realizó un diseño factorial 22 a escala de laboratorio (Statgraphics plus, versión 5.1, EE.UU.), los factores de estudio fueron el tipo de ácido (MM) y la diferencia de temperatura de entrada y salida del equipo (DT) y como variable de respuesta el rendimiento (R) de las sales de quitosana. Las disoluciones ácidas de quitosana fueron la de ácido acético al 10 % (m/m) (MM del ácido = 60,05 g/mol) y la de láctico al 10 % (m/m) (MM del ácido = 90,08 g/mol), las temperaturas de entrada y salida del secador por aspersión fueron 140/90 y 160/100 °C. Se realizaron ocho experimentos aleatorizados, replicados dos veces cada uno, para un volumen de 500 mL de la disolución ácida de quitosana.

Una vez establecidos los parámetros del proceso a través del diseño experimental anterior, se elaboraron dos lotes a escala de laboratorio (500 mL) del acetato (AQ-11001 y AQ-11002) y lactato de quitosana (LQ-11001 y LQ-11002). Las muestras fueron envasadas en bolsas dobles de polietileno de baja densidad, selladas y sacos de papel multicapa, protegidas de la luz y almacenadas a temperatura ambiente (30 ± 2 °C y 70 ± 5 % de HR).

**2.2 Grado de desacetilación. Validación del método analítico**

Se desarrolló un método por espectrofotometría ultravioleta-visble, empleando un espectrofotómetro UV-1601 (Shimadzu Corporation, Japan) y se tomó como referencia lo reportado para el clorhidrato de quitosana en la EP (2017). El procedimiento de validación fue realizado según lo establecido para la categoría I (de la Paz N y col., 2015; CECMED, Regulación 41-2007; CECMED, Anexo I-2013; USP 41, 2018).

**2.3 Evaluación física, química y microbiológica del acetato y lactato de quitosana obtenidos a escala de laboratorio**

Se les determinaron los parámetros físicos, químicos y microbiológicos, tomando como referencia lo reportado en la EP (2017) para el clorhidrato de quitosana, así como en la USP 41 (2018).

**2.4 Escalado industrial de la obtención del acetato y lactato de quitosana por el método de secado por aspersión**

Una vez definida la tecnología propuesta de obtención del acetato y lactato de quitosana a escala de laboratorio, se elaboraron tres lotes industriales (50 L) en la PPPNS del CIDEM. La quitosana (Q-11003) se disolvió en las disoluciones al 10 % (m/m) de ácido acético y en la de láctico, en un tanque agitado de acero inoxidable de 100 L de capacidad. Cada disolución se coló a través de una malla de acero inoxidable de 0,5 mm de tamaño de poro. Se empleó un secador industrial (Sam Young Chemical Machinery co. ltd, Corea). Para demostrar la reproducibilidad del proceso tecnológico establecido a escala de laboratorio e industrial, se analizaron los rendimientos en cada escala.

**2.5 Evaluación física, química y microbiológica del acetato y lactato de quitosana obtenidos a escala industrial**

Se evaluaron los parámetros físicos, químicos y microbiológicos y se les determinó el grado de desacetilación siguiendo lo descrito en el epígrafe 2.3. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

**2.6 Estudio de estabilidad de las sales de quitosana obtenidas a escala industrial**

Se realizó un estudio de estabilidad acelerada a 40 ± 2 °C y 75 ± 5 % de HR durante seis meses, haciendo el muestreo inicial, a los tres y seis meses de elaborados los lotes industriales de cada sal. La estabilidad por vida de estante se realizó durante 24 meses (EMEA, 2003; CECMED, Regulación 23-2000; CECMED, Regulación 24-2000). Se colocaron las muestras correspondientes a los tres lotes estudiados de cada sal, en un local a temperatura de 30 ± 2 °C y HR 70 ± 5 %, envasados en bolsas dobles de polietileno de baja densidad, selladas y sacos de papel multicapa. Se evaluaron las características organolépticas, el pH, el contenido de humedad y el grado de desacetilación, según la metodología seguida en el epígrafe 2.5. La pureza microbiológica se le determinó a todas las muestras al inicio y decursados 24 meses (USP 41, 2018).

**3. Resultados y discusión**

**3.1 Proceso tecnológico de obtención del acetato y lactato de quitosana a escala de laboratorio**

Se estudiaron las mejores condiciones del proceso de obtención del acetato y lactato de quitosana, por secado por aspersión. En el diagrama de Pareto y análisis de varianza (Figura 1), se observó que el tipo de ácido tuvo una influencia significativa, no así la DT, obteniéndose rendimientos por encima del 50 % para la DT de 60 °C, independientemente del tipo de ácido. La interacción entre ambos factores no es significativa. Este comportamiento es descrito a través de la ecuación del modelo siguiente, la cual se corresponde con un modelo lineal (r2 = 0,83):



Se han obtenido sales de quitosana por diferentes métodos, tales como: liofilización (clorhidrato de quitosana), formación de película (laurato de quitosana) y microondas (sulfato de quitosana: Zhang y col., 2017). Nunthanid y col. (2004) obtuvieron acetato y lactato de quitosana por secado por aspersión, empleando una temperatura de entrada de 125 ± 5 °C, mientras que Parize y col. (2008) emplearon disoluciones al 5 % de ácido acético y láctico a una temperatura de entrada de 180 ± 5 °C y de salida 100 ± 5 °C. A partir de los resultados del diseño se decidió emplear una temperatura de entrada de 160 ± 5 °C y salida de 100 ± 5 °C y se empleó la disolución de quitosana al 4 % (m/m) en ácido acético o láctico al 10 % (m/m) para obtener las sales de acetato y lactato de quitosana a escala de laboratorio. Se elaboraron dos lotes del acetato (AQ-11001 y AQ-11002) y lactato de quitosana (LQ-11001 y LQ-11002) a escala de laboratorio a partir de 500 mL de la disolución ácida de quitosana.



Figura 1. Análisis del rendimiento de la obtención del acetato y lactato de quitosana por secado por aspersión a escala de laboratorio. Fuente: elaboración propia.

**3.2 Grado de desacetilación. Validación del método analítico**

El estudio realizado para comprobar la especificidad del método de análisis arrojó que la absorbancia de las disoluciones placebos fueron menores del 1 % en relación al contenido de N-acetilglucosamina, en las sales de acetato y lactato de quitosana, por lo que se evidenció que el método es específico para la N-acetilglucosamina, la cual posee un máximo de absorbancia en el espectro ultravioleta a 205 nm. Se comprobó la linealidad del método debido a que los valores de coeficiente de correlación y determinación resultaron adecuados, superiores a los límites establecidos, además los coeficientes de variación de los factores de respuesta y las desviaciones estándar relativas de la pendiente, considerados estimadores puntuales que permiten caracterizar la variabilidad, fueron inferiores a lo regulado para estos indicadores. En los estudios de la repetibilidad, realizados a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, los coeficientes de variación alcanzados resultaron adecuados para el acetato (0,8 %) y lactato de quitosana (0,2 %), lo que demostró la buena precisión de los métodos según los límites para los métodos espectrofotométricos. Los valores obtenidos en las pruebas de Fischer y t-Student, demostraron que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días, así como entre los días estudiados, para un 95 % de confianza, ya que los valores de F calculados son menores que la F tabulada. Al realizar las pruebas de t-Student los valores calculados resultaron menores que el tabulado para un 95 % de confianza, lo que demostró que no existen diferencias significativas entre las medias alcanzadas. Comprobándose con estos resultados la precisión del método. Los valores de recobrado se encontraron dentro del rango de 98,0 a 102,0 %; así como, los valores de coeficientes de variación total en cada sal evaluada. Al aplicar las pruebas de Cochran se obtuvieron G experimentales menores que el tabulado, para un 95 % de confianza, por lo tanto, las varianzas de las concentraciones estudiadas fueron equivalentes indicando que la concentración no influyó en la variabilidad de estos resultados. Los resultados obtenidos demostraron la exactitud del método evaluado para la determinación de N-acetilglucosamina. Por todo lo anterior se puede afirmar que el método desarrollado es confiable y puede ser empleado para la determinación del GD molar del acetato y lactato de quitosana, obtenidos por el método de secado por aspersión.

**3.3 Evaluación física, química y microbiológica del acetato y lactato de quitosana obtenidos a escala de laboratorio**

En la Tabla I se muestran los resultados de los parámetros físicos, químicos y microbiológicos determinados a las sales de quitosana, correspondiendo a un polvo fino de color amarillo claro a intenso, con bajo contenido de humedad debido al método y condiciones empleados para su obtención. El porcentaje de humedad se encuentra por debajo del 6 %, considerándose adecuado ya que la mayoría de los productos secados por atomización contienen del 1 al 6 % de humedad (Pino y col., 2016). Además, para el clorhidrato de quitosana se plantea como límite menor del 10 % (Rowe y col., 2009; Sheskey y col., 2013; EP, 2017). El análisis estadístico arrojó que no existen diferencias estadísticas (p > 0,05) entre los valores de los lotes para el acetato y lactato de quitosana.

El resto de los parámetros determinados evidenciaron la calidad farmacéutica de estas sales, al corresponderse con los límites establecidos para el clorhidrato de quitosana (Rowe y col., 2009; Sheskey y col., 2013; EP, 2017). El grado de desacetilación de cada sal, se determinó a partir del valor de absorbancia de la N-acetilglucosamina, lo que corroboró la presencia de dichas unidades detectadas tras el análisis por espectroscopía de RMN de estado sólido. Los resultados del conteo microbiano demostraron la pureza microbiológica de las sales de quitosana, como materias primas no estériles (USP 41, 2018).

**3.4 Escalado industrial para la obtención del acetato y lactato de quitosana por el método de secado por aspersión**

A partir de los resultados obtenidos en los epígrafes 3.1 y 3.3 se procedió a escalar industrialmente el proceso tecnológico para la obtención de ambas sales de quitosana, dada su aplicabilidad en la industria farmacéutica y alimentaria. En la escala de laboratorio el sistema de atomización empleado fue una tobera, pero la salida del líquido generada es similar a la del disco centrífugo (Masters, 1991) utilizado a escala industrial. En el caso de la cámara, la relación geométrica altura de la cámara/diámetro de la cámara (H/D) en ambas escalas (laboratorio: 3,90; H/D requerida: 3 - 4 e industrial: 0,60; H/D requerida: 0,6 - 1) se encuentra acorde al valor requerido (Masters, 1991; López y col., 2018). De igual forma, las relaciones geométricas para el caso de los ciclones son similares, estos son dispositivos de separación mecánica, que se tienen en cuenta en el diseño, ya que influyen considerablemente en la eficiencia del dispositivo (Maury y col., 2005). De esta forma fueron verificadas las diferentes relaciones que garantizan la semejanza geométrica en los equipos utilizados. El rendimiento en la escala industrial fue superior que en la de laboratorio , lo que pudiera ser debido al atomizador empleado, el cual no se obstruye y permite trabajar con mayor flexibilidad las disoluciones viscosas (Anandharamakrishnan y Padma Ishwarya, 2015), demostrándose la factibilidad de obtener las sales a escala industrial. Por otra parte, el rendimiento a escala industrial se vio favorecido por la presencia en el secador de un dispositivo para evitar la deposición del polvo obtenido durante el proceso, que en el caso del equipo de laboratorio no existe por ser la cámara de secado de vidrio (López y col., 2018).

Tabla I. Parámetros físicos, químicos y microbiológicos del acetato y lactato de quitosana obtenidos por secado por aspersión a escala de laboratorio. Fuente: elaboración propia.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Parámetro** | **Acetato de quitosana** | **Lactato de quitosana** |
| **AQ-11001** | **AQ-11002** | **LQ-11001** | **LQ-11002** |
| **Características organolépticas** | C | C | C | C |
| **Solubilidad** | C | C | C | C |
| **Identificación** | C | C | C | C |
| **pH**  | 5,42 (0,0) | 5,40 (0,0) | 4,12 (0,0) | 4,20 (0,0) |
| **Sustancia insoluble****en agua (%)** | 0,31 (0,0) | 0,30 (0,01) | 0,38 (0,01) | 0,32 (0,0) |
| **Contenido de humedad (%)** | 4,21 (0,01) | 4,20 (0,01) | 3,13 (0,03) | 3,09 (0,01) |
| **Cenizas** **sulfatadas (%)** | 0,35 (0,01) | 0,35 (0,0) | 0,48 (0,02) | 0,45 (0,01) |
| **GD molar (%)** | 55,52 (0,02) | 55,31 (0,03) | 55,10 (0,06) | 55,42 (0,03) |
| **Conteo microbiano**  | C | C | C | C |

AQ- acetato de quitosana, LQ- lactato de quitosana, GD- grado de desacetilación,

C- cumple con el criterio de aceptación

Valor medio de tres determinaciones (desviación estándar)

**3.5 Evaluación física, química y microbiológica del acetato y lactato de quitosana obtenidos a escala industrial**

Los resultados del análisis de calidad realizado a cada uno de los lotes obtenidos a escala industrial, en todos los casos se obtuvieron materias primas con características organolépticas similares a las descritas en el epígrafe 3.3 y prácticamente insolubles en etanol al 96 %. Se comprobó la formación de una masa gelatinosa voluminosa al añadir la disolución de amoníaco al 25 % (v/v) y la de acetona a una disolución acuosa de cada una de las sales de quitosana. Los valores de pH son característicos de disoluciones ácidas, en un intervalo entre 4,0 y 6,0. Los resultados del análisis de las sustancias insolubles en agua, el contenido de humedad y las cenizas sulfatadas demostraron que se encuentran por debajo de los límites establecidos, para estos parámetros en la EP (2017) para el clorhidrato de quitosana. El GD fue similar al calculado para el acetato y lactato de quitosana obtenidos a escala de laboratorio y el análisis de pureza microbiológica demostró que no existe contaminación microbiana (USP 41, 2018). Todos los resultados se corresponden con los de las sales obtenidas a escala de laboratorio y confirman que el proceso tecnológico desarrollado garantizó la obtención de sales iónicas de quitosana con calidad farmacéutica.

Todos los resultados anteriores permitieron demostrar la reproducibilidad de los lotes del acetato y lactato de quitosana en las escalas estudiadas, además por primera vez se desarrolló un método de secado por aspersión a escala industrial para obtener sales de quitosana, con calidad farmacéutica.

**3.6 Estabilidad física, química y microbiológica de las sales de quitosana obtenidas a escala industrial**

El estudio de estabilidad acelerada muestra que al cabo de los 6 meses no ocurren cambios físicos ni químicos en las muestras. En correspondencia con estos resultados en el estudio de estabilidad por vida de estante para ambas sales, transcurridos 24 meses se mantuvieron adecuados los indicadores de calidad, no se observaron cambios en las características organolépticas, los valores de pH se mantuvieron en el intervalo entre 4,0 y 6,0, el contenido de humedad fue inferior al 10 %, límite establecido para el clorhidrato de quitosana (EP, 2017) y entre los valores del GD no hubo diferencias superiores al 5 % (CECMED, Regulación 23-2000; CECMED, Regulación 24-2000), por lo que se puede afirmar que las sales de quitosana obtenidas son estables, al menos, durante 24 meses en las condiciones estudiadas.

El estudio microbiológico mostró que decursado el tiempo de estudio las muestras cumplen con los límites microbianos establecidos para productos no estériles (USP 41, 2018). Todos estos resultados demostraron que el acetato y lactato de quitosana, obtenidos mediante el proceso de secado por aspersión, en las condiciones de la PPPNS del CIDEM, almacenados en bolsas dobles de polietileno de baja densidad y sacos de papel multicapas, a temperatura de 30 ± 2 °C y humedad relativa 70 ± 5 %, conservan durante 24 meses sus características físicas, químicas y microbiológicas, por lo que podrían ser empleadas como materias primas de calidad farmacéutica en la elaboración de formas terminadas.

**4. Conclusiones**

* Las condiciones para la obtención de las sales de quitosana a escala industrial por el método de secado por aspersión, fueron temperatura de entrada 160 ± 5 °C y salida 100 ± 5 °C y una velocidad del disco centrífugo de 12 736 min-1.
* El método de análisis por espectrofotometría ultravioleta desarrollado, para el control de la calidad y estudio de estabilidad de las sales de quitosana, resultó específico, lineal, preciso y exacto por lo que puede ser empleado para la cuantificación del GD de estos derivados.
* Las propiedades físicas, químicas, tecnológicas y pureza microbiológica de las sales de quitosana, mostraron homogeneidad en los lotes escalados demostrando, por primera vez, la reproducibilidad de la metodología desarrollada y sus potencialidades como materias primas para la industria farmacéutica.
* Los lotes industriales del acetato y lactato de quitosana, envasados en bolsas dobles de polietileno de baja densidad y sacos de papel multicapas, almacenados a temperatura ambiente (30 ± 2 °C), mantuvieron su estabilidad física, química y microbiológica durante 24 meses.

**5. Referencias bibliográficas**

1. (EP) European Pharmacopeia. 9th ed. Strasburg: Council of Europe; 2017:1774, 2028.
2. Anandharamakrishnan C, Padma Ishwarya S. Introduction to spray drying. In: Spray drying for nanoencapsulation of food components. 1st ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015:1-33.
3. Aranaz I, Paños I, Peniche C, Heras Á, Acosta N. Chitosan spray-dried microparticles for controlled delivery of venlafaxine hydrochloride. Molecules. 2017;22:1980.
4. CECMED. Centro para el control estatal de medicamentos, equipos y dispositivos médicos. Regulación No. 23 – 2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos, Cuba. 2000.
5. CECMED. Centro para el control estatal de medicamentos, equipos y dispositivos médicos. Regulación No. 24 – 2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de nuevos ingredientes farmacéuticos activos, Cuba. 2000.
6. CECMED. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos. Regulación 41-2007. Validación de métodos analíticos, Cuba. 2007.
7. CECMED. Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos. Anexo I-2013. Buenas prácticas para laboratorio de control de medicamentos. Validación de Métodos Analíticos, Cuba. 2013.
8. de la Paz N, García C, Fernández M, García L, Martínez V, López O, Nogueira A. Estabilidad de las sales de quitosana, obtenidas por secado de aspersión, derivadas de quitina de langosta. Ars Pharm. 2015;56 (4): 217-224.
9. EMEA. European Medicines Agency. ICH Topic Q1A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products, Reino Unido. 2003.
10. European Pharmacopoeia, 7th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2011; pp. 1651–1652.
11. Grenha A, Seijo B, Remuñán-López C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. Eur. J. Pharm. Sci. 2005;25: 427–437.
12. López HO, Nuñez FY, Mayo AO. Aumento de la biodisponibilidad de lípidos mediante microencapsulación. España: Editorial Académica Española; 2018:38,53.
13. Masters K. Spray drying handbook, 5th ed. UK: Longman Scientific and Technical; 1991:256-57.
14. Maury M, Murphy K, Kumar S, Shi L, Lee G. Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2005;59(3):565-73.
15. Mohammed M, Syeda Jaweria TM, Wasan KM, Wasan EK. An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. Pharmaceutics. 2017:9,53.
16. Nunthanid J, Laungtana-Anan M, Sriamornsak P, Limmatvapirat S, Puttipipatkhachorn S, Lim L. Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets. Journal of Controlled Release. 2004;99(1):15-26.
17. Parize A. Rozone de Souza TC, Costa Brighente IM, de Fávere VT, Laranjeira MC, Spinelli A. Microencapsulation of the natural urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents. Afr. J. Biotechnol. 2008;7(17):3107-14.
18. Perinelli DR, Fagioli L, Campana R, Lam JKW, Baffone W, Palmieri GF, Casettari L, Bonacucina G. Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. Eur. J. Pharm. Sci. 2018;117:8–20.
19. Pino JA, Bringas LM, Aragüez FY. Conocimientos actuales sobre el secado por aspersión de la miel. Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2016;26(2):74-81.
20. Prata A, Grosso C. Production of microparticles with gelatin and chitosan. Carbohydrate Polymers. 2015;116:292-99.
21. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. (Eds.) Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed.; Pharmaceutical Press: London, UK, 2009; pp. 159–161.
22. Sheskey PJ, Cook WG, Cable CG, editors. Chitosan. In: Handbook of Pharmaceutical Excipients. Washington: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association; 2013:544.
23. USP 41 United States Pharmacopeia. USP 41-NF 36. Washington DC: The United States Pharmacopeia Convention SA; 2018: 1250, 5290-91, 5791, 5965, 5971, 6147, 6168, 6485, 7481, 7665.
24. Yamada K, Iwao Y, Bani-Jaber A, Noguchi S, Itai S. Preparation and evaluation of newly developed chitosan salt coating dispersions for colon delivery without requiring overcoating. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 2015;63(10):799-806.
25. Ziaee A, Albadarin AB, Padrela L, Femmer T, O’Reilly E, Walker G. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. Eur. J. Pharm. Sci. 2019;127:300–318.