

## PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS DE QUITOSANO RETICULADAS CON TRIPOLIFOSFATO Y MODIFICADAS CON POLIETILENGLICOL

Nadia Rodríguez Hamamura<sup>\*</sup>, Ana Valderrama Negrón<sup>a</sup>, Hugo Alarcón Cavero<sup>b</sup>,  
Alcides López Milla<sup>c</sup>

### RESUMEN

Se han preparado partículas de quitosano (CS) a escala nanométrica para posteriormente realizar estudios de cargado y liberación de fármacos. El quitosano fue caracterizado por FTIR y valoración conductimétrica para determinar su porcentaje de desacetilación y mediante viscosimetría para obtener su masa molar. Se aplicó el método de gelación iónica para la preparación de las partículas de CS entrecruzadas con aniones tripolifosfato (TPP) y modificadas con polietilenglicol (PEG), obteniéndose tamaños de partícula en un rango de 100 a 400nm. La caracterización de las partículas de CS-TPP modificadas con PEG se realizó usando las técnicas de DLS, TEM y FTIR. Además, se estudiaron los factores que influyen en la estabilidad de las partículas de CS, como el efecto del tiempo, fuerza iónica y pH.

**Palabras clave:** Quitosano, gelación iónica, nanopartículas.

## PREPARATION OF CHITOSAN PARTICLES CROSS-LINKED WITH TRIPOLYPHOSPHATE AND MODIFIED WITH POLYETHYLENE GLYCOL

### ABSTRACT

Chitosan(CS) particles were prepared to nanoescale for further studies of loaded and released drugs. The chitosan was characterized by viscosimetry to obtain the molar mass. Titration conductivity and FTIR were performed in able to determine the percentage of deacetylation. Ionic gelation was the method used for the preparation of CS particles cross-linked with tripolyphosphate (TPP) anions and modified with polyethylene glycol (PEG) to obtain size in a range of 100 to 400nm. Characterization of CS-TPP particles modified with PEG was performed using DLS, TEM and FTIR techniques. The factors that influence the stability of the CS particles, as the effect of time, ionic strength and pH were also studied.

**Key words:** Chitosan ,ionic gelation, nanoparticles.

### INTRODUCCIÓN

El quitosano (CS), poliβ-(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa obtenido a partir de la quitina, es el segundo polisacárido más abundante y un polielectrolito catiónico presente en la naturaleza. El CS ha demostrado tener características de biocompatibilidad favorable y para ser degradado por la lisozima en el suero. Desde un punto de vista biofarmacéutico, el CS tiene un gran potencial de servir como potenciador de la absorción a través del epitelio intestinal para mejorar sus propiedades mucoadhesivas y de permeabilidad.

<sup>\*</sup> Laboratorio de Metalofármacos y Biopolímeros, Universidad Nacional de Ingeniería. Av. Túpac Amaru 210. Lima 25. Perú. nadiarh@gmail.com.

<sup>b</sup> Laboratorio de Películas Delgadas. Universidad Nacional de Ingeniería

<sup>c</sup> Laboratorio de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Ingeniería.

Recientemente, las partículas poliméricas menores de 1000nm están siendo investigadas como portadoras de fármacos por vía oral, con el objetivo de mejorar la asimilación de los fármacos con bajas características de absorción. Algunos investigadores también han observado que el número de partículas de escala nanométrica que atraviesan el epitelio intestinal es mayor que el de las microesferas ( $>1\mu\text{m}$ ), haciendo que su preparación y estudio sea de gran interés. Las partículas poliméricas de tamaño menor de  $1\mu\text{m}$  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 el tracto gastrointestinal tras su administración oral<sup>1</sup>.

Las partículas de quitosano fueron preparadas por gelación iónica del quitosano con aniones de tripolifosfato (TPP) y fueron modificadas con el polímero polietilenglicol (PEG). Al no formar redes permanentes porque no se da la unión química irreversible, no tienen problemas de toxicidad en humanos, ya que se biodegradan y *reabsorben «in vivo»*. Las partículas recubiertas de PEG se han descubierto como grandes potenciales en la aplicación terapéutica para la liberación controlada de fármacos y el suministro de medicamentos a sitios específicos. Pocos estudios han tratado de investigar las partículas de quitosano recubiertas con PEG. Las partículas recubiertas con PEG fueron concebidas con la intención de hacer estas partículas más estables en los fluidos fisiológicos, de ahí nuestro interés en su preparación.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales

Quitosano en polvo, adquirido de Sigma- Aldrich Chemistry, Inc, USA; como Chitosan from crab shells > 75% deacetylated. Polietilenglicol 20000Da, adquirido de Merck-Schuchardt. Tripolifosfato de sodio, adquirido de Sigma- Aldrich Chemistry. Todos los demás reactivos químicos fueron de grado analítico para análisis.

### Caracterización fisicoquímica del quitosano

#### Porcentaje de humedad

Se pesaron muestras de quitosano y se llevaron a peso constante calentándolos en un horno a  $105^\circ\text{C}$ . Finalmente, se pesaron las muestras secas.

#### Contenido de cenizas

Se pesó una muestra de quitosano y se colocó en una mufla a  $800^\circ\text{C}$  durante 6h. Finalmente, se pesó el residuo obtenido tras la calcinación.

#### Contenido de material insoluble

Se filtró al vacío la solución de quitosano al 2% en ácido acético. El papel de filtro rápido con material insoluble se secó en el horno hasta la determinación del peso constante.

#### Porcentaje de desacetilación

**Espectroscopía Infrarroja.** Para obtener el espectro IR de las películas de CS se utilizó el espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier FTIR Shimadzu 8300 con frecuencia de  $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ . Se prepararon las películas de quitosano tomando como base el procedimiento de Baxter<sup>2</sup>. La solución se vertió en una superficie de plástico, buscando una dispersión homogénea del contenido manteniendo la muestra a  $60^\circ\text{C}$  por 24 horas. La película se lava con una solución al 8% de amoníaco en metanol y finalmente con metanol. Nuevamente, se mantiene la muestra a  $60^\circ\text{C}$  por 20 min y luego en un desecador hasta el momento de la medida por FTIR.

**Valoración conductimétrica.** Para obtener la curva de valoración conductimétrica se utilizó el conductímetro, Orión 142. Para esto se pesaron 200mg de quitosano y se disolvieron en

5mL de HCl 1,0 M. Luego, se agregaron 450mL de NaCl 0,001 M, y se llevó a agitación para lograr una solución uniforme.

Esta solución se tituló conductimétricamente con 60mL de NaOH 0,1M estandarizado. La titulación se realizó descargando 0,5mL de NaOH 0,1M por cada medida.

### **Masa molecular**

Las medidas de viscosidad y densidad de las soluciones de quitosano se realizaron con un picnómetro con termómetro y capilar lateral con caperuza y un viscosímetro Ostwald Cannon –Fenske rutina Serie 9721-A50 tamaño 400, de 20,3cm de longitud y 5mm de diámetro.

Se preparó una solución 0,1M de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  en 0,2M de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  que se utilizó como disolvente (buffer), para preparar las diferentes concentraciones de quitosano: 0,5%, 0,25%, 0,125% y 0,0625%(w/v). Se midieron la densidad y viscosidad de las disoluciones de quitosano. Estas mediciones se realizaron en un baño de temperatura constante de 30 °C, por triplicado. Las medidas de viscosidad y densidad también se realizaron para el buffer y el agua destilada.

### **Preparación de las partículas de quitosano**

Las partículas de CS se prepararon tomando como base el procedimiento de Calvo et al.<sup>3</sup>. Se realizaron diversas pruebas con el fin de obtener el tamaño de partículas en suspensión deseado, variando la concentración de CS y de TPP.

Se prepararon soluciones de ácido acético de las siguientes concentraciones 0,9; 1,5; 3; 4,5; 6 y 7,5mg/mL, en la que se disolvió el quitosano a 0,6; 1; 2; 3; 4 y 5mg/mL respectivamente. Se dejó reposando la solución de quitosano por 24horas. Las partículas de quitosano no disueltas se filtraron. Se llevó la solución a pH 4,6 con hidróxido de sodio, 1N. Se agregó polietilenglicol a la solución de quitosano, bajo agitación magnética y a temperatura ambiente, obteniéndose soluciones de PEG-quitosano con diferentes concentraciones de PEG (0, 10, 30, 50 mg/mL). Luego, bajo agitación magnética y a temperatura ambiente, se agregó gota a gota con ayuda de una jeringa insulínica, 4 mL de solución acuosa de tripolifosfato de sodio (TPP) de concentración 0,6 ó 1mg/mL a 10 mL de la solución PEG-quitosano, respectivamente. Finalmente, se ultracentrifugaron las soluciones obtenidas a 10000rpm, 18 °C durante 15 minutos para separar cualquier partícula de mayor tamaño que se haya podido formar y quede lista la muestra para su caracterización.

### **Caracterización fisicoquímica de las partículas de quitosano**

#### **Microscopía de transmisión electrónica (TEM)**

La morfología y tamaño de las partículas de quitosano fueron examinadas usando el microscopio electrónico de transmisión, PHILIPS M300 80keV.

#### **Dispersión de luz dinámica (DLS)**

Se usó el equipo de dispersión de luz dinámica (DLS), Brookhaven 90 Plus para hallar el diámetro hidrodinámico y la distribución del tamaño de las partículas obtenidas.

#### **Espectroscopía IR de reflectancia**

Para obtener el espectro IR de las partículas de quitosano se utilizó el espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier FTIR Shimadzu 8300 con frecuencia de 4000 a 400 $\text{cm}^{-1}$ , usando de blanco bromuro de potasio seco. Las partículas de quitosano de las siguientes concentraciones de CS, PEG y TPP en mg/mL (1, 0 y 1), (1, 10 y 1) y (5, 50 y 1), respectivamente; fueron separadas de la suspensión y secadas mediante un liofilizador *ABCONCO, LYPHLOCK 12*, obteniendo en todos los casos un sólido blanco.

### **Estudio de los factores que influyen la estabilidad de las partículas de quitosano**

#### **Estudio de la variación del tamaño de las partículas de quitosano en el tiempo**

Las partículas de CS que cumplían con los requisitos de tamaño y además presentaban una

opalescencia que se mantenía estable y en suspensión fueron las de concentración de CS 1mg/mL, TPP 1mg/mL y PEG (10, 30 y 50 mg/mL). Éstas fueron las utilizadas para el análisis. Se realizaron las medidas de tamaño de las partículas a cada una de las suspensiones utilizando el DLS. Las medidas se realizaron a los 3, 9 y 17 días.

#### **Efecto salino sobre la variación del tamaño de las partículas de quitosano**

Se preparó una solución de cloruro de sodio 0,30 mol/L. Se tomó 10mL de la suspensión de partículas de quitosano (de concentraciones CS 1mg/mL y TPP 1mg/mL) y se mezcló con 10mL de la solución salina anteriormente preparada, obteniéndose una suspensión de partículas de quitosano en un medio de concentración salina fisiológica 0,15mol/L que se mantuvo en agitación constante. El tamaño de las partículas de quitosano se midió, usando el DLS y luego a los 17, 34 y 51 minutos de la mezcla.

#### **Efecto salino sobre la variación del tamaño de las partículas de quitosano a diferentes concentraciones de cloruro de sodio**

Se prepararon soluciones de cloruro de sodio a 0,10 y 0,30 mol/L. Se tomaron 10mL de la suspensión de partículas de CS (de concentraciones CS 1mg/mL y TPP 1mg/mL) y se mezcló con 10mL de la solución salina 0,10 mol/L anteriormente preparada, obteniéndose una suspensión de partículas de CS en un medio de concentración salina de 0,05mol/L que se mantuvo en agitación constante. Se realizó lo mismo con la solución salina de 0,30 mol/L, obteniéndose una concentración salina de 0,15mol/L. El tamaño de las partículas de CS se midió, usando el DLS, a los 50 minutos después de la mezcla.

#### **Estudio de estabilidad de las partículas de quitosano a diferentes pH**

Para las medidas de estabilidad de CS a pH: 1,2 y 7,4; se prepararon soluciones buffer en las que se agregaron la suspensión de partículas de CS (de concentraciones CS 1mg/mL y TPP 1mg/mL), se mantuvieron en agitación constante y a una temperatura promedio de 37°C, utilizando un sistema compuesto de una chaqueta de calefacción, un termostato y una bomba peristáltica. La solución buffer a pH 1,2 se preparó con 50mL de solución de cloruro de potasio, KCl 0,2M y 85mL de solución de ácido clorhídrico, HCl 0,2 M; este buffer actúa como fluido gástrico simulado. La solución buffer a pH 7,4 se preparó con 100mL de la solución de dihidrógeno fosfato de potasio,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M y 78,2mL de la solución de hidróxido de sodio, NaOH 0,1 M, este buffer actúa como fluido intestinal simulado. Luego, se hizo un barrido de la solución de 200 a 400 nm, utilizando un espectrofotómetro UV LaboMed Inc. Se continuó realizando las mismas medidas después de 1 y 24 horas.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Caracterización fisicoquímica del quitosano**

#### **Porcentaje de humedad**

Todas las muestras de quitosano poseen diferentes contenidos de agua, por este motivo el porcentaje de humedad es un parámetro importante que debe considerarse al momento de trabajar con dichas muestras.

$$\text{Humedad}(\%) = \frac{(\text{peso húmedo} - \text{peso seco})}{\text{peso húmedo}} \cdot 100 \quad (1)$$

Se obtuvo 7,84% de humedad total, un porcentaje alto y que debe considerarse al momento del pesado para no variar los resultados esperados.

### Contenido de cenizas

El contenido de cenizas es indicativo del contenido de materiales inorgánicos presentes en la muestra; se determina de acuerdo a:

$$\text{Contenido de cenizas(\%)} = \frac{\text{peso cenizas}}{\text{peso total}} 100 \quad (2)$$

El contenido de cenizas totales es de 0,2273%; un resultado bajo, lo que es muy importante ya que se quiere orientar el trabajo hacia aplicaciones biomédicas.

### Contenido de material insoluble

El contenido de material insoluble puede venir dado por la presencia de sales insolubles, quitosano poco destilado y otros contaminantes. Se determina de acuerdo a:

$$\text{Material insoluble(\%)} = \frac{\text{peso filtrado}}{\text{peso total}} 100 \quad (3)$$

El contenido de material insoluble es 2,87%, información que se debe considerar al preparar las soluciones de quitosano a la concentración deseada.

### Porcentaje de desacetilación

**Espectroscopía infrarroja.** El espectro FTIR de las películas de quitosano se muestra en la figura 1. Brugnerotto y col.<sup>4</sup> realizaron una extensiva investigación en la que analizaron 25 muestras de quitina y quitosano de diferentes fuentes y con grados de acetilación, determinados por espectroscopía RMN, que iban desde 0,5% hasta 97,9%. A partir de los espectros FTIR se toma como banda característica a la localizada a  $1\,320\text{ cm}^{-1}$ , y como referencia la banda a  $1\,420\text{ cm}^{-1}$ , obteniendo una correlación lineal que viene expresada por la siguiente relación:

$$\text{DA(\%)} = 31,92 (A_{1320}/A_{1420}) - 12,20 \quad (4)$$

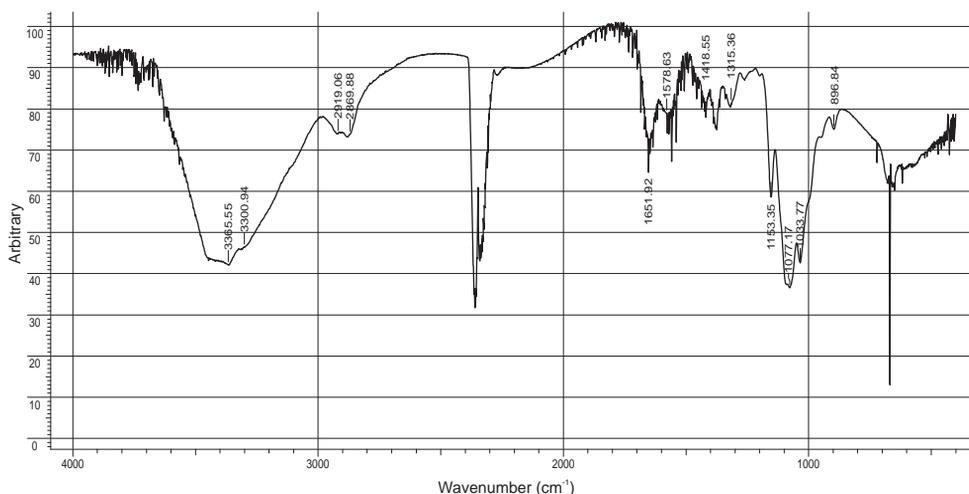


Figura 1. Espectro FTIR de quitosano.

Tabla 1. Datos de absorbancia

Longitud de onda( $\text{cm}^{-1}$ )	%Transmitancia	Absorbancia del pico(u.a.)
1320	80,661577	0,093333
1420	81,162679	0,090644

Tabla 2. Grupos funcionales característicos

Grupo funcional	$\nu_{\text{referencia}}^5$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu_{\text{Exp}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intens. del pico
Grupo -OH	3450	3365	m
Grupo N-H	3292	3300	m
Grupo C-H	2919 y 2862	2919 y 2869	s
Amida I	1655	1652	m
Doblaje del grupo -NH <sub>2</sub>	1580	1579	s
Amida III	1313	1315	s
Tensión asimétrica del C-O-C	1154	1153	m
Vibraciones de su estructura piranósica	1082 y 1032	1077 y 1033	w y m
Tensión C-H de grupos anoméricos	896	896	s

Aplicando la ecuación (4) el grado de acetilación del quitosano es:  $DA(\%) = 19,95$   
 Por lo tanto, el grado de desacetilación es:

$$DD(\%) = 100 - DA \quad (5)$$

$$DD(\%) = 80,05$$

En el espectro IR (figura 1), se pueden apreciar las siguientes bandas características que se muestran en la tabla 2, lo que es consistente con su estructura (figura 2).

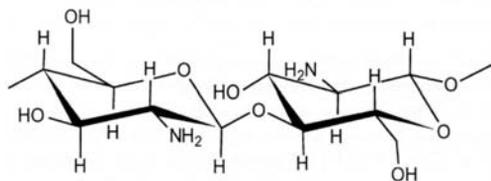
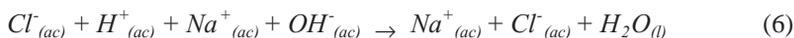


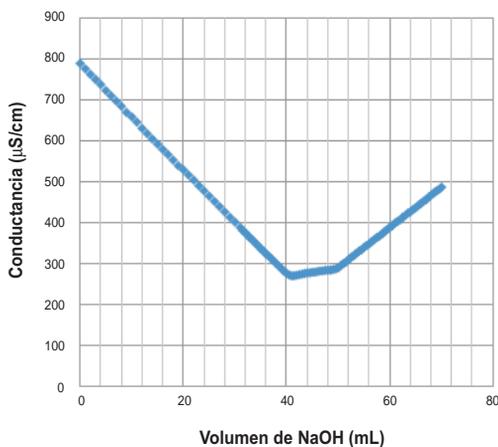
Figura 2. Estructura del quitosano.

### Valoración conductimétrica

La titulación de HCl con NaOH es una titulación ácido fuerte con base fuerte; la reacción que tiene lugar es:



Inicialmente la conductividad de la disolución ácida es grande porque los iones  $H^+$  tienen una movilidad muy alta. Conforme se va produciendo la neutralización, los iones  $H^+$  libres reaccionan con cada  $OH^-$  añadido, y van formándose iones  $Na^+$  libres que tienen una movilidad menor, esto hace que la conductividad disminuya rápidamente, lo que se manifiesta en la curva (figura 3) como una disminución casi lineal de la conductividad de la solución. Hasta que se alcanza el punto mínimo de la curva donde el HCl se ha consumido y empieza la titulación de los grupos amino protonados:



**Figura 3.** Conductancia específica vs volumen del titulante NaOH

A continuación se produce un incremento de la conductividad debido a la neutralización de los grupos amino protonados del quitosano. Esta curva presenta cierta curvatura debido a la precipitación del quitosano, precipitación que comienza a  $pH = 6,5$ .

Cuando la neutralización se completa, la curva ascendente adquiere una mayor pendiente debido a la incorporación de los iones  $OH^-$  libres. Los cambios de pendiente que se observan en los dos puntos mencionados presentan cierta curvatura. Este hecho se debe, en el primer caso, a la disociación inicial de los grupos amino protonados del quitosano y, en el segundo caso, a la precipitación del quitosano antes mencionado. De esta forma, la equivalencia se calcula determinando las posiciones de las intersecciones de las ramas correspondientes de la curva. La diferencia entre los dos puntos de intersección corresponde al volumen de NaOH requerido para neutralizar los grupos amino libres del quitosano, lo que permite determinar el grado de N-acetilación de la muestra.

En el punto de equivalencia:

$$\begin{aligned} \# Eq - g_{(ÁCIDO)} &= \# Eq - g_{(BASE)} \\ \# Eq - g_{(R-NH_3^+)} &= \# Eq - g_{(NaOH)} \\ \frac{w_{(R-NH_3^+)} \cdot x\theta}{M} &= N_{NaOH} \cdot V_{NaOH} \end{aligned}$$

**Donde:**

- Normalidad del NaOH:  $N_{NaOH} = 0,0954N$
- Volumen de NaOH utilizado para neutralizar grupos  $NH_3^+$ :  $V_{NaOH} = 10,1mL$
- Masa de quitosano:  $w_{R-NH_3(Húmedo)} = 0,2006g$   $w_{R-NH_3(seco)} = 0,1849g$
- $q=1$  (número de  $H^+$  neutralizados de cada  $NH_2$ ).

Reemplazando los datos:

$$\frac{mmol_{(NH_2)}}{g(CS)} = \frac{(0,0954N)(10,1mL)}{(0,1849g)} = 5,21 \quad (7)$$

Entonces la cantidad de grupos aminos por gramo de quitosano es:

$$5,21 \frac{mmol_{(NH_2)}}{g(CS)}$$

Así, obtenemos el grado de desacetilación, utilizando la siguiente ecuación:

$$NH_2 \% = \frac{C_{NaOH} \cdot V_{NaOH}}{W_{CS}} \cdot 16,1 \quad (8)$$

Donde 16,1 es una constante que relaciona el peso equivalente del quitosano. Por lo tanto el grado de desacetilación del quitosano es:

<b>DD(%NH<sub>2</sub>) = 83,95</b>
------------------------------------

De ambos resultados se obtuvo el DD(%) promedio, siendo del **82%**, valor alto. A mayor DD(%) del CS, se presentarán mayor cantidad de grupos amino para protonarse y así habrá mayor solubilidad en medio ácido.

### Masa molecular

La viscosimetría es el método más utilizado para obtener la masa molecular del quitosano. Se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca  $[\eta]$ , que está relacionada con la masa molecular en la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada<sup>5</sup>:

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad (9)$$

Donde,  $M_v$  es la masa molar promedio viscosimétrica y  $K$  y  $\alpha$  son dos constantes que dependen del polímero, del sistema disolvente utilizado y de la temperatura. Al obtener las medidas de densidad y viscosidad de las soluciones de quitosano (tabla 3), se procedió a determinar los valores de los parámetros de la tabla 4.

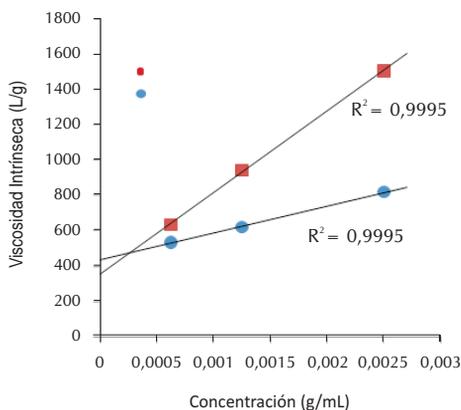
**Tabla 3:** Densidades y viscosidades de las soluciones de quitosano a 30 °C

Muestra	[CS] (g/100mL)	Densidad (g/mL)	Viscosidad (Pa.s)
Agua	0	0,99223	0,000797
Buffer	0	1,00137	0,000837
1	0,5000	1,00237	0,016546
2	0,2500	1,00211	0,004239
3	0,1250	1,00198	0,001820
4	0,0625	1,00143	0,001169

**Tabla 4:** Cálculo de las viscosidades relativa, específica e inherente

Muestra	1	2	3	4
Concentración (C) (g/100mL)	0,5	0,25	0,125	0,0625
Viscosidad ( $\eta$ ) 30°C (Pa.s)	0,0165	0,0042	0,0018	0,0012
Viscosidad relativa ( $\eta_{rel}$ )	19,7683	5,0648	2,1818	1,3968
Viscosidad específica ( $\eta_{esp}$ )	18,7683	4,0648	1,1818	0,3968
Viscosidad inherente $Ln(\eta_{rel})/C$	5,9681	6,4892	6,2412	5,3475
Viscosidad reducida ( $\eta_{esp}/C$ )	37,5366	16,2593	9,4544	6,3496

La viscosidad intrínseca es el límite de la viscosidad inherente y reducida cuando la concentración se aproxima a cero ( $C \rightarrow 0$ ). Esta se obtiene graficando  $\ln(\eta_{rel})/C$  y  $\eta_{sp}/C$  en función de la concentración y obteniendo su intercepto con la ordenada como se observa en la figura 4.



**Figura 4.** Viscosidad intrínseca vs concentración

Siendo,  $[\eta] = 400 \text{ L/g}$ . Wei Wang <sup>6</sup> reportó una serie de ecuaciones, en las que se relaciona la masa molecular de una muestra con respecto a la viscosidad intrínseca  $[\eta]$ . El grado de desacetilación del quitosano es de 82%, con esto obtenemos los valores de  $k$  y  $\alpha$ :

$$82\% \rightarrow [\eta] = 0,6432 \times 10^{-3} M_v^{0,98} \text{ (mL/g)} \quad (10)$$

Luego, la masa molecular viscosimétrica del quitosano, es:

$$M_v = 8,16 \times 10^5 \text{ Da}$$

Como vemos, la masa molecular del quitosano usado es alta. La masa molecular da una idea de la distribución del tamaño de las cadenas del polímero cuando se encuentran en solución. Además, una masa molecular alta nos indica la presencia de cadenas de polímero relativamente largas, generando posible entrecruzamiento entre las cadenas que producen un decrecimiento en la solubilidad.

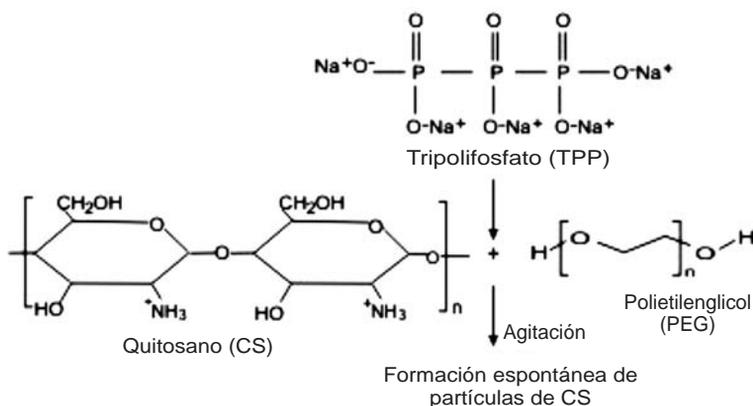
### Preparación de las partículas de quitosano

Las partículas preparadas son hidrogeles físicos, ya que presentan una red tridimensional formada por uniones que no son completamente estables y son más débiles que las uniones covalentes (hidrogeles químicos). El CS es un polication y se aprovecha esta propiedad para que interactúe mediante fuerzas electrostáticas con aniones o moléculas aniónicas; en nuestro caso con el tripolifosfato (TPP), que es un ion polivalente de pequeño tamaño. Así, este hidrogel físico está formado por el CS entrecruzado iónicamente por el TPP.

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



Luego, se agrega el PEG hasta disolverse en la solución de quitosano. A esta solución se le añade gota a gota con agitación constante la solución de TPP polianiónica. Debido a la formación de complejos entre las especies con carga opuesta, el quitosano sufre gelación iónica para formar partículas coloidales (figura5).



**Figura 5.** Esquema de la preparación de las partículas coloidales de quitosano

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 ácida de quitosano. De este modo, hay un mayor número de cargas positivas que pueden interaccionar con las cargas negativas del TPP, lo que se traduce en un mayor grado de entrecruzamiento. Además, cuanto mayor es el grado de desacetilación del quitosano, se presentarán 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. Al caracterizar al quitosano se obtuvo una masa molar alta de  $8,16 \times 10^5$  Da y un grado de desacetilación de 82%; por lo tanto con el quitosano utilizado se debería obtener una alta eficiencia de gelación.

Se realizaron varias pruebas experimentales en la preparación de las partículas de quitosano. Con la concentración de CS de 1mg/mL y de TPP de 1mg/mL se obtuvo satisfactoriamente las partículas coloidales con las características deseadas: suspensión opalescente, que se mantuvo estable por semanas, sin sedimentarse y con el tamaño de partícula de 100 a 400nm. Las medidas de tamaño realizadas con el DLS se encuentran en la tabla 5, donde los resultados mostraron un grado de polidispersidad aceptable, y la mayor distribución según el tamaño de las partículas se encuentre a escala nanométrica.

**Tabla 5:** Partículas de CS (1mg/mL) entrecruzadas con TPP (1mg/mL)

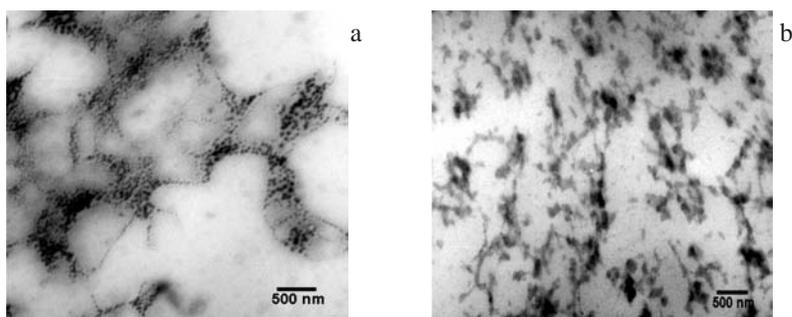
[PEG] (mg/mL)	Tamaño (nm)	Polidispersidad
0	129,3	0,199
10	167,8	0,238
30	231,1	0,253
50	311,3	0,264

La microscopía de transmisión electrónica nos mostró un tamaño de partícula entre 20-120nm para el CS sin PEG (figura 6a) y de 100 a 400nm para las partículas de CS con PEG (50mg/mL) (figura 6b). Podemos observar que las partículas sin PEG tienen una morfología esférica más definida que las modificadas con PEG, que tienen una forma irregular.

Se realizaron las espectroscopías FTIR de las partículas liofilizadas de CS-TPP y CS-TPP modificadas con PEG. En el espectro FTIR del quitosano (figura1) se observan tres picos característicos, uno en  $3365\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la  $\nu(\text{OH})$ ,  $1153\text{ cm}^{-1}$  para la  $\nu(\text{COC})$  y  $1579\text{ cm}^{-1}$  para la  $\nu(\text{NH}_2)$ .

El espectro de las partículas coloidales CS-TPP (figura7) se muestra diferente a la de quitosano matriz. En el caso de las partículas de CS-TPP el ensanchamiento de la banda correspondiente a la  $\nu(\text{OH})$  indica probabilidad de formación de enlace hidrógeno entre los oxígenos del tripolifosfato y los hidrógenos de los grupos amino del quitosano. La vibración correspondiente a la flexión  $\text{NH}_2$  a los  $1579\text{ cm}^{-1}$  desaparece; en cambio, aparecen dos nuevos picos  $1638\text{ cm}^{-1}$  y  $1700\text{ cm}^{-1}$ ; esto, probablemente, debido a la protonación de los grupos  $\text{NH}_2$  que ahora son iones  $\text{NH}_3^+$  y a la formación del enlace hidrógeno entre los O-TPP y los H de los grupos amino libres.

Para las partículas de CS-TPP modificadas con PEG, los cambios en el perfil del espectro FTIR son similares a los explicados para los de CS-TPP; además, de que en el espectro con PEG la banda de  $\nu(\text{O-H})$  se hace más pronunciada por la posible formación del enlace hidrógeno entre el O del PEG con los H-CS. En el espectro también se observan bandas características del PEG en  $1104\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la  $\nu(\text{C-O})$  y  $1340\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la  $\nu(\text{CH}_2)$ . Además de observarse una banda en  $2880\text{ cm}^{-1}$  que le correspondería a la  $\nu(\text{C-H})$ .

**Figura 6.** Micrografía de partículas de CS entrecruzadas con TPP(a), y modificadas con PEG(b).

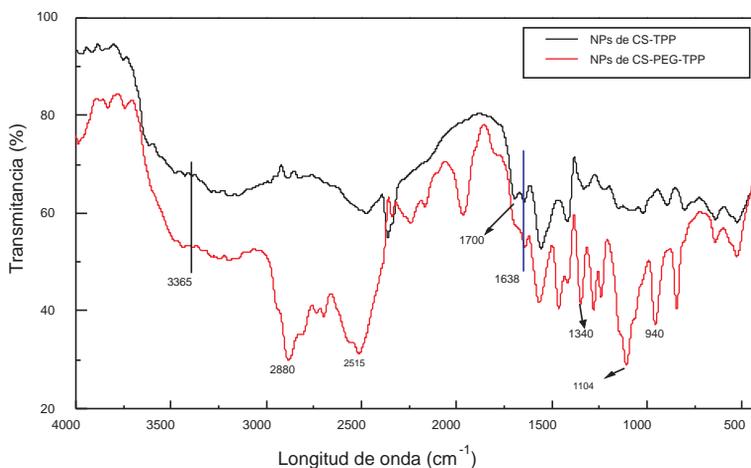


Figura 7. Espectro FTIR de las partículas de quitosano

### Efecto de la modificación del PEG

Como ya vimos con los resultados del TEM (figura 6b), las partículas de CS-TPP modificadas con PEG tienen una forma irregular. La tabla 6 muestra los valores de tamaño de las partículas modificadas con PEG. El aumento de tamaño a medida que se aumenta la concentración del PEG, es un buen indicador de la incorporación del PEG en la estructura de la partícula coloidal.

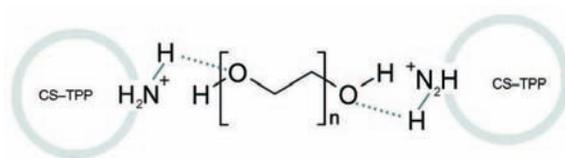
Tabla 6: Partículas de CS (1mg/mL) entrecruzadas con TPP (1mg/mL)

[PEG] (mg/mL)	Tamaño (nm)	Polidispersidad
0	129,3	0,199
10	167,8	0,238
30	231,1	0,253
50	311,3	0,264

Se ha mencionado anteriormente, gracias a los espectros IR, que la incorporación de PEG en el sistema de gel es a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los átomos electropositivos del hidrógeno amino del quitosano y los átomos electronegativos de oxígeno de PEG, formando así una red semi-interpenetrada de CS / PEG. El PEG ha sido añadido a la solución de quitosano antes de la gelificación. Sin la incorporación del TPP, el PEG no tiene una interacción lo suficientemente fuerte para gelificarse con el quitosano, pero los grupos amino del quitosano pueden presentar interacción con el átomo de oxígeno de PEG. Así, el PEG puede competir con los iones TPP en su interacción con los grupos amino del quitosano. Esto podría crear un menor grado de entrecruzamiento iónico y obtener un hidrogel de menor estabilidad mecánica. Por lo tanto, se debe buscar un equilibrio adecuado de PEG y TPP. Con toda la información analizada, podríamos suponer que el PEG se encuentra recubriendo a la

partícula aumentando su tamaño y neutralizando un poco la carga superficial positiva del CS. Así:

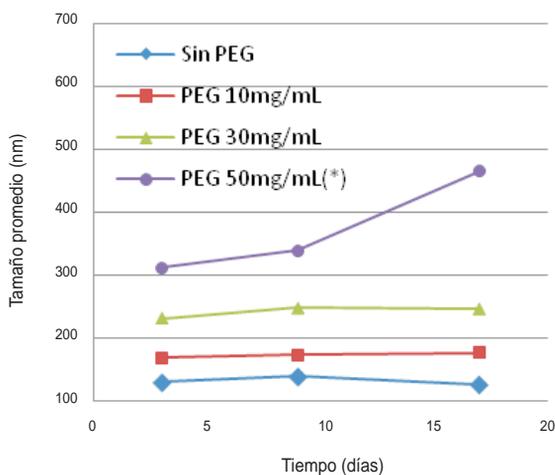
- Las partículas tendrán menor tendencia a juntarse y aglomerarse (figura 8). Comportándose como un agente antiagregante.
- Da una protección frente a la hidrólisis del CS por parte de las hidrolasas del organismo, obteniendo partículas más estables en los fluidos fisiológicos.
- Podría disminuir la velocidad de liberación del fármaco.



**Figura 8.** Interacción entre el CS y PEG.

### Estudio de la variación del tamaño de las partículas de quitosano en el tiempo

En general, se observa (figura 9), para todas las partículas preparadas de CS-TPP a diferentes concentraciones de PEG, un aumento de tamaño que no es muy representativo en más de dos semanas.



**Figura 9.** Estudio de la variación del tamaño en el tiempo de las partículas de CS (1mg/mL) entrecruzadas con TPP (1mg/mL).

Además, es necesario mencionar que las partículas se encontraban todavía en suspensión y con la turbidez característica. Podríamos decir entonces que las partículas obtenidas son estables en el tiempo sin variación de su medio.

\*En la figura 9 se observa un aumento drástico de tamaño (en comparación a los demás) para el PEG de 50mg/mL; presumimos que se pueda deber a la aglomeración del PEG alrededor de las partículas, debido a que se encuentra en grandes concentraciones.

#### **Efecto iónico sobre la variación del tamaño de las partículas de quitosano**

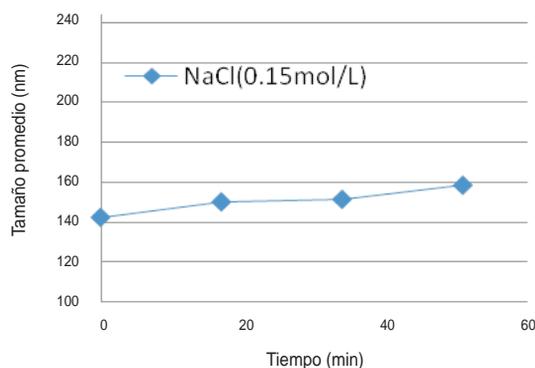
Se realizaron las medidas a la concentración de 0,15M ya que es la concentración salina del fluido fisiológico. La fuerza iónica,  $I$ , es una función de la concentración de todos los iones presentes, definida como:

$$I_c = \frac{1}{2} \sum_{B=1}^n C_B Z_B^2 \quad (12)$$

Donde:  $C_b$  es la concentración molar de iones B,  $Z_b$  es la carga de cada ion, y el sumatorio se refiere a cada una de las especies iónicas presentes en el medio. Así, para la disolución formada por cloruro de sodio, NaCl, la fuerza iónica es igual a la concentración, dado que en el medio hay iones  $Na^+$  y  $Cl^-$ , ambos de igual carga (1) pero signo contrario. Por lo tanto, la fuerza iónica del medio es 0,15M.

La fuerza iónica del medio puede influir sobre el hinchamiento de las partículas, ya que la presencia de  $Na^+$  en el medio interactúa iónicamente con los O del TPP, de igual forma el  $Cl^-$  va a interactuar con la amina protonada del CS.

Por lo tanto, estos iones competirían por el TPP y CS, debilitando las interacciones entre CS-TPP, lo que se traduce en una disminución del entrecruzamiento y por lo tanto la aparición del hinchamiento, debido a que se produciría un aumento en la separación de las cadenas del quitosano.



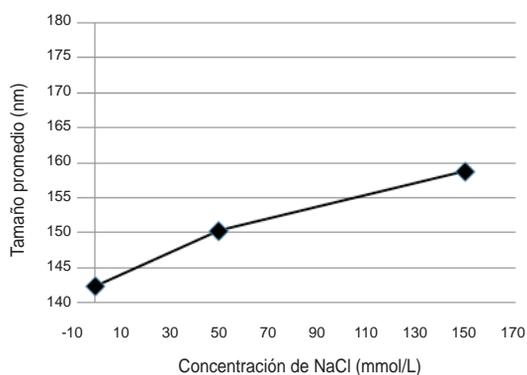
**Figura 10.** Efecto de la solución salina fisiológica en la variación del tamaño de las partículas de CS

En general, se observa un aumento de tamaño que no es muy representativo (figura 10). Podríamos decir nuevamente que las partículas obtenidas son relativamente estables en una solución salina fisiológica.

### Efecto iónico sobre la variación del tamaño de las partículas de quitosano a diferentes concentraciones de cloruro de sodio

Si se aumenta la fuerza iónica del medio de 0M a 0,05M y a 0,15M, se va a esperar un aumento progresivo del tamaño de las partículas, debido a que cada vez más iones compiten por la interacción con el TPP y CS, debilitando su interacción iónica, disminuyendo su entrecruzamiento y aumentando el hinchamiento, como analizamos anteriormente. Comportamiento que se observa en la figura 11.

Podemos concluir que a pesar de ser un hidrogel físico, con entrecruzamiento iónico, características que no dan una buena estabilidad mecánica, el efecto de hinchamiento con el tiempo y debido al efecto iónico no influyen de manera representativa sobre las partículas de CS obtenidas, podríamos decir que permanecen relativamente estables, esto es consecuente con los resultados obtenidos experimentalmente de alta masa molecular y porcentaje de desacetilación del quitosano, que ofrecen a las partículas un mejor entrecruzamiento y así resistencia al hinchamiento.



**Figura 11.** Efecto salino en la variación del tamaño de las partículas de CS a diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

### Estudio de estabilidad de las partículas de quitosano a diferentes pH

El hinchamiento es influenciado principalmente por las interacciones iónicas entre las cadenas de quitosano, que dependen de la densidad de entrecruzamiento establecidos durante la formación de la red. Un aumento de la densidad de entrecruzamiento induce una disminución del hinchamiento y sensibilidad del pH, mejorando la estabilidad de la red.

Sin embargo, en un hidrogel físico, entrecruzado iónicamente la densidad de entrecruzamiento se modifica por las condiciones externas después de la administración, principalmente por el pH del medio. Influye la densidad de carga global del quitosano y del entrecruzante TPP, los que directamente determinan la densidad de entrecruzamiento, la interacción y el hinchamiento. En cambio, en los hidrogeles químicos, entrecruzados covalentemente, la densidad de entrecruzamiento no se modifica después de la administración ya que estos hidrogeles están vinculados por lazos irreversibles. En consecuencia, los hidrogeles entrecruzados iónicamente no sólo se pueden hinchar en ácido, sino también en las condiciones básicas (figura 12)<sup>7</sup>.

Se analizó la estabilidad de las partículas de CS(1mg/mL) entrecruzadas con TPP(1mg/mL) a pH 1,2 y 7,4 a 37°C, simulando el fluido gástrico e intestinal, respectivamente. Si el pH disminuye, habrá mayor concentración de  $H^+$  que neutralizarán algunos iones TPP; entonces la densidad de carga del entrecruzante TPP y por lo tanto la densidad de entrecruzamiento disminuirá, lo que conduce al hinchamiento. Por otra parte, el hinchamiento es favorecido por la repulsión de los grupos amino libres protonados del quitosano. Si la disminución del pH es demasiado grande, la disociación de los enlaces iónicos y la disolución de la red del hidrogel se puede producir, lo que parece que ocurrió al exponer las partículas de CS al pH 1,2, la suspensión de partículas de CS-TPP pasaron de ser una suspensión opalescente a ser translúcida.

Como se muestra en la figura 13a, se trabajó en el rango UV de 200 a 400nm, ya que la muestra es incolora, a la izquierda del gráfico vemos unas curvas que son errores del equipo por encontrarse cerca de los 200nm. Observamos que se da una transmisión del 100%, desde el inicio hasta las 24hrs de medición, lo que nos dice que probablemente las partículas de quitosano se disolvieron completamente, transmitiendo al 100% la radiación.

Si el pH aumenta, disminuye la protonación del quitosano e induce una disminución de la densidad de entrecruzamiento, lo que permite el hinchamiento debido a que se produciría un aumento entre la separación de las cadenas del quitosano. A medida que se aumenta el pH del medio esta separación aumentará; así, las cadenas de quitosano irán quedando libres y empezarán a precipitar ya que el quitosano es menos soluble en medio básico. Ambos efectos se unen para aumentar el tamaño de las partículas, lo que concuerda con el aumento de la turbidez de la suspensión inicial de partículas de CS-TPP.

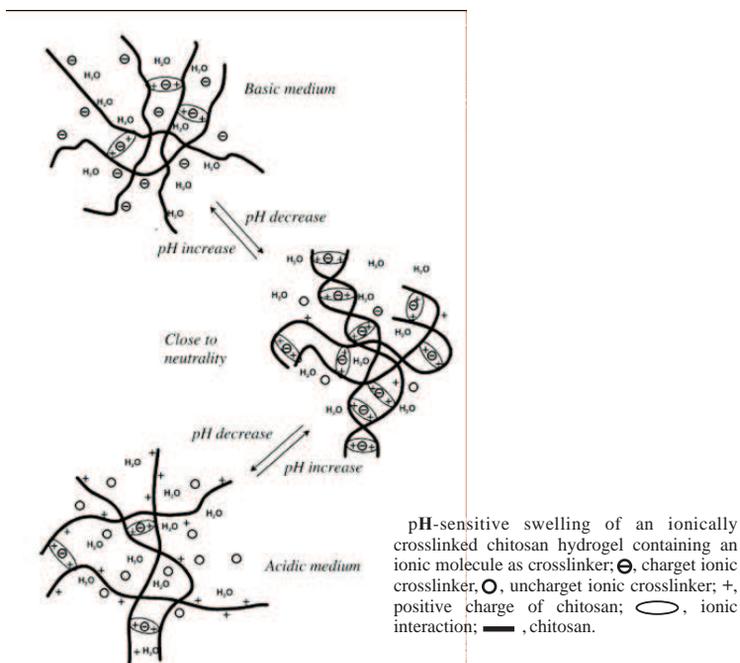
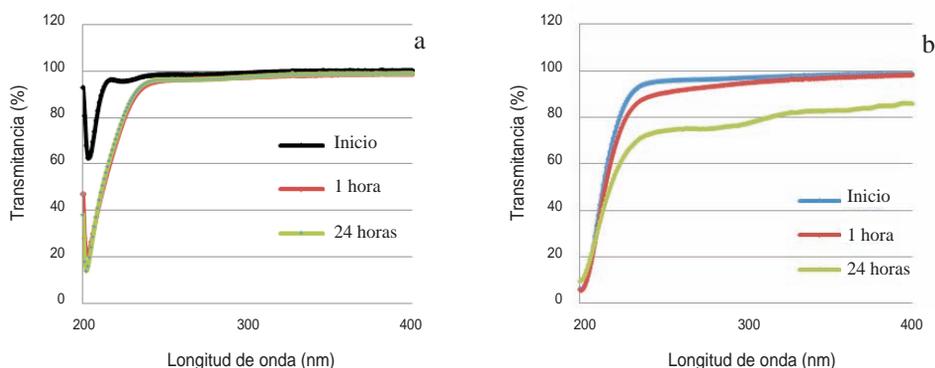


Figura 12. Hinchamiento dependiendo del pH de un hidrogel de quitosano de entrecruzamiento iónico<sup>7</sup>.



**Figura 13.** Estudio de estabilidad de las partículas de quitosano a pH 1,2 (a) y 7,4 (b).

Observamos en la figura 13b, que al inicio se transmite casi el 100% de la radiación, y conforme transcurre el tiempo disminuye la transmitancia, lo que nos puede indicar un aumento de tamaño de las partículas debido al hinchamiento explicado anteriormente, ya que una suspensión de partículas con mayor tamaño transmiten menor cantidad de radiación.

Si el pH es demasiado alto los grupos amino del quitosano se neutralizan con los OH<sup>-</sup> del medio y el entrecruzamiento iónico se inhibe. Si la densidad de entrecruzamiento se vuelve demasiado pequeña, las interacciones iónicas ya no serán lo suficientemente fuertes para evitar la disolución y el entrecruzante iónico TPP se libera.

### CONCLUSIONES

Se obtuvo el grado de desacetilación y masa molar del quitosano siendo 82% y  $8,16 \times 10^5$  Da, respectivamente; ambos valores altos con los que se podría obtener un buen grado de entrecruzamiento. Las partículas coloidales de quitosano se reconocieron como una suspensión opalescente, cuyo rango de tamaño fue de 100 a 400nm. Las partículas de quitosano sin PEG mostraron una forma esférica, mientras que las modificadas con PEG mostraron una forma irregular. Al añadir PEG el tamaño de las partículas de quitosano aumenta.

Se estudiaron algunos factores que influyen la estabilidad de las partículas de quitosano, donde se vio que el efecto del tiempo y fuerza iónica producían un hinchamiento poco representativo de las partículas, pero el efecto del pH si fue marcado. Las partículas de CS-TPP probablemente sufren disolución a pH 1,2 mientras que a pH 7,4 muestra hinchamiento.

### AGRADECIMIENTOS

A los laboratorios de Microscopía electrónica y Películas delgadas de la facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería. Al Mg. Christian Jacinto por su valioso apoyo en la realización de la investigación.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Yan Wu, Wuli Yang, Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics* 295 (2005) 235–245.
2. Baxter, A., Dillon M., Taylor K.D.A. and Roberts G.A.F., Improved method for IR determination of degree of N-acetylation of chitosan. *J. Biol. Macromol.* 14 (1992) 166-169.
3. Calvo, P., Remuñan –López, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci* 63(1997b) 125-132.
4. J. Brugnerotto, An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42 (2001) 3569-3580.
5. Agulló E. et al., Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú (2004). 157-169.
6. Wei Wang, Shuquin Bo, Determination of the Mark-Houwink Equation for chitosans with different degrees of deacetylation, *Int. J. Biol. Macromol* 13 (1991) 281-285.
7. J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 19–34.