

ESTUDIOS PRELIMINARES ACERCA DEL CARGADO Y LIBERACIÓN CONTROLADA DEL COMPLEJO COBRE-METRONIDAZOL A PARTIR DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANO RETICULADAS CON TRIPOLIFOSFATO

Nathalie A. Sánchez López^a, Ana C. Valderrama Negrón^a, Clemente A. Luyo Caycho^b

RESUMEN

Las micropartículas de quitosano tienen aplicaciones potenciales como sistema de liberación controlada de fármacos, ya que muestran ser un excelente mucoadhesivo y a su vez mejora el efecto de permeabilidad a través de las superficies biológicas.

En el presente estudio las micropartículas de quitosano fueron reticuladas con tripolifosfato (TPP) mediante reticulamiento iónico. El trabajo de reticulado se realizó a diferentes concentraciones de TPP 1%, 5% y 10% y ellos en tres distintos medios de pH: FGS(pH=1,2), FIS(pH=6,8) y PBS(pH=8,6). La morfología de las micropartículas TPP-quitosano fueron examinadas por SEM. Cuando el pH y la concentración de TPP decrecen, las micropartículas presentan una forma esférica y una superficie lisa. El comportamiento relacionado a la liberación del cobre-metronidazol (complejo que presenta estudios de actividad biológica) fue afectado por el proceso de preparación de las micropartículas. Las micropartículas de quitosano preparadas con bajo pH y alta concentración de TPP producen una lenta liberación del complejo, indicando que el TPP-quitosano forman una buena matriz para el sistema de liberación del metalofármaco, cobre-metronidazol.

Palabras clave: quitosano, tripolifosfato, cobre-metronidazol, liberación controlada.

PRELIMINARY STUDIES ON THE LOADED AND CONTROLLED RELEASE OF COPPER-METRONIDAZOLE COMPLEX FROM CHITOSAN MICROPARTICLES CROSSLINKED WITH TRIPOLYPHOSPHATE

ABSTRACT

Chitosan microparticles have potential applications as drug delivery systems, because they have an excellent mucoadhesive effect and also simultaneously enhance the permeability through biological surfaces. In this study chitosan microparticles were crosslinked with tripolyphosphate (TPP) by ionic crosslinking. The lattice work was performed at different concentrations of TPP 1%, 5% and 10% and each concentration was evaluated in three different conditions: FGS(pH=1,2), FIS(pH=6,8) and PBS(pH=8,6). The morphology of TPP-chitosan microparticles were examined by SEM. When the pH and TPP concentration decreases, the microparticles present a spherical shape and smooth surface. The performance of the release of copper-metronidazole (complex with biological activity) was affected by the

^a Laboratorio de Investigación de Biopolímeros y Metalofármacos, Escuela Profesional de Química, Universidad Nacional de Ingeniería

^b Laboratorio de Películas Delgadas, Escuela Profesional de Física, Universidad Nacional de Ingeniería.

Av. Túpac Amaru 210 - Rímac / Lima 25 - Perú.

Correo electrónico: amesanlopez@gmail.com, anitacvn29@yahoo.com.mx

preparation process of the microparticles. Chitosan microparticles prepared with low pH and high concentration of TPP produced a slow release of the complex indicating that the TPP-chitosan is a good matrix for the release of the copper-metronidazole complex.

Keywords: chitosan, tripolyphosphate, copper-metronidazole, release control

INTRODUCCIÓN

La química bioinorgánica es un área que se viene desarrollando rápidamente y presenta un potencial enorme para las aplicaciones en medicina. La química inorgánica medicinal ofrece posibilidades reales para la industria farmacéutica tratando de descubrir nuevas drogas que sean más adecuadas para su uso en ese campo.

La *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), que causa la disentería amebiana y abscesos amebianos de hígado, sigue siendo una amenaza significativa para la salud en muchas partes del mundo. Más de 50 millones de personas están afectadas, y solamente la malaria y la esquistosomiasis superan a la amibiasis como causa de la muerte por parásitos¹. Los nitroimidazoles, como metronidazol, son muy eficaces contra la enfermedad aguda, pero son relativamente ineficaces en la erradicación de los parásitos intestinales². Hasta la fecha, ha habido muy pocos informes de la resistencia de *E. histolytica* al metronidazol.

En este trabajo se utiliza el complejo cobre-metronidazol que consiste en la modificación del metronidazol 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etanol por la coordinación con Cu(II). Este nuevo complejo es activo frente a *E. histolytica in vitro e in vivo*^{3,4}, siendo más eficaces que el metronidazol y que puede resultar de utilidad como alternativa clínica a éste.

En la mayoría de los sistemas de liberación controlada, el fármaco, pesticida o cualquier otro agente biológico, se introduce en el interior de lo que se denomina transportador, siendo éste normalmente un material polimérico. La velocidad de liberación de la sustancia deseada está prácticamente controlada por las propiedades del polímero, aunque por otra parte, existen otros factores de menor influencia, tales como el pH del medio en el que se va a realizar la liberación. Teniendo en cuenta estos factores, es posible conseguir sistemas de liberación que actúen lentamente y de forma continua durante largos periodos de tiempo.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

Quitosano en polvo; Sigma- Aldrich, Inc, USA, Chitosan from crab shells minimum 85% desacylated. Ácido acético (Patrón analítico); Productos Químicos Monterrey S.A, México. Hidróxido de sodio, pellet J.T. Baker, USA. Tripolofosfato de sodio, Sigma-Aldrich Inc, USA. G.A.

Síntesis del complejo cobre-metronidazol⁵

El complejo cobre-metronidazol desarrollado en este trabajo fue sintetizado en medio etanólico, en el que se disuelven 0,6021g (0,0035 mol) de metronidazol en 20mL de etanol (cerca del punto de ebullición) agregándose acetato de cobre 0,4062g (0,001 mol) disuelto en 30mL de etanol. La mezcla se mantuvo en agitación constante a temperatura de aproximadamente 60 °C y luego se concentró hasta aproximadamente 10mL por evaporación. La mezcla se filtró en un embudo de placa porosa al vacío. El sólido aislado fue lavado con etanol a temperatura ambiente y secado al vacío durante 10 horas, en un desecador conteniendo sílica gel.

Preparación de micropartículas de quitosano⁶

Una solución al 2% (w/w) se preparó disolviendo el quitosano en una solución de ácido acético al 3%.

Las micropartículas formadas por el método de coacervación simple se dejan reposar en la solución de NaOH 2M por 24 horas con agitación continua, para luego lavarlas, hasta obtener un pH casi neutro, dejándolas en agua para su conservación.

Reticulación con TPP

Se prepararon soluciones de TPP y buffers como lo muestra la siguiente tabla 1:

Tabla 1. Relación de % de TPP en diferentes soluciones buffer.

TPP 1% Buffer1,2	TPP 5% Buffer1,2	TPP 10% Buffer1,2
TPP 1% Buffer6,8	TPP 5% Buffer6,8	TPP 10% Buffer6,8
TPP 1% Buffer8,6	TPP 5% Buffer8,6	TPP 10% Buffer8,6

Se colocaron 6,0 g de las micropartículas de quitosano en 25mL de la solución de TPP con un porcentaje y un determinado pH y se dejaron en agitación por 30 minutos. Se lavaron con agua destilada fría, hasta obtener un pH neutro y se mantuvieron en agua destilada.

Cargado del complejo cobre-metronidazol en micropartículas de quitosano

Seis gramos de micropartículas de quitosano reticuladas con TPP (ver tabla 1) se agitaron por 30 minutos en 50mL de una solución acuosa del complejo cobre-metronidazol 1 411,2 ppm. Una vez concluida la agitación fueron realizadas medidas de absorbancia en la región de 190-400nm para determinar la concentración del complejo cobre-metronidazol remanente en la solución.

Estudio de liberación in vitro

Se colocaron 100mg de micropartículas quitosano-TPP secas y cargadas con el complejo cobre metronidazol en 50mL de una solución buffer pH 1,2 (simulador de jugo gástrico) a una temperatura promedio de 37°C, utilizando un sistema compuesto de una chaqueta de calefacción y un termostato. Cada 10 minutos fueron tomadas muestras de 1mL de solución y luego adicionándose 1mL de solución buffer pH 1,2. Se determinó la absorbancia de la solución en la región de 190-400nm.

Se realizó el mismo ensayo para cada una de las muestras de micropartículas cargadas con el complejo y reticuladas con TPP (1; 5 y 10%) durante un periodo de 4 horas a pH 1,2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de la estabilidad del complejo cobre-metronidazol a diferentes pH

El estudio fue desarrollado a pH 1,2 fluido gástrico simulado (FGS), pH=6,8 fluido intestinal simulado (FIS) y a pH=8,6 (PBS) en solución acuosa del complejo a una concentración 2×10^{-3} M.

Debido a las propiedades del cobre de precipitar a pH >5,5, se estudió la estabilidad del complejo en solución a pH 1,2.

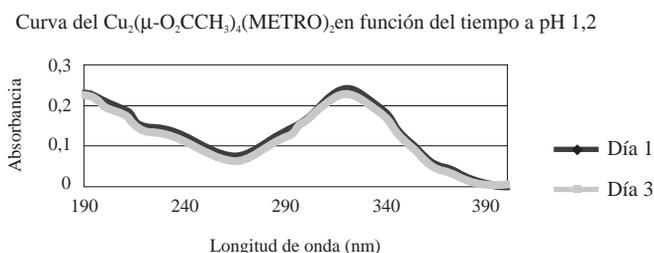


Figura 1. Curva del cobre metronidazol en buffer pH= 1,2 en distintos tiempos.

A partir de los espectros obtenidos, se observa la poca variación de la absorbancia en relación a los días, lo que demuestra que el complejo cobre-metronidazol es estable sólo en medio ácido (pH=1,2) en un tiempo máximo de evaluación de 3 días (72 horas) (figura 1)

Reticulación con TPP al 1%, 5%, 10% ⁷.

El quitosano, debido a los grupos aminos en medio ácido (ácido acético), produce la siguiente reacción:



Donde los grupos aminos se protonan; éstos entran en contacto con el NaOH y se forman las micropartículas, produciéndose una separación de fases, (método de coacervación). El NaOH actúa como un medio coagulante, produciendo una membrana polimérica por precipitación.

Esta membrana depende de factores como el tamaño de la micropartícula de acuerdo a su realización, a la viscosidad del goteo y a la altura del goteo a la solución alcalina.

Las micropartículas de quitosano-TPP fueron preparadas por la interacción iónica entre un grupo amino de quitosano cargado positivamente y un contraión de TPP de carga negativa. El grado de ionización del TPP depende del valor de pH de la solución.

En la solución original el TPP (pH 8,6), se disocia en iones OH⁻ y los iones de TPP: $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$ y $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$. Sin embargo, a un pH bajo, sólo hay aniones $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$.

Por otra parte, el quitosano es una base débil, y como el pH de la solución disminuye, la ionización del grupo amino del quitosano es aumentada. Por lo tanto, las micropartículas de quitosano-TPP preparadas en la solución original de TPP son dominadas por la desprotonación y un poco de reticulación iónica, pero las micropartículas de quitosano preparadas en una solución ácida de TPP son completamente dominadas por entrecruzamiento iónico.

Las micropartículas de quitosano preparadas a pH 6,8 no fueron completamente esféricas, y presentaban una superficie rugosa, mientras que las micropartículas preparadas con la solución de TPP (pH 1,2) presentaban forma esférica y superficie lisa.

Estos resultados muestran que la formación de la matriz TPP-quitosano depende de los valores de pH de la solución de TPP.

Cargado de cobre-metronidazol en las micropartículas de quitosano-TPP⁸.

Una vez realizado el proceso de cargado del complejo cobre metronidazol se registraron los espectros de las soluciones remanentes del complejo obteniéndose los datos de absorbancias

medidas a $\lambda=320\text{nm}$, que es la longitud de onda de máxima absorbancia de acuerdo al espectro inicial del complejo cobre-metronidazol a la región del visible (tabla 2).

Considerando que la solución preparada para el cargado es de 1 411,12ppm ($2,10^{-3}\text{M}$), se obtuvo los siguientes resultados:

La eficiencia del cargado está dada por la siguiente ecuación

$$E_{\%} = \frac{C_1}{C_2} 100$$

$E_{\%}$: eficiencia de cargado

C_1 : concentración real del principio activo en las micropartículas

C_2 : concentración inicial del principio activo

El cargado de las micropartículas de quitosano-TPP está en relación al medio ácido y al porcentaje de TPP. Como se sabe, este medio favorece a una mayor formación de iones amina que interaccionan con aniones del tripolifosfato, estables también en el medio ácido. Como se observa en la tabla 2, el medio ácido proporciona valores altos de eficiencia.

Tabla 2. Datos obtenidos de la absorbancia del complejo cobre-metronidazol después del cargado en micropartículas de quitosano reticuladas con distintos porcentajes de TPP en diferentes buffers, a $\lambda=320\text{nm}$.

TPP %	TPP (pH)	Absorbancia	Concentración (ppm)	Eficiencia de cargado (%)
1	1,2	0,052	103,01	92,7
1	6,8	0,689	1378,66	2,3
1	8,6	0,672	1343,38	4,8
5	1,2	0,046	91,72	93,5
5	6,8	0,386	771,88	45,3
5	8,6	0,404	807,16	42,8
10	1,2	0,013	25,40	98,2
10	6,8	0,034	66,32	95,3
10	8,6	0,373	745,07	47,2

Estudio de liberación in vitro⁹

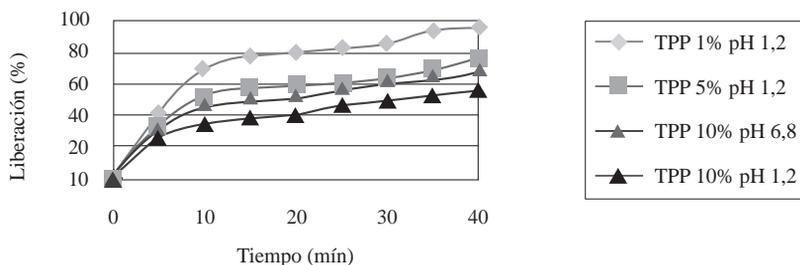
La tabla 3 muestra el porcentaje del complejo cobre-metronidazol liberado en un periodo de 40 minutos.

Tabla 3. Porcentajes de liberación del complejo cobre-metronidazol en el tiempo.

Tiempo (minutos)	1% TPP pH 1,2 % de liberación	5% TPP pH 1,2 % de liberación	10% TPP pH 1,2 % de liberación	10% TPP pH 6,8 % de liberación
0	0	0	0	0
5	42,3	33,6	26,4	30,8
10	69,5	52,1	34,2	45,3
15	77,3	57,6	38,6	49,5
20	79,3	59,4	40,2	52,3
25	82,4	60,4	46,3	55,6
30	85,1	64,3	49,3	60,1
35	93,4	68,9	52,1	62,4
40	95,6	76,2	55,9	68,3

Este estudio preliminar de la liberación del complejo cobre-metronidazol se ha efectuado en un periodo de 40 min. Este tiempo es verdaderamente corto, pero se debe al hecho de que la micropartícula de quitosano- TPP poseen una pobre fuerza mecánica, la cual facilita la liberación rápida del complejo.

El porcentaje de TPP y el pH de la solución, tienen influencia en la formación de redes internas dadas por la reticulación iónica del TPP y iones amino. Esto ha sido posible observar ya que algunas micropartículas sufrieron una deformación durante el secado.

**Figura 2.** Curva de liberación del complejo cobre-metronidazol.

En la figura 2 se observan los resultados de liberación del complejo para los 4 tipos de micropartículas que fueron aptas para este estudio. Se observa que la liberación del complejo a partir de las micropartículas trabajadas en medio ácido (pH 1,2), es mucho mayor cuando éstas presentan poca concentración del reticulante TPP, lo que se puede explicar porque a menor concentración de TPP ocurre una menor formación de redes internas por la reticulación iónica, facilitando la liberación del complejo.

Si comparamos la liberación del complejo a una misma concentración de TPP, (10%), el medio básico favorece la liberación del complejo. Esto debido a que en este medio hay menor presencia de aminas en la estructura del quitosano, reduciendo la cantidad de redes dentro de

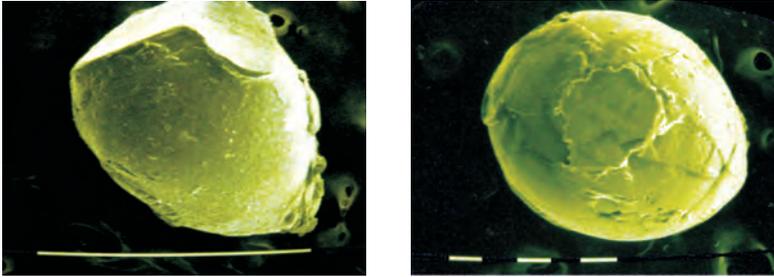


Figura 3. Fotografías de micropartículas secas de quitosano-TPP 1% en buffer 1,2 sin cargar (izq) y cargadas (der) con $\text{Cu}_2(\mu\text{-O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{METRO})_2$ $2 \times 10^{-3}\text{M}$

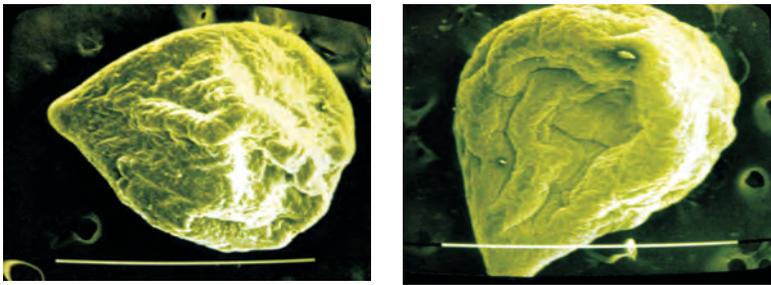


Figura 4. Fotografías de micropartículas secas de quitosano-TPP 5% en buffer 1,2 sin cargar (izq) y cargadas (der) con $\text{Cu}_2(\mu\text{-O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{METRO})_2$ $2 \times 10^{-3}\text{M}$

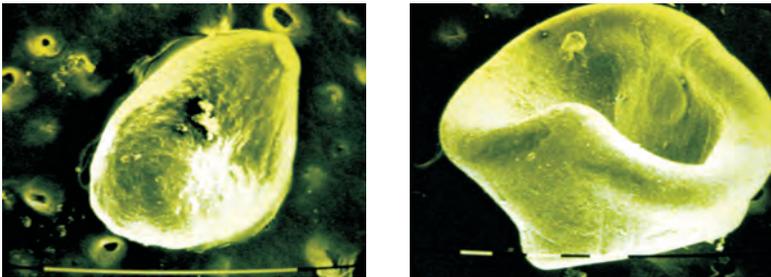


Figura 5. Fotografías de micropartículas secas de quitosano-TPP 10% en buffer 1,2 sin cargar (izq) y cargadas (der) con $\text{Cu}_2(\mu\text{-O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{METRO})_2$ $2 \times 10^{-3}\text{M}$

En las figuras 3-5 desarrolladas en el medio pH 1,2 se observa las diferencias en la superficie de las micropartículas las cuales presentan una superficie lisa cuando se encuentran cargadas y las no cargadas presentan rugosidades en su superficie.

La superficie lisa de las micropartículas cargadas se debe probablemente a la acumulación del complejo en la superficie.

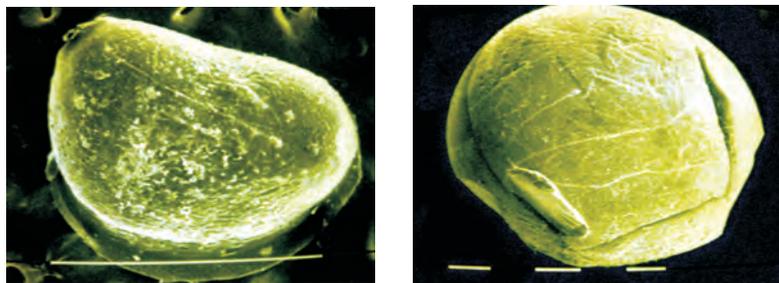


Figura 6. Fotografías de micropartículas secas de quitosano-TPP 10% en buffer 6,8 sin cargar (izq) y cargadas (der) con $\text{Cu}_2(\mu\text{-O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{METRO})_2 \cdot 2 \times 10^{-3}\text{M}$

La figura 6 muestra la estructura de unas micropartículas “casi esféricas”, en relación a las anteriores, esto puede ser debido a que existe una relación equivalente entre las interacciones de la amida del quitosano dadas por el medio (pH 6,8) con los oxígenos del tripolifosfato en relación a la concentración, 10%.

En la figuras se puede observar que la superficie de las micropartículas de quitosano son afectadas según el porcentaje de TPP utilizado en la reticulación a pH 1,2 afectando la estructura mecánica de las esferas.

Un mayor porcentaje de TPP siempre aumenta la interacción de los fosfatos con las aminas de quitosano, pero esto también conllevaría a una desprotonación, es decir, probablemente se generen zonas de mayor atracción de iones generando deformación en las micropartículas, esto se puede observar en la micropartícula al 10% de TPP, la cual se encuentra hundida en el centro.

CONCLUSIONES

El complejo cobre-metronidazol es estable por un periodo de 3 días a un pH = 1,2, no mostrando la misma estabilidad los medios a pH 6,8 y 8,6, por lo cual la liberación del complejo se desarrolló en medio ácido. El cargado del complejo cobre-metronidazol se optimiza en micropartículas desarrolladas por el método de coacervación simple y reticuladas con TPP al 1; 5 y 10% a pH=1,2 y al 10% a pH=6,8. La liberación del complejo cobre-metronidazol se dio rápidamente (aprox. 4h) lo cual hace creer en la necesidad de modificar la estructura mecánica de las micropartículas reticuladas con TPP, lo que quedó demostrado por los estudios realizados por SEM.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Hugo Alarcón Cavero por las facilidades para el uso del espectrofotómetro

BIBLIOGRAFÍA

1. J. A. Walsh, in –Amoebiasis, Ed. J. I. Ravdin, John Wiley & Sons, 1988, p. 93.
2. P. Pehrson, E. Bengtsson, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1984, 78, 505.
3. C. M. Beard, K. L. Noller, W. M. O'Fallon, L. T. Kurland, M. B. Dockerty, *New Eng. J. Med.* 1979, 301, 519.
4. G. D. Friedman, *New Eng. J. Med.* 1980, 302, 519.
5. Ana Cecilia Valderrama Negrón, Síntese, Caracterização e Investigação da Potencialidade Biológica de Carboxilatos Dinucleares de Ru, Rh e Cu com Nitroimidazóis. Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP.2005.
6. Christian Jacinto Hernández, Liberación controlada del difosfato de cloroquina a través de micropartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído. Tesis de Maestría, Escuela Profesional de Química, Facultad de Ciencias, UNI, 2010.
7. J.A. Ko, H.J. Park, S.J. Hwang, J.B. Park, J.S. Lee. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* (2002) 249, 165-174.
8. Fwu-Long Mi, Hsing-Wen Sung, Shin-Shing Shyu, Chia-Ching Su, Chin-Kang Peng. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin cocrosslinked chitosan gel beads. *Polymer* (2003) 44, 6521-6530.
9. M.L. Lorenzo-Lamosa, C. Remuñan-López, J. L. Vila-Jato, M. L. Alonso. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release* (1998) 52, 109-118.