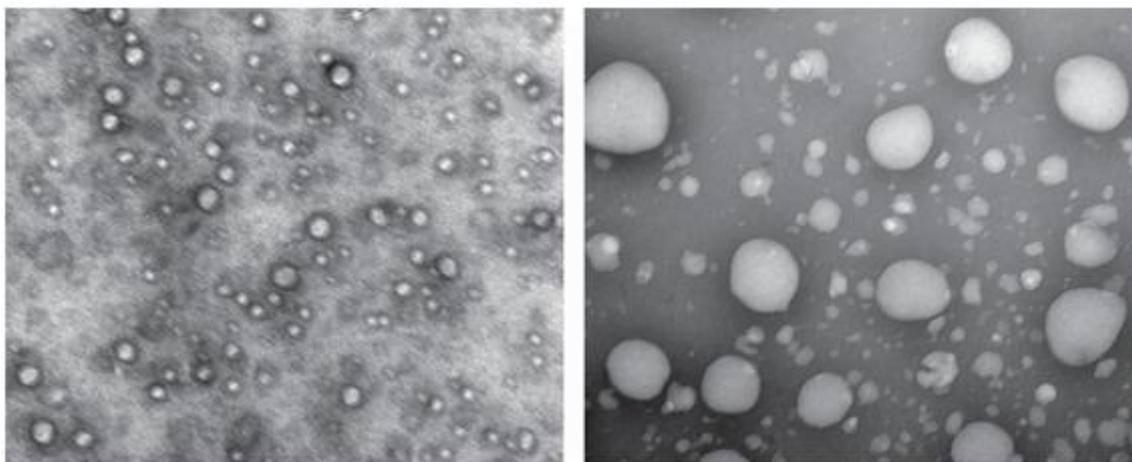


---

---

**Tesina de grado**

**“Formulación, síntesis, optimización y caracterización de dos tipos de nanosistemas de encapsulamiento basados en quitosano”**



**Analía Castro**

Tutora

**Dra. Helena Pardo**

Centro NanoMat del Polo Tecnológico de Pando

Facultad de Química UdelAR

Co-Tutor

**Dr. Juan Benech**

Departamento de Señalización Celular y Nanobiología

IIBCE

**Agosto 2014**

# Índice

---

1. <a href="#">Resumen</a> .....	1
2. <a href="#">Introducción</a> .....	3
2.1 <a href="#">Generalidades sobre Nanotecnología</a> .....	3
2.2 <a href="#">Quitosano</a> .....	4
2.3 <a href="#">Propiedades del quitosano</a> .....	5
2.4 <a href="#">Nanopartículas de quitosano</a> .....	8
2.5 <a href="#">Tripolifosfato de sodio como agente reticulante</a> .....	9
2.6 <a href="#">Sulfato de condroitín como agente reticulante</a> .....	11
2.7 <a href="#">Principio activo: Ácido ascórbico</a> .....	12
2.8 <a href="#">Objetivos</a> .....	12
3. <a href="#">Materiales y Métodos</a> .....	14
3.1 <a href="#">Materiales</a> .....	14
3.2 <a href="#">Preparación de las nanopartículas</a> .....	14
3.2.1 <a href="#">Preparación de nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP</a> .....	14
3.2.2 <a href="#">Preparación de nanopartículas de quitosano reticuladas con sulfato de condroitín</a> .....	15
3.3 <a href="#">Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de quitosano</a> ...	16
3.4 <a href="#">Cálculo de Eficiencia de Encapsulación (EE)</a> .....	16
3.5 <a href="#">Estudios in vitro de viabilidad celular</a> .....	18
4. <a href="#">Resultados y Discusión</a> .....	19
4.1 <a href="#">Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP</a> .....	19

4.2 <a href="#">Caracterización morfológica de las nanopartículas de quitosano y TPP</a> .....	25
4.3 <a href="#">Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de quitosano reticuladas con CHS</a> .....	26
4.4 <a href="#">Caracterización morfológica de las nanopartículas de quitosano y CHS</a> .....	29
4.5 <a href="#">Estudios in vitro de viabilidad celular</a> .....	31
5. <a href="#">Conclusión</a> .....	32
6. <a href="#">Referencias Bibliográficas</a> .....	33

# 1. *Resumen*

---

Los sistemas nanométricos utilizados en Nanomedicina suelen ser biomateriales con organización a escala nanométrica, los cuales son utilizados como reservorios para el transporte, la liberación controlada y la protección de los principios activos que contienen. Los biopolímeros se presentan como una alternativa especialmente interesante para la preparación de éstos sistemas debido a que en general son biocompatibles y pueden ser modificados químicamente, lo que les otorga una gran versatilidad a la hora de diseñar dichos sistemas. En especial, en este trabajo se propone el empleo como material pared de quitosano (CS), un polisacárido que se obtiene de la desacetilación de la quitina. El quitosano presenta varias propiedades que lo hacen un candidato excelente para aplicaciones biomédicas ya que además de ser biocompatible y biodegradable, exhibe actividad antibacteriana, antifúngica, mucoadhesiva, analgésica y hemostática. Todas éstas características surgen por la presencia de aminas primarias a lo largo de su cadena, y la presencia de éstos grupos amino revela que el pH altera la carga y las propiedades del quitosano.

Normalmente, las nanopartículas de quitosano se obtienen mediante el método de gelificación iónica, a través del extenso entrecruzamiento intermolecular entre los grupos amino con carga positiva del quitosano con las cargas negativas de una amplia variedad de compuestos aniónico. Éstos últimos pueden ser pequeños iones tales como el tripolifosfato de sodio (TPP) o grandes macromoléculas polianiónicas como el sulfato de condroitín (CHS). En éste trabajo se caracterizaron y desarrollaron dos sistemas nanométricos de quitosano, donde uno de ellos se reticuló con TPP y el otro con CHS a través del método de gelificación iónica, además se llevó a cabo la encapsulación de ácido ascórbico (AA).

El AA muestra una actividad multifactorial sobre una gran variedad de sistemas biológicos. Sin embargo presenta la desventaja de ser inestable en presencia de oxígeno y luz natural, descomponiéndose fácilmente en compuestos biológicamente inactivos. Por lo tanto la encapsulación constituye una estrategia adecuada para prolongar la vida útil del AA.

Los resultados de éste trabajo muestran la influencia de la concentración de quitosano y la relación de la mezcla [CS/agente reticulante] sobre el tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas de modo tal que cuanto mayor sea la concentración de quitosano y la relación [CS/agente reticulante] mayor será el tamaño y el potencial zeta. Las nanopartículas obtenidas de quitosano reticuladas con TPP de menor tamaño (109.3 nm) fueron preparadas con una concentración de 1.5 mg/ml de quitosano, 0.6 mg/ml de TPP y una concentración de 0.6 mg/ml de AA a pH 5, cuya relación de mezcla [CS/TPP] fue de 2.5/1 y la Eficiencia de Encapsulación (EE) obtenida fue de aproximadamente el 21%. Mientras que para el caso de las nanopartículas reticuladas con sulfato de condroitín, el tamaño más pequeño de partícula (405.6 nm) se obtuvo con una concentración final de quitosano y sulfato de condroitín de 2.4 y 1.2 mg/ml respectivamente, y una concentración de AA de 0.6 mg/ml resultando en una relación de mezcla [CS/CHS] 2/1. La eficiencia de encapsulación obtenida fue de aproximadamente el 27%.

## *2. Introducción*

---

### **2.1 Generalidades sobre Nanotecnología:**

La Nanotecnología es una rama de la Ciencia dedicada al control y manipulación de la materia a escala nanométrica en un rango entre 1 y 100 nanómetros (Aguiar et al, 2011).

En la actualidad una de las áreas más importantes de la Nanotecnología es la que generalmente se denomina Nanomedicina, cuyo campo de investigación tiene por objetos prevenir, diagnosticar, tratar enfermedades y heridas, aliviar el dolor y, en general, mejorar la salud. Cabe señalar que ésta se trata de un área netamente interdisciplinaria que involucra distintas áreas tales como biología, química, ingeniería, farmacología, medicina, entre otros (Mejias Sánchez et al, 2009).

La Nanomedicina agrupa tres áreas principales: el nanodiagnóstico, la medicina regenerativa y la liberación controlada de fármacos. El nanodiagnóstico desarrolla sistemas de análisis y de imagen para detectar una enfermedad o un mal funcionamiento celular en los estadios más tempranos posibles, la medicina regenerativa pretende reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados aplicando herramientas nanobiotecnológicas. Los sistemas de liberación controlada de fármacos son utilizados como reservorios para el transporte, la liberación controlada y la protección de los principios activos que contienen, asegurando el transporte de medicamentos sólo a las células o zonas afectadas proporcionando un tratamiento más efectivo y con menos efectos secundarios. (Mejias Sánchez et al, 2009).

En los últimos tiempos se ha considerado de gran interés el desarrollo de sistemas nanométricos biodegradables, y varios polímeros se han puesto a prueba para dicho fin (Kumaresh S. et al, 2001), debido a que presentan características excepcionales que les otorga una gran versatilidad a la hora de diseñar dichos sistemas, puesto que además de ser biocompatibles y biodegradables, los biopolímeros pueden ser modificados químicamente (Riva R. et al; 2011).

## 2.2 Quitosano

Uno de los polímeros más utilizados para la preparación de nanosistemas es el quitosano (véase figura.1), un polisacárido lineal semi-cristalino compuesto por unidades de N-acetil D-glucosamina y D- glucosamina unidos mediante enlaces glucosídicos  $\beta$  (1-4), cuya fórmula molecular es  $C_{12}H_{24}N_2O_9$  (Kaloti M. & Bohidar H.B., 2010). El quitosano resulta de la desacetilación parcial de la quitina (véase figura.2), el segundo biopolímero más abundante luego de la celulosa, que se encuentra comúnmente formando parte del exoesqueleto de artrópodos o de las paredes celulares de hongos y levaduras (Jayakumar R. et al, 2010; Rinaudo M., 2006). A escala industrial, las dos principales fuentes de quitosano son los crustáceos y los micelios de hongos (Croisier & Jérôme, 2012; Teng WL. et al, 2001).

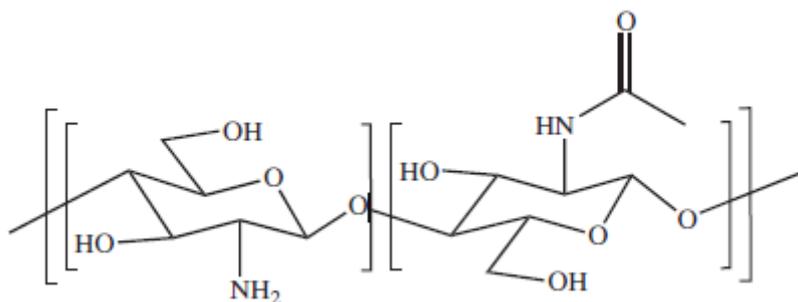


Fig. 1. Estructura química del quitosano (Croisier & Jérôme, 2012)

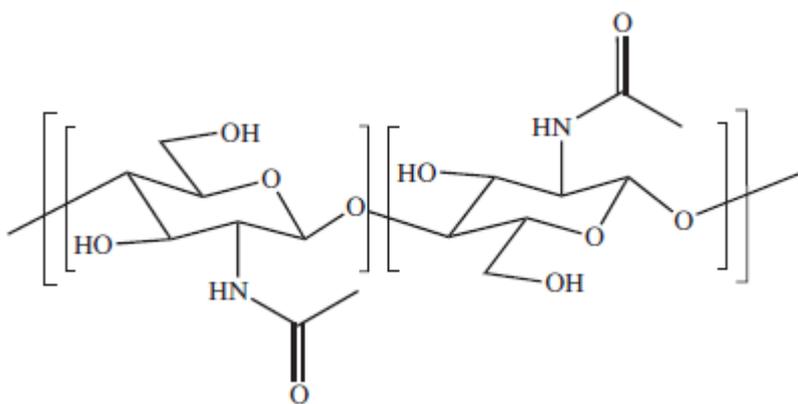


Fig. 2. Estructura química de la quitina (Croisier & Jérôme, 2012)

La desacetilación de la quitina se lleva a cabo por hidrólisis química bajo condiciones alcalinas o por hidrólisis enzimática, donde entran en acción enzimas tales como la quitina desacetilasa (Jayakumar et al, 2010; Venkatesan J. & Kim S-K., 2010). Cuando el grado de desacetilación de la quitina supera el 60% se convierte en quitosano (Riva R. et al; 2011). El método elegido determina el peso molecular (PM) y el grado de desacetilación (GD) del polímero, los cuales a su vez afectan de forma directa las propiedades químicas y biológicas del mismo (Dash M. et al, 2011).

El GD de quitosano es un indicativo del número de grupos amino a lo largo de las cadenas, y se calcula como la relación entre la D –glucosamina y la suma de D- glucosamina y N - acetil D-glucosamina (Croisier & Jérôme, 2012). De hecho, la presencia de grupos amino, revela que el pH altera la carga y las propiedades del quitosano (Yi H. et al, 2005).

El quitosano es poco soluble, excepto en soluciones acuosas ácidas (pH < 6), donde los grupos amino de los residuos de D-glucosamina pueden ser protonados otorgándole solubilidad (Jang K. & Lee H., 2008). Estos grupos amino protonados, cuyo pKa tiene un valor de 6.3, convierten al quitosano en un polícatión capaz de formar complejos iónicos con una amplia variedad de compuestos aniónicos natural o sintéticos (Madhally & Matthew, 1999), tales como lípidos, proteínas, ADN y algunos polímeros sintéticos cargados negativamente (Croisier & Jérôme, 2012; Rinaudo M., 2006).

### **2.3 Propiedades del quitosano**

La mayoría de las propiedades que hacen del quitosano un candidato excelente para aplicaciones biomédicas, surgen de la presencia de aminas primarias a lo largo de su cadena (Jang K. & Lee H., 2008). Éste polisacárido además de ser biocompatible (Sashiwa & Aiba, 2004; VandeVord PJ. et al, 2002) y biodegradable (Bagheri-Khoulenjani S et al, 2009; Vaarum KM. et al, 1997), exhibe actividad antibacteriana (Ong S-Y et al, 2008; Sudarshan NR. et al, 1992),

antifúngica (Aranaz I et al, 2009), mucoadhesiva (Lehr CM et al, 1992), analgésica (Aranaz I et al, 2009) y hemostáticas (Yang J et al, 2007).

La mucoadhesión de quitosano por ejemplo, se puede explicar por la presencia de residuos cargados negativamente (ácido siálico) en la mucina, la glicoproteína que compone el moco, que pueden interactuar con los grupos aminos del quitosano cargados positivamente en medio ácido. Esta mucoadhesión está directamente relacionada con el grado de desacetilación del quitosano puesto que si se incrementa el grado de desacetilación, el número de cargas positivas también aumenta, lo que conduce a mejores propiedades mucoadhesivas (He et al; 1998).

La actividad hemostática de quitosano también puede ser relacionada con la presencia de cargas positivas en la columna vertebral de dicho polímero. De hecho, las membranas de los glóbulos rojos están cargados negativamente, y por lo tanto puede interactuar con las cargas positivas del quitosano (Park P-J et al, 2004; Klokkevold PR et al, 1999; Rao & Sharma, 1997).

El quitosano también puede interactuar con la porción negativa de las membranas celulares, provocando la reorganización y apertura de las proteínas de unión estrecha, esto explica las propiedades de alta permeabilidad de este polisacárido. Por lo que si el grado de desacetilación del quitosano aumenta, la capacidad de permeación también aumenta (Smith J et al; 2004)

En cuanto a su actividad antimicrobiana y antifúngica; se ha informado de dos mecanismos principales en la literatura para explicarlas. En el primer mecanismo propuesto, el quitosano cargado positivamente puede interactuar con grupos cargados negativamente en la superficie de las células, y, como consecuencia, modificar su permeabilidad. Esto evitaría el ingreso de material esencial en las células y / o conducir a la filtración de solutos fundamentales fuera de la misma. El segundo mecanismo implica la unión de quitosano con el ADN de la célula, lo cual conduce a la inhibición de la síntesis de ARN microbiano. Por lo tanto, las propiedades antimicrobianas del quitosano podría ser el resultado de una combinación de ambos mecanismos (Chung & Chen, 2008; Sudarshan NR et al, 1992)

La naturaleza policatiónica del quitosano también permite explicar sus efectos analgésicos. Debido a que los grupos amino de los residuos de D-glucosamina pueden protonarse en presencia de iones con carga positiva que se liberan en el área inflamatoria, lo cual resulta en un efecto analgésico (Okamoto Y et al, 2002).

Para explicar la biodegradabilidad del quitosano, es importante recordar que el quitosano es un polisacárido que contiene enlaces glucosídicos rompibles, y en consecuencia, puede ser degradado in vivo por varias proteasas, principalmente la lisozima (Dash M et al, 2011; Aranaz I et al, 2009). La biodegradación del quitosano conduce a la formación de oligosacáridos no tóxicos de longitud variada que pueden ser incorporados en las vías metabólicas o de excreción (Pangburn SH et al, 1982). La tasa de degradación de quitosano está relacionada con su grado de desacetilación, la distribución de residuos de N- acetil- D- glucosamina y la masa molecular del mismo (Zhang H & Neau SH, 2001; Tomihata K & Ikada Y, 1997; Aiba S, 1992).

Para explicar la relación entre biodegradación y grado de desacetilación cabe destacar que el quitosano es un polímero semi-cristalino; de hecho la cristalinidad es máxima para un grado de desacetilación igual a 0 o 100% (quitina o quitosano totalmente desacetilado, respectivamente), y disminuye para valores intermedios. Sin embargo, como la cristalinidad del polímero se relaciona de forma inversa con la cinética de biodegradación, cuando el grado de desacetilación del quitosano disminuye (cerca del 60 %), su cristalinidad también disminuye, lo que resulta en un aumento de la velocidad de biodegradación. Además, la distribución de residuos acetilo a lo largo de quitosano también afectará su cristalinidad, y por lo tanto la velocidad de biodegradación. Por último, se puede suponer razonablemente que cadenas pequeñas de quitosano se degradarán más rápidamente en oligosacáridos que cadenas de quitosano con mayor masa molecular (Croisier & Jérôme, 2012).

El quitosano ha demostrado ser biocompatible (Aranaz I et al, 2009; Thanou M, 2001) Sin embargo, la compatibilidad con el medio fisiológico depende del método de preparación (proteínas residuales podrían causar reacciones alérgicas) y del grado de desacetilación (cuanto mayor es el grado

de desacetilación mayor la biocompatibilidad). De hecho, el quitosano es más citocompatible in vitro que la quitina, debido que a medida que el número de cargas positivas aumenta, la interacción entre las células y el quitosano aumenta por lo que tiende a mejorar la biocompatibilidad (Chatelet C et al, 2000).

Teniendo en cuenta todas las propiedades mencionadas anteriormente, no es sorprendente que el quitosano fue, es y será puesto a prueba en muchas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas principalmente para su uso en ingeniería tisular (Dutta P et al, 2011; Madhumathi, Binulal, et al, 2009), cicatrización de heridas (Madhumathi et al, 2010), implantes dentales y óseos (Rinaudo M; 2006), como excipiente para la administración de fármacos (Jayakumar, Nwe, Tokura, & Tamura, 2007; Jayakumar et al, 2005), formación de micropartículas (Prabaharan & Mano, 2005) y nanopartículas (A. Alishahi et al, 2011), entre otras aplicaciones.

## **2.4 Nanopartículas de quitosano**

En éste trabajo se hará énfasis en las peculiaridades de los sistemas nanométricos de quitosano, y tal como se ha mencionado anteriormente, las nanopartículas poliméricas han sido ampliamente investigadas como vehículos para la administración de fármacos, de hecho en este sentido las nanopartículas presentan ciertas ventajas frente a otros sistemas de entrega, como por ejemplo los liposomas, ya que a diferencia de éstos, las nanopartículas presentan mayor vida útil y tienen la capacidad de encapsular más droga (Wu et al, 2005). Además, varios estudios han destacado la importancia del tamaño en éstos sistemas revelando las ventajas de las nanopartículas sobre las microesferas ( $>1\mu\text{m}$ ) (Meclean et al, 1998). Se ha encontrado que las nanopartículas de quitosano tienen mayor capacidad de penetrar en el epitelio que las microesferas (Desai et al, 1996), y con su fácil accesibilidad en el cuerpo, las nanopartículas pueden ser transportadas a través de la circulación a diferentes destinos. Por lo tanto, éstos sistemas no sólo podrían controlar la velocidad de administración del fármaco; lo cual prolonga la duración del efecto terapéutico, sino también entregar la droga a un sitio específico (Wu et al, 2005).

Normalmente, las nanopartículas de quitosano se obtienen mediante el método de gelificación iónica (Kaloti M. & Bohidar H.B., 2010; Calvo et al, 1997), a través del extenso entrecruzamiento intermolecular entre los grupos amino con carga positiva del CS con las cargas negativas de una amplia variedad de compuestos aniónico (Hansson A. et al, 2012). Éstos últimos pueden ser pequeños iones tales como el tripolifosfato de sodio (véase Fig. 3A) (Fan et al, 2012), o grandes macromoléculas polianiónicas como el sulfato de condroitín (véase Fig. 3B) (Yeh et al, 2011).

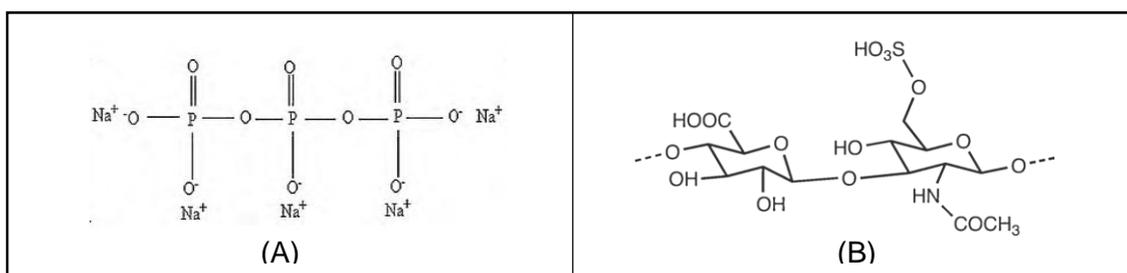


Fig 3. (A) Estructura química del tripolifosfato de sodio (TPP) (Kaloti M. & Bohidar H.B., 2010). (B) Estructura química del sulfato de condroitín (CHS) (Hansson A. et al, 2012).

El método de gelificación iónica presenta las ventajas de ser un proceso no tóxico, libre de disolvente orgánico, fácil y controlable (Agnihotri S.A. et al, 2004). Sin embargo, uno de los inconvenientes de este método es la baja carga de fármaco durante la formación de las partículas (Hansson A. et al, 2012). Además, las nanopartículas formadas son sensibles a los cambios de pH y concentración iónica, lo que podría causar una alta liberación del fármaco (Hansson A. et al, 2012).

## 2.5 Tripolifosfato de sodio como agente reticulante

Uno de los agentes reticulantes ampliamente utilizados para la formación de nanopartículas de quitosano es el tripolifosfato de sodio debido a sus propiedades multivalentes y a su inexistente toxicidad (Shu X.Z. & Zhu K.J., 2002). Ésta molécula contiene grupos fosfatos capaces de interactuar con el quitosano mediante interacciones electrostáticas bajo condiciones ácidas. Sin embargo se ha demostrado que las moléculas de quitosano se unen de forma

selectiva con el TPP generando varios complejos intra e intermoleculares, los cuales se esquematizan en la Fig. 4 y 5.

La formación de nanopartículas sólo tiene lugar bajo ciertas condiciones específicas de concentración del biopolímero, pH y relación de la mezcla [CS/TPP]. A concentraciones bajas de quitosano (<0.5 mg/ml) y relación de la mezcla [CS/TPP] < 2, los iones tripolifosforicos conducen el sistema hacia la coacervación natural a través de la formación de enlaces intermoleculares. La coacervación se define generalmente como un proceso durante el cual una solución homogénea de macromoléculas cargadas, con escasa afinidad con el disolvente, sufre una separación de fases líquido-líquido, dando lugar a una fase líquida super densa, rica en polímeros, coexistente con su sobrenadante. Estas dos fases líquidas son inmiscibles, pero interactúan fuertemente. Bajo éstas condiciones no se observan nanopartículas. Mientras que si la concentración del polímero supera los >0.5 mg/ml y la relación de la mezcla es > 2 se formarán preferentemente nanopartículas cuyo tamaño dependerá de la concentración de quitosano y de la relación [CS/TPP], de modo tal que cuanto mayor sean ambos mayor será el tamaño de las nanopartículas obtenidas. Esto se debe a que los iones hidroxilo, presentes en la solución, se unen a los grupos amino del quitosano, generando un debilitamiento de la cadena que permite la formación de enlaces intramoleculares con los iones tripolifosfóricos, lo cual hace que la cadena se pliegue y se produzcan las nanopartículas (Kaloti M. & Bohidar H.B., 2010).

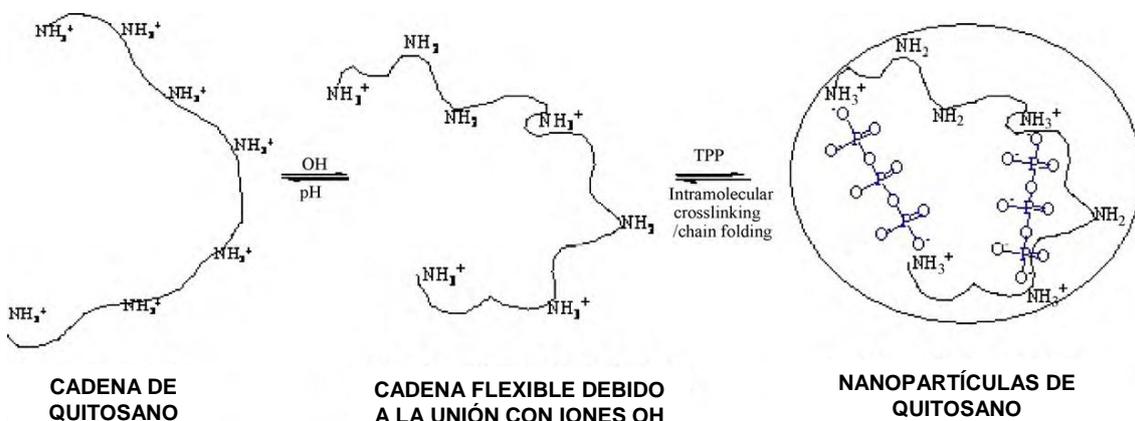


Fig. 4. Unión de los grupos amino del quitosano con los iones hidroxilo que debilita la cadena y permite la formación de uniones intramoleculares con los iones tripolifosforicos, lo cual genera las nanopartículas (Kaloti M. & Bohidar H.B., 2010).

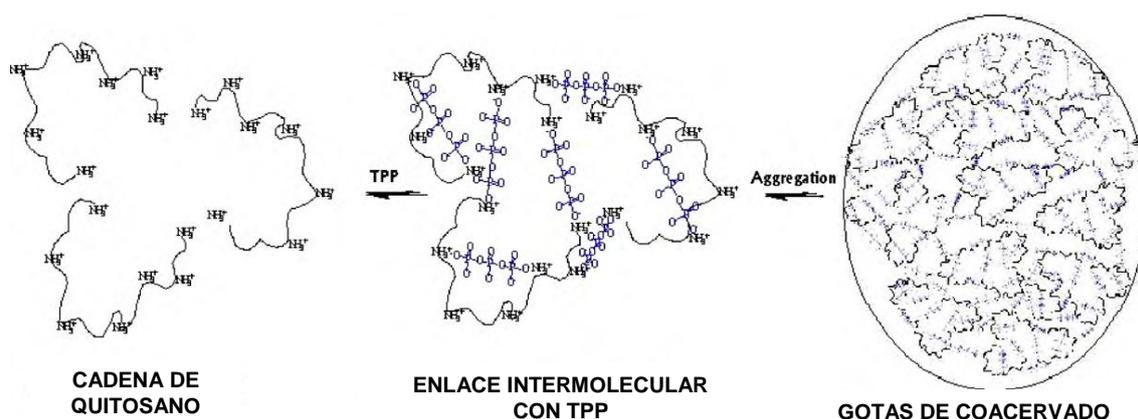


Fig. 5. Esquema de la unión de los grupos amino del quitosano con los iones tripolifosforicos para formar enlaces intermoleculares que generan complejos solubles, los que posteriormente se asocian para dar lugar a coacervados (Kaloti M. & Bohidar H.B., 2010)

## 2.6 Sulfato de condroitín como agente reticulante

Otro de los agentes reticulantes utilizados para la formación de nanopartículas poliméricas es el sulfato de condroitín, un polisacárido de origen natural que se encuentra en el tejido conectivo, cartílago y hueso, compuesto por unidades repetidas y alternadas de N-acetil-galactosamina y ácido glucurónico unidos entre ellos mediante enlaces  $\beta$ 1-4 y  $\beta$ 1-3 respectivamente, que contiene un grupo sulfato y carboxilo en cada disacárido (Santo V. E. et al, 2012; Sui et al, 2008). Se trata de un glicosaminoglicano (GAG), que por lo general se encuentra ligado a las proteínas para formar proteoglicanos, y son componentes estructurales abundantes en la matriz extracelular, que se han puesto a prueba para desempeñar un papel en la reparación de heridas, morfogénesis, y señalización de factores de crecimiento (Sugahara et al, 2003). El sulfato de condroitín tiene varias aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, de hecho ha sido empleado para preparar nanopartículas destinadas a la administración de fármacos (Yeh et al, 2011), en apósitos para heridas (Kirker et al, 2002), y en andamios de ingeniería tisular (Wang et al, 2006). Dada su naturaleza polianiónica y su alta densidad de carga, el sulfato de condroitín es capaz de formar complejos polielectrolitos estables (PEC) con polímeros policatiónicos ya sea como componente principal o como agente de reticulación (Santo V. E. et al,

2012). En este trabajo se estudiará la formación de nanopartículas de quitosano reticuladas con condroitín sulfato donde los grupos sulfato interactúan con los grupos amino del quitosano a través de interacciones electrostáticas reversibles.

## **2.7 Principio activo: Ácido ascórbico**

Las nanopartículas de quitosano han sido ampliamente utilizadas como transportadores de péptidos, proteínas, oligonucleótidos, vitaminas, plásmidos y drogas (Janes K.A et al, 2001), ya que tienen la capacidad para proteger las macromoléculas bioactivas sensibles a la degradación enzimática y química in vivo durante el almacenamiento, y además facilitan el transporte de macromoléculas cargadas a través de las células epiteliales de absorción (Mao H.Q et al, 2001).

En este trabajo se empleará como principio activo al ácido ascórbico (AA), conocido comúnmente como vitamina C, una vitamina hidrosoluble indispensable para mantener los procesos fisiológicos de varios animales, incluidos los humanos (Esposito et al, 2002). El AA es un potente agente antioxidante que cuenta con una gran variedad de funciones biológicas ya que promueve la biosíntesis de colágeno, proporciona fotoprotección, provoca la reducción de la melanina, elimina los radicales libres y mejora la inmunidad (Bendich A et al, 1986). Sin embargo el AA es muy inestable en presencia de oxígeno, luz, condiciones de humedad, altas temperaturas y en contacto con iones metálicos, durante los cuales se descompone fácilmente en compuestos biológicamente inactivos (Jang K. & Lee H, 2008). La encapsulación es una técnica adecuada para prolongar la vida útil del AA ya que mejora su estabilidad al protegerlo de los factores ambientales adversos anteriormente mencionados (Alishahi A. et al, 2011).

## **2.8 Objetivos**

En éste trabajo se propone como objetivo formular y evaluar las propiedades fisicoquímicas y morfológicas de dos sistemas nanométricos de quitosano que serán empleadas en un trabajo mayor en el que se desarrollan matrices de reposición tisular para el tratamiento de lesiones dérmicas.

Uno de los sistemas empleará tripolifosfato de sodio como agente reticulante y además encapsulará ácido ascórbico, por lo que se estudiará la influencia de varios factores (tales como: relación de la mezcla [CS/TPP], concentración de quitosano, pH y concentración de AA) sobre el tamaño y el potencial zeta de la nanopartículas. Por último se observarán las características morfológicas de la síntesis más óptima obtenida.

También se propone la formación y caracterización de nanopartículas de quitosano con un agente reticulante alternativo, el sulfato de condroitín, por lo que también se realizarán estudios de la influencia de varios factores sobre el tamaño y potencial zeta de éste tipo de sistema.

## **3. *Materiales y Métodos***

---

### **3.1 Materiales**

Quitosano (CS) de bajo peso molecular y grado de desacetilación  $\geq 75$  %, tripolifosfato de sodio (TPP), sulfato de condroitín (CHS), ácido ascórbico 99.7% pureza, ácido acético glacial, NaOH 2N, HCl 1N y agua miliQ.

### **3.2 Preparación de las nanopartículas**

Con el fin de llevar a cabo los objetivos planteados, en primer lugar se procedió a realizar una búsqueda exhaustiva en la bibliografía donde se encontró mayor número de material referido a nanopartículas de quitosano y TPP en comparación con las nanopartículas de sulfato de condroitín. Por lo que fue posible partir de una base de datos más consistente para las primeras que para las segundas y es por este motivo que el estudio se encara de manera distinta para ambos sistemas. Para las nanopartículas de quitosano y TPP se prepararon dos síntesis con concentraciones de mezcla CS/TPP distinta, además de experimentar con distintas concentraciones del principio activo y variar las condiciones de pH. Mientras que para las nanopartículas de quitosano y sulfato de condroitín se realizaron varias síntesis con distintas relaciones CS/CHS para ver su influencia en el tamaño y el potencial Z de las nanopartículas, obteniéndose los siguientes protocolos de síntesis:

#### **3.2.1 Preparación de nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP**

Las nanopartículas fueron preparadas de acuerdo con el procedimiento reportado por Jang & Lee (Jang K. & Lee H., 2008), Wu et al. (Wu et al, 2005) y Calvo et al. (Calvo et al, 1997) basado en el método de gelificación iónica entre quitosano (CS) y aniones de tripolifosfato de sodio (TPP). El esquema general para la preparación de nanopartículas de quitosano se muestra en la Fig. 6. Donde el CS se disuelve en una solución acuosa de ácido acético de concentración 2.4 mg/ml. La concentración de ácido acético en solución acuosa fue 1.75 veces la de CS. Bajo agitación magnética y a temperatura ambiente, 3 ml de solución acuosa de TPP de concentración 0.8 y 1.6 mg/ml, fueron añadidos

gota agota a 5 ml de la solución de CS. La concentración final de CS en la suspensión de nanopartículas fue de 1.5 mg/ml en todos los casos y la concentración final de TPP fue de 0.3 y 0.6 mg/ml.

La formación de las nanopartículas de quitosano cargadas con ácido ascórbico (AA) resulta de la adición de 3 ml de solución de TPP (0.3 o 0.6 mg/ml), bajo agitación magnética, a 5 ml de solución de CS (1.5 mg/ml) que además contiene AA (0.2, 0.3 y 0.6 mg/ml). Previo a la adición de la solución de TPP se mide PH y se ajusta a PH=3.6, 4 o 5 con una solución de NaOH 2N.

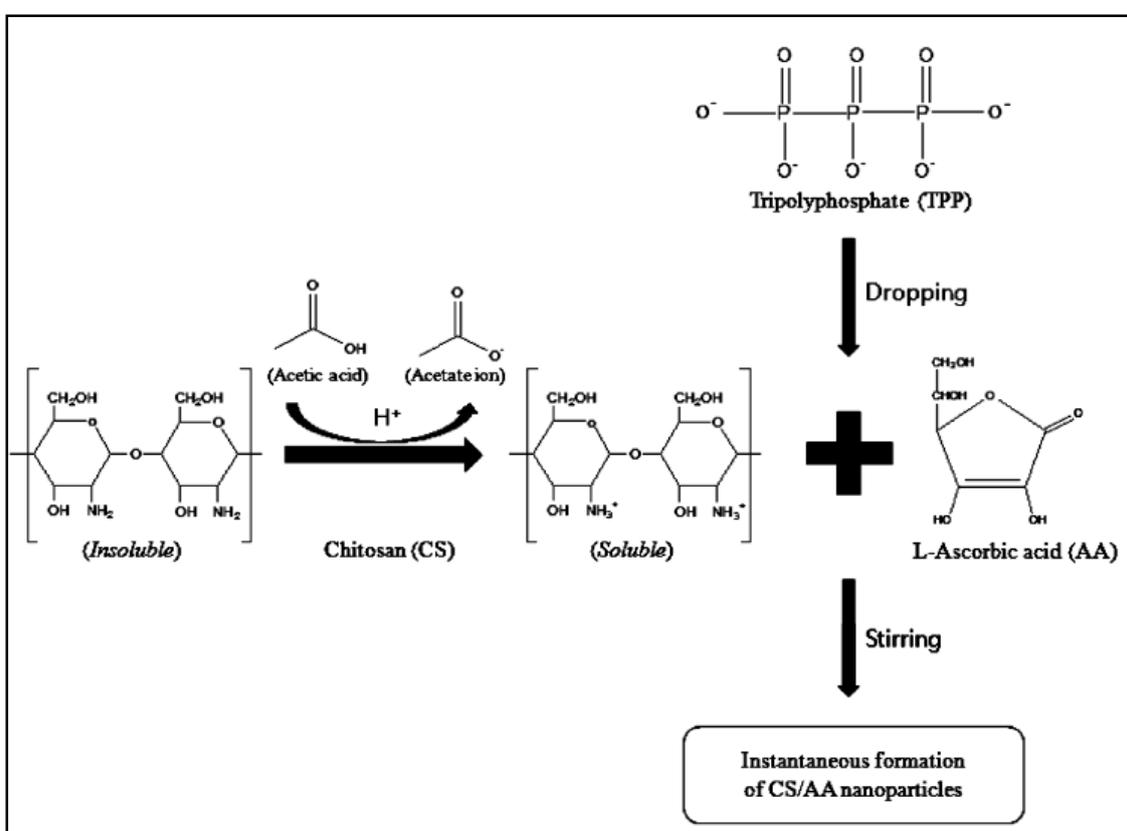


Fig 6. Esquema de la preparación de nanopartículas de quitosano y TPP cargadas con ácido ascórbico mediante el método de gelificación iónica (Jang K. & Lee H., 2008).

### 3.2.2 Preparación de nanopartículas de quitosano reticuladas con sulfato de condroitín

Las nanopartículas de quitosano reticuladas con sulfato de condroitín (CHS) también fueron preparadas mediante el método de gelificación iónica. Donde el CS se disuelve en una solución acuosa de ácido acético de dos

concentraciones (3.84 y 0.80 mg/ml). La concentración de ácido acético en la solución acuosa fue, en todos los casos, de 1.75 veces la de CS. Bajo agitación magnética y a temperatura ambiente, 3 ml de solución acuosa de sulfato de condroitín de varias concentraciones (3.20, 1.07, 0.53 y 0.80 mg/ml), fue añadida gota a gota a 5 ml de la solución de CS. La concentración final de CS en la suspensión de nanopartículas fue de 2.40 y 0.50 mg/ml y la concentración final de CHS fue de 0.20, 0.30, 0.40 y 1.20 mg/ml.

La formación de las nanopartículas de quitosano cargadas con ácido ascórbico (AA) resulta de la adición de 3 ml de solución de sulfato de condroitín (1.2 mg/ml), bajo agitación magnética, a 5 ml de solución de CS (2.4 mg/ml) que además contiene AA (0.6 mg/ml).

### **3.3 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de quitosano**

El tamaño de las nanopartículas y el potencial Z fueron determinados mediante la utilización del Nano Z-sizer (Malvern Instruments) mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). La distribución de tamaños de las mismas se reporta como el índice de polidispersidad (PDI).

Las características morfológicas de las nanopartículas fueron examinadas a través del Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) JEOL JEM-1010. Donde 10µl de suspensión de nanopartículas se colocaron sobre una grilla con film de carbón de 200 mesh, sin teñir. Luego de 10 minutos se remueve el líquido excedente acercando un segmento de papel de filtro al borde de la grilla y por último se deja secar para su posterior observación en TEM. Para medir el tamaño de las nanopartículas se empleó el *software* de edición de imágenes ImageJ. El tratamiento informático de la distribución de tamaños se realizó con el programa Microcal Origin 7.0.

### **3.4 Cálculo de Eficiencia de Encapsulación (EE)**

Para evaluar la EE de las nanopartículas de quitosano cargadas con ácido ascórbico se llevó a cabo la separación de las mismas del medio acuoso, el cual contiene vitamina C libre, mediante ultracentrifugación (Avanti J-30 I Centrifuge, Beckman) a 15000g, 4 °C, en condiciones de vacío por 30 minutos. La cantidad de ácido ascórbico libre en el sobrenadante se determinó mediante

espectrofotometría UV. Para ello se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de ácido ascórbico dentro del rango de 0.1 a 1.0 mg/ml, luego se tomaron alícuotas de cada concentración y se realizaron diluciones al décimo con una solución de HCl 1N con el fin de medir posteriormente su absorbancia a 244nm ( $\lambda_{\text{máx}}$  del ácido ascórbico en HCl 1N). La concentración de vitamina C en el sobrenadante fue determinada efectuando una dilución al décimo del sobrenadante con HCl 1N, midiendo su absorbancia a 244nm e interpolando éste valor en la curva de calibración, donde a partir de la ecuación de la recta de la gráfica de Absorbancia en función de la concentración (véase Fig. 7) fue posible conocer la cantidad de ácido ascórbico sin encapsular. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado.

La EE fue calculada como:  $EE = (A - B) / A \times 100$ , donde A es la concentración total de ácido ascórbico y B corresponde a la concentración calculada de ácido ascórbico libre en el sobrenadante.

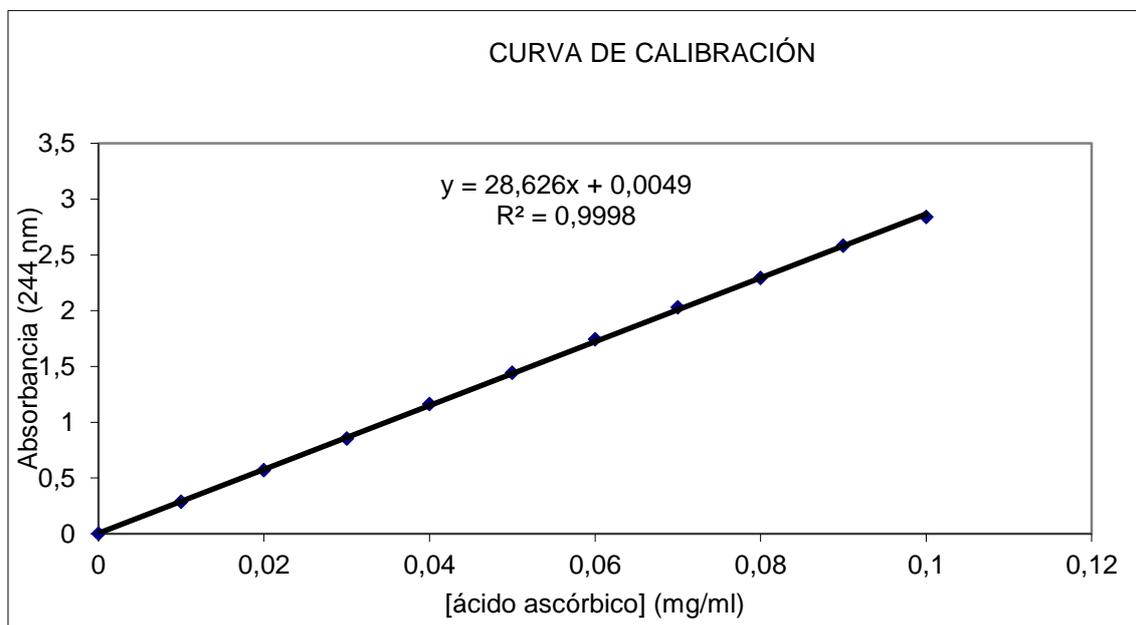


Fig. 7. Gráfica de Absorbancia a 244nm en función de la concentración de ácido ascórbico.

### 3.5 Estudios in vitro de viabilidad celular

Para evaluar la proliferación y la citotoxicidad de las nanopartículas de quitosano y sus componentes se realizaron ensayos colorimétricos (MTT). Dichos estudios fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología del IIBCE. Los mismos, fueron efectuados con 48 hrs de incubación en soluciones de AA y suspensiones de Np CS con AA (NP-AA), donde la relación [CS/TPP] fue 2.5/1 y la relación [CS/CHS] fue 2/1, la línea celular utilizada fue de fibroblastos humanos BJ proveniente de piel de prepucio. El protocolo que se siguió es el que se detalla a continuación. Las células BJ contenidas en una placa de petri con un 80 % de confluencia se decolan de su sustrato con Tripsina (trypsin 0.25% in 0.3% EDTA in PBS). Las células se resuspenden y se prepara una dilución de células de forma tal de sembrar en una placa de 96 pocillos  $1,5 \times 10^5$  células/ml. Luego de 24 h de incubación en estufa de cultivo, se procede a realizar los tratamientos con distintas concentraciones en base al AA (30, 50, 75, 100 y 150  $\mu\text{M}$ ) por triplicado. A las 48 hrs se remueve el medio de cultivo y se agrega una solución de medio de cultivo conteniendo MTT (Concentración final = 0,5 mg/ml) a cada pocillo. Se incuba 1 hr en estufa de cultivo y luego se remueve la solución y se agrega DMSO. Finalmente, se mide la absorbancia de cada pocillo a 570 nm en un lector de placas. Se determina el promedio de los triplicados y se calcula el porcentaje de células viables empleando los pocillos controles como 100 %.

## ***4. Resultados y Discusión***

---

### **4.1 Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP**

La preparación de las nanopartículas se basó en el método de gelificación iónica, donde el quitosano se disuelve en una solución acuosa de ácido acético dando lugar a la protonación de los grupos amino. Estos grupos amino protonados convierten al quitosano en un polícatión capaz de interactuar con el TPP, una molécula aniónica multivalente, a través de interacciones electrostáticas.

Cuando el CS y el TPP se mezclan en la solución acuosa de ácido acético, se forma espontáneamente nanocomplejos compactos con un carga superficial total positiva, y la densidad de la carga superficial se ve reflejada en los valores de potencial zeta (Jang K. & Lee H., 2008). El potencial zeta es un indicativo de la estabilidad coloidal de las nanopartículas (Chern C. S. et al, 2004; Trimaille T. et al, 2003). De hecho la presencia de una alta carga superficial (positiva o negativa) provoca la repulsión de cargas y evita la agregación en virtud de menos colisiones y atracciones iónicas. El rango de potencial zeta estable en suspensión acuosa ha sido empíricamente definido como mayor de  $|\pm 30|$  mV (Hartig et al, 2007; Sugrue S., 1992).

Otro factor importante a definir es el tamaño de las nanopartículas, ya que suele condicionar su accesibilidad en el cuerpo (Panyam & Labhasetwar, 2003). Las nanopartículas más pequeñas (~100 nm) han demostrado tener mejor absorción a través de las mucosas y los epitelios que las nanopartículas de mayor tamaño (Song C. et al, 1998; Desai M.P. et al, 1996).

Por lo tanto, para iniciar con la caracterización fisicoquímica, se evaluó la influencia de la relación [CS/TPP] sobre el tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas, para ello se prepararon dos suspensiones, en donde la concentración final de quitosano fue de 1.5 mg/ml en ambos casos y la concentración final de TPP fue de 0.3 y 0.6 mg/ml, cuya relación [CS/TPP] es de [5/1] y [2.5/1] respectivamente. Ambos sistemas se prepararon sin AA y con AA

(0.6 mg/ml) a pH4. En la Tabla 1 se muestran las medidas de tamaño, PDI y Potencial Z de dichas suspensiones de nanopartículas.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de quitosano con y sin AA a pH 4.

[AA] (mg/ml)	[CS] (mg/ml)	[TPP] (mg/ml)	Rel. [CS/TPP]	pH	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
0.0	1.5	0.3	5/1	4	223.9 ± 11.8	0.678 ± 0.174	37.8 ± 2.06
0.6	1.5	0.3	5/1	4	258.7 ± 27.4	0.669 ± 0.065	30.5 ± 1.49
0.0	1.5	0.6	2.5/1	4	157.6 ± 0.76	0.401 ± 0.021	35.9 ± 1.22
0.6	1.5	0.6	2.5/1	4	204.2 ± 4.04	0.523 ± 0.009	29.8 ± 1.47

El tamaño de las nanopartículas de quitosano (NpCS) depende de la concentración del polímero y de la relación de la mezcla [CS/TPP], de modo tal que cuanto mayor sea la concentración de quitosano y la relación [CS/TPP] mayor será el tamaño de las nanopartículas obtenidas (Kaloti M. & Bohidar H.B., 2010). Por lo tanto, no es sorprendente que la síntesis con relación [CS/TPP] 5/1 contenga mayores tamaños de nanopartículas (223.9 y 258.7 nm correspondiente a las NP sin y con AA respectivamente) que la relación 2.5/1 (157.6 y 204.2 nm sin y con AA respectivamente). Mientras que el potencial zeta disminuye a medida que la concentración de TPP se incrementa para una misma concentración de quitosano (Jang K. & Lee H., 2008), debido a que los grupos amino protonados de quitosano se neutralizan por la presencia de los aniones TPP.

En la Fig. 8. Se observan las imágenes TEM de las nanopartículas sin (A) y con (B) ácido ascórbico, cuya relación [CS/TPP] fue 5/1 a pH 4, y las nanopartículas con relación [CS/TPP] 2.5/1 sin (C) y con (D) ácido ascórbico, también a pH 4. Donde puede apreciarse que las nanopartículas con una menor concentración de TPP presentan una forma menos definida en comparación con las nanopartículas que cuentan con concentraciones de TPP superior.

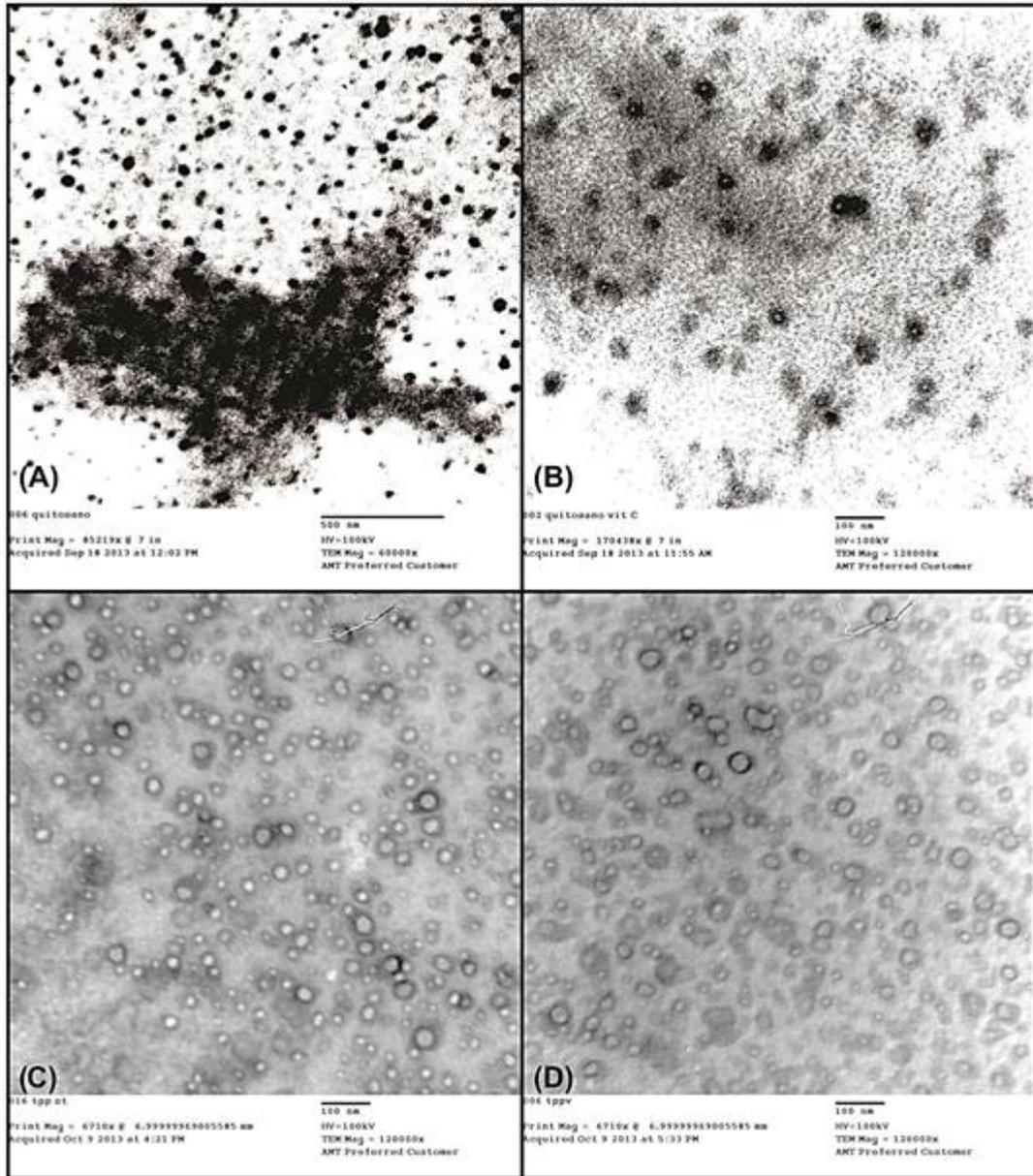


Fig. 8. Características morfológicas de las nanopartículas sin (A, C) y con (B, D) ácido ascórbico a pH 4, cuya relación de mezcla [CS/TPP] fue 5/1 (A-B) y 2.5/1 (C-D).

Luego se procedió a evaluar la influencia del pH y la concentración del principio activo (ácido ascórbico), para una misma relación [CS/TPP], sobre el tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas. Se eligió la relación de mezcla 2.5/1 debido a que se obtienen nanopartículas de menor tamaño y con una forma esférica más definida.

En la Tabla 2 se observan los valores promedio del tamaño, Índice de polidispersidad (PDI), Potencial Zeta y Eficiencia de Encapsulación (EE) de cada

suspensión de nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP obtenidas en las distintas condiciones de síntesis, en las cuales se varía la concentración del principio activo (AA) y el pH.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas y Eficiencia de Encapsulación (EE) de las nanopartículas de quitosano cargadas con ácido ascórbico (AA).

[AA] (mg/ml)	pH	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	EE (%)
0.0	3.6	146.8 ± 0.651	0.343 ± 0.005	38.7 ± 0.50	0.00 ± 0.00
0.2	3.6	146.8 ± 2.150	0.349 ± 0.014	37.1 ± 1.74	22.3 ± 0.67
0.3	3.6	157.4 ± 0.902	0.386 ± 0.029	36.7 ± 0.64	18.5 ± 0.87
0.6	3.6	170.9 ± 2.346	0.423 ± 0.008	36.5 ± 1.41	12.7 ± 0.70
0.0	4.0	157.6 ± 0.755	0.401 ± 0.021	35.9 ± 1.22	0.00 ± 0.00
0.2	4.0	158.9 ± 2.495	0.427 ± 0.023	32.1 ± 0.47	31.9 ± 0.73
0.3	4.0	170.2 ± 0.723	0.511 ± 0.014	32.6 ± 1.19	31.7 ± 0.57
0.6	4.0	204.2 ± 4.038	0.523 ± 0.009	29.8 ± 1.47	15.9 ± 0.69
0.0	5.0	201.6 ± 0.265	0.342 ± 0.048	23.4 ± 1.11	0.00 ± 0.00
0.2	5.0	136.4 ± 0.757	0.245 ± 0.010	22.8 ± 1.59	25.9 ± 0.44
0.3	5.0	127.7 ± 0.551	0.212 ± 0.002	21.0 ± 1.30	22.6 ± 0.58
0.6	5.0	109.3 ± 1.082	0.219 ± 0.003	20.3 ± 0.99	21.2 ± 0.88

La concentración final, para todos los casos, de quitosano y de TPP fue de 1.5 y de 0.6 mg/ml respectivamente, y las concentraciones de AA van de 0.2 a 0.6 mg/ml en cada condición de pH (3.6 - 4 - 5).

Como puede observarse en la Tabla 2, en condiciones de pH 3.6 y 4, el tamaño promedio de las nanopartículas de quitosano aumenta a medida que la concentración de AA se incrementa desde 0.2 a 0.6 mg/ml (desde 146.8 a 170.9 nm a pH 3.6 y de 157.6 a 204.2 nm a pH 4), al igual que el PDI. Mientras que el Potencial Z tiende a disminuir cuando la concentración de AA aumenta (desde 38.7 a 36.5 mV a pH 3.6 y de 35.9 a 29.8 mV en condiciones de pH 4).

Para explicar éste fenómeno, cabe señalar que la encapsulación de AA pueda ocurrir mediante dos métodos, es decir, durante la preparación de las nanopartículas y después de la formación de las mismas (Agnihotri S.A. et al, 2004). En el primer método, la encapsulación se llevó a cabo mediante la adición de AA a la solución de quitosano previo a la reticulación con TPP, donde los grupos ácidos de la vitamina C interactúan a través de interacciones electrostáticas con los grupos amino protonados del quitosano. Esto resulta en

la encapsulación de AA dentro de las nanopartículas de quitosano preparadas por el método de gelificación iónica. En el segundo método, el AA libre restante es físicamente adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas de CS. Por lo tanto no es sorprendente que la encapsulación de AA dentro o fuera de las nanopartículas genere un aumento en el tamaño y el PDI, y que el AA adsorbido en la superficie de las nanopartículas de quitosano conduzca a una disminución del Potencial Z.

En cuanto a la suspensión de las nanopartículas a pH 5, a medida que se incrementa la concentración de AA desde 0.2 a 0.6 mg/ml, el tamaño y el PDI de las nanopartículas de quitosano disminuyen (desde 201.6 a 109.3 nm) al igual que el Potencial Zeta (desde 23.4 a 20.3 mV).

Para que el quitosano pueda interactuar mediante fuerzas electrostáticas con el TPP se requiere de una cierta densidad de cargas, la cual es regulada por el pH de la solución. Cuando el pH de una solución disminuye desde neutra a ácida el número de cargas de TPP disminuye, mientras que lo contrario ocurre para el quitosano, ya que un incremento en el pH de la solución (especialmente cerca al  $pK_a$  del quitosano  $\approx 6,3$ ) disminuye el grado de ionización de los grupos amino (Shu X.Z. & Zhu K.J., 2002). Por lo tanto, en la solución de quitosano a pH 5 hay una disminución en la densidad de cargas del quitosano en relación a las soluciones de pH 3.6 o 4, y es posible que esta disminución en la densidad de cargas afecte la interacción con el AA y el TPP, resultando en una reducción del tamaño, PDI y potencial Zeta a medida que la concentración de AA se incrementa. De hecho, se ha reportado que un aumento en el pH de la solución genera un aumento de grupos amino desprotonados disminuyendo el nivel de ionización por lo que el tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas de quitosano disminuyen (Lin et al., 2007).

En la Tabla 2 también se exponen los valores de EE del AA dentro de las nanopartículas de quitosano y puede observarse que en todos los casos disminuye a medida que se incrementa la concentración de vitamina C desde 0.2 a 0.6 mg/ml. La EE del AA obtenida para las distintas condiciones de pH se mantienen en un rango de valores que van desde 13 a 32 %. Sin embargo las nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP que encapsulan ácido

glicirrético (GLA) y proteínas tales como la BSA han demostrado obtener una EE de 80-90 % (Wu et al, 2005; Calvo et al, 1997). En base a los resultados de nuestros estudios, la EE de AA dentro de las nanopartículas es más complejo, ya que los iones hidrógeno del AA suelen disociarse en la solución de quitosano, por lo que únicamente los grupos ácidos interactúan con las cargas positivas de los grupos amino del quitosano para formar las nanopartículas cargadas con AA resultando en una EE más baja (Jang K. & Lee H., 2008).

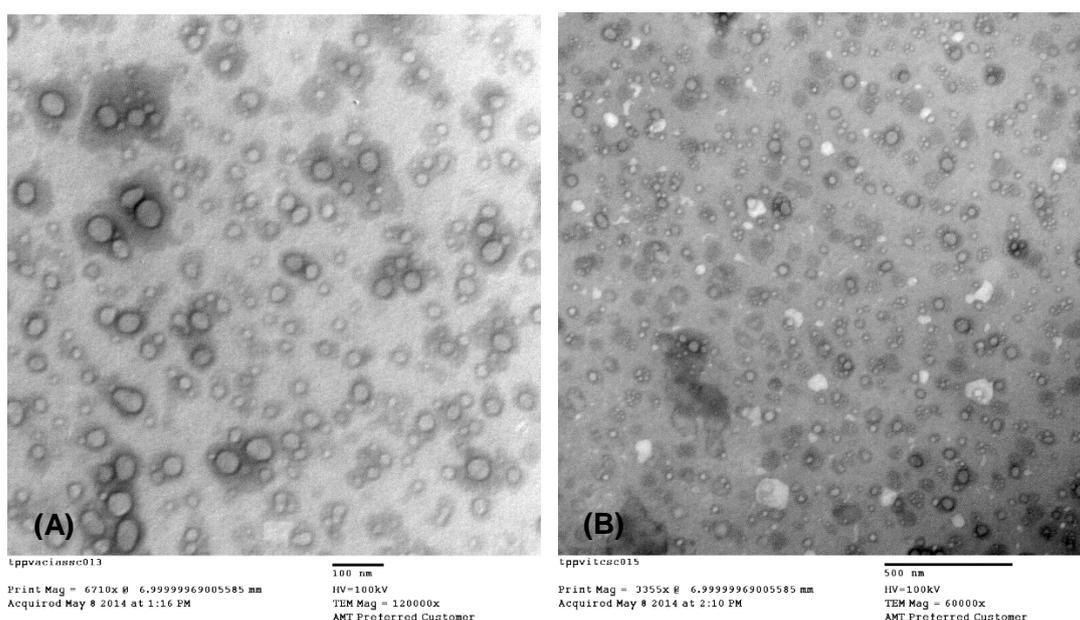
El tamaño de las nanopartículas es uno de los determinantes más importantes a la hora de evaluar su accesibilidad en el cuerpo a través de las mucosas o el tejido epitelial (Panyam & Labhasetwar, 2003). Las nanopartículas más pequeñas (~100 nm) han demostrado tener una absorción arterial 3 veces superior en comparación con nanopartículas más grandes (~275 nm), debido a que las nanopartículas más pequeñas fueron capaces de penetrar a través de las capas submucosas, mientras que las nanopartículas de mayor tamaño permanecieron localizadas predominantemente en el revestimiento epitelial (Song C. et al, 1998; Desai M.P. et al, 1996). Por lo tanto el tamaño de las nanopartículas es importante para potenciar la entrega del principio activo al sitio diana específico. Otro factor limitante de la eficiencia de administración de fármacos mediada por las nanopartículas es el PDI, ya que en un sistema polidisperso, las nanopartículas más grandes por lo general tienen una mayor capacidad de carga, mientras que las nanopartículas más pequeñas tienen una mayor eficiencia de entrega a los tejidos o células. Esta contradicción significa que aunque el sistema de transporte del fármaco cuente con una alta eficiencia de encapsulación, la eficiencia en la entrega puede ser escasa.

En éste trabajo las nanopartículas de menor tamaño (109.3 nm) y bajo PDI (0,219), fueron obtenidas con una concentración final de CS de 1.5 mg/ml, una concentración de TPP de 0.6 mg/ml y una concentración de ácido ascórbico de 0.6 mg/ml a pH 5. Ésta síntesis fue seleccionada para los siguientes estudios.

## 4.2 Caracterización morfológica de las nanopartículas de quitosano y TPP

Para estudiar las características morfológicas, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), de las nanopartículas de quitosano y TPP de menor tamaño (109.3 nm), se prepararon suspensiones con y sin AA (0.6mg/ml), cuya concentración final de CS y TPP fue de 1.5 y 0.6 mg/ml respectivamente a pH5.

En la Fig.9. se muestran las imágenes de TEM de las nanopartículas sin (A) y con (B) AA, en las que se puede apreciar una forma esférica y una distribución de tamaños de nanopartículas en el intervalo de 21.25-63.75 nm para las vacías (C) y entre 15.25-62.75 nm para las nanopartículas que contienen AA (D). La distribución de tamaños se ajusta a una distribución normal centrada en 41.06nm y 36.52nm para las nanopartículas sin y con AA respectivamente. Sin embargo el tamaño medido mediante DLS fue de 201.6 nm para las nanopartículas sin AA y de 109.3 nm para las que contienen AA. La discrepancia en la medida de tamaño entre TEM y DLS surge porque en solución los iones de carga opuesta serán atraídos a la superficie de las nanopartículas generando capas iónicas que se mueven junto con ella, y DLS mide el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas en solución, mientras TEM informa el diámetro real de las nanopartículas sin la capa iónica (Fan et al, 2012).



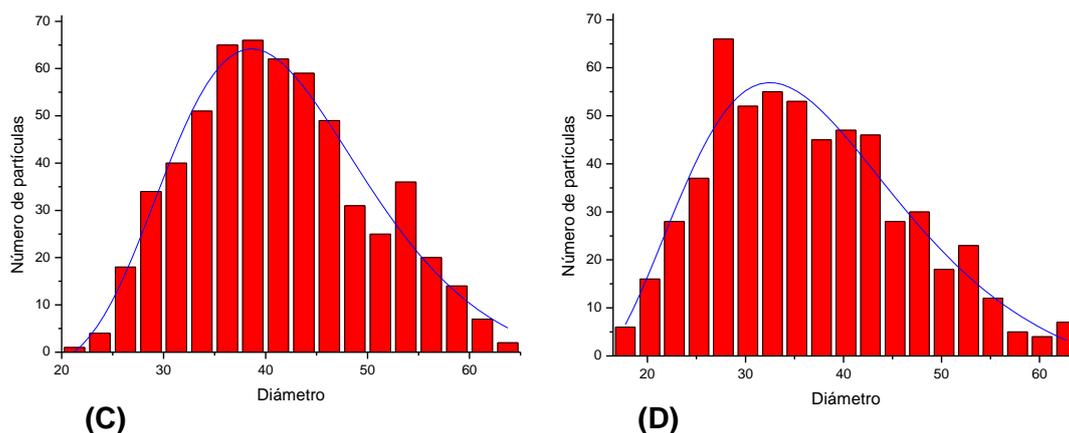


Fig. 9. Micrografías de TEM, distribución de tamaños y ajuste normal de las de las nanopartículas sin (A, C) y con (B, D) ácido ascórbico a pH 5, cuya concentración de CS, TPP y AA es de 1.5, 0.6 y 0.6 mg/ml respectivamente. La media y la varianza del ajuste normal son 41.06nm y 0.62nm para las nanopartículas vacías y 36.52nm y 1.55nm para las que contienen AA respectivamente.

### 4.3 Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de quitosano reticuladas con CHS

El quitosano es un polielectrolito catiónico que bajo condiciones ácidas es capaz de formar complejos electrostáticos con el sulfato de condroitín, una molécula polianiónica, donde las interacciones intermoleculares entre las cargas negativas de los grupos carboxilato y sulfato del CHS y las cargas positivas de los grupos amino del CS son responsables de la formación de las nanopartículas (Rinaudo M, 2006).

El tamaño y la carga superficial de las nanopartículas de quitosano se ven influenciados por la relación en masa y la concentración final de CHS (Yeh et al, 2011). Para evaluar la influencia de la relación m/m CS/CHS sobre el tamaño y la carga superficial de las nanopartículas se prepararon varias suspensiones en las que se varía dicha relación. A continuación en la Tabla 3 se detallan las concentraciones de quitosano y sulfato de condroitín que fueron utilizadas, así como la relación en masa resultante y las medidas de tamaño, PDI y Potencial Zeta obtenidas.

Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de quitosano y CHS

[CS] (mg/ml)	[CHS] (mg/ml)	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	Relación CS/CHS
0.5	0.2	974.1 ± 30.85	0.405 ± 0.112	66.9 ± 0.681	2.5/1
2.4	0.2	2732 ± 92.63	0.666 ± 0.088	83.4 ± 2.06	12/1
0.5	0.3	855.6 ± 9.521	0.327 ± 0.017	62.9 ± 2.45	1.7/1
2.4	0.3	2510 ± 144.9	0.732 ± 0.130	80.7 ± 1.27	8/1
0.5	0.4	798.3 ± 7.660	0.305 ± 0.007	50.4 ± 4.51	1.25/1
2.4	0.4	1857 ± 202.4	0.910 ± 0.156	79.4 ± 4.94	6/1

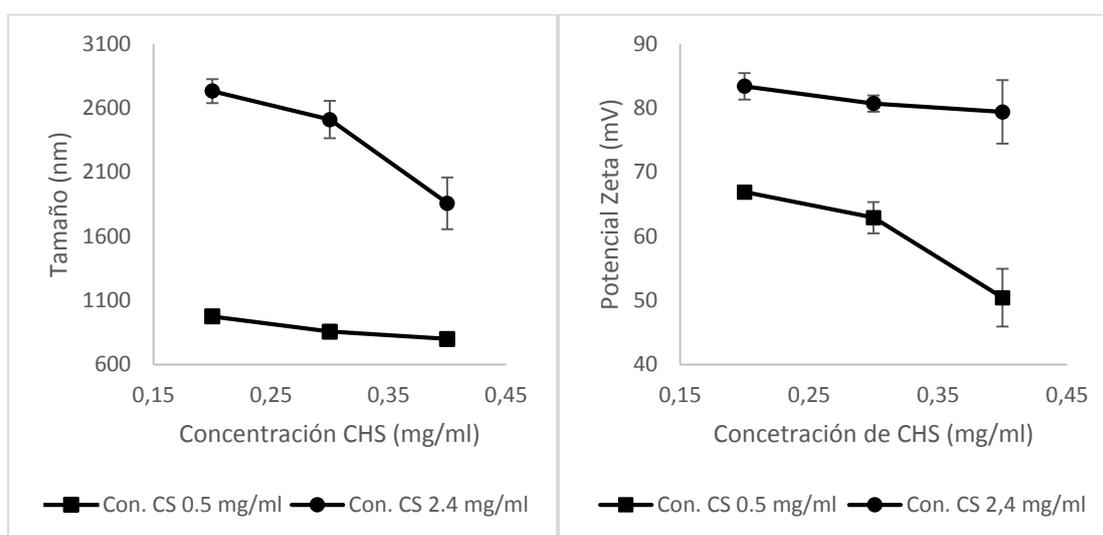


Fig. 10. (A) Tamaño de las Np CS-CHS en función de la concentración final de CHS. (B) Potencial Zeta de las Np CS-CHS en función de la concentración final de CHS.

Tal como se observa en la Fig. 10 A y B, el tamaño y el potencial zeta disminuyen a medida que la relación CS/CHS disminuye, por ejemplo, para una concentración fija de CHS 0.2 mg/ml, el tamaño es de 974 nm y el potencial zeta de 66.9 mV para la relación 2.5/1, mientras que para la relación 12/1 el tamaño es de 2732 nm y el potencial zeta de 83.4 mV. Por lo tanto, para una concentración fija de CHS, a medida que la concentración de quitosano decrece, o lo que es lo mismo, a medida que la relación CS/CHS disminuye, el tamaño y el potencial zeta también disminuyen.

Para evaluar la influencia de la concentración final del CHS sobre el tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas se realizaron 3 síntesis en las que se mantuvo constante la relación CS/CHS (2.5/1) mientras que se incrementó

la concentración de CHS desde 0.2-0.6 mg/ml. En la Tabla 4 se muestran los valores obtenidos de tamaño y potencial zeta.

Tabla 4 Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de quitosano y CHS con relación de mezcla 2.5/1.

[CHS] (mg/ml)	Relación CS/CHS	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)
0.2	2.5/1	974.1 ± 30.85	66.9 ± 0.681
0.4	2.5/1	2732 ± 72.63	70.7 ± 0.833
0.6	2.5/1	2981 ± 754.4	74.0 ± 6.450

En la Tabla 4. y en la Fig. 11 A y B, puede observarse que el tamaño y el potencial zeta de las nanopartículas, para una relación fija de CS/CHS, aumentan a medida que la concentración final de CHS se incrementa desde 0.2 a 0.6 mg/ml.

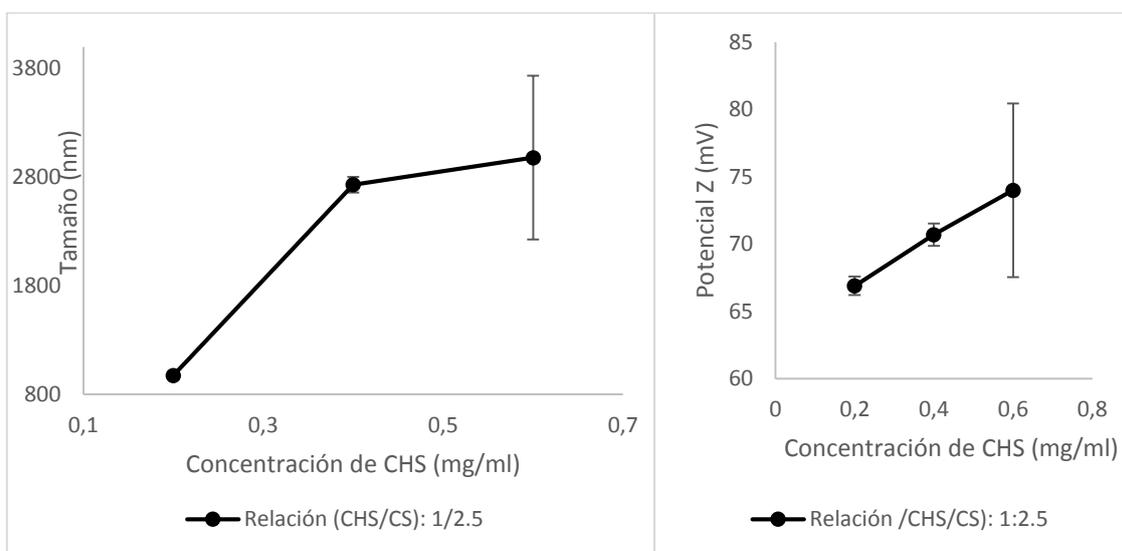


Fig. 11. (A) Tamaño de las Np CS-CHS en función de la concentración final de CHS. (B) Potencial Zeta de las Np CS-CHS en función de la concentración final de CHS.

Por lo que puede decirse que tanto el tamaño como el potencial zeta de las nanopartículas aumenta con un incremento en la concentración final CHS para una relación CS/CHS fija, y un aumento en la relación CS/CHS cuando se mantiene constante la concentración final de CHS. El aumento en el tamaño de las nanopartículas debido al incremento en la concentración final de CHS genera

un aumento del área superficial y como consecuencia un incremento del valor de potencial zeta (Yeh et al, 2011).

#### 4.4 Caracterización morfológica de las nanopartículas de quitosano y CHS

Para estudiar las características morfológicas de las nanopartículas, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), se preparó una suspensión cuya concentración final de CS y CHS fue de 2.4 y 1.2 mg/ml respectivamente resultando en una relación de mezcla [CS/CHS] 2/1. Ésta relación de mezcla ha sido evaluada en varios artículos científicos (Santo V. E. et al, 2012; Yeh et al, 2011) donde se obtuvieron resultados satisfactorios de tamaño y potencial zeta. También se preparó una suspensión con AA 0.6 mg/ml a modo de prueba para evaluar su influencia. En la Tabla 5 se muestran las características fisicoquímicas y EE de AA de las nanopartículas.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de quitosano y CHS con y sin AA.

[AA] (mg/ml)	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z	EE (%)
0.0	959.2 ± 35.31	0.566 ± 0.043	50.4 ± 4.51	0.00 ± 0.00
0.6	405.6 ± 1.102	0.176 ± 0.036	43.5 ± 2.61	27.6 ± 0.29

Tal como se observa en la Tabla 5, el tamaño de las nanopartículas disminuye con la adición de AA y esto puede ser explicado por un proceso de competencia entre el sulfato de condroitín y el ácido ascórbico, ya que cuando el ácido ascórbico se mezcla en la solución de quitosano, la interacción resultante reduce el número de grupos amino del quitosano capaces de interactuar con el sulfato de condroitín generando una reducción en el tamaño. Sin embargo, el potencial zeta no resulta significativamente afectado por la adición de AA, lo cual sugiere que el AA fue encapsulado mayoritariamente dentro de las nanopartículas y no fuera de las mismas. Además el potencial zeta en ambos casos es >+30mV, lo cual sugiere que el sistema es estable en solución (V. E. Santo et al, 2012).

En la Fig.12. se muestran las imágenes TEM de las nanopartículas sin (A) y con (B) ácido ascórbico, en las que se puede apreciar una forma esférica en ambos sistemas y una amplia distribución de tamaños en el intervalo de 27.5-142.5nm para las nanopartículas sin AA y un rango entre 27.5-117.5nm para las nanopartículas con AA. Al igual que ocurre con las nanopartículas reticuladas con TPP, el tamaño obtenido por DLS discrepa con el observado mediante TEM (véase Tabla 5).

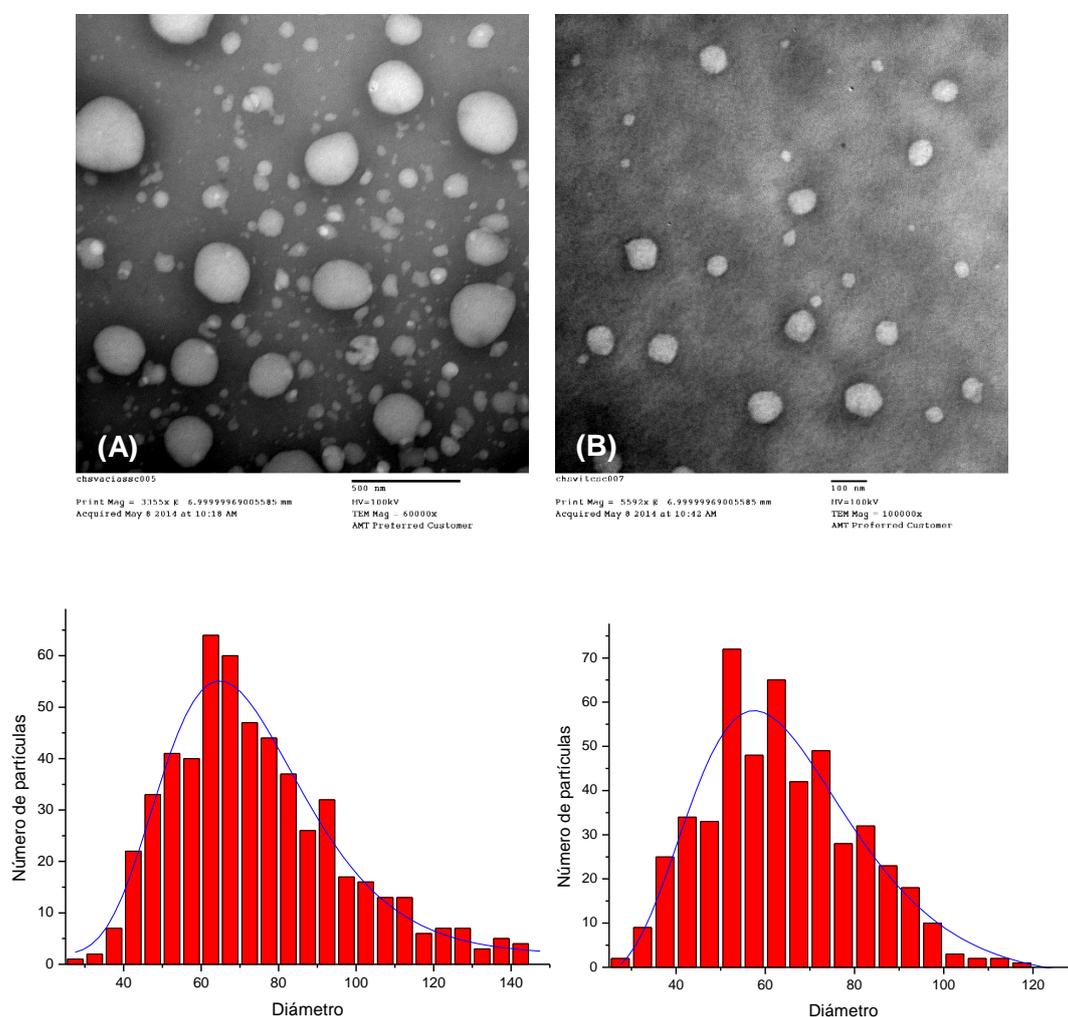


Fig. 12. Micrografías de TEM, distribución de tamaños y ajuste normal de las nanopartículas de quitosano y CHS vacías (A) y con ácido ascórbico (B). La media y la varianza del ajuste normal son 70.01nm y 1.08nm para las nanopartículas vacías y 63.16nm y 1.87nm para las que contienen AA respectivamente.

#### 4.5 Estudios in vitro de viabilidad celular

La citotoxicidad de las nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP (Np CS-TPP) y reticuladas con sulfato de condroitín (Np CS-CHS) cargadas con AA fue determinada en líneas celulares humanas de fibroblastos BJ utilizando el ensayo colorimétrico MTT (Bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazólico). Este ensayo se basa en la conversión del MTT en cristales de formazán por células vivas, el cual determina la actividad mitocondrial que está relacionada de forma directa con la viabilidad celular (Van Meerloo et al, 2011). El porcentaje de viabilidad celular obtenido fue mayor del 93% luego de ser tratadas con las Np CS-TPP y mayor del 100% luego del tratamiento con las Np CS-CHS para las distintas concentraciones de AA (30, 50, 75, 100 y 150  $\mu\text{M}$ ) (Véase Fig. 13). El alto porcentaje de viabilidad celular indica que ambos tipos de nanopartículas de quitosano no son citotóxicas para las células BJ bajo las condiciones utilizadas.

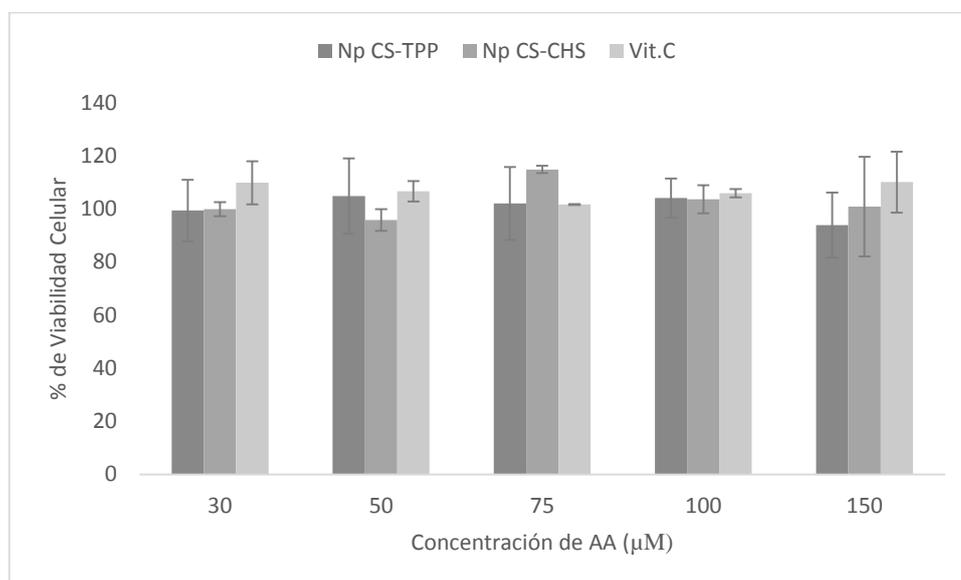


Fig. 13. Perfil de citotoxicidad de las Np CS-TPP y CS-CHS cargadas con AA luego de 48 hrs de incubación con células humanas BJ determinado por el ensayo MTT.

## 5. *Conclusión*

---

En éste estudio se demostró que mediante el método de gelificación iónica fue posible obtener nanopartículas de quitosano de forma esféricas y monodispersas en ambos sistemas, ya sean reticuladas con TPP o con CHS.

Además los resultados de éste trabajo nos permiten concluir que el tamaño de las nanopartículas, que es uno de los determinantes más importantes a la hora de evaluar su accesibilidad al cuerpo, depende en ambos sistemas de la concentración del polímero y de la relación de la mezcla [CS/agente reticulante], de modo tal que cuanto mayor sea la concentración de quitosano y la relación [CS/agente reticulante] mayor será el tamaño de las nanopartículas obtenidas. Mientras que el potencial zeta, considerado como un indicativo de la estabilidad coloidal de las nanopartículas, también depende de la relación de la mezcla, ya que un aumento en la concentración de quitosano o una disminución en la concentración del agente reticulante, genera un aumento del potencial zeta. En el presente trabajo se obtuvieron nanopartículas de quitosano reticuladas con TPP con un tamaño de 109.3 nm, un potencial zeta  $<+30\text{mV}$ , un PDI de 0.219 y una EE de AA de 21 %, mientras que las nanopartículas reticuladas con sulfato de condroitín presentan mayor tamaño (aprox. 405 nm) y mayor potencial zeta  $>+30\text{mV}$ , un PDI de 0.176 y una EE de AA de 27.6%. Además, ambos sistemas de encapsulamiento de quitosano no presentan citotoxicidad en las líneas celulares humanas de fibroblastos BJ de piel de prepucio.

Cabe señalar que estas nanopartículas de encapsulamiento de AA basadas en quitosano fueron diseñadas con el fin de ser empleadas en un trabajo mayor en el que se desarrollan matrices de reposición tisular para el tratamiento de lesiones dérmicas. Por lo tanto puede concluirse que cumplen con los requisitos necesarios para dicha aplicación.

## *6. Referencias Bibliográficas*

---

Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N., Aminabhavi T.M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release* 100: 5–28.

Aguiar, Valdés y Labaut (2011). Propuesta del sitio Web para la Gestión de Contenidos sobre Nanociencias y Nanotecnologías del Centro de Estudios Avanzados de Cuba. *Ciencias de la Información* Vol. 42 (2): 61 – 70.

Aiba S (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially Nacetylated chitosans. *Int J Biol Macromol*, 14: 225–8.

Alishahi A., Mirvaghefi A., Tehrani M.R., Farahmand H., Shojaosadati S.A., Dorkoosh F.A, Elsabee Maher Z (2011). Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. *Food Chemistry* 126: 935–940.

Annasara Hansson, Tiziana Di Francesco, Francoise Falson, Patricia Rousselle, Olivier Jordan, Gerrit Borchard (2012). Preparation and evaluation of nanoparticles for directed tissue engineering. *International Journal of Pharmaceutics* 439: 73– 80.

Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, et al (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr Chem Biol*,3: 203–30.

Bagheri-Khoulenjani S, Taghizadeh SM, Mirzadeh H (2009). An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. *Carbohydr Polym*, 78: 773–8.

Bendich A.; Machlin L. J.; Scandurra O.; Barton G. W.; Wayner D. D. M (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Adv. Free Radical. Biol. Med.*, 2: 419–444.

Calvo, P.; Remunan-López, C.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63:125–132.

Chatelet C, Damour O, Domard A (2000). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22: 261–8.

Chern C. S., Lee C. K., and Chang C. J (2004). Electrostatic interactions between amphoteric latex particles and proteins. *Colloid Polym. Sci.* 283(3): 257–264.

Chung Y-C, Chen C-Y (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresour Technol*, 99: 2806–14.

Croisier F. & Jérôme C. (2012). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* 49:780–792.

Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E (2011). Chitosan – a versatile semisynthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci*, 36: 981–1014.

Desai M.P., Labhasetwar V., Amidon G.L., Levy R.J. (1996). Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles effect of particle size. *Pharm. Res.* 13 (12):1838–1845.

Dutta P, Rinki K, Dutta J (2011). Chitosan: a promising biomaterial for tissue engineering scaffolds. *Chitosan for biomaterials II*. In: Jayakumar R, Prabakaran M, Muzzarelli RAA, editors. *Advances in polymer science*. Heidelberg: Springer Berlin. p. 45–79.

Esposito E., Cervellati F., Menegatti E., Nastruzzi C., & Cortesi R. (2002). Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *International Journal of Pharmaceutics*, 242: 329–334.

Fan W., Yan W., Xu Z., Ni H., (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 90: 21–27.

Hartig SM, Greene RR, DasGupta J, et al. (2007). Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes. *Pharm Res*, 24(12): 2353–2369.

He P, Davis SS, Illum L (1998). In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharm*; 166: 75–88.

Janes K. A.; Calvo P.; Alonso M. J (2001). Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 47: 83–97.

Jang K. & Lee H. (2008). Stability of Chitosan Nanoparticles for L-Ascorbic Acid during Heat Treatment in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 56 (6).

Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, Nair SV, Tamura H (2010) Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials. A short review. *Carbohydr Polym* 82: 227–32.

Jayakumar R., Nwe N., Tokura S., & Tamura H. (2007). Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40: 175–181.

Jayakumar R., Prabakaran M., Reis R. L., & Mano J. F. (2005). Graft copolymerized chitosan—Present status and applications. *Carbohydrate Polymers*, 62: 142–158.

Kaloti M. & Bohidar H.B. (2010). Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan–sodium tripolyphosphate solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81: 165–173.

Kirker Kelly R., Yi Luo, J. Nielson Harte, Jane Shelby, Glenn D. Prestwich (2002). Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound healing *Biomaterials* 23: 3661–3671

Klokkevold PR, Fukayama H, Sung EC, Bertolami CN (1999). The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*, 57: 49–52.

Kumaresh S. Soppimatha, Tejraj M. Aminabhavia, Anandrao R. Kulkarnia, Walter E. Rudzinski (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of Controlled Release*, 70: 1 –20.

Lehr CM, Bouwstra JA, Schacht EH, Junginger HE (1992). In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm*, 78:43–8.

Lin A. H., Liu Y. M. and Ping Q. N. (2007), Free amino groups on the surface of chitosan nanoparticles and its characteristics. *Yao Xue Bao.*, 42: 323-328.

Madhumathi K., Binulal N. S., Nagahama H., Tamura H., Shalumon K. T., Selvamurugan N., et al. (2009). Preparation and characterization of novel-chitin-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44: 1–5.

Madihally SV & Matthew HWT (1999). Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 20: 1133–42.

Mao H. Q.; Krishnendu R.; Troung-Le V. L.; Janes K. A.; Lin K. L.; August J. T.; Leong K. W (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. Controlled Release*, 70: 399–421.

Meclean S., Processer E., O'Malley D., Clark N., Ramtoola Z., Brayden D. (1998). Binding and uptake of biodegradable polyd, l-lactide micro and nanoparticles in intestinal epithelia. *Eur. J. Pharm. Sci.* 6: 153–163

Mejias Sánchez Yoerquis, Cabrera Cruz Niviola, Toledo Fernández Ana Margarita, Duany Machado Orgel José (2009). La nanotecnología y sus posibilidades de aplicación en el campo científico-tecnológico. *Rev Cubana Salud Pública* 35(3).

Okamoto Y, Kawakami K, Miyatake K, Morimoto M, Shigemasa Y, Minami S (2002). Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydr Polym*, 49: 249–52.

Ong S-Y, Wu J, Moochhala SM, Tan M-H, Lu J (2008). Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*; 29: 4323–32.

Pangburn SH, Trescony PV, Heller J (1982). Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials*, 3: 105–8.

Panyam J. & Labhassetwar V (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 55: 329–347.

Park P-J, Je J-Y, Jung W-K, Ahn C-B, Kim S-K (2004). Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates. *Eur Food Res Technol*; 219: 529–33.

Prabaharan M. & Mano J. F. (2005). Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Delivery*, 12: 41–57.

Rao SB & Sharma CP (1997). Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res*, 34: 21–8.

Rinaudo M (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci* 31: 603–32.

Riva R, Ragelle H, des Rieux A, Duhem N, Jérôme C, Prémat V (2011). Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering. Chitosan for biomaterials II. In: Jayakumar R, Prabakaran M, Muzzarelli RAA, editors. *Advances in polymer science*. Heidelberg: Springer Berlin. pag. 19–44.

Santo V. E., Gomes Manuela E., Mano João F. and Reis Rui L. (2012). Chitosan–chondroitin sulphate nanoparticles for controlled delivery of platelet lysates in bone regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 6(3): 47–59.

Sashiwa H & Aiba S (2004). Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Prog Polym Sci*, 29: 887–908.

Shu X.Z. & Zhu K.J. (2002). The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 54: 235–243

Smith J, Wood E, Dornish M (2004). Effect of chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. *Pharm Res*; 21: 43–9.

Song C.; Labhasetwar V.; Cui X.; Underwood T.; Levy R. J (1998). Arterial uptake of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery: results with an acute dog model. *J. Controlled Release*, 54: 201–211.

Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol*, 6: 257–72.

Sugrue S. (1992). Predicting and controlling colloid suspension stability using electrophoretic mobility and particle size measurements. *Am. Lab*. 24(6):64–71.

Sui W, Huang L, Wang J, et al. (2008). Preparation and properties of chitosan–chondroitin sulfate complex microcapsules. *Colloids Surf B Biointerfaces* 65(1): 69–73.

Teng WL, Khor E, Tan TK, Lim LY, Tan SC (2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydr Res*; 332: 305–16.

Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE (2001). Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv Drug Delivery Rev*, 52: 117–26.

Trimaille T., Pichot C., Elaissari A., Fessi H., Briancon S., and Delair T. (2003). Poly(D,L-lactic acid) nanoparticle preparation and colloidal characterization. *Colloid Polym. Sci.* 281(12): 1184–1190.

Tomihata K & Ikada Y (1997). In vitro and in vivo degradation of films in chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials*, 18: 567–75.

Vaarum KM, Myhr MM, Hjerde RJN, Smidsroed O (1997). In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydr Res*, 299: 99–101.

Van Meerloo, Kaspers, Cloos (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. Ian A. Cree (ed.) *Cancer Cell Culture. Methods and Protocols*, Second Edition, *Methods in Molecular Biology*, 731: 237-245.

VandeVord PJ, Matthew HWT, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH (2002). Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res*, 59: 585–90.

Venkatesan J & Kim S-K (2010). Chitosan composites for bone tissue engineering – an overview. *Mar Drugs*, 8: 2252–66.

Wu Y.; Yang W.; Wang C.; Hu J.; Fu S (2005). Chitosan nanoparticles as a novel deliver system for ammonium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* 295:235–245.

Yang J, Tian F, Wang Z, Wang Q, Zeng Y-J, Chen S-Q (2007). Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis. *J Biomed Mater Res, Part B*, 84 B:131–7.

Yeh M.K., Cheng K.M., Hu C.S., Huang Y.C., Young J.J., (2011). Novel protein-loaded chondroitin sulfate–chitosan nanoparticles: preparation and characterization. *Acta Biomater.* 7: 3804–3812.

Yi H, Wu LQ, Bentley WE, Ghodssi R, Rubloff GW, Culver JN, Payne GF (2005). Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, 6: 2881–94.

Zhang H & Neau SH (2001). In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 22: 1653–8.