

Obtención de partículas de quitosano mediante radiación gamma y gelación ionotrópica

Kety León^{1,*}, Javier Gago¹, Alcides López¹, Julio Santiago²

¹Dirección de Investigación y Desarrollo, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

²Facultad de Química e Ingeniería Química. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela s/n

Resumen

Se prepararon partículas de quitosano de tamaño micrométrico y nanométrico por gelación ionotrópica, utilizando radiación gamma y obteniéndose partículas de forma y tamaño uniforme. Se aplicó radiación gamma a muestras de quitosano hasta 15 kGy, en 5 dosis y a las que se les añadió un polianión, fueron caracterizadas por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), observándose la presencia de micropartículas y nanopartículas a partir de la segunda hasta la cuarta dosis de irradiación, a partir de la quinta ya se observa la formación de una especie de malla. La concentración de 0,2 % de quitosano y 0,84 g/mL del polianión son importantes en la formación de las partículas así como en su distribución. Las nanopartículas obtenidas presentaron actividad antimicrobiana frente a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis*, no se observó actividad antimicrobiana para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Esta investigación es parte de un proyecto mayor que acoplará el principio activo de la planta nativa llamada *Croton lechleri* y será usado en la formulación de una pomada con características cicatrizantes para el tratamiento de heridas y quemaduras.

Palabras claves: Irradiación gamma, Gelación iónica, Quitosano, Partículas

Abstract

Preparations were made to obtain particles of micrometric and nanometric size by ionotropic gelation of chitosan, using gamma radiation to obtain particles of uniform size and shape. Samples of chitosan which were irradiated to 15 kGy, in five applied doses and which a polyanion was added to, were characterized by Atomic Force Microscopy (AFM) and Transmission Electron Microscopy (TEM), showing the presence of microparticles and nanoparticles from the second to the fourth dose of irradiation, while the net formation is observed from the fifth dose. The concentration of 0,2 % chitosan and 0,84 g/mL of the polyanion are important in the formation of the particles and their distribution. The obtained nanoparticles have antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis*, while no antimicrobial activity was observed for *Staphylococcus aureus* strain ATCC 25923. This research is part of a major project to apply the active ingredient of a native plant called *Croton lechleri* and will be used in the formulation of an ointment for the treatment of wound and burn healing.

Keywords: Gamma irradiation, Ionic gelation, Chitosan, Particles

1. Introducción

En los últimos años se ha experimentado un avance notable en las investigaciones sobre nanotecnología y nanociencia aplicadas a las ciencias médicas.

Existe mucho optimismo en que la nanotecnología aplicada a las ciencias médicas proporcionará nuevas herramientas para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

La esperanza es que las partículas, materiales y dispositivos nanométricos puedan ser diseñados para interactuar con los materiales biológicos de una manera más directa, eficiente e incluso precisa, debido a su pequeño tamaño, serán capaces de acceder a áreas del cuerpo, tales como el cerebro y células individuales, a las cuales han sido difícil acceder con las tecnologías actuales.

* Correspondencia autor: inde1@ipen.gob.pe

Una de las características importantes de los materiales a escala nanométrica, que la hacen atractiva para uso médico, es su relación superficie a masa que es mayor al de otras partículas de mayor tamaño, su propiedad cuántica, así como su capacidad de adsorber y transportar otras sustancias.

Existen polímeros naturales y sintéticos usados en la preparación de nanogeles; uno de ellos es el quitosano, un aminopolisacárido obtenido por la N-acetilación termoalcalina de la quitina aislada de los desechos de los crustáceos [1]. La quitina forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos [2].

Desde el punto de vista fisicoquímico el quitosano es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, estructuras porosas, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves. Además, el carácter policationico le confiere al quitosano alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas, por ejemplo, insulina, pADN, siARN, heparina, etc. y antigénicas, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica [1-6].

En 1989 Bodmeir *et al.* describieron la producción de perlas de quitosano por gelación ionotrópica usando TPP, probando distintas viscosidades de quitosano y TPP, donde dispersaron moléculas de sulfadiazina que luego evaluaron en un medio intestinal simulado [3].

En 1997 se describió la preparación de nanopartículas de quitosano por gelificación ionotrópica con tripolifosfato sódico (TPP), obteniendo nanopartículas biodegradables y biocompatibles preparadas por un proceso más suave, sin altas temperaturas ni solventes orgánicos. El mecanismo propuesto para la formación de nanopartículas de quitosano-TPP plantea que la gelificación ionotrópica del quitosano ocurre por interacciones electrostáticas entre productos de la disociación del TPP en solución acuosa con los grupos amino del quitosano [4].

Durante la década pasada, el quitosano ha sido usado en el desarrollo de sistemas innovadores para la liberación de fármacos,

en ingeniería de tejidos y en la manufactura de parches cicatrizantes.

Algunas de sus propiedades funcionales como su biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante, la hacen atractiva para una variedad de usos [1-8].

La ventaja de usar la radiación ionizante en un sistema acuoso es la creación de especies fuertemente oxidantes y reductoras. Se ha demostrado que esta técnica es eficiente en la preparación de nanogeles poliméricos de tamaños, formas y composición química determinados y que pueden ser usados para diferentes aplicaciones médicas.

El objetivo del trabajo fue obtener nanopartículas de quitosano usando la radiación gamma y la gelación ionotrópica para su aplicación médica.

2. Experimental

2.1 Materiales

Se utilizó quitosano de alta viscosidad (fluka) con 78 % de deacetilación, tripolifosfato de sodio TPP (Sigma Chemical Co. USA) de grado analítico, ácido acético glacial, Agar Casoy, Caldo Casoy y Agar Muller Hinton de Merck.

2.2 Preparación de las muestras

Se prepararon soluciones acéticas de quitosano (0,012 a 0,2 % wt/v) las que se colocaron en viales de vidrio e irradiaron a dosis de hasta 15 kGy en un equipo Gammacell 220, con una tasa de dosis de 5 kGy/h. Para la obtención de los coloides se preparó una solución de anión en una concentración de 0,84 mg/mL. Luego de la irradiación, cada solución fue compensada con el anión correspondiente.

2.3 Caracterización de los coloides

La caracterización de los coloides se realizó mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) usando el microscopio Nanosurf Easy Scan 2 AFM System.

La caracterización estructural y morfológica de las partículas de quitosano fueron estudiadas empleando microscopía electrónica de transmisión para lo cual se

utilizó el microscopio de transmisión Phillips EM 400 operando a 80 kV. Para la medición de la viscosidad se utilizó un reómetro marca Brookfield y la medición del pH se realizó en un pHmetro marca Cole-Parmer. Las lecturas de absorbancia de los coloides se realizó en un espectrofotómetro UV-Vis BioChrom Libra S22.

2.4 Pruebas de actividad antimicrobiana

Se realizó por el método de difusión en agar de Bauer-Kirby, siguiendo las recomendaciones del Comité Nacional de Control de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS) [12].

El inóculo (preparado a una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de Mac Farland) fue aplicado en la placa y agar Muller Hinton. Se dejó secar de 3 a 5 minutos, luego se perforaron hoyos de aproximadamente 0,8 mm de diámetro en los que se sembraron las muestras. Se incubaron a 37 °C por 18-24 horas.

3. Resultados y Discusión

Las soluciones después de la irradiación se muestran limpias a todas las dosis aplicadas. Luego de añadir el TPP se forman las partículas, lo que se evidencia en la dispersión óptica de un rayo láser. La Figura 1 muestra los resultados obtenidos por espectrofotometría, observándose baja absorbancia para longitudes de onda menores a 240 nm, para mayores longitudes, la absorbancia aumenta debido a que el incremento de TPP reacciona precipitando partículas en la solución.

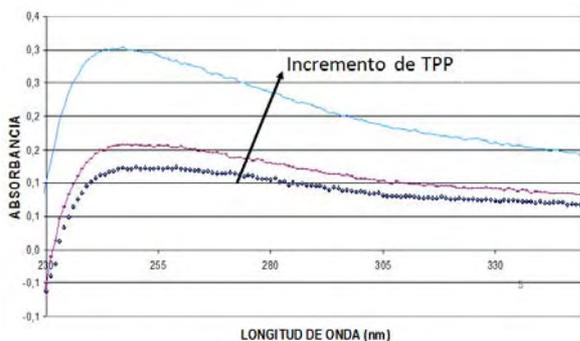


Figura 1. Variación de la absorbancia debido a la suspensión de partículas originadas por el incremento de TPP.

Los grupos amino libres del quitosano producto de la radiación gamma interactúan electrostáticamente con el TPP lo que hace que se formen las partículas que se manifiestan en la dispersión del láser.

Tabla 1. Efecto de la dosis de radiación en el pH y viscosidad del polímero.

Dosis (kGy)	pH	Viscosidad (cP)
0	3.46	38
1	3.48	1.5
3	3.49	1.15
5	3.50	1

En la Tabla 1 se observa que el pH de las soluciones se mantiene en todas las dosis aplicadas con ligera variación y que la viscosidad disminuye al incrementarse la dosis, debido al rompimiento de enlaces.

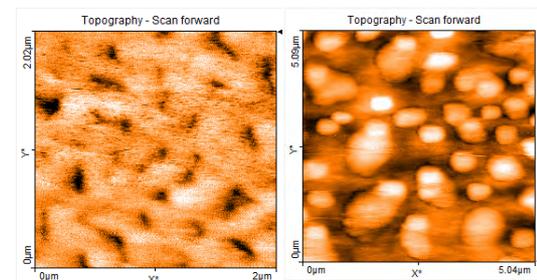


Figura 2. Quitosano no irradiado sin el anión y el anión.

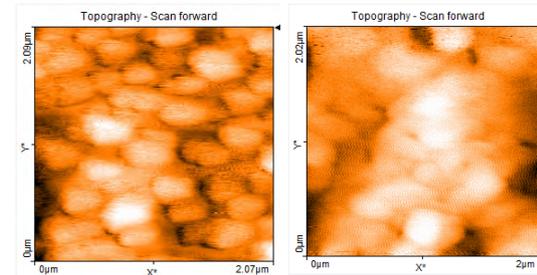


Figura 3. Quitosano irradiado a 3 y 5 kGy dosis con el anión.

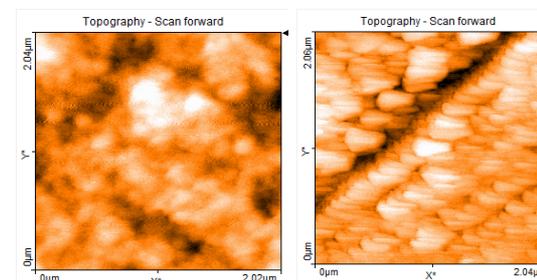


Figura 4. Quitosano irradiado a 8 y 15 kGy dosis con el anión.

En las Figuras 3 y 4 las imágenes AFM nos muestran formación de partículas semiesféricas y que a medida que aumenta la

dosis de radiación las partículas tienden a formar una especie de malla.

Se observa que las muestras no irradiadas presentan partículas de diferentes tamaños al añadir el anión y a medida que pasa el tiempo tienden a sedimentar, mientras que en el caso de las muestras irradiadas se mantiene la suspensión.

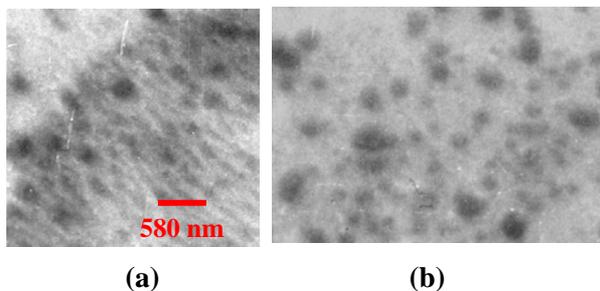


Figura 5. Microfotografías electrónicas de transmisión de geles de quitosano irradiados a dosis de: (a) 3 kGy y (b) 5 kGy.

Por microscopía electrónica de transmisión, en la figura 5 se observa la formación de nanogeles a 3 y 5 kGy de dosis de radiación analizada, con un tamaño promedio de 150 nm.

En la Figura 6 se muestra la actividad antimicrobiana de los nanogeles de quitosano frente a la cepa de *P. aeruginosa*, lo que se evidencia en la formación de los halos de inhibición de crecimiento microbiano. Estos halos se mantienen en el tiempo. También se ha observado actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, ambas cepas gram negativas. No se ha observado actividad antimicrobiana frente a la cepa de *S. aureus*, un gram positivo. Se ha observado cierta actividad antimicrobiana frente a la cepa de *B. subtilis*.

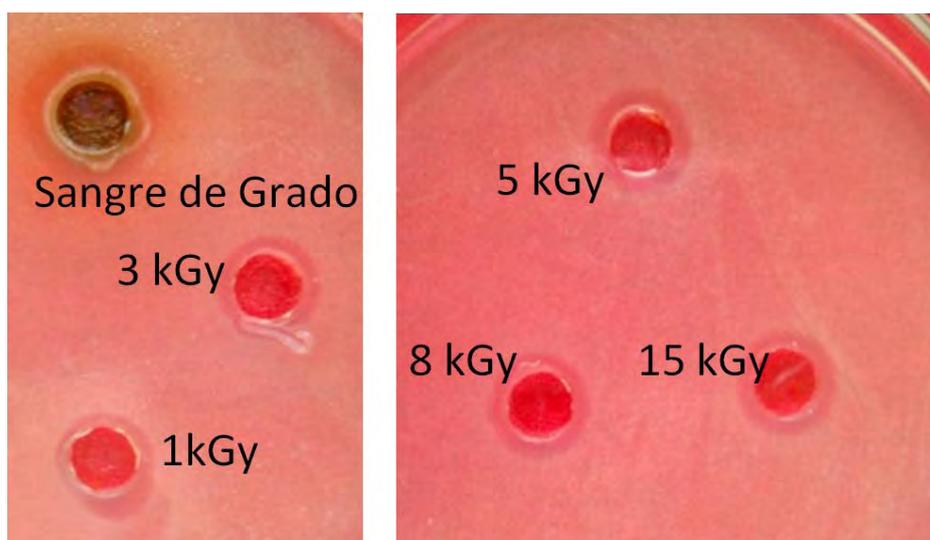


Figura 6. Actividad antimicrobiana de nanogeles de quitosano tratados con radiación gamma frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4. Conclusiones

- Se ha logrado obtener nanogeles de quitosano en un proceso combinado de radiación gamma y gelación ionotrópica.
- Dependiendo de la dosis aplicada y por efecto de la radiación gamma se pueden obtener nanogeles de diferente tamaño.
- La forma obtenida de los nanogeles a las dosis estudiadas es únicamente semiesférica.

- La concentración 0.2 % de quitosano y 0.84g/mL de TPP posibilitan la formación de nanogeles de quitosano.

5. Agradecimiento

Al Licenciado Johnny Vargas del Laboratorio de Aplicaciones-SERA por la irradiación de las muestras.

6. Bibliografía

- [1]. Goycoolea FM, Remuñan C, Alonso MJ. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. En: Vila Jato JL. editores. Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid, España; 2009. p. 103-131.
- [2]. Paños Ines, Acosta Niuris, Heras Angeles. New drug delivery systems based on chitosan. *Current Drug Discovery Technologies*. 2008; 5:333-341.
- [3]. Bodmeier R, Oh K, Pramar Y. Preparation and evaluation of drug containing chitosan beads. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1989; 15(9):1475-1494.
- [4]. Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci*. 1997; 63:125-132.
- [5]. Rodríguez N, Valderrama A, Alarcón H, López A. Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Rev. Soc. Quím Perú*. 2010; 76(4):336-354
- [6]. Expósito Ruth. Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. [Tesis Doctoral]. España, Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2009.
- [7]. Dutta PK, Tripathi Shipra, Mehrotra GK, Dutta Joydeep. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*. 2009; 114(4): 1173-1182.
- [8]. Dhawan S, Kumar A, Vivek Ranjan. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS PharmSciTech*. 2004; 5(4): 122-128.
- [9]. Dubey R, Parikh R. Two-stage optimization process for formulation of chitosan microspheres. *AAPS PharmSciTech* 2004; 5(1):20-28.
- [10]. Wim H De Jong, Paul JA Borm. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine*. 2008; 3(2): 133-149.
- [11]. Risco Esther, Iglesias José, Cañiqueral Salvador. Interés Terapéutico del látex de *Croton lechleri*. 12 Forum de Natura Rerum. París, Octubre 2001.
- [12]. Coyle Marie B, editor. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C.; 2005.