

PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO MODIFICADAS CON ALGINATO DE SODIO CON POTENCIAL PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE MEDICAMENTOS

✉ ADRIANA PATRICIA HERRERA BARROS¹
MARÍA TERESA ACEVEDO MORANTES²
MANUEL IGNACIO CASTRO HOYOS³
LEANDRO JOSÉ MARRUGO OSPINO⁴

RESUMEN

Nanopartículas de quitosano modificadas con alginato de sodio (QA) fueron sintetizadas por el método de gelación iónica usando como agente entrecruzante tripolifosfato pentasódico (TPP) con el propósito de evaluar su comportamiento como excipiente de medicamentos. Se prepararon cuatro muestras de partículas (QA₁-QA₄) con diferentes proporciones del agente modificante alginato (0,5 y 1 mg/mL) y entrecruzante TPP (1,5 y 2 mg/mL), con una concentración fija de quitosano (2,25 mg/mL). Estas nanopartículas fueron suspendidas en *buffers* biológicos para representar las condiciones de basicidad y acidez del sistema gastro-intestinal humano (pH 7,4 y 1,2 respectivamente). El tamaño hidrodinámico de las nanopartículas fue determinado a través de un análisis de dispersión de luz dinámica (DLS). A partir de estas mediciones se estimó un diámetro hidrodinámico de 152 ± 68 nm para la mejor combinación de quitosano-alginato-TPP. Se realizaron pruebas para medir la capacidad de encapsulación y liberación controlada de medicamentos de las nanopartículas sintetizadas usando rodamina-B como trazador. A partir de esta evaluación se observó una capacidad de encapsulamiento del 52 % y valores de liberación de la molécula trazadora del 36 % (pH 7,4) y 46 % (pH 1,2), sugiriendo así el potencial de estas nanopartículas para aplicaciones biomédicas.

PALABRAS CLAVE: nanopartículas, quitosano, alginato, gelación iónica, rodamina, biomedicina.

PREPARATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES MODIFIED WITH SODIUM ALGINATE WITH POTENTIAL FOR CONTROLLED DRUG RELEASE

ABSTRACT

Chitosan nanoparticles modified with sodium alginate (QA) were synthesized by ionic gelation method, using pentasodium tripolyphosphate (TPP) as crosslinking agent to evaluate their behavior as a drug carrier. Four samples were prepared (QA₁-QA₄) with different proportions of modifier agent alginate (0,5 and 1 mg / mL) and crosslinker TPP

¹ Ph.D. Ingeniera Química, Doctora en Ingeniería Química, Postdoctorado en Nanotecnología. Universidad de Cartagena

² MSc. Ingeniera Química, Magister en Ingeniería Química. Docente del programa de Ingeniería Química, Universidad de Cartagena

³ Ingeniero Químico. Universidad de Cartagena

⁴ Ingeniero Químico. Universidad de Cartagena



Autor de correspondencia: Herrera Barros, A.P. (Adriana Patricia): Universidad de Cartagena, Campus Piedra de Bolívar. Avenida el Consulado Calle 30 #48-152, Cartagena, Colombia. Tel: (57 5) 301 453 4014 / Correo electrónico: aherrerab2@unicartagena.edu.co.

Historia del artículo:

Artículo recibido: 15-XI-2015 / Aprobado: 29-III-2016

Disponible online: mayo 30 de 2016

Discusión abierta hasta mayo de 2017

(1,5 and 2 mg / mL), maintaining a fixed concentration of chitosan (2,25 mg / mL). These nanoparticles were suspended in biological buffers to emulate the basicity and acidity conditions of the human gastro-intestinal tract (pH 7,4 and 1,2 respectively). Hydrodynamic sizes of the synthesized nanoparticles were determined using a dynamic light scattering (DLS). From these measurements it was estimated a hydrodynamic diameter of 152 ± 68 nm for the best combination of chitosan-alginate-TPP. Tests were conducted to measure the encapsulation capacity and controlled drug release of the synthesized nanoparticles using rhodamine-B as a tracer. From this evaluation, it was observed an encapsulation capacity of about 52% and values of dye release of 36% (pH 7,4) and 46% (pH 1,2), suggesting in this way the potential of these nanoparticles for biomedical applications

KEYWORDS: Nanoparticles, chitosan, alginate, ionic gelation, rhodamine, biomedicine.

PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO MODIFICADAS COM ALGINATO DE SÓDIO COM POTENCIAL PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE MEDICAMENTOS

RESUMO

Nanopartículas de quitosana modificadas com alginato de sódio (QA) foram sintetizadas pelo método de gelificação iônica como agente de reticulação tripolifosfatopentassódico (TPP), com o propósito de avaliar o seu desempenho como um excipiente de medicamentos. Se prepararam quatro amostras de partículas (QA₁-QA₄) com diferentes proporções de agente modificante alginato (0,5 e 1 mg / ml) e reticulação TPP (1,5 e 2 mg / ml), mantendo a concentração fixa de quitosano (2,25 mg / mL). Estas nanopartículas foram suspensas em buffers biológicos para representar as condições de basicidade e acidez do sistema gastrointestinal humano (pH 7,4 e 1,2 respectivamente). O tamanho hidrodinâmico das nanopartículas foi determinado por uma análise de dispersão de luz dinâmica (DLS). A partir destas medições se estimou um diâmetro hidrodinâmico de 152 nm para a melhor combinação de quitosana-alginato-TPP. Se realizaram testes para medir a capacidade de encapsulamento e liberação controlada de medicamentos das nanopartículas sintetizadas usando rodamina-B como um marcador de liberação. Deste Avaliação se observou uma capacidade de encapsulação Os valores de liberação de 52% e valores de liberação da molécula do marcador de 36% (pH 7,4) e 46% (pH 1,2), sugerindo assim o potencial destas nanopartículas para aplicações biomédicas.

PALAVRAS-CHAVE: Nanopartículas, quitosano, alginato, a gelificação iônica

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos materiales que respondan a los requerimientos farmacéuticos, como el aumento de la selectividad de los excipientes para mejorar la entrega de medicamentos en zonas afectadas, para evitar los efectos secundarios causados por los principios activos de la droga, ha aumentado el uso de biopolímeros, tales como los polisacáridos, liposomas, y polianhídridos, entre otros (Yang *et al.*, 2015). Estos representan una prometedora plataforma para la liberación de medicamentos debido a sus excelentes propiedades, tales como su estabilidad, alta capacidad para asociarse y liberar macromoléculas terapéuticas y bioadhesividad, lo cual les permite atravesar barreras

epiteliales (tratamientos nasales, intestinales y oculares) (Pichyangkura y Chadchawan, 2015; y Goycoolea *et al.*, 2009). Los polisacáridos además de ser altamente seguros, biodegradables, no tóxicos y biocompatibles, son abundantes en la naturaleza y sus procesos de extracción son de bajo costo (Shukla *et al.*, 2013). Estos son carbohidratos poliméricos que presentan en su estructura unidades repetidas de monosacáridos unidas por enlaces glucosídicos y debido a que tienen un gran número de grupos reactivos en las cadenas moleculares, tales como grupos hidroxilo, carboxilo y aminos, pueden ser fácilmente modificados química y bioquímicamente, permitiendo su uso como vehículos de transporte de medicamentos (Sibaja *et al.*, 2015; y Goycoolea *et al.*, 2009).

Entre los polisacáridos más estudiados se encuentra el quitosano, el cual es obtenido de la desacetilación de la quitina que se encuentra en la cascara de los camarones, el segundo polisacárido más abundante en la tierra (Shukla *et al.*, 2013); el quitosano es un polielectrólito catiónico que, además de tener las características anteriormente mencionadas, también presenta actividad antimicrobiana y responde a estímulos externos tales como el pH, la temperatura y la fuerza iónica del medio, permitiendo mejorar la sensibilidad de los excipientes (Mohammed *et al.*, 2013). Químicamente el quitosano está compuesto de β -(1,4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosas (unidades desacetiladas) con pequeños residuos o no de N-acetil-D-glucosamina (unidades acetiladas) (Chen *et al.*, 2011); estos pequeños residuos permiten determinar la pureza del quitosano puesto que esta depende del grado de desacetilación (DD, por sus siglas en inglés) alcanzado en la quitina. Otro polisacárido de bastante interés es el alginato de sodio, el cual es un polielectrólito aniónico extraído de las algas marrones y de las bacterias pseudomonas y azotobacter, cuyas propiedades le permiten ser usado como agente gelificante (Hay *et al.*, 2013). El alginato de sodio químicamente se define como un copolímero de bloques formado por cadenas lineales de ácido D-manurónico y ácido L-gulurónico que se encuentran unidos por puentes glucósidos 1 \rightarrow 4 (Hay *et al.*, 2013).

El uso de estos dos polisacáridos para la preparación de nanopartículas garantiza que puedan ser usadas para la liberación de medicamentos en lugares que, por el tamaño y las características propias del material, solo podrían hacerlo ampliando el margen de tratamientos para combatir el cáncer (Shukla *et al.*, 2013; y Raveendran *et al.*, 2015). Para la preparación de nanopartículas existen diferentes metodologías como co-precipitación, reticulación química, termodescomposición, coacervación, emulsificación y gelación iónica, esta última de bastante interés ya que es mayormente usado para la preparación de nanopartículas de polisacáridos (Raveendran *et al.*, 2015). La gelación iónica permite el entrecruzamiento de cadenas poliméricas que se ordenan en nanoestructuras por interacciones que pueden ser intermoleculares de tipo covalente o no covalente y que pueden ser logradas a través del uso de agentes entrecruzantes que faciliten este puente (Dong *et al.*, 2013). El uso de esta metodología permite evitar el uso de procesos en los que deban inter-

venir altas temperaturas para estabilizarse y solventes orgánicos tóxicos que resultan costosos (Dong *et al.*, 2013; y Raveendran *et al.*, 2015).

Esta investigación se centró en la preparación y caracterización de nanopartículas biopoliméricas basadas en quitosano y modificadas con alginato de sodio para evaluar su capacidad de encapsulación y liberación de una molécula modelo (rodamina-B) como función del pH del medio de suspensión.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Quitosano (DD=85 %), rodamina-B (99 %) y tripolifosfato pentasódico (99 %) fueron manufacturados por la empresa Alfa Aesar. El alginato de sodio (99 %) fue adquirido en Danisco®. Los reactivos usados para la preparación de los *buffers* biológicos, ácido clorhídrico (37 %), fosfato ácido de potasio (99 %), hidróxido de sodio (99 %) y cloruro de potasio (99 %) fueron manufacturados por Panreac.

2.1. Preparación de nanopartículas de quitosano/alginato

Las nanopartículas de quitosano/alginato (QA) fueron preparadas por el método gelación iónica usando como agente reticulante el tripolifosfato pentasódico TPP (Goycoolea *et al.*, 2009; y Keawchaoon & Yoksan, 2011). La **Tabla 1** muestra las concentraciones empleadas de quitosano, alginato y TPP para la preparación de las nanopartículas. Las soluciones de TPP y alginato se hicieron en agua destilada mientras que la solución de quitosano fue preparada usando una solución acuosa de ácido acético al 1 % v/v.

Tabla 1. Concentración de las soluciones de quitosano, alginato y TPP empleadas en las síntesis de las nanopartículas biopoliméricas

SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN
Quitosano	2,25 mg/mL
TPP	2,0 mg/mL
	1,0 mg/mL
Alginato	0,5 mg/mL
	1,0 mg/mL

Usando las concentraciones mostradas en la **Tabla 1**, fueron preparadas cuatro soluciones de alginato/TPP, de las cuales se tomaron 3 mL de cada mezcla para luego ser añadidas a temperatura ambiente a cuatro muestras de 9 mL de la solución de quitosano, manteniendo una agitación constante de 700 rpm durante 10 minutos (Goycoolea *et al.*, 2009). Finalizada la etapa de síntesis, las nanopartículas fueron separadas mediante centrifugación a 5500 rpm durante 30 minutos, lavadas con agua desionizada y liofilizadas hasta obtener un producto seco. La **Tabla 2** presenta las diferentes relaciones de alginato-TPP empleadas en las síntesis de las nanopartículas biopoliméricas.

Tabla 2. Relación de alginato-TPP utilizado en la síntesis de nanopartículas basadas en quitosano (QA) empleando el método de gelación iónica

Muestra	Concentración (mg/mL)	
	Alginato	TPP
QA ₁	0,5	1,5
QA ₂	0,5	2,0
QA ₃	1	1,5
QA ₄	1	2,0

2.3. Preparación de nanopartículas de quitosano/alginato cargadas con rodamina-B

En un procedimiento típico de preparación se agregó la molécula modelo rodamina-B a las soluciones bases de TPP descritas en la **Tabla 2** hasta lograr una concentración de 0,06 mg/mL. Luego se adicionó la solución de alginato de sodio de acuerdo a las relaciones indicadas en la **Tabla 2** y se procedió a realizar la síntesis de las nanopartículas de quitosano/alginato siguiendo los pasos de síntesis descritos anteriormente. Al finalizar la etapa de síntesis, las nanopartículas de quitosano/alginato cargadas con rodamina-B fueron separadas mediante centrifugación a 5500 rpm durante 30 minutos, luego fueron lavadas tres veces con agua desionizada para eliminar la rodamina-B libre y nuevamente fueron centrifugadas, obteniéndose un gel viscoso.

2.4. Determinación de tamaño hidrodinámico y evaluación de capacidad de encapsulación/liberación de las nanopartículas biopoliméricas

Se hicieron mediciones de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés) usando un equipo Horiba LB-550 a temperatura ambiente para determinar el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas de quitosano modificado con alginato de sodio (QA). Por tal motivo, se suspendieron 3 mL de las muestras de las nanopartículas en 2 mL de cada *buffer* biológicos preparados a pH 1,2 y 7,4. Estos valores de pH fueron seleccionados con el propósito de simular las condiciones de acidez y basicidad que podrían experimentar las partículas en el sistema gastrointestinal. Para esto, el *buffer* básico (pH 7,4) fue preparado mezclando 100 mL de una solución de fosfato ácido de potasio [0,1 M] y 78,2 mL de una solución de hidróxido de sodio [0,1 M]. En el caso del *buffer* ácido (pH 1,2) se obtuvo al mezclar 50 mL de una solución de cloruro de potasio [0,2 M] y 85 mL de una solución de ácido clorhídrico [0,2 M] (Keawchaon & Yoksan, 2011).

Para la determinación de la capacidad de encapsulamiento de las nanopartículas biopoliméricas se realizaron dos curvas de calibración de concentración de rodamina-B versus absorbancia como función del pH del medio de suspensión. Estas mediciones se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Spectro UV-2650 a una longitud de onda de 554 nm, la cual se ha reportado en la literatura para la determinación de rodamina tipo-B en solución acuosa (Ma *et al.*, 2015). Para realizar dichas curvas se prepararon dos soluciones madre de rodamina-B en los *buffer* biológicos a una concentración de 0,03 mg/mL. Culminadas las curvas de calibración, se seleccionaron las partículas de quitosano-alginato que exhibieron menor tamaño hidrodinámico, procediendo a cargarlas con rodamina-B, tal como se describió en la sección anterior. Seguidamente, se tomó el sobrenadante que resulta del aislamiento por centrifugación de las nanopartículas cargadas y se realizó una lectura en el espectrofotómetro UV-Vis, determinándose la concentración de rodamina no encapsulada. A partir de este valor, y conociendo la cantidad inicial de rodamina-B adicionada al sistema, se calculó

el porcentaje de encapsulamiento de las nanopartículas usando la **Ecuación (1)** (Keawchaoon & Yoksan, 2011):

$$\text{Encapsulación(\%)} = \frac{\text{Masa de rodamina - B encapsulada}}{\text{Masa de rodamina - B inicial}} * 100 \quad (1)$$

Para determinar la capacidad de liberación de rodamina-B, se tomaron 3 mL de las nanopartículas cargadas con la molécula trazadora para ser suspendidas en 50 mL de cada los *buffers* biológicos y colocadas en una incubadora a 37 °C con una agitación constante a 150 rpm durante un período de 48 h. Durante este proceso se fueron tomando a diferentes intervalos de tiempo alícuotas de 5 mL de la solución, los cuales fueron reemplazados inmediatamente con igual cantidad de solución tampón fresco (Goycoolea *et al.*, 2009). Cada alícuota tomada fue centrifugada a 5500 rpm durante 10 minutos, luego el sobrenadante fue analizado en el UV-vis para determinar su absorbancia, lo cual indicó si la molécula modelo se liberó o no, de las nanopartículas como efecto del pH del medio de suspensión (Makhlof *et al.*, 2011). El porcentaje de rodamina-B liberado fue calculado mediante la siguiente ecuación (Keawchaoon & Yoksan, 2011):

$$\text{Rodamina - B Liberada (\%)} = \frac{m_{\text{rodamina}}(t=0) - m_{\text{rodamina}}(t=n)}{m_{\text{rodamina}}(t=0)} \quad (2)$$

Donde:

$m_{\text{rodamina}}(t=0)$: Masa de rodamina-B contenida en la nanopartícula en el tiempo 0.

$m_{\text{rodamina}}(t=n)$: Masa de rodamina-B contenida en la nanopartícula en el tiempo n.

3. RESULTADOS

3.1. Tamaño hidrodinámico

La **Figura 1** muestra los histogramas de frecuencia obtenidos para las mediciones de tamaño hidrodinámico de las partículas de quitosano-alginato (QA) suspendidas en un *buffer* biológico a pH 7,4. A partir de estas mediciones pudo observarse que las partículas con menores tamaños hidrodinámicos fueron obtenidas usando el nivel más bajo de concentración de alginato (0,5 mg/mL) y de agente entrecruzante TPP (1,5 mg/mL), destacándose a pH 7,4 un tamaño hidrodinámico promedio de 152 ± 68 nm para la muestra QA₁. En el caso de las muestras QA₂, QA₃, y QA₄, estas presentaron tamaños hidrodinámicos promedios de 396, 725, y 670

nm, respectivamente, con desviaciones estándares mayores a 300 nm, lo que muestra la gran polidispersidad de tamaños presentes en estas muestras, como se observa en la **Figura 1**.

Para determinar el efecto del cambio de tamaño hidrodinámico de las partículas sintetizadas de quitosano-alginato como función del pH del medio de suspensión, se procedió a suspender muestras de estas partículas en el *buffer* preparado a pH 1,2. La **Figura 2** presenta los resultados obtenidos en los histogramas de frecuencia del tamaño hidrodinámico exhibido por las partículas en el medio ácido. A partir de este análisis se pudo observar un aumento significativo en el tamaño hidrodinámico de todas las muestras, estimándose tamaños promedios de 585 nm para la muestra QA₁, 527 nm para la muestra QA₂, 1046 nm para la muestra QA₃, y 926 nm para la muestra QA₄. En la **Figura 2** se evidencia la gran polidispersidad de tamaños en cada una de las muestras, ocasionando que las desviaciones estándares sean superiores a los 300 nm. Esto puede atribuirse al hinchamiento de las partículas en presencia del medio ácido y al posible colapso en su estructura debido a la protonación de los grupos amino presentes en el biomaterial y a la disociación de los enlaces formados por los puentes de hidrógeno (Cerchiara *et al.*, 2015).

3.2. Capacidad de encapsulamiento

Debido a que la relación de concentraciones de alginato y TPP empleadas para la preparación de la muestra QA₁ fue la que presentó el menor tamaño hidrodinámico a pH 7,4, se usaron iguales proporciones para preparar las nanopartículas cargadas con la molécula trazadora rodamina-B. Para determinar el porcentaje de rodamina-B encapsulada en las nanopartículas biopoliméricas, se determinó en el UV-Vis la absorbancia de una muestra de sobrenadante procedente de la centrifugación de las nanopartículas cargadas con la rodamina-B a una longitud de onda de 554 nm. Usando la curva de calibración realizada para la absorbancia de la rodamina y la **Ecuación (1)** se estimó por triplicado el porcentaje de encapsulamiento de la molécula trazadora. La **Tabla 3** presenta un resumen de estos resultados, a partir de lo cual se calculó un valor promedio del $51,8 \pm 0,27$ % de encapsulamiento de la rodamina-B en las nanopartículas de quitosano-alginato.

Figura 1. Histogramas de frecuencia a pH 7,4 para lecturas de tamaño hidrodinámico de las partículas basadas en quitosano y modificadas con alginato de sodio. a) QA₁; b) QA₂; c) QA₃; y d) QA₄.

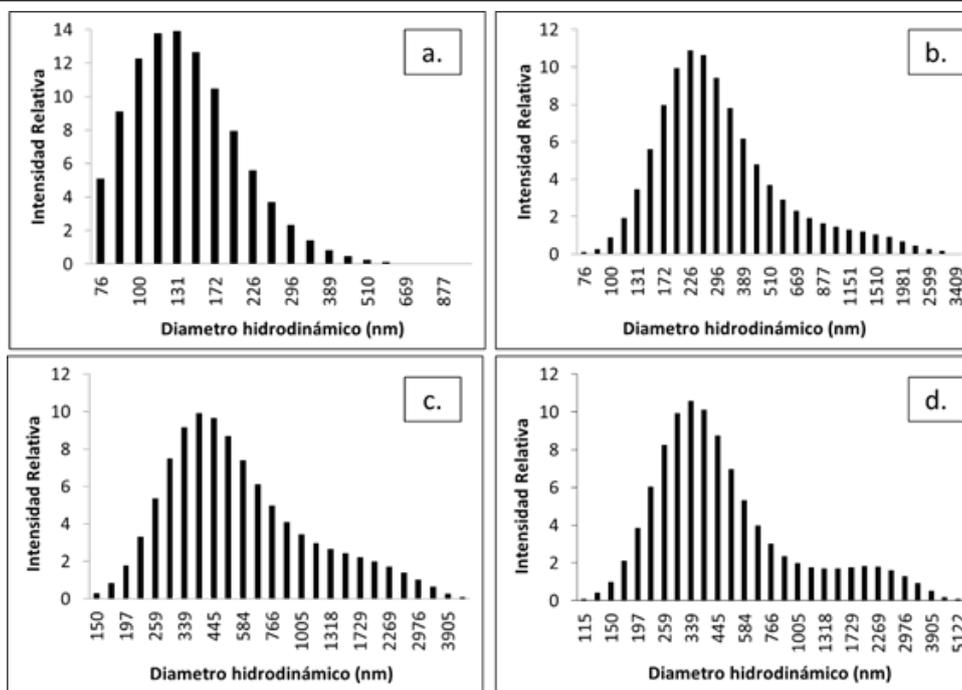


Figura 2. Histogramas de frecuencia a pH 1,2 para lecturas de tamaño hidrodinámico de las partículas de quitosano-alginato. a) QA₁; b) QA₂; c) QA₃; y d) QA₄.

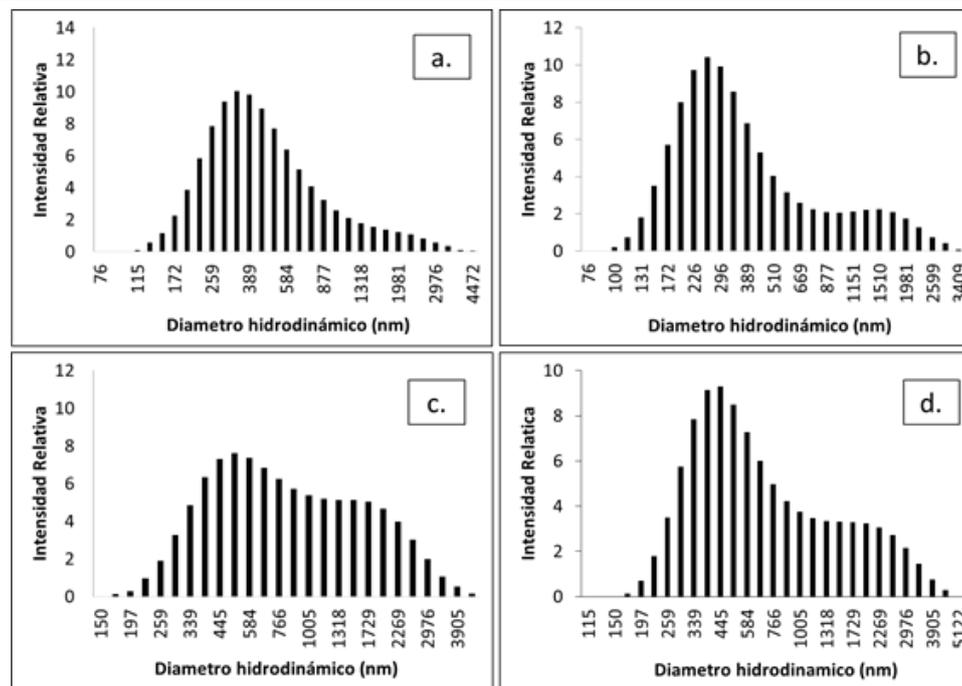


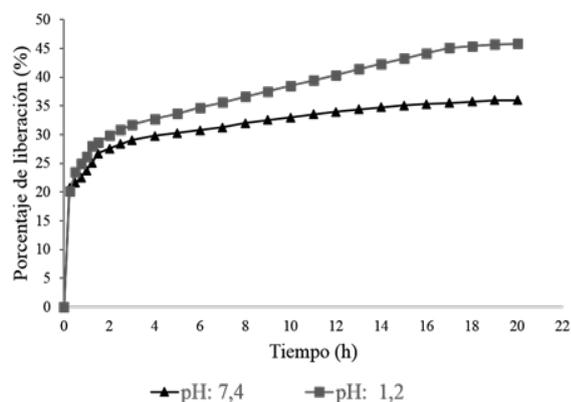
Tabla 3. Porcentaje de encapsulamiento

Absorbancia del sobrenadante	Concentración del sobrenadante (mg/mL)	% de encapsulamiento
2,790	0,028796	52,01
2,793	0,028880	51,86
2,800	0,029079	51,53

3.3. Capacidad de liberación

Las nanopartículas cargadas con rodamina-B se prepararon para estudiar la liberación controlada de la molécula modelo, por lo que luego de sintetizadas se lavaron con 150 mL de agua destilada, posteriormente centrifugadas a 5500 rpm y por último se leyó la absorbancia del sobrenadante; este proceso se repitió hasta lograr que la absorbancia leída fuese aproximadamente cero, garantizando la ausencia de rodamina-B que quedó adherida en la superficie de la nanopartícula. Las nanopartículas fueron suspendidas en las soluciones tampón a pH 7,4 y 1,2 procediendo con los pasos citados en la sección 2.3. Los datos obtenidos fueron tabulados e interpretados en la gráfica de dispersión de la **Figura 3**.

Figura 3. Cinética de liberación de rodamina-B encapsulada en las nanopartículas de quitosano-alginato (QA₁) como función del tiempo de dispersión en los buffers biológicos preparados a pH 7,4 y 1,2.



4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El método de gelación iónica da lugar a la formación de las partículas de quitosano debido a las interacciones electrostáticas producto de la disociación de los reactivos en las soluciones acuosas, presentándose en el medio grupos $-NH_3^+$ pertenecientes a la estructura del quitosano, grupos $P_3O_{10}^{5-}$ y $HP_3O_{10}^{4-}$ pertenecientes a la estructura del TPP y los grupos $-COO^-$ pertenecientes al alginato (Goycoolea *et al.*, 2009). El éxito de este entrecruzamiento depende de la carga negativa de los grupos funcionales del TPP y de la carga positiva de los grupos aminos presentes en el quitosano. Los resultados entregados por el análisis de DLS evidencian para cada suspensión valores elevados del tamaño hidrodinámico, causadas por la alta disponibilidad de grupos entrecruzables presentes en la suspensión, permitiendo notar que la cantidad agregada de los reactivos participantes del proceso tiene efecto en el tamaño hidrodinámico de las muestras. Al comparar los resultados obtenidos para el tamaño hidrodinámico de las partículas se observó el siguiente comportamiento a pH 7,4 (**Figura 1**): $QA_3 > QA_4 > QA_2 > QA_1$. Estos resultados evidencian la tendencia a la disminución del tamaño hidrodinámico de las partículas de quitosano al disminuir la concentración del agente entrecruzante y modificante.

En este estudio, la preparación QA₁ presentó los valores más bajos de concentración de alginato y TPP para la formación de nanopartículas, los cuales se notaron con los resultados obtenidos de la lectura de DLS con un tamaño hidrodinámico promedio de 152 ± 68 nm (**Figura 1**), perfilando esta muestra como la más adecuada para ser aplicada en tratamientos biomédicos de diversas enfermedades que requieran la fácil distribución de las nanopartículas por el cuerpo para la liberación selectiva y controlada de medicamentos. En adición, al estar formado estas nanopartículas por polímeros de origen natural, presentan otras ventajas como su buena compatibilidad, bioadsorción y bajos efectos secundarios (Masalova, *et al.*, 2013). Es importante resaltar que el tamaño hidrodinámico obtenido con la preparación QA₁ compara muy bien con los reportados en la literatura, donde se ha registrado tamaños inferiores a 250 nm para la síntesis de nanopartículas de quitosano usando el método de gelación iónica con el entrecruzante TPP (Goycoolea *et al.*, 2009; Keawchaon & Yoksan, 2011; y Cerchiara *et al.*, 2015).

El quitosano es un polisacárido policatiónico sensible a sufrir cambios conformacionales como efecto del pH del medio de suspensión (Harris *et al.*, 2008).

Esto se debe a que en su estructura química posee grupos aminos e hidroxilos, los cuales pueden formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua que los rodean en una suspensión acuosa. Cuando las partículas de quitosano se dispersan en un medio ácido, los enlaces de hidrógeno pueden disociarse como efecto de la protonación de los grupos amino, obteniéndose un hinchamiento de la partícula y por consiguiente un aumento de su tamaño hidrodinámico (Cerchiara *et al.*, 2015). Este efecto pudo observarse al suspender las partículas en un medio ácido empleando el *buffer* preparado a pH 1,2 a partir de lo cual se pudo observar un aumento significativo en el tamaño hidrodinámico de todas las muestras, con lo que se obtuvieron valores superiores a los 500 nm (Figura 2). Lo anterior sugiere la capacidad de las partículas basadas en quitosano para liberar una droga farmacéutica que haya sido previamente encapsulada en su estructura.

La rodamina-B es un compuesto empleado como trazador que tiene en su estructura grupos carboxílicos fácilmente protonizables y que muestran una forma predominante en condiciones ácidas que mantienen el anillo abierto y permiten que haya repulsiones con los grupos aminos protonizables presentes en la estructura del quitosano, debido a que el medio de preparación de las nanopartículas es ácido, por la cantidad de ácido acético usada para solubilizar el quitosano. Estas repulsiones son causantes de la baja efectividad de encapsulamiento, sin embargo, los valores reportados en esta investigación del 51,8 % \pm 0,27 para el encapsulamiento de rodamina-B en las nanopartículas de quitosano-alginato (Tabla 3) concuerdan con los reportados por otros investigadores. Goycoolea y colaboradores reportaron en 2009 porcentajes de encapsulamiento de entre 47 % y 52 % de insulina para nanopartículas de quitosano y alginato preparadas por el mismo método. (Goycoolea *et al.*, 2009) mientras que para Mukhopadhyay y colaboradores se obtuvo un 85 % de encapsulación de insulina (Mukhopadhyay *et al.* 2015).

Las nanopartículas de quitosano modificadas con alginato (QA_i) presentaron sensibilidad al pH del medio en el que se encuentran suspendidas, puesto que se logró la liberación controlada de la molécula modelo rodamina-B para alcanzar, en el medio de suspensión cuyo pH es 7,4 un porcentaje de liberación del 36 % de la cantidad inicial de rodamina encapsulada y de un 46 % en el medio de suspensión cuyo pH es 1,2 luego de

trascorridas 20 horas de análisis (Figura 3). Durante las primeras 5 horas se evidenció que la velocidad de liberación en ambos medios fue alta, siendo a pH 1,2 donde se liberó más rodamina-B en ese intervalo de tiempo. Estos datos evidencian que el flujo de rodamina-B que sale de la nanopartícula es favorecido por la diferencia de pH presentada por el medio de suspensión, por esta razón la velocidad de liberación fue más alta al inicio del análisis y mientras más tiempo se dejaron suspendidas las nanopartículas en el mismo medio empieza a disminuir su velocidad de liberación. Es probable que la liberación sea mucho mayor a pH ácido por la protonación presentada en este medio de los grupos carboxílicos de la rodamina y los grupos aminos del quitosano, ocasionando repulsiones que favorecieron la liberación de la molécula modelo.

La respuesta de liberación de rodamina-B encapsulada en las nanopartículas de quitosano modificado con alginato difiere de los resultados obtenidos por otros investigadores que estudiaron la liberación de insulina como función del pH del medio de suspensión. Mukhopadhyay y colaboradores estudiaron la respuesta de liberación de insulina usando nanopartículas de quitosano-alginato a pH 1,2, 6,8 y 7,4 que reportan una liberación de la droga farmacéutica del 80 % a pH 7,4 y del 84 % de liberación de insulina simulando un sistema continuo gastrointestinal, donde se hacían pasar primero las nanopartículas por un medio ácido (pH 1,2) y luego por uno básico (pH 7,4) (Mukhopadhyay *et al.*, 2013; Mukhopadhyay *et al.*, 2015). Esta diferencia entre los resultados obtenidos en el presente estudio y los reportados en la literatura pueden deberse a las distintas estructuras químicas de la rodamina-B y la insulina las cuales, como se mencionó anteriormente, pueden ocasionar repulsiones electrostáticas con el quitosano en ambientes ácidos.

En conclusión, en el presente estudio se obtuvieron nanopartículas de quitosano-alginato con tamaños hidrodinámicos inferiores a 250 nm y con sensibilidad de hinchamiento como función del pH del medio de suspensión, las cuales permitieron el encapsulamiento del 52 % de la rodamina inicial, que indica la susceptibilidad de estos biomateriales como medio de encapsulamiento de medicamentos para su transporte y liberación en el cuerpo humano. En adición, el comportamiento de la curva de liberación de rodamina-B observado para estas nanopartículas permitió comprobar que son sensibles al pH del medio de suspensión y que pueden ser usadas en tratamientos médicos para liberación controlada de

drogas farmacéuticas en condiciones de acidez similares a las exhibidas por el sistema gástrico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad de Cartagena por el financiamiento del proyecto de investigación (Proyecto No. 052-2013).

REFERENCIAS

- Cerchiara T., Abruzzo A., Di Cagno M., Bigucci F., Bauer-Brandl A., Parolin C., Vitali B., Gallucci M. y Luppi B. (2015) Chitosan based micro and nanoparticles for colon targeted delivery of vancomycin prepared by alternative processing methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 92, mayo, pp. 112-119.
- Chen M., Liu Y., Yang W., Li X., Liu L., Zhou Z., Wang Y., Li R. y Zhang Q. (2011), Preparation and characterization of self-assembled nanoparticles of 6-O-cholesterol-modified chitosan for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 84, abril, pp. 1244-1251.
- Dong Y., Kiong Ng W., Shen S., Kim S. y Tan R. (2013), Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), mayo, pp. 940-945.
- Goycoolea F., Lollo G., Rumañan-López C., Quaglia F. y Alonso M. (2009). Chitosan-Alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules. *Biomacromolecules*, 10(7), mayo, pp. 1736-1743.
- Harris R., Paños I., Acosta N. y Heras A. (2008). Preparation and characterization of chitosan microspheres for controlled release of tramadol. *Journal of Controlled Release*, 132 (3), diciembre, pp.76-77.
- Hay I., Wang Y., Rehman Z., Rehm B. y Moradali M. (2013). Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial biotechnology*, 6(6), agosto, pp. 637-650.
- Keawchaon L. y Yoksan R. (2011). Preparation, characterization and *in vitro* release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), mayo, pp. 163-171.
- Ma P., Liang F., Wang D., Yang Q., Yang Z.; Gao D., Yu Y., Song D. y Wang X. (2015), A novel fluorescence and Surface-enhanced Raman scattering dual-signal probe for pH sensing based on Rhodamine derivate. *Dyes and Pigments*, 122, noviembre, pp. 224-230.
- Makhlof A., Tozuka Y. y Takeuchi H. (2011). Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(5), abril, pp. 445-451.
- Masalova O., Kulikouskaya V., Shutava T. y Agabekov V. (2013). Alginate and chitosan gel nanoparticles for efficient protein entrapment. *Physics Procedia*, 40, marzo, pp. 69-75
- Mohammed M., Williams P. y Tverezovskaya O. (2013). Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids*, 31(2), junio, pp. 166-171.
- Mukhopadhyay P., Sarkar K., Chakraborty M., Bhattacharya S., Mishra R. y Kundu P.P. (2013), Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: *In vitro* and *in vivo* studies in diabetic animal model. *Materials Science and Engineering: C*, 33, enero, pp. 376-382.
- Mukhopadhyay P., Chakraborty S., Bhattacharya S., Mishra R. y Kundu P. (2015), pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, enero, pp. 640-648.
- Pichyangkura R. y Chadchawan S. (2015) Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, noviembre, pp. 49-65.
- Raveendran S., Palaninathan V., Nagaoka Y., Fukuda T., Iwai S., Higashi T., Mizuki T., Sakamoto Y., Mohanan P.V., Maekawa T. y Kumar S. (2015), Extremophilic polysaccharide nanoparticles for cancer nanotherapy and evaluation of antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, mayo, pp. 310-319.
- Sibaja B., Culbertson E., Marshall P., Boy R., Broughton R., Aguilar A., Esquivel M., Parker J., De la Fuente L. y Auad M. (2015), Preparation of alginate-chitosan fibers with potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 134, diciembre, pp. 598-608.
- Shukla S., Mishra A., Arotiba O. y Mamba B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, agosto, pp. 46-58.
- Yang J., Han H., Zheng H., Dong H. y Liu J. (2015), Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 123, junio, pp. 53-66.

**PARA CITAR ESTE ARTÍCULO /
TO REFERENCE THIS ARTICLE /
PARA CITAR ESTE ARTIGO /**

Herrera Barros, A.P.; Acevedo Morantes, M.T.; Castro Hoyos, M.I.; Marrugo Ospino, L.J. (2016). Preparación de nanopartículas de quitosano modificadas con alginato de sodio con potencial para la liberación controlada de medicamentos. *Revista EIA*, 12(E3), mayo, pp. 75-83. [Online]. Available on: <http://dx.doi.org/10.14508/reia.2016.12.e3.75-83>