

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE QUITOSANO ENCAPSULANTE PARA LA LIBERACIÓN DE INSULINA

PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ENCAPSULATING CHITOSAN FOR INSULIN'S DELIVERY

Cecilia Prudkin¹, Oscar É. Pérez¹

(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN (UBA-CONICET), Intendente Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria, 4576-3300 Buenos Aires – Argentina
(e-mail: ceciliaps@qb.fcen.uba.ar)

Recibido: 31/12/2015 - Evaluado: 10/03/2016 - Aceptado: 09/05/2016

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue lograr la caracterización fisicoquímica de las especies químicas, quitosano e insulina, con miras a desarrollar matrices nanoparticuladas biopoliméricas, constituyendo nanovehículos para esta proteína. Se caracterizó al quitosano en cuanto a su distribución de tamaño de partícula y de carga superficial, obteniéndose poblaciones con baja polidispersidad relativa. Para la insulina se corroboró una distribución de tamaños monomodal. Los potenciales ζ para ambas especies fueron de $38,4 \pm 1,2$ y $37,5 \pm 0,4$ mV, para insulina y CH respectivamente, a pH 3. Las soluciones diluidas mostraron un comportamiento newtoniano para el polisacárido. Estos resultados guardan implicancias prácticas ya que se debe contar con estos datos a los fines de determinar y cuantificar la interacción entre estos dos polielectrolitos.

ABSTRACT

The aim of this work was to achieve the physicochemical characterization of chemical, chitosan and insulin species in order to develop nanoparticulate biopolymer matrices, constituting nanocarriers for this protein. Chitosan in their particle size distribution and surface charge was characterized, obtaining low polydispersity relative populations. For insulin a monomodal size distribution was corroborated. ζ potential result equal to $38,4 \pm 1,2$ and $37,5 \pm 0,4$ mV, for insulin and CH, respectively, at pH 3. Dilute solutions showed a Newtonian behavior for the polysaccharide. These results have practical implications since these data must be counted for the purpose of determining and quantifying the interaction between these two polyelectrolytes.

Palabras clave: nanovehículos, autoensamblado, quitosano, insulina

Keywords: nanocarriers, self-assembling, chitosan, insulin

INTRODUCCIÓN

En términos generales, es sabido que las interacciones entre biopolímeros cargados y ligandos dependen fuertemente del tipo de biopolímero y ligando, así como también de las condiciones del medio y sus propiedades fisicoquímicas (pH, fuerza iónica, temperatura, etc.) (Bugnicourt *et al.*, 2014). Ante este hecho se hace necesaria la caracterización molecular y fisicoquímica de cada especie interactuante, en vistas de formar nanovehículos para insulina con dimensiones de partícula definidas y reproducibles (Yang *et al.*, 2015).

Los nanovehículos o nanopartículas encapsulantes poseen una alta relación superficie/masa y pueden adsorber y transportar diferentes compuestos. Además, es posible seleccionar su tamaño, su hidrofobicidad y la carga superficial de manera tal de entrapar y liberar de manera controlada las sustancias que contienen.

Si bien existen múltiples opciones para la generación de nanovehículos, el autoensamblado se presenta como un método suave y limpio, en el cual la formación de polielectrolitos se ven favorecidas por las interacciones electrostáticas de las especies involucradas. En la Figura 1 se muestra un esquema que ejemplifica la interacción entre un polication (quitosano, azul) y una especie cargada negativamente (insulina, rojo) para formar una nanopartícula del tipo *core-shell*.

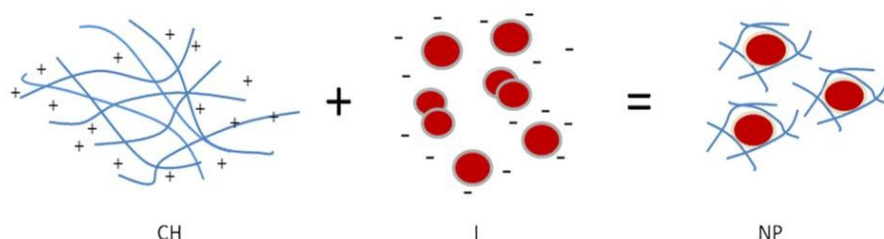


Fig. 1: Principio de autoensamblaje molecular, interacción electrostática entre dos especies de cargas opuestas.

El quitosano (CH) es un polímero biodegradable, biocompatible y no tóxico que se obtiene de la quitina. Es conocido que la quitina es un subproducto que se convierte en contaminante ambiental derivado de las actividades en las piscifactorías. Luego de una modificación química, no sólo el subproducto es aprovechado sino que se obtiene un nuevo producto con valor agregado y nuevas propiedades. La presencia de grupos $-NH_2$ y $-OH$ le otorga al CH interesantes propiedades químico-biológicas (Shukla *et al.*, 2013).

En la literatura se citan usos y propiedades para este polisacárido tan variados como inmovilización enzimática, agente antimicrobiano, en la preservación de alimentos, promotor de crecimiento vegetal y absorción de metales y tintes, por nombrar algunos (Kaur & Dhillon, 2014).

La insulina por su parte, es uno de los péptidos más empleados a nivel mundial en el tratamiento de pacientes insulino-dependientes. La administración oral de esta hormona presenta una baja biodisponibilidad debido principalmente al pH gástrico y a las barreras enzimática del tracto intestinal y física del epitelio intestinal (Fonte *et al.*, 2015).

La encapsulación de insulina en nanovehículos puede constituir un medio alternativo en el desarrollo de una nueva generación de fármacos, que protejan por un lado el ligando de interés de las condiciones hostiles del entorno de administración y por el otro que aumenten su absorción. A su vez, tales sistemas de liberación controlada poseen la ventaja de acrecentar el intervalo temporal de biodisponibilidad de la insulina (Pan *et al.*, 2002).

El objetivo planteado para esta contribución fue obtener parámetros fisicoquímicos que permitan la caracterización de la insulina y el quitosano que se emplearán para la construcción de los nanovehículos.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

La Insulina -recombinante humana- fue gentilmente donada por Laboratorios Denver Farma– Centro Industrial Garín, Ruta Panam. s/n Km 37.5 Buenos Aires (Argentina), mientras que el quitosano fue amablemente donado por el Laboratorio de Microbiología de INTI, Mar del Plata (Argentina).

Como primer paso se purificó el quitosano por reprecipitación. Se lo disolvió en medio ácido bajo agitación magnética suave y se lo precipitó con NaOH 4N. El precipitado se lavó con agua destilada hasta que se llegó a pH neutro y se lo enjuagó con etanol. El CH así purificado se secó en estufa a 40°C durante 5 h. (Mukhopadhyay *et al.*, 2012). Para las diferentes caracterizaciones se prepararon soluciones de distintas concentraciones, en medio ácido. El pH se ajustó adicionando cantidades adecuadas de NaOH 4N.

Metodología

A fin de obtener la distribución de tamaños de partícula se empleó dispersión dinámica de luz láser (DLS) (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). El análisis de CUMULANTES permitió obtener el diámetro promedio o *Z-average* y una estimación del ancho de la distribución o índice de polidispersidad, que es considerada como un indicador del grado de agregación (Sharma *et al.*, 1996).

El análisis de CONTIN permitió obtener los percentiles de distribución de los tamaños para las diferentes soluciones (Pérez *et al.*, 2014). Si bien la distribución de tamaño original generada por el equipo de DLS es la distribución de tamaños por intensidad, mediante la teoría de Mie (1908), ésta puede convertirse a distribución de tamaños por volumen con el objetivo de analizar la importancia relativa de los diferentes picos en relación a la cantidad de partículas presentes en la muestra. Ya que el equipo registra el movimiento Browniano de las partículas, es posible calcular su radio hidrodinámico empleando la ecuación de Stokes-Einstein. En este trabajo, se presenta por consiguiente la distribución de tamaños expresado en volumen, en función del radio hidrodinámico.

Para evaluar el potencial ζ se usó el mismo equipo DLS que con las celdas adecuadas (DTS1060, Malvern Instruments, Worcestershire, UK), permite determinar la carga superficial de las partículas aplicando el principio de movilidad electroforética. A tal fin se consideraron concentraciones del polímero de 10^{-4} y 10^{-3} % p/p.

El comportamiento al flujo de las dispersiones de quitosano para diversas concentraciones se registró a través de un reómetro de esfuerzo de corte controlado Paar Physica (MCR 301) (Graz, Austria) con sistema de cono y plato (CP 50) a un gap de 0,099 mm. Se vertieron 570 μ l de cada dispersión a pH 3 en el plato del reómetro. La temperatura fue controlada a 25 °C por un sistema Peltier (Viscotherm VT2, Paar Physica). Se registró la evolución del esfuerzo de corte en función de la velocidad de cizalla creciente linealmente desde 0 a 300 s^{-1} . Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

Se obtuvieron los valores de esfuerzo de corte frente a las velocidades de deformación y a continuación los datos se ajustaron utilizando la ecuación de la ley de potencia (Ecuación 1).

$$\tau = k \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

Donde: τ es el esfuerzo de corte, $\dot{\gamma}$ la velocidad de deformación, K el índice de consistencia y n el índice de flujo.

Para los análisis por espectroscopía infrarroja se utilizó un espectrofotómetro con transformada de *Fourier* (FTIR) marca Perkin Elmer FT-IR/FT-NIR, aplicando la técnica de Reflectancia Total Atenuada (ATR). De manera sucinta, el haz infrarrojo es dirigido hacia un cristal denso y con alto índice de refracción. La reflexión interna genera una onda evanescente que se extiende más allá del cristal y alcanza al analito en contacto con dicho cristal. La energía así atenuada regresa al haz infrarrojo, el cual atraviesa el cristal hacia el detector.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que los nanovehículos serán construidos por inducción de la agregación de las moléculas de polímero en solución luego de la adición de la insulina, se requiere conocer las distribuciones de tamaño y carga de las especies individuales a la concentración y pH correspondientes a la mezcla con antelación a dicha construcción.

Caracterización del quitosano

Se confirmó que las moléculas de las muestras analizadas presentan un radio hidrodinámico que varía entre 150 y 700 nm. La distribución de tamaños obtenida coincide con lo reportado previamente en la literatura (Pedroni *et al.*, 2003), donde además se informa que este polisacárido puede formar agregados dependiendo del pH y de su concentración. Este análisis resulta de suma importancia ya que es sabido que las moléculas proteicas podrían presentar distintos grados de agregación o asociación molecular de acuerdo a las condiciones intrínsecas de las moléculas o extrínsecas (de la solución) (Myrick *et al.*, 2014). En la Figura 2 se muestra dicha distribución, expresada en volumen.

El quitosano manifestó además un valor de potencial ζ de $37,5 \pm 0,4$ mV al pH de disolución, pH 3,0, ya que este biopolímero requiere un medio ácido para su disolución y al momento de mezclar esta solución con la solución de insulina, las interacciones electrostáticas del CH estarían disminuidas.

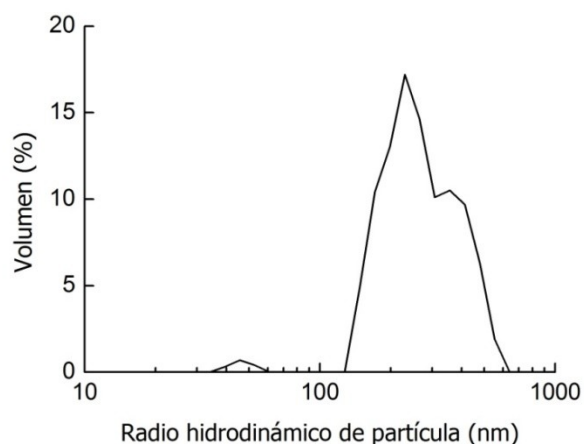


Fig. 2: Distribución de tamaño de partículas correspondiente a una solución de quitosano, expresada en volumen, 10^{-7} % p/p, pH 3, 25°C.

La viscosidad aparente (μ_{ap}) del quitosano corresponde a la pendiente de la curva que relaciona el torque con la velocidad de deformación. En la Figura 3a puede apreciarse que la relación entre estos dos parámetros es lineal, lo que indica que la solución de CH se comporta como un fluido newtoniano en las condiciones de concentración (10^{-2} % p/p) y temperatura empleadas (25°C). A partir del ajuste lineal de los puntos experimentales, dicha viscosidad resultó 0.03671 ± 2.10^{-4} s⁻¹. En la Figura 3b se aprecia cómo la viscosidad puede considerarse

constante para un amplio rango de velocidades de deformación, lo que demuestra el carácter newtoniano del CH en solución.

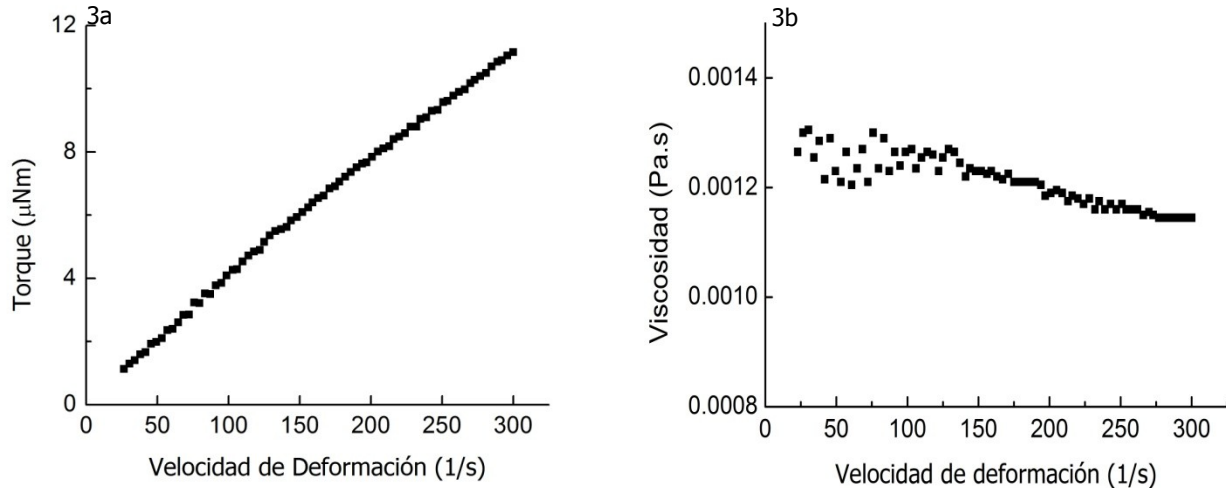


Fig. 3: Curva de flujo (a) y evolución de la viscosidad en función de la velocidad de deformación (b) para una solución de quitosano, 10^{-2} % p/p, pH 3, 25°C.

De acuerdo a la ec. 1, k es la viscosidad aparente o índice de consistencia y depende del valor del índice de flujo n . Para soluciones newtonianas (con $n \approx 1$) k se corresponde efectivamente con la viscosidad, mientras que para valores de $n < 1$ la solución se considera pseudoplástica.

El ajuste de los datos experimentales mediante este modelo se muestra en la Tabla 1. Allí se evidencia que las soluciones de CH para diversas concentraciones poseen un comportamiento newtoniano y que k es aproximadamente constante para todas ellas (McKenna & Lyng, 2001).

Tabla 1: Parámetros derivados de la ley de la potencia. Índice de consistencia k y de flujo n , para disoluciones con diversas concentraciones de quitosano, pH 3 y 25°C.

[CH] (% p/p)	K	n
10^{-7}	$0,00104 \pm 0,00005$	$0,985 \pm 0,009$
10^{-5}	$0,0013 \pm 0,0001$	$0,956 \pm 0,021$
10^{-4}	$0,00114 \pm 0,00002$	$0,982 \pm 0,004$
10^{-3}	$0,0027 \pm 0,0002$	$0,866 \pm 0,013$
10^{-2}	$0,00183 \pm 0,00009$	$0,918 \pm 0,009$

Caracterización de la insulina

En la Figura 4 se presenta el gráfico de distribución de tamaño de partícula, expresado en volumen, para la insulina objeto de estudio. Esta distribución resultó monomodal, con límites entre 1-2 nm y con un pico muy agudo en 1.44 nm, lo cual coincide con reportes previos (Zetasizer Nano Applications, 2015).

Este resultado es importante ya que las moléculas proteicas pueden presentar un grado variable de agregación como respuesta a los cambios extrínsecos operando sobre las soluciones en que se encuentran disueltas, por

ejemplo: pH, fuerza iónica, temperatura, por unión con ligandos o como consecuencia de los procesos de purificación (Martinez *et al.*, 2010; Rajagopal & Schneider, 2004). La insulina presentó un potencial ζ de 38,4 \pm 1,2 mV al pH de disolución, pH 3.0.

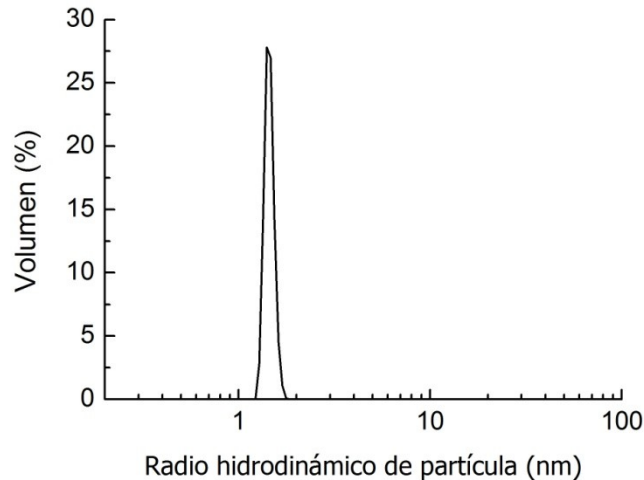


Fig. 4: Distribución de tamaño de partícula expresada en volumen correspondiente a una solución de insulina 0.2% p/p, pH 3, 25°C.

Se obtuvo el espectro infrarrojo de muestras liofilizadas sólidas de cada especie. La resolución instrumental fue de 2 cm^{-1} y la temperatura se mantuvo en 25°C. Los espectros de la insulina muestran picos en 3281 y 2961 cm^{-1} (elongamiento O-H/N-H y C-H respectivamente) y en 1648 y 1519 cm^{-1} (amidas I y II respectivamente), como puede observarse en la Figura 5. El espectro del CH exhibe picos en 3420 y 3000 cm^{-1} (elongación de las uniones O-H/N-H y C-H respectivamente), la deformación del grupo NH_2 en 1557 cm^{-1} y el estiramiento del puente -O- en torno a 1244 cm^{-1} . Los picos hallados concuerdan con los reportados previamente en la literatura (Cocoletzi *et al.*, 2009; Prusty & Sahu, 2013).

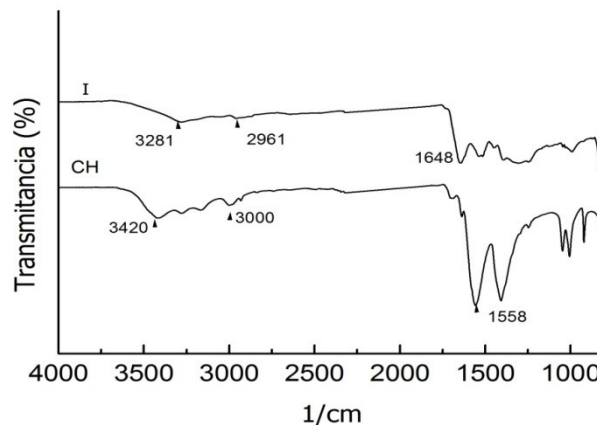


Fig. 5: Espectros típicos de FT-IR para Insulina (0,2 % p/p) y CH (10^{-4} % p/p). Se observan los picos correspondientes a los grupos funcionales de cada especie.

El empleo de biopolímeros, tales como los polisacáridos, presenta múltiples ventajas para la construcción de nanopartículas encapsulantes (tipo *core-shell*). Los polisacáridos se encuentran entre las sustancias más

abundantes de la naturaleza; son de bajo costo y su obtención es ampliamente conocida, lo que los convierte en reemplazantes naturales de los polímeros sintéticos. Son además materiales seguros, no tóxicos y biodegradables. Sus diferentes composiciones les confieren un sinfín de estructuras y propiedades (peso molecular, carga, polaridad, solubilidad, etc.) (Joye & McClements, 2014) que aumentan en la mayoría de los casos la biodisponibilidad de los ligandos encapsulados.

Una de las características más interesantes de las nanopartículas encapsulantes compuestas de polisacáridos -y en particular de CH- es su potencialidad para entrapar y liberar de manera controlada las sustancias que contienen. Esta liberación dependerá entre otros factores del pH, la temperatura o la fuerza iónica del medio que las rodea (Ichikawa *et al.*, 2005).

En este marco, se han realizado varios intentos de desarrollar sistemas de encapsulación y posterior liberación "sitio-específica" de compuestos de importancia biológica, tanto en el sector alimenticio como en el farmacéutico y el cosmético empleando estos materiales como agentes encapsulantes (Nasti *et al.*, 2009). En los últimos años, ha habido un creciente interés en el diseño de sistemas de liberación sitio-dirigida o liberación sitio-específica (*delivery systems*) basados en estructuras poliméricas. De esta manera se encapsula, protege y libera compuestos bioactivos beneficiosos para un sistema biológico determinado.

CONCLUSIONES

El desarrollo de nanovehículos biopoliméricos con materiales de bajo costo y de síntesis amigable, abre una nueva vía para la generación de materiales encapsulantes.

Se ha logrado la caracterización parcial del quitosano empleado en este trabajo, el cual proviene de una planta experimental en la ciudad de Mar del Plata, y está siendo producido aún a pequeña escala. La caracterización implicó obtener datos en cuanto a su distribución de tamaño de partícula y de cargas al pH de trabajo así como también el comportamiento reológico de sus soluciones diluidas. Se observó una distribución polidispersa y un comportamiento newtoniano para las concentraciones empleadas.

En cuanto a la insulina, se corroboró una distribución de tamaños monomodal y con bajo índice de polidispersidad. Esto tiene implicancias prácticas ya que se debe contar con estos datos a los fines de determinar y cuantificar la interacción entre estos dos polielectrolitos.

Esta primera contribución constituye el paso inicial a los fines de obtener nanocápsulas de insulina, vehiculizada por un polímero biocompatible como el quitosano.

Los espectros obtenidos mediante FT-IR permitieron identificar los grupos funcionales característicos de cada especie, con miras a cuantificar la interacción, instancia en la que está ya nuestra investigación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento por el financiamiento aportado por las siguientes instituciones: ANPCyT. PICT-2013-1985; Universidad de Buenos Aires. Proyecto 20020120200087BA y CONICET.

REFERENCIAS

1. Bugnicourt, L., Alcouffe, P. & Ladavière, C. (2014). Elaboration of chitosan nanoparticles: Favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely divided, spherical, and colloidally stable objects. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457, 476-486.

2. Cocolletzi, H.H., Almanza, E.Á., Augustin, O.F., Nava, E.V. & Casselis, E.R. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, 22 (3), 57-60.
3. Fonte, P., Araujo, F., Silva, C., Pereira, C., Reis, S., Santos, H.A., *et al.* (2015). Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. *Biotechnol Adv.*, 33 (6, part 3), 1342-1354.
4. Ichikawa, S., Iwamoto, S. & Watanabe, J. (2005). Formation of biocompatible nanoparticles by self-assembly of enzymatic hydrolysates of chitosan and carboxymethyl cellulose. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69 (9), 1637-1642.
5. Joye, I.J. & McClements, D.J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19 (5), 417-427.
6. Kaur, S. & Dhillon, G.S. (2014). The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. *Crit. Rev. Microbiol.*, 40 (2), 155-175.
7. Martinez, M.J., Farías, M.E. & Pilosof, A.M.R. (2010). The dynamics of heat gelation of casein glycomacropptide- β -lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase. *International Dairy Journal*, 20 (9), 580-588.
8. McKenna, B.M & Lyng, J.G. (2001). *Instrumentation and Sensors for the Food Industry*. Cap. 15. Pp. 425-452. ISBN: 9781855735606.
9. Mie, G. (1908). Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*, 330 (3), 377-445.
10. Myrick, J.M., Vendra, V.K. & Krishnan, S. (2014). Self-assembled polysaccharide nanostructures for controlled-release applications. *Nanotechnology Reviews*, 3 (4), 319-346.
11. Mukhopadhyay, P., Mishra, R., Rana, D. & Kundu, P.P. (2012). Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progress in Polymer Science*, 37 (11), 1457-1475.
12. Nasti, A., Zaki, N.M., de Leonardis, P., Ungphaiboon, S., Sansongsak, P., Rimoli, M.G., *et al.* (2009). Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. *Pharm. Res.*, 26 (8), 1918-1930.
13. Pan, Y., Li, Y.J., Zhao, H.Y., Zheng, J.M., Xu, H., Wei, G., *et al.* (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.*, 249 (1-2), 139-147.
14. Pedroni, V.I., Schulz, P.C., Gschaider, M.E., & Andreucetti, N. (2003). Chitosan structure in aqueous solution. *Colloid and Polymer Science*, 282 (1), 100-102.
15. Pérez, O.E., David-Birman, T., Kesselman, E., Levi-Tal, S. & Lesmes, U. (2014). Milk protein-vitamin interactions: Formation of beta-lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on in vitro gastro-duodenal proteolysis. *Food Hydrocolloids*, 38, 40-47.
16. Prusty, A.K. & Sahu, S.K. (2013). Development and Evaluation of Insulin Incorporated Nanoparticles for Oral Administration. *ISRN Nanotechnology*, 2013, 1-6.

17. Rajagopal, K. & Schneider, J.P. (2004). Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications. *Current Opinion in Structural Biology*, 14 (4), 480-486.
18. Sharma, M., Haque, Z.U. & Wilson, W.W. (1996). Association tendency of β -lactoglobulin AB purified by gel permeation chromatography as determined by dynamic light scattering under quiescent conditions. *Food hydrocolloids*, 10 (3), 323-328.
19. Shukla, S.K., Mishra, A.K., Arotiba, O.A. & Mamba, B.B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 59, 46-58.
20. Yang, J., Han, S., Zheng, H., Dong, H. & Liu, J. (2015). Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 123, 53-66.
21. Zetasizer Nano Applications. Protein Characterization (en línea). Recuperado, Julio 15, 2015. Sitio web: <http://www.iesmat.com/iesmat/upload/file/Malvern/Productos-MAL/DLS-Protein%20characterization-b.pdf>.

