

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Química

TITULADA:

“ESTUDIO DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE ANTOCIANINAS A PARTIR  
DE PELÍCULAS DE QUITOSANO DESPOLIMERIZADO Y RETÍCULADO CON  
TRIPOLIFOSFATO DE SODIO”

Presentada por:

CARLOS SALAZAR MAX JORGE

Asesora:

Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón

LIMA-PERÚ

Digitalizado por:

Consortio Digital del  
Conocimiento MebLatam,  
Hemisferio y Dalse

2013

**DEDICATORIA:**

Dedico éste trabajo a mis padres, que me ayudaron mucho durante todo este tiempo de trabajo y estudio.

## **AGRADECIMIENTO:**

Durante este tiempo he recibido el apoyo de muchas personas a las que quiero mostrar mi más sincero agradecimiento

Agradezco a mi asesora, la Dra. Ana Valderrama por su apoyo durante el desarrollo del trabajo, por sus conocimientos, paciencia, ayuda, buena disposición, tiempo dedicado a quien les habla y a cada uno de sus estudiantes, también, agradezco el haberme dado la oportunidad de trabajar con ella, gracias a la cual se me permite realizar este trabajo de tesis.

He disfrutado mucho pertenecer a la Universidad de Nacional de Ingeniería. Quiero mostrar mi agradecimiento por el haberme dado la oportunidad de realizar parte del trabajo experimental de la tesis en el grupo de investigación de biopolímeros y metalofármacos. Gracias a mis compañeros allí, a Larry, Denisse, Cecilia, por dedicar su tiempo a enseñarme y ayudarme en el laboratorio.

Expreso mi agradecimiento al Laboratorio de Química N° 33 y N° 12 de la Facultad de Ciencias, y las personas que ocupan su dirección, el Dr. Hugo Alarcon y el Ing. Marcelino Dávila, respectivamente; gracias también a las personas que laboran en dichos lugares, Zoila, Sofia, Amet y Sebastián, por su apoyo, colaboración y paciencia durante el desarrollo de la parte experimental del trabajo.

También quiero expresar mi agradecimiento al Instituto de Química de la Universidad de São Paulo, al laboratorio de Biología Molecular y Espectroscopía, a la Dra. Dalva L. Faria por los análisis realizados; también quiero agradecer al Instituto de Química de São Carlos de la Universidad de São Paulo, al grupo de Bioquímica y Biomateriales así como al Grupo de Análisis térmico, electroanalítica y química de soluciones, y a las personas que ocupan su dirección: la Dra. Ana María de Guzzi Plepis y el Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro por permitirme trabajar y hacer análisis en sus respectivos laboratorios así como también a la Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins por su apoyo y consejos.

El agradecimiento más grande de todos va dirigido a mi familia, sobre todo a mi padre, a mi madre y Karina, mi hermana, porque esta tesis es una realidad gracias a ellos, a su apoyo incondicional, desde el principio. Gracias también a los que están lejos y a los que ya no están, porque sé que les hubiese gustado estar aquí y ver mi tesis terminada.

Igualmente quiero hacer un agradecimiento a todos los profesores que ayudaron con mi formación profesional, social y moral. Cito a algunos de ellos: Mg. Cristhian Jacinto, Lic, Hugo Gontaruck, Dr. Hugo Alarcón, Dr. Adolfo La Rosa, Lic. Clemente Luyo entre otros. Gracias por sus valiosas ideas, por su ayuda frente a los múltiples problemas y complicaciones que involucran este trabajo de tesis.

Muchas gracias a todos, de corazón.

**ÍNDICE**

<b>Índice.....</b>	<b>2</b>
<b>Índice de Gráficos.....</b>	<b>5</b>
<b>Índice de Tablas.....</b>	<b>8</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>9</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>10</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>11</b>
<b>I. FUNDAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
1. Sistemas de liberación Modificada.....	13
2. Polímeros Utilizados en sistemas de liberación de fármacos.....	14
3. Quitosano: Características, propiedades y aplicaciones.....	15
4. Caracterización Físicoquímica de Quitosano.....	17
4.1.Determinación del porcentaje de Humedad.....	17
4.2.Determinación del contenido de cenizas.....	17
4.3.Determinación del contenido de material insoluble.....	17
4.4.Espectroscopía Infrarroja.....	17
4.5.Determinación del grado de N-acetilación del quitosano.....	18
4.5.1. Valoración conductimétrica.....	18
4.5.2. Espectroscopia infrarroja.....	18
4.6.Peso molecular del quitosano - Viscosimetría.....	18
5. Degradación de polímeros.....	21
5.1.Tipos de degradación.....	21
5.1.1 Fotodegradación.....	21
5.1.2. Degradación Térmica.....	22
5.1.3. Degradación Oxidativa.....	22
5.1.4. Degradación Hidrolítica.....	23
6. Películas de Quitosano.....	23
6.1.Hinchamiento de las películas de quitosano.....	24
7. Agentes Entrecruzantes – Tripolifosfato Sódico.....	25
8. Compuesto de cargado: Antocianinas.....	27
8.1.Estructura de las Antocianinas y Color.....	27
8.2.Factores químicos que determinan el color y la estabilidad de las antocianinas.....	28
8.2.1. Efecto del pH.....	28
8.2.2. Efecto de la temperatura.....	29
8.2.3. Efecto del oxígeno y el ácido ascórbico.....	29
8.2.4. Efecto del Dióxido de azufre.....	29
8.2.5. Otros.....	29
8.3.Actividad biológica de las antocianinas.....	29
9. Modelos Matemáticos.....	30
9.1.Cinética de orden cero.....	31
9.2.Cinética de primer orden.....	31
9.2.1. Modelo de Higuchi.....	31
9.2.2. Modelo de Hixson- Crowell o de la raíz cúbica.....	31
9.2.3. Modelo de Korsmeyer-Peppas.....	32
<b>II. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>34</b>
1. Reactivos.....	35
2. Materiales.....	35
3. Equípos.....	35
4. Obtención de quitosano depolimerizado.....	36
5. Caracterización de Quitosano (CS) y Quitosano Depolimerizado (CSD).....	36

3.1. Espectroscopía Infrarroja.....	37
3.2. Grado de Desacetilación.....	37
3.2.1. Conductimetría.....	37
3.2.2. Espectroscopía infrarroja.....	37
3.3. Determinación del peso molecular.....	37
6. Obtención de películas de quitosano.....	38
7. Caracterización de películas de quitosano.....	39
5.1. Estudios de Morfología.....	39
5.2. Espectroscopía Infrarroja.....	39
5.3. Análisis Termogravimétrico.....	39
5.4. Grado de Hinchamiento.....	39
5.5. Ensayo Citotóxico.....	40
8. Estudio de liberación <i>in vitro</i> .....	40
<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
1. Caracterización y Depolimerización de Quitosano.....	42
1.1. Caracterización de Quitosano.....	42
1.1.1. Espectroscopía Infrarroja.....	42
1.1.2. Grado de Desacetilación: Conductimetría.....	43
1.1.3. Grado de Desacetilación: Espectroscopía Infrarroja.....	45
1.1.4. Determinación de Peso Molecular.....	46
1.2. Caracterización de Quitosano Depolimerizado (CSD-II).....	49
1.2.1. Espectroscopía Infrarroja.....	49
1.2.2. Grado de Desacetilación: Conductimetría.....	50
1.2.3. Grado de Desacetilación: Espectroscopía Infrarroja.....	51
1.2.4. Determinación del Peso Molecular.....	52
2. Obtención y Caracterización de películas de quitosano.....	54
2.1. Obtención de películas de quitosano.....	54
2.2. Estudio de morfología.....	56
2.3. Espectroscopía Infrarroja.....	57
2.3.1. Espectro IR del Tripolifosfato de Sodio.....	57
2.3.2. Espectro IR de la Película de Quitosano reticulado con Tripolifosfato..	58
2.4. Análisis Termogravimétrico.....	63
2.5. Estudio de Hinchamiento.....	71
2.5.1. Efecto de la concentración de Tripolifosfato sobre el grado Hinchamiento.....	71
2.5.2. Efecto del tiempo de entrecruzamiento sobre el grado Hinchamiento.....	72
2.5.3. Efecto del espesor de las películas sobre el grado de hinchamiento.....	73
2.5.4. Efecto del peso molecular de las películas sobre el grado hinchamiento.....	75
2.5.5. Modelo Cinético.....	75
2.6. Ensayo Citotóxico.....	77
3. Estudios de liberación <i>in vitro</i> .....	78
3.1. Efecto de la concentración.....	79
3.2. Efecto de entrecruzamiento.....	80
3.3. Efecto del espesor de las películas.....	82
3.4. Efecto del peso molecular de quitosano.....	83
3.5. Ajustes de los perfiles de liberación a modelos matemáticos.....	84
<b>IV. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>

<b>V. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>91</b>
<b>VI. ANEXOS.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO 1: Construcción de superficie de acrílico adaptado con un nivel.....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO 2: Análisis espectrofotométrico de antocianinas y curva de calibración .....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO 3: Fotografías de películas de quitosano.....</b>	<b>101</b>

**ÍNDICE DE GRÁFICOS**

<b>I.</b>	<b>FUNDAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
<b>Fig I.1.</b>	Estructura de la quitina (a) y del quitosano (b).....	15
<b>Fig I.2.</b>	Espectro FTIR de una muestra de quitosano. Las líneas base a y b son las utilizadas por Baxter (ecuación. IV.2), y las líneas base c y d son las utilizadas por Brugnerotto.....	17
<b>Fig I.3.</b>	Reacción de termodescomposición al azar del poliestireno (PS).....	22
<b>Fig I.4.</b>	Mecanismo general de las reacciones de oxidación (termooxidación y fotooxidación).....	22
<b>Fig I.5.</b>	Sensibilidad de la hinchazón de una reticulación iónica de un hidrogel de quitosano conteniendo una molécula iónica como reticulante.....	26
<b>Fig I.6.</b>	Estructura de las Antocianinas.....	27
<b>Fig I.7.</b>	Estructura de la Antocianina a diferentes pHs.....	28
<b>II.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>34</b>
<b>Fig II.1.</b>	Diagrama del proceso de obtención de Quitosano Depolimerizado.....	36
<b>Fig II.2.</b>	Diagrama del proceso de obtención de Películas de Quitosano.....	38
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>Fig III.1.</b>	Espectro IR de quitosano.....	42
<b>Fig III.2.</b>	Valoración Conductimétrica de quitosano.....	43
<b>Fig III.3.</b>	Cálculo del grado de desacetilación por IR.....	45
<b>Fig III.4.</b>	Gráfico de Constantes $K$ y $a$ en función del grado de desacetilación (DD).....	46
<b>Fig III.5.</b>	Gráfico de concentración de quitosano vs Viscosidad reducida e Inherente.....	48
<b>Fig III.6.</b>	Espectro IR de quitosano.....	49
<b>Fig III.7.</b>	Valoración Conductimétrica de quitosano depolimerizado.....	50
<b>Fig III.8.</b>	Cálculo del grado de desacetilación por IR de quitosano depolimerizado.....	51
<b>Fig III.9.</b>	Gráfico de concentración de quitosano depolimerizado vs Viscosidad reducida e Inherente.....	53
<b>Fig III.10</b>	Películas de quitosano a) antes de reticulación b) durante la reticulación c) después de la reticulación.....	55
<b>Fig III.11.</b>	Microfotografías de Barrido Electrónico de películas de quitosano reticuladas a PH 6.5 con TPP 0% a), 2.5% b), 5.0% c), 7.5% d) y 10% e) entrecruzadas durante una hora...	56
<b>Fig III.12.</b>	Espectro FTIR del Tripolifosfato de Sodio.....	57
<b>Fig III.13.</b>	Espectro FTIR de Quitosano reticulado con Tripolifosfato.....	58
<b>Fig III. 14.</b>	Espectro FTIR de a) Tripolifosfato de Sodio, b) película de Quitosano/TPP CP3 y c) película de Quitosano CP1.....	59
<b>Fig III. 15</b>	Espectro FTIR de a) Tripolifosfato de Sodio, b) película de Quitosano depolimerizado/TPP CDP3 y c) película de Quitosano depolimerizado CDP1.....	60
<b>Fig III. 16.</b>	Espectro FTIR de a) Antocianinas, b) película de quitosano reticulado con Tripolifosfato CP12 y cargado con Antocianinas, b) película de quitosano reticulado con Tripolifosfato CP3.....	61
<b>Fig III. 17.</b>	Espectro FTIR de a) Antocianinas, b) película de quitosano reticulado con Tripolifosfato CDP8 y cargado con Antocianinas, b) película de quitosano reticulado con Tripolifosfato CDP3.....	62
<b>Fig III. 18.</b>	Termograma de quitosano a) película de Quitosano CP1 y b) película de quitosano depolimerizado CDP1.....	63
<b>Fig III. 19.</b>	Termograma película de Quitosano reticulado con tripolifosfato 5% CP8, 7.5% CP10 y 10% CP11.....	65

<b>Fig III. 20</b>	Grado de reticulación en función de la concentración de Tripolifosfato.....	66
<b>Fig III.21</b>	Termograma Tripolifosfato.....	67
<b>Fig III.22</b>	Termograma Antocianinas.....	67
<b>Fig III. 23</b>	Termograma de película de quitosano reticulado con tripolifosfato y cargado con Antocianinas CP13 comparado con los termogramas de Quitosano CP1, Tripolifosfato y Antocianinas.....	69
<b>Fig III. 24</b>	Termograma de película de quitosano reticulado con tripolifosfato y cargado con Antocianinas CDP9 comparado con los termogramas de Quitosano depolimerizado CDP1, Tripolifosfato y Antocianinas.....	70
<b>Fig III. 25.</b>	Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (1% p/v) entrecruzadas con 0, 1, 2 y 5%(p/v) de TPP, en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de agitación...	71
<b>Fig III. 26.</b>	Grado de hinchamiento de las películas de quitosano depolimerizado (1% p/v) entrecruzadas con 0, 1, 2 y 5%(p/v) de TPP, en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de agitación.....	72
<b>Fig III. 27.</b>	Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (1% p/v) entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 0.5 y 1 hora, en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de agitación.....	73
<b>Fig III. 28.</b>	Grado de hinchamiento de las películas de quitosano depolimerizado (1% p/v) entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 0.5 y 1 hora, en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de agitación.....	73
<b>Fig III. 29.</b>	Grado de hinchamiento de las películas de quitosano 25 mL (CP3) y 50 mL (CP5) al 1% p/v entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 1 hora, en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de agitación.....	74
<b>Fig III. 30.</b>	Grado de hinchamiento de las películas de quitosano depolimerizado 25 mL (CDP3) y 50mL (CDP5) 1% p/v entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 1 hora, en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de agitación.....	74
<b>Fig III. 31.</b>	Perfiles de hinchamiento de las películas de quitosano 1% p/v entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 1 hora, en PBS (pH 6,5) ajustados a la ecuación de Schott.....	76
<b>Fig III. 32.</b>	Perfiles de hinchamiento de las películas de quitosano depolimerizadas 1% p/v entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 1 hora, en PBS (pH 6,5) ajustados a la ecuación de Schott.....	76
<b>Fig III.33.</b>	Curvas de Viabilidad celular obtenidas del ensayo de citotoxicidad.....	77
<b>Fig III.34.</b>	Curva de degradación de antocianinas en PBS (pH 6.5) a 37 °C y 100 rpm de revolución.....	78
<b>Fig III.35.</b>	Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano 1% p/v reticuladas durante 1 hora con diferentes concentraciones de TPP (1%, 2% y 5%) en PBS (pH 6.5) a 37 °C y 100rpm de revolución.....	79
<b>Fig III.36.</b>	Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano 1% p/v reticuladas durante 1 hora con diferentes concentraciones de TPP (0%, 1% y 5%) en PBS (pH 6.5) a 37 °C y 100rpm de revolución.....	79
<b>Fig III.37</b>	Película de quitosano CP12 destruida, cargada con 0.4% de antocianinas, después de la liberación de tres horas.....	80
<b>Fig III.38.</b>	Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano 1% p/v reticuladas con TPP 1% en PBS (pH 6.5) durante 1 y 4 horas a 37 °C y 100 rpm de revolución.....	81
<b>Fig III.39.</b>	Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano depolimerizadas al 1% p/v reticuladas con TPP 1% en PBS (pH 6.5) durante 0, 1 y 4 horas a 37 °C y 100 rpm de revolución.....	81
<b>Fig III.40.</b>	Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano al 1% p/v con diferente espesor 50 µm (CP13)y 100 µm (CP15), reticuladas con TPP 1% en	82



	PBS (pH 6.5) durante 1h a 37 °C y 100 rpm de revolución.....	
<b>Fig III.41.</b>	Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano depolimerizadas al 1% p/v con diferente espesor 50 µm (CDP9)y 100 µm (CDP11), reticuladas con TPP 1% en PBS (pH 6.5) durante 1 h a 37 °C y 100 rpm de revolución.....	82
<b>Fig III.42.</b>	Perfiles de liberación de antocianinas de películas de quitosano CP12, CP13, CP16, CP17, CP14 y CP15 ajustadas al modelo de Higuchi.....	84
<b>Fig III.43.</b>	Perfiles de liberación de antocianinas de películas de quitosano CDP8, CP9, CP10, CP13, CP11 y CP12 ajustadas al modelo de Higuchi.....	85
<b>Fig III.44.</b>	Perfiles de liberación de antocianinas de películas de quitosano CDP8, CDP9, CDP10, CDP11, CP12 y CP16 ajustadas al modelo de Korsmeyer-Peppas, ecuación.....	86
<b>Fig III.45.</b>	Perfiles de liberación de antocianinas de películas de quitosano CP14, CP17, CDP12 y CDP13 ajustadas al modelo de Korsmeyer-Peppas.....	86
<b>Fig III.46</b>	Perfiles de liberación de antocianinas de películas de quitosano CP13 y CP15 ajustadas al modelo de Korsmeyer-Peppas.....	87
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>V.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>91</b>
<b>VI.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>97</b>
<b>Fig VI.1.</b>	Superficie de acrílico para la preparación de películas de quitosano.....	98
<b>Fig VI.2.</b>	Espectro Visible de antocianinas .....	99
<b>Fig VI.3.</b>	Curva de Calibración de antocianinas en HCl.....	100
<b>Fig VI.4.</b>	Película de quitosano CDP1, antes de reticular.....	101
<b>Fig VI.5.</b>	Película de quitosano CP1, en el proceso de entrecruzado con tripolifosfato.....	101
<b>Fig VI.6.</b>	Película de quitosano CP8, entrecruzado con tripolifosfato 5% durante 1 hora, después del proceso de entrecruzado con tripolifosfato, antes del secado.....	102
<b>Fig VI.7.</b>	Película de quitosano CP14, cargada con 0.4% de antocianinas antes del entrecruzado con tripolifosfato.....	102
<b>Fig VI.8.</b>	Película de quitosano CP14, cargada con 0.4% de antocianinas entrecruzado con tripolifosfato 1% durante 1 hora, después del secado.....	103
<b>Fig VI.9.</b>	Película de quitosano CP12 destruida, cargada con 0.4% de antocianinas, después de la liberación de tres horas.....	103
<b>Fig VI.10.</b>	Sistema de liberación de películas de quitosano.....	104
<b>Fig VI.11.</b>	Soluciones extraídas del sistema de liberación antes de ser medidas.....	104

**ÍNDICE DE TABLAS:**

<b>I.</b>	<b>FUNDAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
<b>Tabla I.1</b>	Características y ejemplos de los diferentes tipos de liberación modificada.....	14
<b>Tabla I.2.</b>	Agentes externos que provocan distintos tipos de degradación.....	21
<b>Tabla I.3.</b>	Sustituyentes de las Antocianinas.....	27
<b>Tabla I.4.</b>	Resumen de los mecanismos de transporte de Solutos dependiendo del exponente difusional $n$ .....	33
<b>Tabla I.5.</b>	Valores del exponente difusional en el modelo empírico de Korsmeyer-Peppas para sistemas de distinta geometría.....	33
<b>II.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>34</b>
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabla III.1</b>	Grupos funcionales del espectro IR del quitosano.....	43
<b>Tabla III.2.</b>	Datos y Resultados de Grado de desacetilación por conductimetría de Quitosano (CS).....	44
<b>Tabla III.3.</b>	Constantes MHS para el quitosano con variación de DA.....	46
<b>Tabla III.4.</b>	Datos tomados de las soluciones de quitosano.....	47
<b>Tabla III.5.</b>	Densidad y Viscosidad de las soluciones de quitosano.....	47
<b>Tabla III.6.</b>	Resultados de Caracterización de Quitosano.....	48
<b>Tabla III.7.</b>	Grupos funcionales del espectro IR del quitosano depolimerizado.....	50
<b>Tabla III.8.</b>	Datos y Resultados de Grado de desacetilación por conductimetría de quitosano depolimerizado (CSD).....	51
<b>Tabla III.9.</b>	Datos tomados de las soluciones de quitosano depolimerizado.....	52
<b>Tabla III.10.</b>	Densidad y Viscosidad de las soluciones de quitosano depolimerizado.....	52
<b>Tabla III.11.</b>	Resultados de Caracterización de quitosano depolimerizado.....	53
<b>Tabla III.12.</b>	Condición de preparación de las películas de quitosano (CS) y cargadas con Antocianinas (CAT).....	54
<b>Tabla III.13.</b>	Condición de preparación de las películas de quitosano depolimerizado(CSD) y cargadas con Antocianinas (CAT).....	55
<b>Tabla III.14.</b>	Grupos funcionales del espectro IR del Tripolifosfato de Sodio.....	57
<b>Tabla III.15.</b>	Bandas del espectro IR del quitosano depolimerizado reticulado con TPP.....	58
<b>Tabla III.16.</b>	Grado de reticulación de películas de quitosano/TPP.....	64
<b>Tabla III.17.</b>	Grado de hinchamiento de películas de quitosano y quitosano reticulado.....	75
<b>Tabla III.18.</b>	Resultados de ensayo de citotoxicidad.....	77
<b>Tabla III.19.</b>	Liberación de películas de quitosano y quitosano reticulado.....	83
<b>Tabla III.20.</b>	Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los perfiles de liberación de antocianinas de las películas de quitosano a los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas.....	87
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>V.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>91</b>
<b>VI.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>97</b>

## **OBJETIVOS:**

Siguiendo la línea de trabajo del Laboratorio de Investigación de Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET) y dentro del área de sistemas de liberación controlada de fármacos basados en quitosano, en esta Tesis se ha dado un paso más en el conocimiento del quitosano y las potenciales aplicaciones de este biopolímero en el campo de la tecnología farmacéutica.

Así, el objetivo general de esta Tesis ha sido la obtención de películas de quitosano para la encapsulación y liberación de antocianinas.

Este objetivo general podría desglosarse en los siguientes objetivos específicos:

- Obtención y caracterización de quitosano depolimerizado
- Obtención y caracterización de películas de quitosano depolimerizado y sin despolimerizar
- Estudio de liberación *in vitro* de películas de quitosano como sistema de liberación controlada de Antocianinas para uso tópico.
- Identificar el mecanismo de liberación de las antocianinas en estas matrices.

**RESUMEN:**

En este trabajo se ha estudiado la preparación y caracterización de películas de quitosano (CS) reticuladas con tripolifosfato de sodio (TPP), preparadas por el método de evaporación del solvente. Inicialmente se estudió la depolimerización del quitosano con nitrito de sodio con la finalidad de obtener menor peso molecular en el polímero utilizado, así se logró obtener una reducción de 554,22 kDa a 133,37 kDa de masa molar. Posteriormente se prepararon y caracterizaron películas de quitosano reticuladas con TPP, evidenciando la interacción puente hidrógeno con el polianión mediante técnicas FTIR, SEM, TG; también se realizó estudios de hinchamiento. Con el objetivo de identificar el tipo de modelo cinético que permite explicar dicho fenómeno en estas películas. Finalmente se realizó el estudio de liberación de antocianinas en películas de quitosano, y posteriormente se ajustó dichas curvas a perfiles de liberación de modelos matemáticos, el modelo de Higuchi y al de Korsmeyer-Peppas fueron los más cercanos.

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM), también llamadas de liberación controlada, ha suscitado gran interés en la industria farmacéutica. Se trata de dispositivos que aportan mejores pautas posológicas, mejor perfil farmacocinético e incluso reducción de efectos adversos. De acuerdo con la Real Farmacopea Española [1], las FFLM son aquellas en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas es diferente del de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por la misma vía. En ellas se introducen modificaciones en la formulación o en el proceso de producción con el fin de alterar la velocidad, el tiempo o el lugar de liberación del fármaco [2]. De esta forma se pueden alcanzar los niveles terapéuticos del fármaco en el lugar de acción y mantenerlos a lo largo del tiempo.

Actualmente, en la elaboración de sistemas de liberación controlada, se utilizan un gran número de polímeros. Existen dos grandes grupos de polímeros:

Polímeros naturales, como el colágeno, la albúmina o el quitosano.

Polímeros sintéticos, entre los que se distinguen: Polímeros biodegradables, como los ácidos poliláctico y poliglicólico, y Polímeros no biodegradables, como los ácidos poliacrílicos.

La liberación del fármaco desde una matriz polimérica puede deberse a tres tipos de mecanismos: liberación desde la superficie de las partículas, difusión a través de la matriz hinchada y liberación debido a la erosión del polímero. En la mayoría de los casos, la liberación se debe a más de uno de estos mecanismos [3].

El quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. Es por ello que el quitosano es un copolímero de 2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucosa. Algunas de las propiedades funcionales del quitosano tales como la biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, capacidad hemostática, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante [4] han promovido su utilización en varios campos distintos como son agricultura, industria y medicina.

El interés por los pigmentos antociánicos e investigación científica se han incrementado en los últimos años, debido no solamente al color que confieren a los productos que las contienen sino a su probable papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes; a sus efectos antiinflamatorios y mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorantes, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano. A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su baja estabilidad y la falta de disponibilidad de material vegetal limitan su aplicación comercial [5, 6].

## ***I. FUNDAMENTO TEÓRICO***

---

## **1. SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA**

En las últimas décadas, el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM), también llamadas de liberación controlada, ha suscitado gran interés en la industria farmacéutica. Se trata de dispositivos que aportan mejores pautas posológicas, mejor perfil farmacocinético e incluso reducción de efectos adversos. De acuerdo con la Real Farmacopea Española [1], las FFLM son aquéllas en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas es diferente del de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por la misma vía. En ellas se introducen modificaciones en la formulación o en el proceso de producción con el fin de alterar la velocidad, el tiempo o el lugar de liberación del fármaco [2]. De esta forma se pueden alcanzar los niveles terapéuticos del fármaco en el lugar de acción y mantenerlos a lo largo del tiempo. Como consecuencia, las FFLM presentan numerosas ventajas con respecto a las formas farmacéuticas convencionales [7]:

- Disminución de la frecuencia de administración del medicamento, mejorando de esta forma el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.
- Reducción de los efectos secundarios relacionados con dosis elevadas.
- Disminución de la fluctuación de niveles plasmáticos.
- Efecto terapéutico más uniforme.

Sin embargo, también existen algunos inconvenientes, entre los que hay que destacar [7]:

- Coste elevado.
- Correlaciones *in vitro/in vivo* difíciles de predecir.
- Posible sobredosificación por liberación inmediata e incontrolada de la dosis.
- Dificultad en el ajuste de la dosificación.
- Dependencia del tiempo de tránsito intestinal en las formas de administración oral.
- Riesgo de acumulación del fármaco y necesidad de ajuste de pautas posológicas.

En la Tabla I.1 se resumen los principales tipos de liberación modificada [8,9]:

Tabla I.1. Características y ejemplos de los diferentes tipos de liberación modificada.

Tipo de Liberación	Características Principales	Ejemplos
<b>Prolongada o Controlada</b>	Diseñadas para garantizar una liberación más lenta del fármaco	Comprimidos o parches lipídicos, hidrofílicos o de polímeros insolubles.
<b>Retardada</b>	Retrasan la liberación del principio activo. No prolongan el efecto terapéutico.	Sistemas de cubierta entérica o formas farmacéuticas gastroresistentes.
<b>Pulsátil</b>	Modificadas para garantizar una liberación secuencial del fármaco. Normalmente presentan dos fases: una inmediata y otra al cabo de un tiempo.	Sistemas que pretenden hacer coincidir la liberación del fármaco con ciclos circadianos hormonales.
<b>De control espacial</b>	Liberan el principio activo cuando la forma farmacéutica alcanza su lugar de acción.	Sistemas bioadhesivos.

Los sistemas de liberación modificada también se pueden clasificar en función del mecanismo por el cual se libera el principio activo. La liberación puede ocurrir por difusión, disolución, presión osmótica, fuerza mecánica, hinchamiento, erosión o activación [2].

## **2. POLÍMEROS UTILIZADOS EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS**

Actualmente, en la elaboración de sistemas de liberación controlada, se utilizan un gran número de polímeros. Existen dos grandes grupos de polímeros:

Polímeros naturales, como el colágeno, la albúmina o el quitosano.

Polímeros sintéticos, entre los que se distinguen:

- Polímeros biodegradables, como los ácidos poliláctico y poliglicólico.
- Polímeros no biodegradables, como los ácidos poliacrílicos.

Tanto los materiales empleados en el desarrollo de los sistemas de liberación así como sus productos de degradación han de ser biocompatibles.

La liberación del fármaco desde una matriz polimérica puede deberse a tres tipos de mecanismos: liberación desde la superficie de las partículas, difusión a través de la matriz hinchada y liberación debido a la erosión del polímero. En la mayoría de los casos, la liberación se debe a más de uno de estos mecanismos [3].

En el caso de la liberación desde la superficie, el fármaco atrapado en la capa superficial de las partículas se disuelve instantáneamente al entrar en contacto con el medio. Esto provoca el llamado efecto estallido, del inglés —burst effect, que puede evitarse utilizando agentes entrecruzantes o lavando las partículas con solventes apropiados, lo cual puede conducir a una baja eficiencia de encapsulación.

La liberación por difusión implica tres etapas. En la primera, el agua penetra en el sistema, lo que hace que la matriz se hinche; en la segunda, el polímero cristalino se convierte en una matriz hidratada; y en la tercera, se produce una difusión del fármaco a



través de dicha matriz hidratada. La velocidad global del proceso vendrá determinada por la velocidad de cada etapa. Ajustando experimentalmente las variables adecuadas se puede conseguir la velocidad de liberación del fármaco idónea. Este tipo de liberación es típico en hidrogeles.

En el caso de polímeros biodegradables, el principio activo puede liberarse por erosión de la matriz en la que está encapsulado.

### 3. QUITOSANO: CARACTERÍSTICAS, PROPIEDADES Y APLICACIONES

El quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. La quitina forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. Se trata además de un subproducto importante de varias industrias como la pesquera y la cervecera. La quitina y el quitosano son biopolímeros que en los últimos años han encontrado gran cantidad de aplicaciones, especialmente en la industria alimentaria y en la biotecnológica [10].

La quitina está formada por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). La obtención de quitosano a partir de quitina se realiza por desacetilación de la misma, dejando libre el grupo amino del carbono 2, este proceso nunca llega al 100% [11]. Es por ello que el quitosano es un copolímero de 2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucosa (Figura I.1).

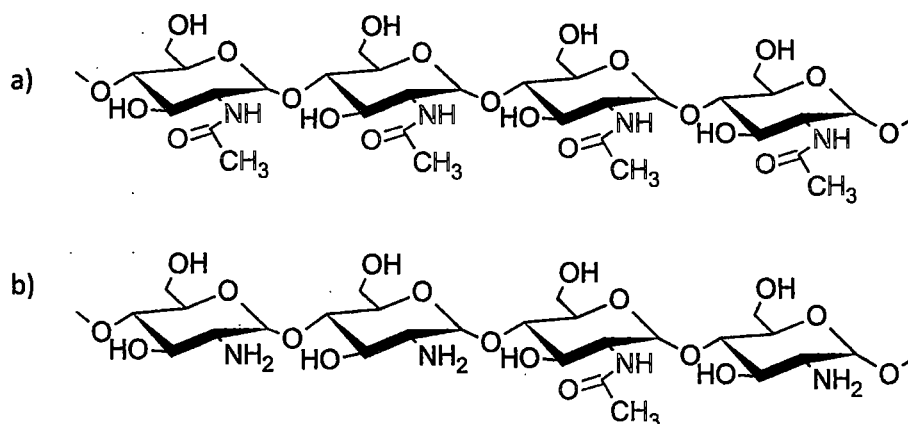


Fig I.1. Estructura de la quitina (a) y del quitosano (b).

La fuente y el método de obtención determinan la composición de las cadenas de quitosano y su tamaño. Por este motivo, el grado de desacetilación y el peso molecular promedio son dos parámetros de obligado conocimiento para la caracterización de este polímero.

Las principales propiedades físico-químicas del quitosano que determinan sus propiedades funcionales son su grado de desacetilación y su peso molecular promedio, aunque la cristalinidad, el contenido de agua, cenizas y proteínas también son características físico-químicas a considerar para la aplicación de un quitosano específico.

El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de quitosano es lo que se denomina grado de desacetilación y está estrechamente vinculado con su solubilidad. Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-aceto, aumenta la capacidad hidrofílica del quitosano y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluídas (acético, fórmico, clorhídrico, entre otros) ya que el pKa del grupo amino del quitosano es de 6,5 [12]. La protonación de los grupos amino del quitosano en medio ácido le confiere un carácter altamente reactivo.

El quitosano es un polímero formado por unidades repetidas de D-glucosamina, por lo que la longitud de la cadena y, por tanto, su peso molecular, es una característica importante de la molécula.

Algunas de las propiedades funcionales del quitosano son: biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante [4]. Estas propiedades funcionales han promovido su utilización en varios campos distintos como son agricultura, industria y medicina. En agricultura, el quitosano se ha descrito como antiviral en plantas y como aditivo en fertilizantes. Así mismo se ha investigado como agente quelante de metales en agricultura e industria y como agente filmogénico en cosmética [13]. También ha sido utilizado en la industria papelera, en la textil y en el tratamiento de aguas residuales [14]. En la industria alimentaria se puede utilizar como ingrediente funcional y como fibra alimentaria. Además, tiene la capacidad de unirse a grasas, por lo que se utiliza como agente hipocolesterolémico en productos dietéticos [4]. Ha sido altamente utilizado en el campo de la biomedicina debido a su actividad inmuno estimuladora, propiedades anticoagulantes, acción antibacteriana y antifúngica [13] y por su acción como promotor de la cicatrización de heridas [16].

Debido a su carácter catiónico y a sus propiedades gelificantes y filmogénicas, el quitosano ha sido estudiado en la industria farmacéutica por su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos [17, 18]. En este sentido, hay que destacar que el hidrocloreto de quitosano fue aprobado por las autoridades e incluido en la cuarta edición de la Farmacopea Europea (2002) [19].

Constituye un vehículo para la encapsulación del fármaco, protegiéndolo y liberándolo de forma controlada, además de promover su absorción a través del epitelio. Así mismo, el quitosano presenta propiedades necesarias para su uso en dicha industria, como son su biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad. La toxicidad del quitosano por vía oral es baja; se ha descrito una LD50 (dosis letal para el 50% de un conjunto de animales de prueba) de 16g/Kg en ratas [20]. El grado de desacetilación y el peso molecular promedio del quitosano son dos características físico-químicas fundamentales, ya que afectan a las propiedades de las formulaciones farmacéuticas basadas en este polímero [4].

En los últimos años, el estudio del quitosano se ha centrado sobre todo en mejorar la liberación y la absorción de las llamadas biomoléculas terapéuticas, como son los fármacos proteicos [21]. Existen resultados contradictorios sobre la mayor eficiencia del quitosano en solución, en polvo o en forma de nanopartículas en la liberación *in vivo*. En general, se ha visto que la eficiencia de la absorción de macromoléculas en mucosas utilizando nanopartículas de quitosano como vehículo de encapsulación es inferior a la obtenida con formulaciones de quitosano en solución o en polvo [22].

#### 4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE QUITOSANO [23]

##### 4.1. Determinación del porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad normalmente se determina por gravimetría, para ello, se lleva a peso constante una muestra calentada en un horno a 105 °C. En otros casos, se puede utilizar el análisis térmico diferencial y se determina el porcentaje de agua a partir de la pérdida de peso de la muestra a temperaturas entre 50 y 160 °C.

##### 4.2. Determinación del contenido total de cenizas

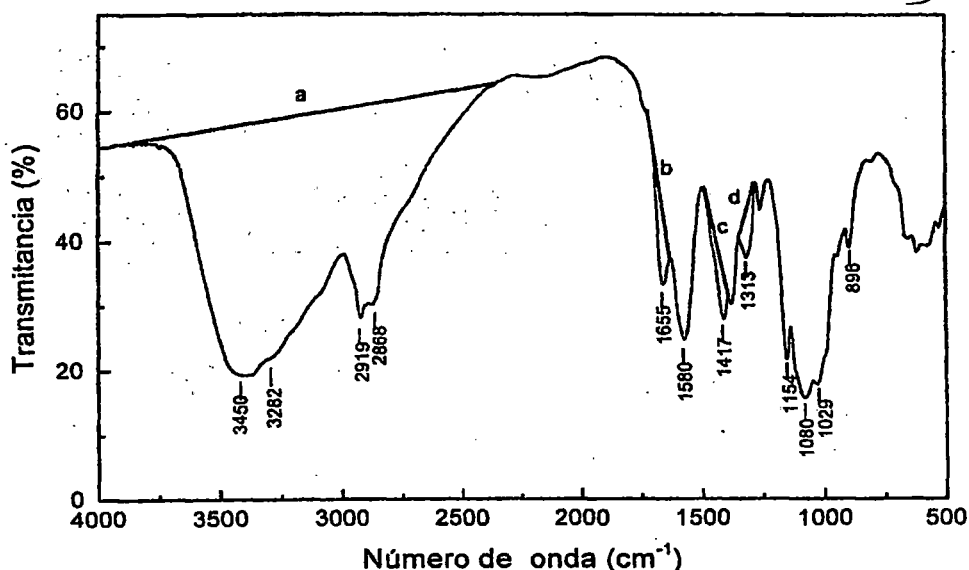
El contenido de cenizas es indicativo del contenido de materiales inorgánicos presentes en la muestra. Es un parámetro muy importante al momento de evaluar las aplicaciones de un quitosano determinado, El contenido de cenizas depende, por supuesto, de la temperatura utilizada para la combustión de la muestra. En el caso del quitosano. El contenido de cenizas se determina gravimétricamente a partir del residuo tras la combustión de la muestra al menos 6 horas a 800 °C.

##### 4.3. Determinación el contenido de material insoluble

El contenido de material insoluble puede venir dado por la presencia de sales insolubles, quitosano poco desacetilado, u otros contaminantes. Este contenido se determina disolviendo el quitosano en ácido acético, o su sal, en agua y, luego, filtrado. El peso de partículas que quedan en el filtro nos permite determinar el porcentaje de materiales insoluble

##### 4.4. Espectroscopia infrarroja

En la Figura I.2, se muestra el espectro FTIR de una quitosano con un 30% de N acetilación. Se pueden apreciar las bandas características en un espectro de IR típico: a 3450 cm<sup>-1</sup> (grupo -OH), a 3292 cm<sup>-1</sup> (grupo N-H), a 2 919 y 2 862 cm<sup>-1</sup> (grupo C-H), a 1655 cm<sup>-1</sup> (amida I), a 1580 cm<sup>-1</sup> (doblaje del grupo -NH<sub>2</sub>), a 1313 cm<sup>-1</sup> (amida III), a 1154 cm<sup>-1</sup> (tensión antisimétrica del puente C-O-C), a 1082 y 1032 cm<sup>-1</sup> (vibraciones del esqueleto propias de su estructura piranósica) y 896 cm<sup>-1</sup> (tensión C-H de los grupos anoméricos)[23]. El método de IR consiste en correlacionar la relación de absorbancias entre dos bandas de absorción determinadas, con el tanto por ciento de acetilación del quitosano.



**Fig I.2.** Espectro FTIR de una muestra de quitosano. Las líneas base a y b son las utilizadas por Baxter (ecuación. IV.2), y las líneas base c y d son las utilizadas por Brügnérötto.

#### 4.5. Determinación del grado de N-acetilación del quitosano

Se han desarrollado numerosos métodos para determinar el grado de N-acetilación del quitosano basados en diversas técnicas. Entre estas técnicas, podemos destacar la espectroscopia de infrarrojo [24, 25], la espectroscopía de UV, la espectroscopía de RMN, la potenciometría, y la conductimetría [26]. Otras técnicas alternativas incluyen el análisis elemental, el análisis térmico, la cromatografía de HPLC y el dicroísmo circular.

Normalmente este parámetro se designa con las siglas DA (degree acetylation), aunque también se le puede encontrar como DA, o como grado de desacetilación, DD (deacetylation degree), de acuerdo con las preferencias personales de cada autor. El cual se calcula según la siguiente relación:

$$DD = 100 - DA \quad (I.1)$$

##### 4.5.1. Valoración conductimétrica

Este método se basa en la elevada conductancia que presentan los iones hidrógeno e hidroxilo en comparación con otros. Nuevamente, una solución de quitosana en exceso de HCl se valora con una solución de NaOH y se usa, en este caso, un conductímetro.

##### 4.5.2. Espectroscopia Infrarroja

La selección de las bandas de absorción involucra una señal que depende del grado de N-acetilación, normalmente, una de las bandas amida y otra que sirve referencia interna para corregir las diferencias de grosor de las películas o de concentración en las pastillas de KBr. Por ejemplo, en el método descrito por Baxter et. al. [27], el grado de N acetilación se calcula por la siguiente ecuación:

$$DD (\%) = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33] - \text{Línea base} \quad (I.2)$$

Donde  $A_{1655}$  y  $A_{3450}$  son las absorbancias correspondientes, respectivamente, a la amida I y a la referencia [25].

El factor 1.33 se considera para una muestra de quitina completamente desacetilada, mientras que la ecuación. I.3 es una modificación de Baxter [27]. Para muestras parcialmente desacetiladas.

$$DD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 115] - \text{Línea Base} \quad (I.3)$$

Brugnerotto y col. Realizaron una extensiva investigación en la que analizaron 25 muestras de quitina y quitosano de diferentes fuentes y con grados de acetilación, determinados por espectroscopia RMN, que iban desde 0,5% hasta 97,9%.

Tomando como banda característica a la localizada a  $1320 \text{ cm}^{-1}$ , y como referencia la banda a  $1420 \text{ cm}^{-1}$ , obtuvieron una correlación lineal que viene expresada por la siguiente relación:

$$DA(\%) = 31,92 \times ((A_{1320}/A_{1420}) - 12,20); (r = 0.990) \quad (I.4)$$

En todas las determinaciones por IR, es muy importante la selección adecuada de las líneas base en el cálculo de la absorbencia para alcanzar buenos resultados.

#### 4.6. Peso molecular promedio del quitosano

Los métodos utilizados para determinar el peso molecular de la quitina y el quitosano son los empleados para ese fin en cualquier compuesto macromolecular: la viscosimetría, la dispersión de la luz y la cromatografía de permeación de gel. [23]

##### *Viscosimetría:*

La viscosimetría es el método más utilizado para obtener el peso molecular del quitosano. El método tiene la desventaja de no ser una técnica absoluta, por lo que requiere la determinación de las constantes mediante la correlación de valores de

viscosidad intrínseca con valores de pesos moleculares medidos por un método absoluto.

Su principal ventaja radica en su sencillez. Se basa en la obtención de la viscosidad intrínseca  $[\eta]$ , que está relacionada con el peso molecular en la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$\eta = KM_v^a \quad (I.5)$$

En esta ecuación,  $M_v$  es el peso molecular promedio viscosimétrico y  $K$  y  $a$  son dos constantes que dependen de la naturaleza del polímero, del sistema disolvente utilizado y de la temperatura. Particularmente, en el caso del quitosano, la extensión del grado de N-acetilación y la poli-dispersidad respecto del contenido de residuos N-acetilo deben controlarse durante la calibración por su influencia sobre el comportamiento de la disolución. También debe tenerse en cuenta la tendencia del quitosano a formar agregados, que hace necesario clarificar cuidadosamente las soluciones por filtración y/o centrifugación.

Para la medida de la viscosidad de un polímero en solución se emplean viscosímetros de tipo capilar. En estos viscosímetros, se mide el tiempo que tarda el nivel del disolvente o la disolución en pasar entre dos marcas fijadas y se relaciona con la viscosidad mediante la ecuación de Poiseuille:

$$v = \frac{\pi Pr^4}{8\eta l} \quad (I.6)$$

En esta ecuación,  $v$  es la velocidad de flujo del volumen contenido entre las dos marcas,  $P$  es la diferencia de presión que mantiene el flujo,  $r$  es el radio del capilar,  $\eta$  es la viscosidad del líquido y  $l$  la longitud del capilar.

Esta ecuación es válida para un flujo newtoniano y laminar, siempre que la energía potencial del líquido esté por encima del valor que presenta cuando los dos niveles del líquido se encuentren estacionarios. Se utiliza solamente en forma de trabajo contra las fuerzas viscosas internas y no se utiliza en impartir energía cinética al líquido.

Si se trabaja con polímeros en disolución, las dimensiones apropiadas para el capilar son 12 cm de longitud y 0,4 mm de diámetro con el propósito de dar tiempos de flujo de alrededor de 150 segundos para 2 cm<sup>3</sup> de los disolventes orgánicos comunes.

Para lograr una precisión elevada, las medidas de viscosidad deben realizarse en un baño a temperatura constante regulada en  $\pm 0,02$  °C.

Replanteamos la ecuación en forma apropiada para el cálculo de la relación de viscosidad definida por la siguiente igualdad:

$$\frac{\eta_{solución}}{\eta_{solvente}} = \frac{\eta_1}{\eta_2} \quad (I.7)$$

Se entiende que ambos valores están tomados a la misma temperatura.

Supongamos que el volumen del líquido contenido entre las dos marcas fijas sea  $V$  y que los tiempos de flujo para el disolvente y la disolución sean  $t_1$  y  $t_2$ , respectivamente.

Podemos entonces escribir lo siguiente:

$$\frac{V}{t_1} = \frac{\pi P_1 r^4}{8\eta_1 l} \quad (I.8)$$

$$\frac{V}{t_2} = \frac{\pi P_2 r^4}{8\eta_2 l} \quad (I.9)$$

De manera que se llega a la siguiente igualdad:

$$\frac{\eta_2}{\eta_1} = \frac{t_2 P_2}{t_1 P_1} \quad (I.10)$$

Nuestro único problema ahora es el cálculo de la relación de las presiones  $P_1$  y  $P_2$ .

Esto se simplifica si en cada caso está presente la misma altura promedio de líquido, de manera que las presiones estén en una relación que corresponda a la relación entre las densidades de la solución y el solvente  $\eta_1$  y  $\eta_2$ , respectivamente. Si llamamos  $g$  a la aceleración de la gravedad:

$$\frac{\eta_2}{\eta_1} = \frac{t_2 h \rho_2 g}{t_1 h \rho_1 g} = \frac{t_2 \rho_2}{t_1 \rho_1} \quad (\text{I. 11})$$

Esta condición se cumple en el viscosímetro de nivel suspendido de Ubbelohde; en el caso del viscosímetro de Ostwald (FIG 12), solamente es cierta si se emplean los mismos volúmenes de disolvente y disolución. Para disoluciones diluidas,  $\eta_1$  y  $\eta_2$  son prácticamente idénticas y, así, podemos escribir la siguiente igualdad:

$$\frac{\eta_2}{\eta_1} = \frac{t_2}{t_1} \quad (\text{I. 12})$$

La variación de la relación de viscosidad con la concentración de polímero disuelto puede expresarse como una serie de potencias de la concentración de la siguiente manera:

$$\frac{\eta_2}{\eta_1} = 1 + \eta k c + \dots, \quad (\text{I. 13})$$

En esta ecuación,  $[\eta]$  y  $k$  son constantes. Ella muestra, simplemente, que, para concentración cero, la relación de viscosidad es la unidad y que, a mayores concentraciones, esta cantidad aumenta de forma parabólica con el incremento de  $c$ , el cuarto término en la expresión no se hace importante hasta que se alcancen altos valores de  $c$ .

Si centramos nuestra atención en disoluciones diluidas, de manera que solamente se necesiten considerar los tres primeros términos de la expresión anterior, la última ecuación puede reordenarse de la siguiente forma:

$$\frac{\eta_2 - \eta_1}{\eta_1 c} = \eta + k c \quad (\text{I. 14})$$

Si representamos en una gráfica el término de la izquierda frente a  $c$ , obtenemos una línea recta de pendiente  $k$  y ordenada en el origen  $[\eta]$ . La cantidad:  $\frac{\eta_2 - \eta_1}{\eta_1 c}$  se denomina índice de viscosidad y la cantidad  $[\eta]$  se denomina índice de viscosidad límite o viscosidad intrínseca.

Otro factor que puede influir en las discrepancias entre los valores reportados para un mismo disolvente es el uso de muestras con distribuciones de pesos moleculares desconocidas o muy amplias. En este sentido, las constantes dadas por Rinaudo y col. podrían ser bastante realistas, ya que utilizaron en la calibración del método la cromatografía de exclusión por tamaños y, por lo tanto, un gran número de fracciones monodispersas.

En consecuencia, para evitar ambigüedades, siempre que se reporte el peso molecular promedio viscosimétrico de una muestra de quitosano es imprescindible declarar el disolvente utilizado, la temperatura y la referencia a partir de la que se tomaron los valores de las constantes viscosimétricas.

## 5. DEGRADACIÓN DE POLÍMEROS

El término *degradación* de polímeros se refiere a los procesos inducidos por luz solar, calor y otros agentes atmosféricos que conducen a una modificación de la estructura del polímero.

Un polímero puede tener diversos cambios físicos o químicos:

**a.- Físicos:** decoloración, pérdida de brillo superficial, formación de grietas, superficies untuosas; erosión superficial y pérdida de propiedades como resistencia a la tracción-deformación

**b.- Químicos:** rotura de cadenas, cambios en sustituyentes laterales, reacciones de entrecruzamiento, etc.

Cada agente externo que conduce a la degradación del polímero da lugar a un mecanismo diferente de degradación (y modifica la estructura del polímero).

Tabla I.2. Agentes externos que provocan distintos tipos de degradación.

Agente Externo	Tipo de Degradación
Luz solar	Fotodegradación
Calor	Degradación térmica
Agentes atmosféricos	Degradación oxidativa
Humedad	Degradación hidrolítica
Hongos y microorganismos	Biodegradación
Luz + oxígeno	Fotodegradación oxidativa
Calor + oxígeno	Degradación termoxidativa
Luz + humedad	Degradación fotohidrolítica

Los polímeros están expuestos a acciones simultáneas de diversos agentes (tres últimas filas), y ante la buena respuesta a estas condiciones adversas, su uso se ha generalizado a aquellas actividades o aplicaciones desarrolladas a la intemperie.

### 5.1. Tipos de degradación

#### 5.1.1. Fotodegradación

Las reacciones promovidas por la acción de la luz pueden ser fotolíticas o fotoquímicas. Las primeras están provocadas por la acción exclusiva de la luz, mientras que las segundas se deben a la acción combinada de ésta con algún otro agente, como por ejemplo el O<sub>2</sub> (fotooxidación) o la humedad [28].

Aunque gran parte de la radiación solar es absorbida por la atmósfera, la comprendida entre los 280 y 400 nm alcanza la superficie terrestre (UV). Puesto que la energía de esta radiación va de 72 a 100 Kcal, es suficiente para producir la rotura de los enlaces covalentes y ocasionar el amarilleo y fragilidad de los polímeros orgánicos. El polietileno, PVC, poliestireno, los poliésteres y el propileno se degradan cuando se someten a longitudes de onda de 300, 310, 319, 325 y 370 nm, respectivamente. Así, la mayoría de estos polímeros se fabrican con una gran cantidad de aditivos para evitar la descomposición por fotodegradación. Entre los factores que determinan el comportamiento polimérico bajo irradiación, se encuentran: la fabricación o procesado, tipo de catalizador, presencia de grupos carbonilo, hidroperóxido e instauraciones, morfología y propiedades del material, y la cristalinidad. En polímeros semicristalinos, la escisión de cadenas se produce en la zona amorfa, lo que conduce a una reestructuración del material, con aumento de la fase cristalina y de grietas superficiales.

La combinación de escisiones de cadena y acumulación de esfuerzos favorece la propagación de grietas que conducen a la fragilidad del polímero.

### 5.1.2. Degradación Térmica

El calor conlleva a la ruptura hemolítica de los enlaces covalentes de la cadena o de los grupos laterales, provocada por el aumento de la temperatura. Tras la ruptura del enlace, las reacciones que se dan dependen de la actividad de cada radical (como es obvio, a más temperatura, mayor es la degradación).

Las reacciones de termodescomposición o degradación térmica se pueden producir en ausencia de oxígeno (pirólisis) o en presencia de éste (termo-oxidación). La tendencia de los polímeros a experimentar reacciones de tipo pirolítico tiene relación con las energías de enlace asociadas a su composición química y para que ocurran es necesario alcanzar niveles de temperatura relativamente elevados, tal es el caso del. Poli(carbonato) (PC) (~425°C), copolímero poli(etileno/polipropileno) (~415°C), poli(etilentereftalato) (PET) (~390°C), poli(estireno) (PS) (~375°C), poli(metacrilato de metilo) (PMMA) (~320°C), poli(acetato de vinilo) (PVAc) (~310°C). Por tanto, en estos casos las reacciones de tipo pirolítico no son significativas, puesto que durante su procesado no se alcanzan valores tan altos[29].

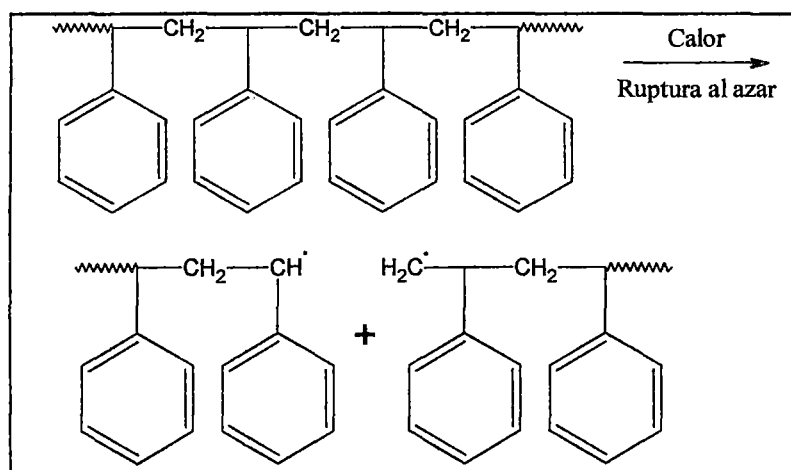


Fig I.3. Reacción de termodescomposición al azar del poliestireno (PS)[29].

### 5.1.3. Degradación Oxidativa

Los gases atmosféricos pueden provocar cambios químicos. Dentro de estos destaca la acción del oxígeno en combinación con la temperatura (termo-oxidación) o con la luz (fotooxidación).

Los procesos de oxidación de los polímeros siguen un mecanismo en etapas de tipo radicalico. La primera etapa (iniciación) es promovida por una fuente de energía (térmica o radiante). Los radicales libres así formados experimentan sucesivos procesos de oxidación en la etapa de propagación; como consecuencia, se forman peróxidos e hidroperóxidos, ambos inestables. Finalmente, en la etapa de terminación, estas especies químicas reaccionan entre sí y dan lugar a productos estables.

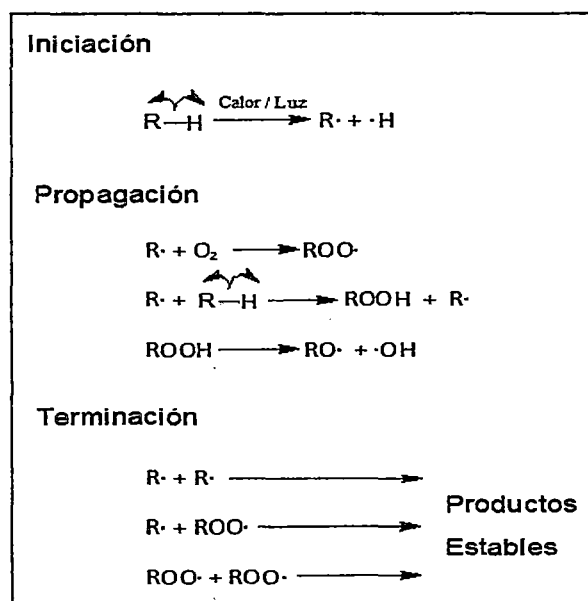


Fig I.4. Mecanismo general de las reacciones de oxidación (termooxidación y fotooxidación)



Conviene señalar que cuando el radical peróxido ( $-O-O-$ ) o hidroperóxido ( $-O-OH$ ) se forma a partir de un C terciario, se pueden generar grupos cromóforos como, por ejemplo, el grupo carbonilo ( $C=O$ ), que son responsables del amarillamiento del polímero.

#### 5.1.4. Degradación Hidrolítica

Estas reacciones afectan a los polímeros obtenidos mediante un proceso de polimerización por condensación, en el que además del polímero se forman otros productos de pequeño tamaño (normalmente agua). El proceso inverso a esta reacción se conoce como hidrólisis. Para su desarrollo es necesaria la presencia de agua y, además, que el medio sea ácido (hidrólisis ácida) o básico (hidrólisis básica).

Por tanto, para que este tipo de degradación polimérica tenga lugar, es necesario que en la cadena principal del polímero o en sus ramificaciones existan grupos hidrolizables; tal es el caso de poliésteres, poliamidas y PVAc. En este último, los grupos hidrolizables están en las cadenas laterales o ramificaciones. Hay que señalar, que este tipo de proceso no es significativo a temperatura ambiente y pH neutro.

## 6. PELÍCULAS DE QUITOSANO

El carácter filmogénico del quitosano dio lugar a una de las primeras aplicaciones investigadas de este polímero natural. Es posible formar películas de quitosano con buenas propiedades físicas y mecánicas a partir de sus disoluciones en ácidos diluidos [30], tales como fórmico, acético o propiónico [31]. Las propiedades filmogénicas del quitosano se deben a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos amino e hidroxilo de sus cadenas. A pH ácido estos enlaces de hidrógeno se disocian debido a la protonación de los grupos amino y se produce un rápido hinchamiento de la película.

Muzzarelli planteó por primera vez en 1974 dos metodologías generales de trabajo para obtener películas de quitosano; la primera es mediante la evaporación del ácido empleado en la solución de quitosano (método de evaporación de solvente), y la segunda se basa en la preparación directa de quitosano a partir de la película quitinosa de la jibia (molusco cefalópodo). Este último método [32] no resultó eficiente, pues las propiedades mecánicas de las películas obtenidas no fueron las idóneas, por lo cual no es utilizado en la actualidad.

Las posibles aplicaciones de las películas de quitosano se extienden a la medicina, la industria fotográfica, la alimentación y la cosmética [33, 34]. En el campo de la farmacia, las películas de quitosano se han empleado para el recubrimiento de comprimidos [35] y como sistemas de liberación controlada de fármacos [36].

El uso de películas de quitosano para el tratamiento de heridas cutáneas presenta un gran interés puesto que se puede administrar el fármaco de forma localizada y sostenida en el sitio de acción. Se trata de un sistema ventajoso con respecto al uso de cremas, ya que éstas deben ser aplicadas continuamente y son eliminadas con facilidad. Se ha descrito en la bibliografía el uso de películas de quitosano para el vendaje de heridas cutáneas y películas con minociclina para el tratamiento de quemaduras en ratas [37].

Las películas de quitosano resultan efectivas porque protegen la herida, absorben el exudado, tienen acción antibacteriana [38, 39] y favorecen la cicatrización de heridas al estimular la proliferación de fibroblastos [40, 41]. Por otro lado, también se han realizado estudios de citotoxicidad del quitosano en células cutáneas como queratinocitos y fibroblastos, estudios importantes para este tipo de aplicación, y se ha comprobado que no presenta citotoxicidad *in vitro* [42].

El carácter hemostático del quitosano ha promovido su utilización en parches y vendajes hemostáticos [43]. Prueba de ellos es la comercialización de varios productos de este tipo a base de quitosano por parte de la empresa HemCon Medical Technologies INC (Oregon, EEUU).

### 6.1 Hinchamiento de las películas de quitosano

La hidratación de los polímeros es uno de los factores que influyen en la liberación de principios activos a través de matrices poliméricas. La hidrofiliidad en los polímeros está dada por el grado de hinchamiento, el cual se calcula a partir de la relación entre el volumen de gel hinchado y el volumen de gel seco. Durante el proceso de hinchamiento se produce la incorporación del líquido en el interior de la matriz, producto de la diferencia de potencial químico del disolvente dentro y fuera de ella, provocando una dilatación de la misma. Al proceso de dilatación se opone una fuerza elástica-retráctil, la cual se opone a la penetración del solvente [44]. El equilibrio de hinchamiento se alcanza cuando se igualan la fuerza de hinchamiento y la fuerza elástica-retráctil.

En los hidrogeles iónicos, la presencia de grupos cargados confiere características únicas al hinchamiento. Dichas características dependen del pH y la fuerza iónica del medio. Peppas y Khare [45] determinaron como factores clave que afectan el hinchamiento:

- Grado de ionización.
- Equilibrio de ionización.
- Naturaleza de los contraiones.

El modelo más común para estudiar la difusión es el propuesto en las leyes de Fick. En la primera ley se define que, en estado de equilibrio, el flujo del penetrante es proporcional al gradiente de concentración [45]:

$$J = -D (dc/dx) \quad (I.15)$$

donde  $J$  representa el número de moléculas de sustancia por segundo y por unidad de superficie perpendicular a la dirección de flujo,  $D$  es el coeficiente de difusión, y  $dc/dx$  es el gradiente de concentración.

Existen otros modelos de cinéticas que describen el comportamiento del hinchamiento en los polímeros. Un ejemplo de los mismos es el planteado por Schott [46], donde se estudia la cinética de hinchamiento en películas de gelatina y celulosa. El autor llega a una ecuación empírica que ajusta los valores obtenidos para todo el proceso de hinchamiento. Dicha ecuación es:

$$\frac{t}{W} = A + Bt \quad (I.16)$$

donde  $W$  representa el hinchamiento a un tiempo  $t$ ,  $A$  es la ordenada en el origen y  $B$  es el inverso del hinchamiento máximo. El hinchamiento se calcula por la ecuación [47]:

$$W = \frac{M - M_0}{M_0} \quad (I.17)$$

donde  $M$  es el peso de la película a un tiempo  $t$  y  $M_0$  es el peso de la película antes del proceso de hinchamiento.

Para tiempos grandes  $Bt \gg A$ , la pendiente  $B$  se define como el inverso del hinchamiento máximo  $\frac{1}{W_\infty}$ , mientras que para tiempos cortos  $Bt$  se puede despreciar y en este caso  $A$  es el recíproco de la velocidad inicial de hinchamiento  $A = \frac{1}{\frac{dW}{dt}_0}$ .

A diferencia del comportamiento Fickiano, en que el hinchamiento está controlado por la difusión, en el modelo de Schott el hinchamiento está controlado por la relajación de las cadenas.

Al representar los valores de  $\frac{t}{W}$  en función de  $t$ , Schott demostró que el proceso de hinchamiento de estos materiales respondía a una cinética de segundo orden respecto al hinchamiento remanente, representada por la siguiente ecuación:

$$\frac{dW}{dt} = KW_\infty - W^2 \quad (I.18)$$

donde  $W_\infty$  es el hinchamiento a tiempo infinito,  $W$  el hinchamiento a tiempo  $t$  y  $K$  la constante del sistema. El proceso completo de transporte en una matriz polimérica depende principalmente de dos factores, los cuales están gobernados por una amplia variedad de elementos relacionados con la composición y las condiciones experimentales. Uno de ellos es la movilidad segmental de las cadenas poliméricas y el otro está relacionado con la estructura y morfología del polímero. En cuanto al primer factor, el movimiento difusivo depende de la movilidad relativa de las moléculas del penetrante y de los segmentos de la cadena polimérica, su tamaño, concentración, la interacción de los componentes, la temperatura y otros factores que afectan la movilidad segmental del polímero [44]. La estructura de la red polimérica es un parámetro determinante cuando se describe el transporte a través de las películas, ya que la magnitud del espacio entre las cadenas poliméricas va a determinar cómo se produce dicho transporte.

## 7. AGENTES ENTRECruzANTES

Los sistemas de liberación a base polímeros biodegradables necesitan ser entrecruzados para modular sus propiedades y mantener la estabilidad de la matriz y así cumplir el objetivo de liberar el fármaco a lo largo del tiempo deseado. El quitosano, como se ha comentado, se disuelve en condiciones ácidas, lo que limita su aplicación como sistema de liberación. El entrecruzamiento puede reducir la solubilidad del quitosano en solventes acuosos, aumentar su resistencia a la degradación química o biológica y ayudar a controlar la liberación de principios activos desde la matriz formada. El glutaraldehído es un agente entrecruzante muy utilizado, pero su capacidad de transformación en especies reactivas tóxicas ha promovido la búsqueda de otros agentes y procedimientos de entrecruzamiento más seguros, como son el tripolifosfato sódico y otros [48].

### ***Tripolifosfato sódico***

El tripolifosfato sódico (TPP) es un agente entrecruzante no tóxico, reconocido como GRAS (general recognized as safe) por la FDA (Food and drug administration), que es capaz de formar geles al unirse con el quitosano por interacción iónica.

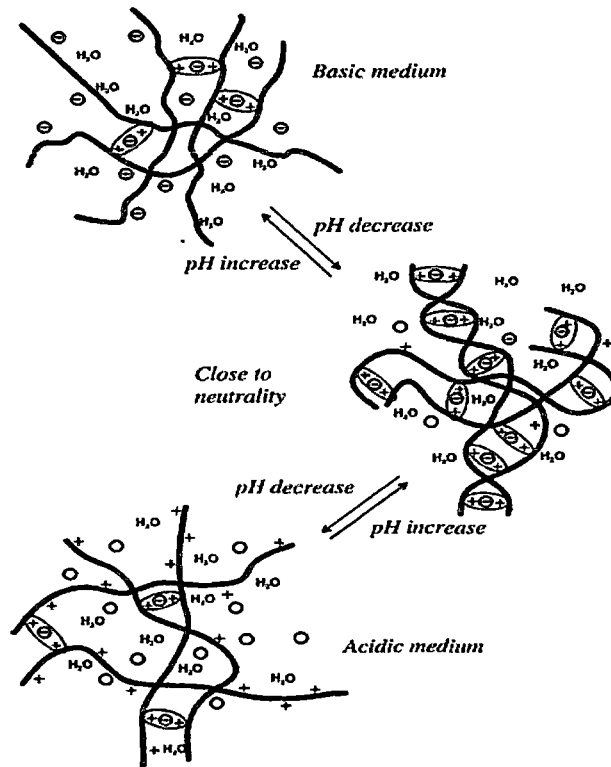
Desde que Bodmeier *et al.* (1989) [49] describiesen la preparación de complejos quitosano/TPP, la formación de complejos entre estas moléculas con cargas opuestas para obtener formulaciones que controlan la liberación de fármacos ha ganado interés puesto que se trata de un proceso muy simple.

Concretamente, la formulación de micro y nanopartículas por interacción iónica entre el quitosano y el tripolifosfato sódico es muy común porque implica la mezcla de dos fases acuosas a temperatura ambiente sin el uso de solventes orgánicos.

La reacción que se produce entre el quitosano y el TPP ha sido descrita en la bibliografía [50, 51]. El TPP ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ) disuelto en agua se disocia en iones tripolifosfóricos y en  $\text{OH}^-$  y la solución resultante tiene pH 9. Los  $\text{pK}_a$  del TPP son:  $\text{pK}_1=1$ ,  $\text{pK}_2=2$ ,  $\text{pK}_3=2,79$ ,  $\text{pK}_4=6,47$  y  $\text{pK}_5=9,24$  [52]. Los aniones procedentes del TPP ( $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ ,  $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$  y  $\text{H}_2\text{P}_3\text{O}_{10}^{3-}$ ) coexisten en solución acuosa en función del pH.

Dependiendo del valor de éste, predominarán unos u otros y de ello dependerá el tipo de interacción que ocurra entre el TPP y el quitosano. Cuando el TPP se disuelve en agua, con pH 9, se disocia en iones  $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  y, éste a su vez en  $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$  y en iones  $\text{OH}^-$ . Al añadir la solución de este agente entrecruzante (pH 9) a una solución de quitosano (pH ácido), los iones  $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$  y  $\text{HP}_3\text{O}_{10}^{4-}$  compiten con los  $\text{OH}^-$  por reaccionar con los grupos  $\text{NH}_3^+$  del quitosano por entrecruzamiento iónico, en el caso de los iones tripolifosfóricos o por desprotonación, en el caso de los  $\text{OH}^-$ .

A pH 9 de la disolución de TPP, por tanto, habrá grupos aminos neutralizados por los grupos hidroxilo y grupos amino entrecruzados iónicamente. Sin embargo, si el pH del TPP es ajustado a un pH ácido, sólo existirán iones tripolifosfóricos. El tipo de iones tripolifosfóricos y su proporción vendrán dados por el pH de la solución. En este caso, el complejo quitosano-TPP se forma exclusivamente por entrecruzamiento iónico entre los grupos  $\text{NH}_3^+$  y los aniones de TPP.



**Fig I.5.** Sensibilidad de la hinchazón de una reticulación iónica de un hidrogel de quitosano conteniendo una molécula iónica como reticulante:  $\Theta$  reticulante iónico cargado;  $O$  reticulante iónico descargado,  $+$ , carga positiva del quitosano,  $\bigcirc$ , interacción iónica,  $\text{—}$ , quitosano[53].

## 8. COMPUESTO DE CARGADO: ANTOCIANINAS

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano [54]. Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales, acumulados en las vacuolas de la célula [55]. Las antocianinas poseen diferentes funciones en la planta como son la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana.

El interés por los pigmentos antocianínicos e investigación científica se han incrementado en los últimos años, debido no solamente al color que confieren a los productos que las contienen sino a su probable papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes; a sus efectos antiinflamatorios y mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorantes, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano. A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su baja estabilidad y la falta de disponibilidad de material vegetal limitan su aplicación comercial [6,7].

### 8.1. Estructura de las Antocianinas y Color

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de tres carbonos. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (Figura I.6).

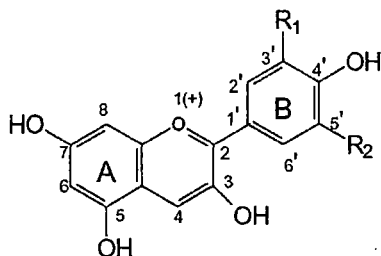


Fig I.6. Estructura de las Antocianinas [47].

Tabla I.3. Sustituyentes de las Antocianinas.

Aglicona	Substitución		$\lambda_{max}(nm)$
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	510 (azul-rojo)

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas.

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos

orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico. Stintzing *et al.*, 2002, demostraron que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura.

## 8.2. Factores químicos que determinan el color y la estabilidad de las Antocianinas

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento [6, 7]. Factores como su misma estructura química, pH, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, concentración y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento.

### 8.2.1. Efecto del pH:

Este es uno de los factores más importantes. Las antocianinas son más estables en un medio ácido que en un medio neutro o alcalino. En medio ácido la forma predominante es el ión flavilio, el cual posee color rojo cuando está sometida a pH básico o alcalino. El ión flavilio es susceptible a un ataque nucleofílico por parte del agua, produciéndose la pseudobase carbinol, esto es a pH 4.5 y seguido se forma la chalcona, las dos formas son incoloras. Conociendo esto, las antocianinas tienen su máxima expresión de color a pH ácidos (pH1), y su forma incolora se forma a pH neutros o alcalinos, debido a esta característica las antocianinas se utilizan a pH ácido o ligeramente neutro en la industria alimenticia.

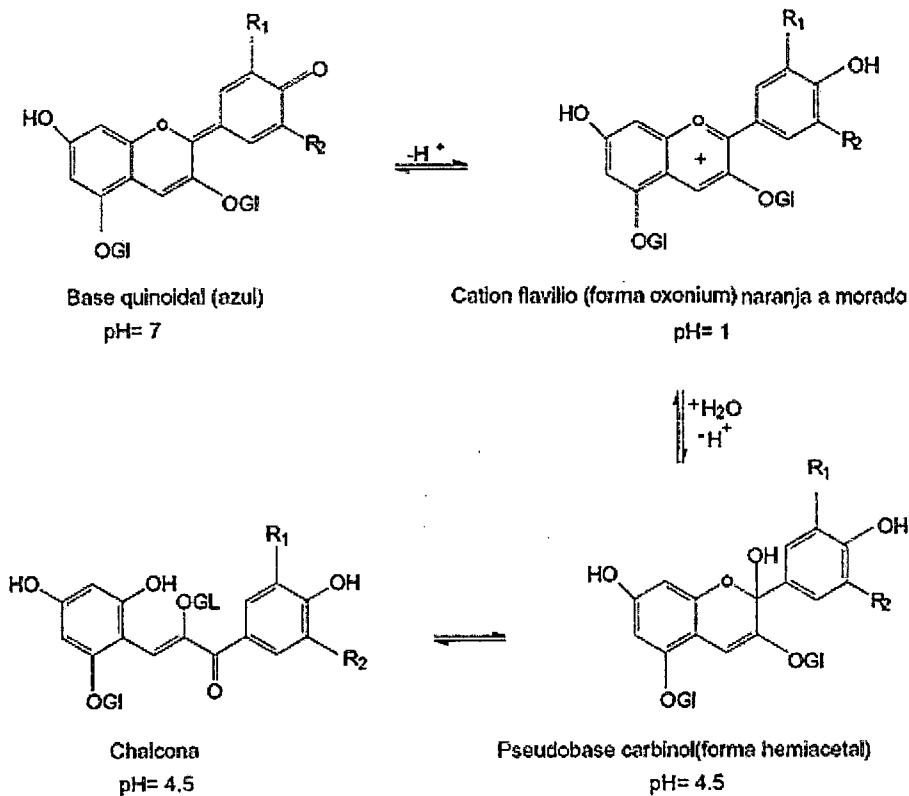
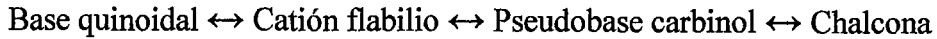


Fig I.7. Estructura de la Antocianina a diferentes pHs [56]

**8.2.2. Efecto de la temperatura:**

La antocianina es destruida por el calor durante el procesamiento y almacenamiento. Un incremento logarítmico en la destrucción de la antocianina se produce por un incremento en la temperatura. Se observó que el equilibrio entre las estructuras es endotérmico, en una dirección de izquierda a derecha [57]:



A altas temperaturas el equilibrio cambia hacia chalconas. El Retorno de chalconas a flabilio es lento.

**8.2.3. Efecto del oxígeno y el ácido ascórbico:**

El efecto degradativo del oxígeno y el ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas está relacionado. Se reportaron que las condiciones que favorecen la oxidación aeróbica del ácido ascórbico en jugo de fresa y en sistemas modelo que contenían pelargo-nidina-3-glucósido causaban grandes pérdidas de antocianinas, pero cuando el oxígeno era excluido del sistema no se observaba deterioro del color [58]. De igual manera, Markakis et al., reportó un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el oxígeno sobre la degradación de la pelargonidina-3-glucósido en solución [59]. En investigaciones más recientes, se confirmó la aceleración de la destrucción de antocianinas de fresa cuando el ácido ascórbico está presente tanto en sistemas naturales como en sistemas modelo [60]. El efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas ha sido explicado como una posible reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos [61].

**8.2.4. Efecto del Dióxido de azufre:**

Enzimas que destruyen a las antocianinas pueden ser inactivadas utilizando dióxido de azufre en bajas concentraciones (30 ppm). Por ejemplo pueden inhibir la degradación enzimática de antocianinas en cerezas agrias rojas sin blanquear. Bajas concentraciones también son utilizadas para estabilizar las antocianinas y altas concentraciones de dióxido de azufre en la región de los 10,000 ppm se utiliza para un blanqueo irreversible, que se utiliza en las cerezas rojas para la producción de maraschino, escarchadas o cerezas glace.

**8.2.5. Otros:**

Complejos de metal aparecen cuando las antocianinas reaccionan con aluminio cobre y hierro. La adición de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Al}^{3+}$  mejora la estabilidad de antocianinas.

**8.3. Actividad biológica de las antocianinas.**

El interés en los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas [62] y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante. Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que estas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas [63]. Estos resultados sugieren que las antocianinas son la explicación de la conocida "Paradoja Francesa". Aunque varias hipótesis existen, se propone que el bajo riesgo de la enfermedad coronaria en Francia se asocia con el alto consumo de vino tinto [64; 65]. De igual manera, se han demostrado que frutos rico en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y contra radicales peróxido, ( $\text{ROO}^\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) y oxígeno singulete ( $\text{O}_2$ ) [66,67].

A las antocianinas también se les atribuye actividad antitumoral y anticancerígena, demostraron que el suministro de papas púrpuras dulces y repollo morado a ratas de laboratorio, causan supresión de tumores [68]. De igual manera, reportaron efectos antitumorales al usar extractos de frijoles rojos de soya que contenían cianidina conjugada con glucosa y ramnosa [69]. En cuanto a la actividad anticancerígena, reportaron la supresión de células cancerígenas HCT-15 provenientes del colon humano y de células cancerígenas gástricas AGS al suministrar fracciones de antocianinas del vino tinto [70]. Así también, realizaron bioensayos que demuestran que los arándanos inhiben las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis [71]. Referente a la actividad antiinflamatoria, encontraron en extractos concentrados de antocianinas efecto inhibitorio de la producción de óxido nítrico en macrófagos activados [72]. Por otra parte, encontraron efecto supresor de prostaglandina EG2, sinónimo de actividad antiinflamatoria en extractos de antocianinas de frambuesa [73]. Antocianinas provenientes de cuatro especies de arándanos silvestres: *Amelanchier alnifolia*, *Viburnum trilobum*, *Prunus virginian* y *Shepherdia argentea*, muestran propiedades hypoglicémicas [74]. Tales frutos, con alto contenido de sustancias fitoquímicas, han sido consumidas tradicionalmente por tribus norteamericanas para la protección de enfermedades crónicas como diabetes.

Estudios clínicos realizados en Italia revelaron que 79% de los pacientes diabéticos consumidores de extracto de bayas rojas (160 mg dos veces al día durante un mes) mostraron alivio en los síntomas de retinopatía diabética. Finalmente, el mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo como resultado del consumo de antocianinas han sido reportados, suministraron extractos de frutas ricas en antocianinas a ratas con deficiencia ocular, lo cual resultó en un efecto antiinflamatorio y de aumento de la agudeza visual [75].

## **9. MODELOS MATEMÁTICOS DE CINÉTICAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA**

Los estudios de disolución/liberación *in vitro* constituyen un eslabón importante dentro de la cadena del desarrollo de un nuevo medicamento. Bajo ciertas condiciones puede servir para aportar criterios de biodisponibilidad y bioequivalencia. Un objetivo fundamental a la hora de desarrollar nuevos sistemas de liberación controlada, es poder predecir los niveles plasmáticos que alcanzará el fármaco una vez administrado. De esa forma, el desarrollo de los procesos de obtención de nuevos medicamentos puede ser acelerado, de modo que éstos pueden ponerse en el mercado con mayor brevedad y a menor precio. Por este motivo se han desarrollado numerosos modelos matemáticos que permiten predecir las cinéticas de disolución- liberación de los principios activos incluidos en los sistemas de liberación controlada, y por tanto su biodisponibilidad *in vivo*. Estos modelos permiten interpretar los resultados cuantitativos de un ensayo de liberación *in vitro* a través de una ecuación que relaciona varios parámetros [76]. Para comparar diferentes perfiles de liberación se pueden emplear métodos matemáticos (métodos modelo dependiente) y métodos estadísticos (métodos modelo independiente), que incluyen el análisis de la varianza, de una o dos vías (ANOVA).

Los modelos matemáticos facilitan el análisis cuantitativo de los resultados obtenidos en los ensayos de liberación/disolución, y describen los resultados de liberación en función de alguna de las características o variables de la formulación empleada [76].

### **9.1. Cinética de orden cero**

Las formas farmacéuticas que presentan esta cinética liberan la misma cantidad de fármaco por unidad de tiempo. Es el mecanismo de liberación ideal cuando se quiere conseguir una acción farmacológica prolongada.



La liberación del fármaco desde formas farmacéuticas que no se disgregan y que liberan el principio activo lentamente (asumiendo que el área no cambia y que no se alcanzan condiciones de equilibrio), puede ser representada por la siguiente ecuación:

$$W_0 - W_t = K_t \quad (I.19)$$

donde  $W_0$  es la cantidad inicial de fármaco en la forma farmacéutica,  $W_t$  es la cantidad de fármaco presente en la misma a tiempo  $t$  y  $K$  la constante de proporcionalidad.

Si esta ecuación se divide entre  $W_0$  y se simplifica, se obtiene:

$$f_t = K_0 t \quad (I.20)$$

donde:  $f_t = 1 - W_t/W_0$  representa la fracción de fármaco liberado a tiempo  $t$  y  $K_0$  la constante de liberación aparente o constante de orden cero. De esta forma, una gráfica de la fracción de fármaco liberado en función del tiempo será lineal si se cumplen las condiciones anteriores.

Otra forma de expresar este modelo se refleja en la siguiente ecuación:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (I.21)$$

donde  $Q_t$  es la cantidad de fármaco liberado a tiempo  $t$ ,  $Q_0$  es la cantidad inicial de fármaco en solución, que generalmente es cero y  $K_0$  es la constante de velocidad en la cinética de orden cero.

## 9.2. Cinética de primer orden

La aplicación de este modelo al estudio de la liberación de fármacos fue propuesto por primera vez por Gibaldi y Feldman en 1967 [77]. La cinética de orden uno presenta la siguiente ecuación de velocidad:

$$Q_t = Q_0 e^{K_1 t} \quad (I.22)$$

$$\ln Q_t = -K_1 t + \ln Q_0 \quad (I.23)$$

o en logaritmos decimales:

$$\log Q_t = -\frac{K_1 t}{2,303} + \log Q_0 \quad (I.24)$$

donde  $Q_t$  es la cantidad de fármaco liberado a tiempo  $t$ ,  $Q_0$  es la cantidad inicial de fármaco en la solución y  $K_1$  es la constante de primer orden.

De esta forma, la representación del logaritmo de la cantidad de fármaco disuelto frente al tiempo transcurrido da lugar a una recta en los procesos con cinética de primer orden.

Las formas farmacéuticas que siguen este perfil de disolución suelen ser matrices porosas que contienen principios activos hidrosolubles.

### 9.2.1. Modelo de Higuchi

Higuchi et. al desarrolló varios modelos teóricos para estudiar la liberación de fármacos solubles y poco solubles incorporados en matrices sólidas o semi-sólidas [78].

Este modelo describe la liberación del fármaco como un proceso de difusión a través de la matriz de polímero, siempre y cuando se mantengan las condiciones —sumidero‖ (del inglés *sink conditions*), es decir, que se garantice la solubilidad del fármaco en todo momento durante la liberación. Esta difusión está basada en la ley de Fick, que depende de la raíz cuadrada del tiempo. Generalmente se emplea lo que se conoce como ecuación simplificada de Higuchi:

$$Q = K_H t^{1/2} \quad (I.25)$$

donde  $Q$  es la cantidad de fármaco liberado y  $K_H$  es la constante de disolución de Higuchi.

### 9.2.2. Modelo de Hixson- Crowell o de la raíz cúbica

Hixson and Crowell [79], partiendo de la base de que el área regular de la partícula es proporcional a la raíz cúbica de su volumen propusieron la siguiente ecuación para describir este modelo:

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t \quad (I.26)$$

donde  $W_0$  es la cantidad inicial de fármaco en la forma farmacéutica,  $W_t$  es la cantidad de fármaco que queda en la forma farmacéutica a tiempo  $t$  y  $K_s$  es una constante que incorpora la relación superficie-volumen.

Dividiendo la ecuación anterior entre  $W_0^{1/3}$  y simplificando:

$$1 - f_t^{1/3} = 1 - K_\beta t \quad (I.27)$$

donde  $f_t = 1 - W_t/W_0$  representa la fracción de fármaco disuelto a tiempo  $t$  y  $K_\beta$  es la constante de liberación.

La gráfica de la raíz cúbica de la fracción de fármaco no liberada en función del tiempo será lineal si la forma farmacéutica disminuye de tamaño proporcionalmente en el tiempo. Cuando se utiliza este modelo, se asume que la velocidad de liberación está condicionada por la velocidad de disolución de las partículas de fármaco y no por la difusión que pueda ocurrir a través de la matriz polimérica.

### 9.2.3. Modelo de Korsmeyer-Peppas

Korsmeyer *et al.* [80] desarrollaron un modelo semiempírico sencillo que relaciona la liberación de fármaco con el tiempo a través de una ecuación exponencial. Estos autores plantearon que, en ocasiones, el mecanismo de difusión se desvía de la difusión Fickiana, siguiendo un comportamiento anómalo o no Fickiano. Es un modelo especialmente útil cuando se desconoce el mecanismo de liberación o cuando ésta ocurre por más de un mecanismo.

$$M_t/M_\infty = Kt^n \quad (I.28)$$

$$\text{Log}M_t/M_\infty = \text{Log}K + n\text{Log}t \quad (I.29)$$

donde  $M_t$  es cantidad de fármaco liberado a tiempo  $t$ ,  $M_\infty$  es la cantidad de fármaco que se liberaría a tiempo infinito (por tanto,  $M_t/M_\infty$  es la fracción de fármaco liberado a tiempo  $t$ ),  $K$  es la constante del sistema y  $n$  es el exponente difusional. La representación del  $\text{Log}M_t/M_\infty$  en función del  $\text{Log}t$  dará lugar a una línea recta si el sistema se ajusta a este modelo.

Según los valores que tome  $n$  se pueden definir distintos mecanismos de transporte [81]. En la Tabla I.4 se muestran los posibles mecanismos que se pueden observar en la liberación controlada de un principio activo utilizando una película polimérica como sistema regulador. Cuando  $n = 0,5$  se trata de una difusión Fickiana y la constante  $k$  puede expresarse como:

$$k = 4 \frac{D_t}{\pi \delta^2}^{1/2} \quad (I.30)$$

donde  $D_t$  es el coeficiente de difusión del fármaco desde el polímero y  $\delta$  el espesor de la matriz de polímero.

Valores de  $n > 0,5$  se asocian a un mecanismo de difusión anómalo (no Fickiano). En particular, cuando  $n = 1$ , se trata de la cinética de orden cero, que Peppas considera un caso límite de transporte no Fickiano, denominándolo "Transporte Caso II". En este caso, el transporte del soluto se realiza a velocidad constante debido a que el frente de hinchamiento del polímero avanza de forma constante. Este tipo de transporte está controlado por la relajación de las cadenas del polímero.

Cuando  $0,5 < n < 1$ , el proceso está dominado por procesos de difusión y relajación de las cadenas poliméricas. Valores de  $n > 1$  aparecen usualmente cuando los tiempos de liberación son muy elevados y a este tipo de transporte lo denominan "Transporte Supercaso II". Por último, valores de  $n < 0,5$  se asocian a la presencia de poros en la matriz polimérica y a la consiguiente difusión simultánea a través de la matriz hinchada y a través de los poros llenos de medio de disolución.

**Tabla I.4.** Resumen de los mecanismos de transporte de Solutos dependiendo del exponente difusional  $n$ .

<b>Exponente de liberación(n)</b>	<b>Mecanismo de transporte del fármaco</b>
0,5	Difusión Fickiana
$0,5 < n < 1$	Transporte anómalo
$n = 1$	Transporte Caso II
$n > 1$	Transporte Supercaso II

En la Tabla I.5 se muestran los valores del exponente difusional ( $n$ ) para matrices de liberación con diferentes geometrías y mecanismos de liberación.

**Tabla I.5.** Valores del exponente difusional en el modelo empírico de Korsmeyer-Peppas para sistemas de distinta geometría.

<b>Geometría de la matriz</b>	<b>Sistema controlado por difusión (Caso I)</b>	<b>Sistema controlado por hinchamiento (Caso II)</b>
<i>Lámina</i>	$n = 0,5$	$n = 1$
<i>Cilindro</i>	$n = 0,45$	$n = 0,89$
<i>Esfera</i>	$n = 0,43$	$n = 0,85$

## ***II. PARTE EXPERIMENTAL***

---

## 1. REACTIVOS:

En este trabajo se han utilizado los siguientes reactivos:

### Polímero:

- Quitosano (CS), suministrado por Sigma - Aldrich Chemistry, (Irlanda)

### Compuesto de cargado:

- Extracto de antocianinas atomizado, suministrado por Globenatural Internacional S.A.(Perú)

### Agente entrecruzante:

- Tripolifosfato de Sodio (TPP), suministrado por Sigma - Aldrich Chemistry, (USA)

### Otros:

- Nitrito de Sodio (G.A.)
- Hidróxido de Sodio (G.A.)
- Ácido Clorhídrico (G.A.)
- Cloruro de Sodio (G.A.)
- Células NCTC clone 929
- Medio de cultivo MEM
- Suero bobino fetal
- Solución de Atorvastatina (ATV )

## 2. MATERIALES:

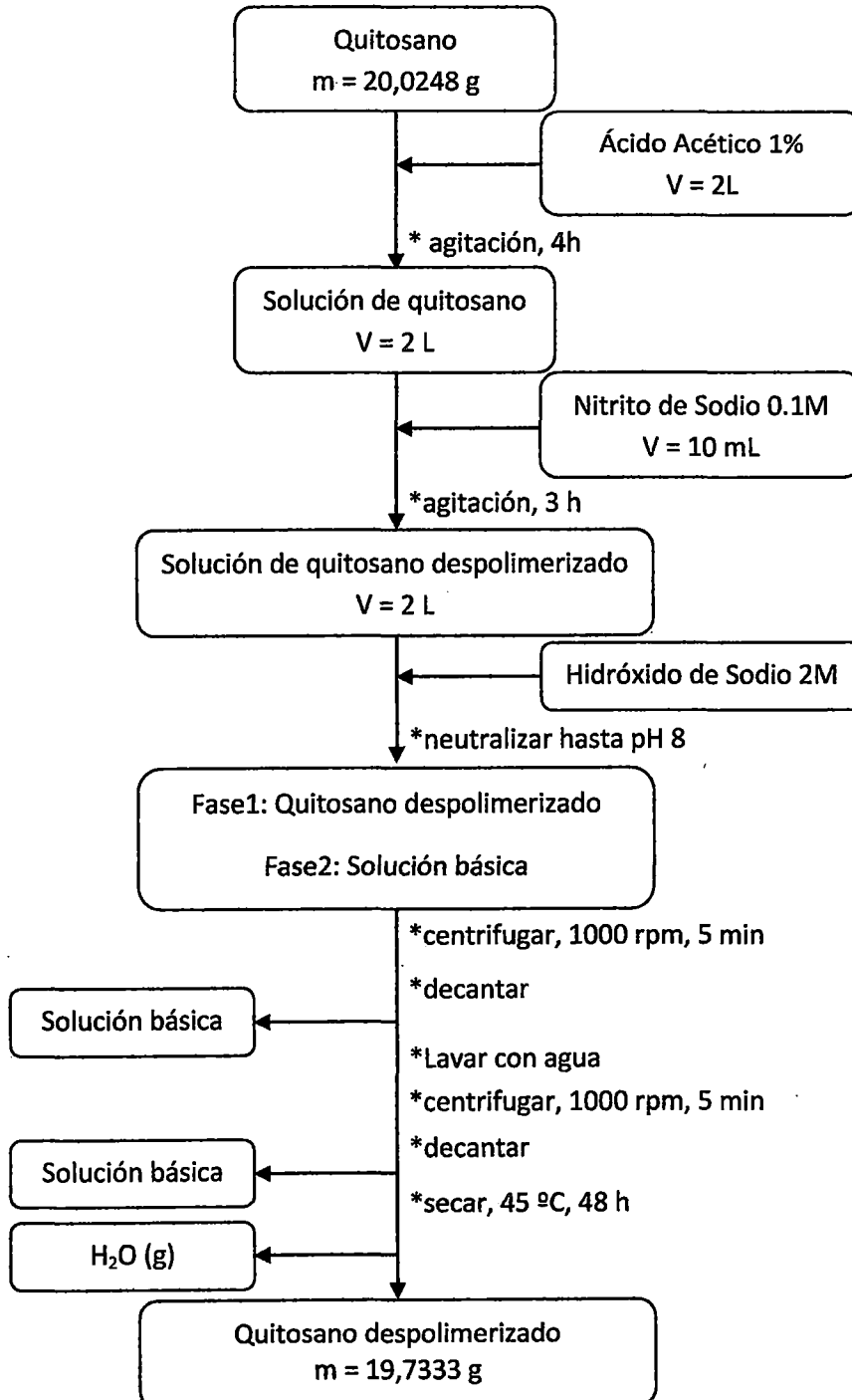
- Vasos de precipitado
- Espátula de vidrio
- Bagueta
- Bureta
- Probeta
- Fiolas
- Soporte de Acrílico (Anexo 1)
- Chaquetas de calentamiento de vidrio
- Desecador
- Viscosímetro de Oswald
- Termómetro

## 3. EQUÍPOS

- Estufa de calentamiento
- Agitador magnético
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Espectrómetro Infrarrojo
- Conductímetro
- Microscopio de Barrido Electrónico
- Equipo de análisis termogravimétrico
- Hemocitómetro

**4. OBTENCIÓN DE QUITOSANO DEPOLIMERIZADO:**

El quitosano despolimerizado se obtuvo mediante Degradación Oxidativa utilizando Nitrito de Sodio. Se preparó una solución de 1% (p/v) de quitosano en 1% (p/v) de ácido acético. Se adicionó de  $\text{NaNO}_2$  0,1M tal que la relación de moles entre el quitosano y el nitrito sea 0,01 , posteriormente se mantuvo en reacción durante 3h con agitación constante. La recuperación del quitosano despolimerizado se realizó con Hidróxido de Sodio, llevando la solución hasta pH 8, para después proceder a un lavar con agua. Finalmente se recuperó el quitosano por centrifugación a 1000 rpm por 5 min y se secó en estufa durante a 45 °C hasta peso constante. En la Fig II.1 se muestran un diagrama del proceso de despolimerización [82].



**Fig II.1.** Diagrama del proceso de obtención de Quitosano Depolimerizado.

## **5. CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO (CS) Y QUITOSANO DEPOLIMERIZADO :**

### **5.1. Espectroscopía Infrarroja**

Los espectros de infrarrojo del quitosano se obtuvieron en forma de películas con un Magna-IR 750 (Nicolet) por el método de transmisión (Unidad de Espectroscopía de Infrarrojo, Laboratorio de Espectroscopía Molecular, Instituto de Química, Universidad de São Paulo, (Brasil). Las muestras se midieron con un beamsplitter de KBr y un detector DTGS de KBr entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  de longitud de onda. Las muestras de películas de quitosano se midieron a 4  $\text{cm}^{-1}$  con 128 acumulaciones.

### **5.2. Grado de Desacetilación**

El grado de desacetilación se calculó por dos métodos diferentes, por conductimetría y por espectroscopia infrarroja

#### **5.2.1. Conductimetría**

Se pesaron 200 mg de quitosano, posteriormente se adicionó 5 mL de HCl 1.0M, hasta disolver la muestra completamente. Se agregaron 450 mL de NaCl 0,001M, y se llevó a agitación para lograr una solución uniforme. La solución anterior se tituló conductimétricamente con 60mL de NaOH 0.1M estandarizado. La titulación se realizó descargando 0,5 mL de NaOH 0.1M, anotando las lecturas del conductímetro.

#### **5.2.2. Espectroscopía Infrarroja**

El grado de desacetilación se calculó utilizando los espectros infrarrojos obtenidos anteriormente; se miden las absorbancias de dos bandas diferentes del espectro, en este caso el pico de 1655  $\text{cm}^{-1}$  y 3450  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos amida y amina respectivamente, también se utilizan las líneas base de Baxter [27] para el cálculo. Se utilizan las ecuaciones correspondientes I.2 y I.3, a las líneas base tomadas y se calcula el grado de desacetilación.

### **5.3. Determinación del peso molecular**

Se preparó una solución de 0,2M de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  en 0,1M de NaCl que se utilizó como disolvente (buffer) para preparar las diferentes concentraciones de quitosano: 0,25%, 0,125%, 0,0625%, 0,03125% y 0,015625 (w/v).

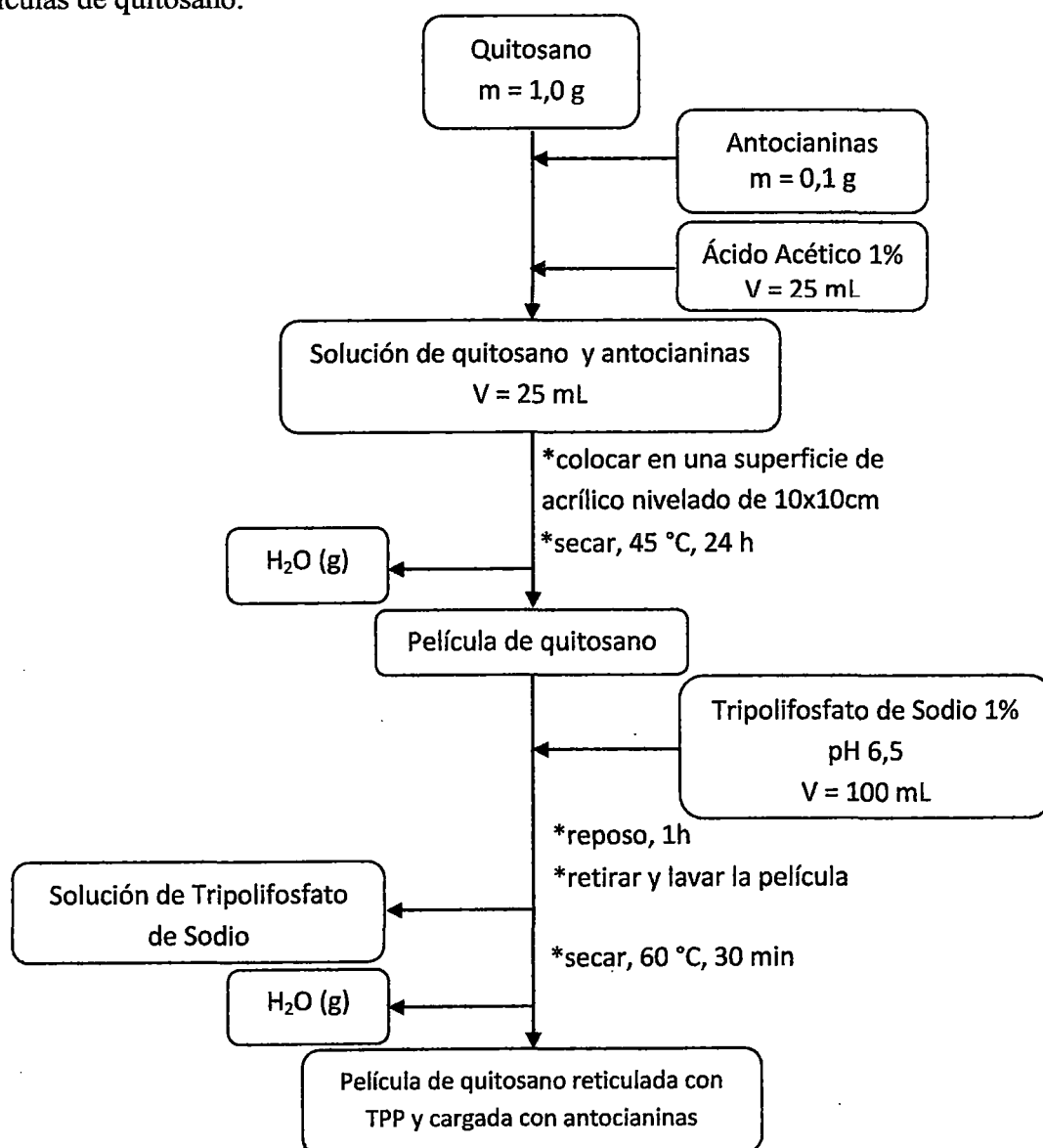
Se midió la densidad de las soluciones utilizando un picnómetro con brazo lateral y la viscosidad utilizando un Viscosímetro de Oswald.

Estas mediciones se realizaron en un baño de temperatura constante de 30 °C, por triplicado, también se realizaron para el buffer y el agua destilada.

## 6. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO:

Las películas de quitosano cargadas con antocianinas se obtuvieron por el método de evaporación de solvente. Se preparó una solución de quitosano al 1% (w/v) en ácido acético 1%(v/v) y se añadió 0,1 g de extracto de antocianinas atomizado. Para esto se pesó 1,0 g del polímero y la cantidad indicada de la antocianina y se disolvieron en 25mL de ácido acético 1%(v/v), con agitación constante durante 4 h.

Se colocaron 25 mL de solución en una superficie de acrílico (Anexo 1) de 10,0 cm x 10,0 cm y se niveló horizontalmente. Se llevó el soporte con la solución a una estufa a 45°C durante 24 h. Se retiró la película seca preparada de la superficie de soporte. Se sumergió la película preparada en 100 mL solución de TPP 1% durante un tiempo determinado (1/2 a 4 h). Finalmente se secó la película en una estufa a 60 °C durante 30 min para luego ser almacenada en un desecador. En la Fig II.2 se muestra un diagrama de la preparación de películas de quitosano.



**Fig II.2.** Diagrama del proceso de obtención de Películas de Quitosano cargado con Antocianinas.



## **7. CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO:**

### **7.1. Estudios de morfología**

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) presentadas en este trabajo se obtuvieron en el Laboratorio de Películas delgadas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

Las muestras de películas, se adhirieron con una cinta de doble haz adhesivo sobre los portamuestras cilíndricos.

Las muestras se metalizaron con Au utilizando un recubridor de oro (Electron Microscopy Science, EMS-550). Se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo Philips 505.

### **7.2. Espectroscopia Infrarroja**

Los espectros de infrarrojo del quitosano se obtuvieron en forma de películas con un Magna-IR 750 (Nicolet) por el método de transmisión (Unidad de Espectroscopía de Infrarrojo, Laboratorio de Espectroscopía Molecular, Instituto de Química, Universidad de São Paulo, (Brasil). Las muestras se midieron con un beamsplitter de KBr y un detector DTGS de KBr entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  de longitud de onda. Las muestras de películas de quitosano se midieron a 4  $\text{cm}^{-1}$  con 128 acumulaciones.

### **7.3. Análisis Termogravimétrico:**

Se tomó una masa de 5 mg de muestra, y se llevó a cabo el análisis termogravimétrico (TGA) con el uso del programa de calentamiento del equipo SDT Q600 V8.3 Build 101, perteneciente al Instituto de Química de la Universidad de São Paulo – São Carlos, donde se utilizó un intervalo de temperatura desde 30 hasta 1000 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 grado/min y un flujo de aire seco de 50 mL/min. Se calculó la primera derivada ( $dm/dT$ ) a las curvas calorimétricas obtenidas, para determinar la temperatura de máxima velocidad de descomposición.

### **7.4. Grado de Hinchamiento:**

El hinchamiento de las películas se llevó a cabo en PBS a pH 6,5. Se utilizaron para ello muestras de películas con una superficie de 10  $\text{cm}^2$  y que no contenían principio activo. Se pesó el fragmento de película en una placa *Petri* y se anotó su peso exacto, se añadieron 50 mL de medio atemperado y en un agitador magnético a 37 °C y 100 rpm. A intervalos de tiempos predeterminados, la película se extrajo y, de forma rápida y cuidadosa, se secó ligeramente sobre un papel de filtro para eliminar el exceso de líquido, se pesó y se volvió a introducir en la placa. El grado de hinchamiento (W) se determinó mediante la siguiente expresión (I.17):

$$W = \frac{M - M_0}{M_0}$$

donde M es el peso a tiempo t y  $M_0$  el peso a tiempo cero. Posteriormente estos valores se utilizaron en el análisis cinético.

### 7.5. Ensayo Citotóxico:

Con el fin de estudiar el efecto de la liberación de sustancias nocivas de una película de quitosano reticulada sobre una línea celular se realizó el ensayo de toxicidad.

#### Preparación de la suspensión de la célula:

Se cultivaron Células NCTC clon 929 en un frasco de cultivo celular, con medio de cultivo MEM suplementado con suero bovino fetal al 10%. Después de un crecimiento en cultivos celulares las celdas resaltadas fueron tratadas con una solución de ATV. Las células se contaron en un hemocitómetro (cámara de recuento de Newbauer) y la suspensión celular fue tratada hasta obtener  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^3$ . Se distribuyó la suspensión celular en microplacas. Se distribuyó un volumen de  $0,2 \text{ cm}^3$  de suspensión celular en cada pocillo de cultivo celular (microplacas de 96 pozos). La placa fue incubada a  $37^\circ \text{C}$  y atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$  durante aproximadamente 24 horas para la adhesión y formación de una capa de células en la parte inferior de cada pozo.

#### Preparación de las muestras

Se sumerge 0,5 g de la película o partícula de quitosano en 10 mL de MEM (medio de cultura) y se dejan reposar por 24 h. El extracto es sometido al test.

#### Test propiamente dicho

Se colocó en tres pozos que contienen células adheridas, controles positivos y negativos; se sometieron al mismo procedimiento de la muestra. Como control positivo se utilizó una solución de fenol y 0.02% como control negativo el extracto resultante del vertido de cloruro de polivinilo (PVC) en medio de cultivo MEM no tóxico durante 24 horas a  $37^\circ \text{C}$ . Para el control de las células se colocaron pozos de  $0,2 \text{ cm}^3$  de medio MEM.

La placa se mantuvo entonces en una estufa a  $37^\circ \text{C}$  y atmósfera húmeda con  $\text{CO}_2$  al 5% durante 24 horas. Después de este período los medios de cultivo fueron intercambiados por medio fresco con  $50 \mu\text{g cm}^{-3}$  colorante rojo neutro y se incubaron durante 3 h. Después de este período (tiempo necesario para la incorporación de la muestra por células vivas) la placa se lavó dos veces con tampón fosfato salino y una vez con una solución de  $\text{CaCl}_2$  en formaldehído y luego cada uno recibió  $0,2 \text{ cm}^3$  de solución de ácido etanol acético. La placa fue llevada a un lector de ELISA, se agitó durante 10 minutos y la lectura fue hecha a 540 nm, tomando como referencia el filtro de 630 nm.

### 8. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*:

Los ensayos de liberación se llevaron a cabo introduciendo la película de quitosano cargada con antocianinas en 50 mL de tampón de fosfato salino (PBS) a pH 6.5 e incubando en un agitador orbital en las mismas condiciones experimentales descritas en el apartado anterior. A tiempos predeterminados se tomaron 2 mL del medio de liberación y se repuso con el mismo volumen de medio. Se adicionaron 2 mL de HCl 1M o 2 mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  5%, dependiendo del método utilizado para cuantificar las antocianinas. La cantidad de fármaco liberado en los 2 mL de la muestra en cada tiempo se determinó por espectrofotometría UV-VIS, mediante el método I y II de la determinación espectrofotométrica de antocianinas (Anexo 4). La longitud de onda correspondiente a la máxima absorción se determinó mediante barridos entre 300 y 600 nm, siendo de 515.2 nm.

Se realizaron los ajustes de los perfiles de liberación a los modelos matemáticos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas.

### ***III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

---

# 1. CARACTERIZACIÓN Y DEPOLIMERIZACIÓN DE QUITOSANO.

## 1.1. Caracterización de Quitosano.

En este apartado se muestran los resultados de la caracterización del quitosano de partida por los diversos métodos indicados en el capítulo anterior.

### 1.1.1. Espectroscopía Infrarroja

Se obtuvo el espectro de quitosano de partida, como se puede ver en la Fig III.1 se muestran los picos de los grupos característicos en la estructura del quitosano.

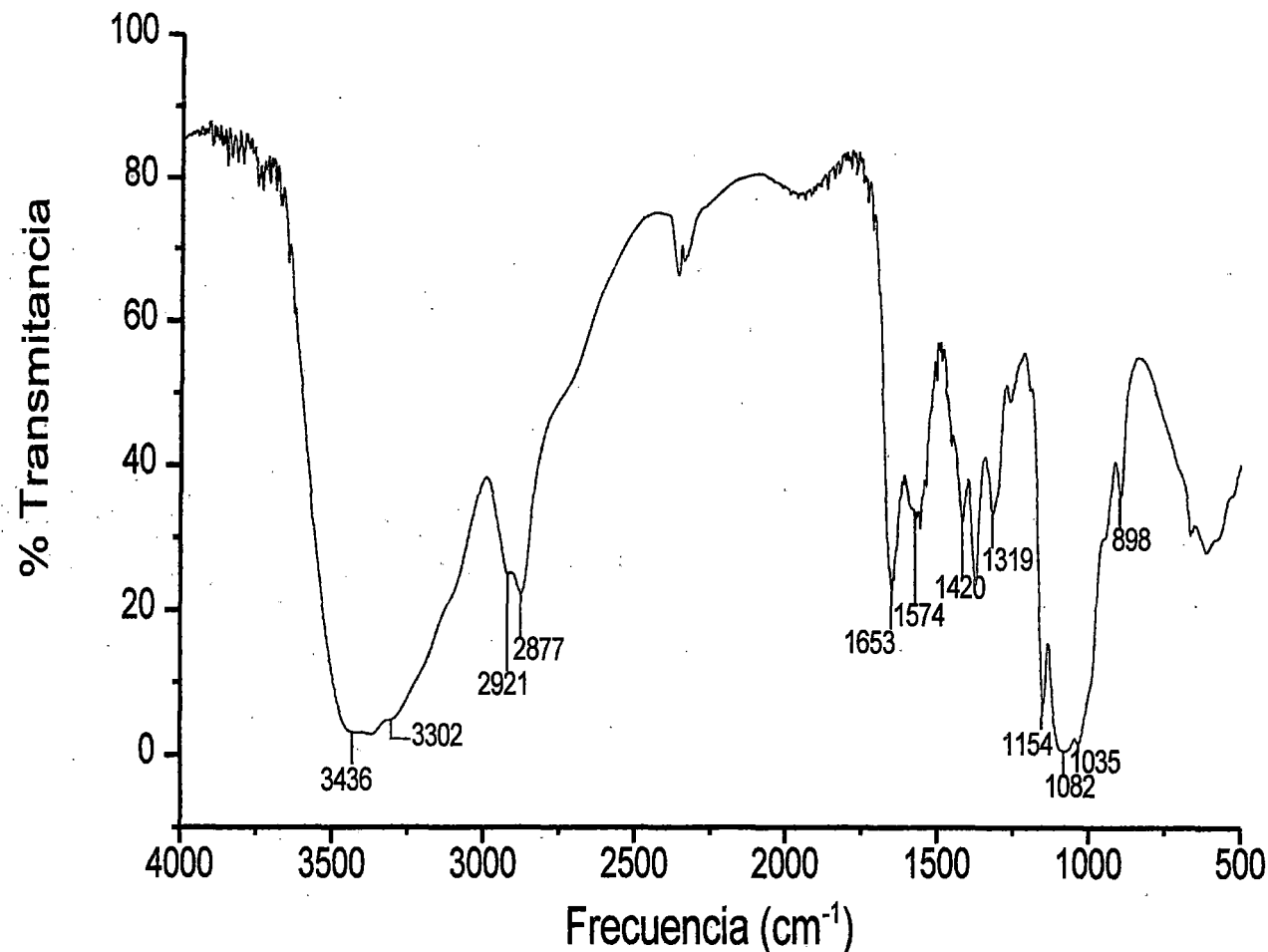


Fig III.1. Espectro IR de quitosano

En esta muestra, el espectro describe bandas características, la absorción a  $1653$  y  $1574\text{ cm}^{-1}$  las cuales son atribuidas a la deformación de axial o deformación de Tensión de la amida I  $-(C=O)NH-$  y a la deformación angular o deformación de flexión de la amina  $-(N-H)-$  respectivamente, el pico que se encuentra aproximadamente  $1420\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la deformación angular asimétrica de  $C-CH_3$ , estos enlaces son característicos del grupo acetilo e indican la presencia de grupos funcionales acetilo en algunos monómeros de quitosano.

Las bandas a  $3436$  y  $3302$  son concernientes a la deformación axial o de los grupos  $O-H$  y  $N-H$  respectivamente; estos picos indican la desacetilación eficaz de la quitina.

A continuación se muestran los principales grupos funcionales, con sus respectivas longitudes de onda.

Tabla III.1: Grupos funcionales del espectro IR del quitosano

Grupo Funcional	Tipo de vibración	$\nu$ Experimental ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu$ referencia [23] ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad del pico
Grupo -OH	V. Tensión de O-H	3436	3450	Fuerte
Grupo -NH	V. Tensión de N-H	3302	3292	Fuerte
Grupo -CH	V. Tensión simétrica C-H	2920	2919	Media
	V. Tensión Asimétrica de C-H	2876	2862	
Grupo -(C=O)NH-	V. Tensión (C=O) Banda de Amida I	1653	1655	Media fuerte
Grupo -NH-	V. Flexión N-H	1574	1580	Media fuerte
Grupo -CH <sub>3</sub>	V. Tensión C-CH <sub>3</sub>	1420	1450-1400	Media
Grupo -(C=O)NH-	V. Flexión N-H Banda de Amida II	1319	1313	Media
Grupo C-O-C	V. Tensión asimétrica del C-O-C	1154	1154	Fuerte
	Vibraciones de su estructura piranósica	1082 y 1035	1082 y 1032	Fuertes
	Tensión C-H de grupos anoméricos	897	896	Débil

### 1.1.2. Grado de Desacetilación: Conductimetría

Se realizó una valoración conductimétrica del quitosano disuelto en un volumen en exceso conocido de ácido clorhídrico, titulando con hidróxido de sodio. (Fig III.2)

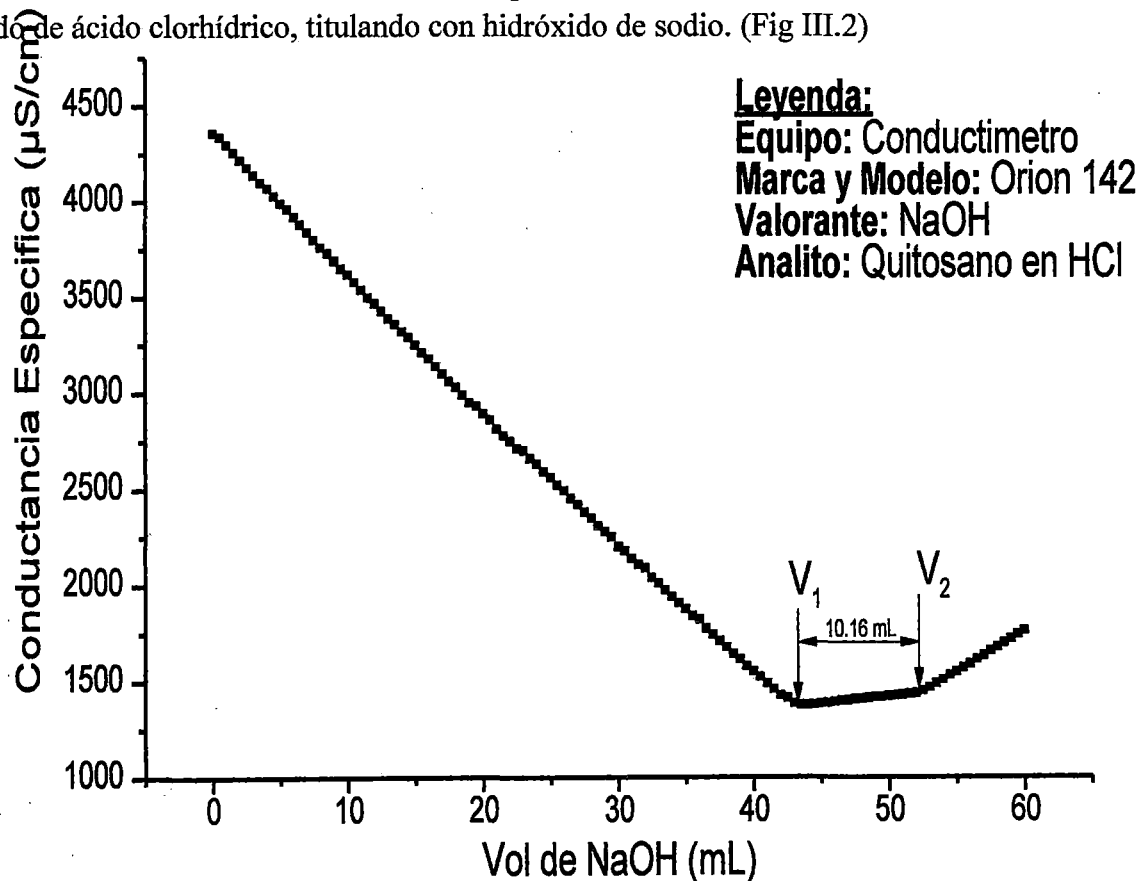
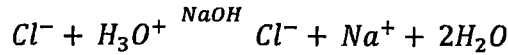
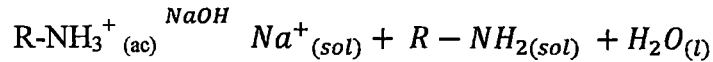


Fig III.2. Valoración Conductimétrica de quitosano

En la primera parte de la valoración se puede ver una parte lineal propia de la titulación de HCl con NaOH, ácido fuerte con base fuerte, la reacción que tiene lugar es:



Inicialmente la conductividad de la disolución ácida es grande porque los iones  $H^+$  tienen una movilidad muy alta. Conforme se va produciendo la neutralización, los iones  $H^+$  libres reaccionan con cada  $OH^-$  añadido, y dejando iones  $Na^+$  libres que poseen una menor movilidad, esto hace que la conductividad disminuya rápidamente, lo que se manifiesta en la curva como una disminución casi lineal de la conductividad de la solución. Cuando se alcanza el punto mínimo de la curva, el HCl se ha consumido en su totalidad, empieza entonces la titulación de los grupos amino protonados según la reacción:



Se produce un incremento de la conductividad debido a la neutralización de los grupos amino protonados del quitosano.

Cuando la neutralización se completa, la curva ascendente adquiere una mayor pendiente debido a la incorporación de los iones  $OH^-$  libres. Los cambios de pendiente que se observan en los dos puntos mencionados presentan cierta curvatura. Este hecho se debe, en el primer caso, a la disociación inicial de los grupos amino protonados del quitosano y, en el segundo caso, a la precipitación del quitosano, fenómeno que ocurre a pH 6,5. De esta forma, la equivalencia se calcula determinando las posiciones de las intersecciones de las ramas correspondientes de la curva. La diferencia entre los dos puntos de intersección corresponde al volumen de NaOH requerido para neutralizar los grupos amino libres del quitosano, lo que permite determinar el grado de N-acetilación de la muestra.

En el punto de equivalencia:

$$\#Eq - g_{(R-NH_2^+)} = \#Eq - g_{(NaOH)} \quad (III.1)$$

$$\frac{w_{(R-NH_2^+)} \times \theta}{M} = C_{NaOH} \times V_{NaOH} \quad (III.2)$$

Así, obtenemos el Grado de desacetilación, utilizando la siguiente ecuación [78]:

$$\% NH_2 = \frac{C_{NaOH} \times \Delta V_{NaOH}}{w \text{ quitosano}} \times 16.1$$

Donde 16.1 es una constante que relaciona el peso equivalente del quitosano.

Se obtuvo el siguiente cuadro de resultados ( $NH_2\% = DD$ )

**Tabla III.2.** Datos y Resultados de Grado de desacetilación por conductimetría de Quitosano (CS)

Muestra	$C_{NaOH}$	w quitosano	$\Delta V_{NaOH}$	DD(%)	DD Total (%)
CS-1	0,0922	0,1936	10,16	77,93	78,87
CS-2	0,0928	0,1937	10,35	79,81	

### 1.1.3. Grado de Desacetilación: Espectroscopía Infrarroja

El grado de desacetilación es calculado usando las líneas bases de Baxter et. al. [27], la ecuación (I.2) que involucra la línea base es:

$$DD (\%) = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1.33] - \text{Línea base}$$

En la Fig III.3 procedemos a trazar las líneas bases y calculamos las absorbancias a 1655 y 3436  $\text{cm}^{-1}$  e introducimos los datos en la ecuación (I.2).

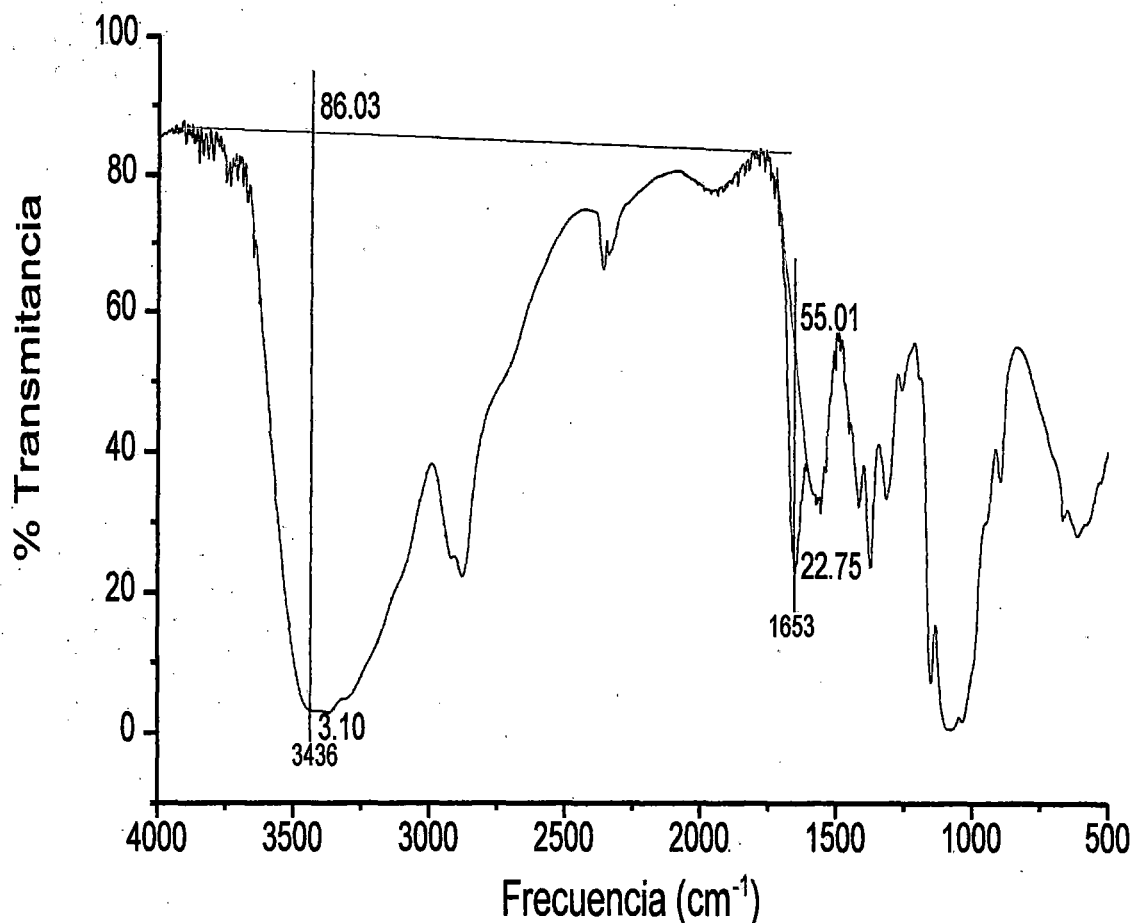


Fig III.3. Cálculo del grado de desacetilación por IR

Así obtenemos los siguientes datos:

$$A_{3436} = -\log(3,10/86,03) = 1,44$$

$$A_{1652} = -\log(22,75/55,01) = 0,38$$

$$DD = 100 - [(A_{1652} \times 100 / A_{3436}) / 1,33]$$

$$DD = 80,16\%$$

Como podemos observar, los resultados obtenidos de estas determinaciones por ambos métodos, son bastante aproximados, por lo que se pueden considerar en las determinaciones de peso molecular. La diferencia en los valores está determinada por el número de repeticiones en el caso de una determinación conductimétrica así como también por la adecuada elección de la línea base

en el método Infrarrojo. Cabe resaltar la importancia de la ausencia de agua en la muestra que puede alterar el espectro y dar resultados errados.

#### 1.1.4. Determinación del peso molecular

##### Determinación de constantes MHS

Para la determinación del peso molecular, es necesario el cálculo de las constantes  $K$  y  $a$  correspondientes al quitosano trabajado. Según Mark-Houwink-Sakurada (MHS) [83], se pudo recopilar los siguientes datos de constantes  $K$  y  $a$  para algunos casos.

Tabla III.3. Constantes MHS para el quitosano con variación de DA. [83]

Solvente	T (°C)	DA (%)	pH	$\mu$ (M)	$K \times 10^6$ (L/g)	$a$
0.2M HAc/0.1M NaAc	30	0	4,4	0,1	16,8	0,81
0.2M HAc/0.1M NaAc	30	9	4,4	0,1	6,589	0,88
0.2M HAc/0.1M NaAc	30	16	4,4	0,1	1,424	0,96
0.2M HAc/0.1M NaAc	30	31	4,4	0,1	0,104	1,12

Se puede obtener los gráficos siguientes a partir de los datos de la Tabla III.5.

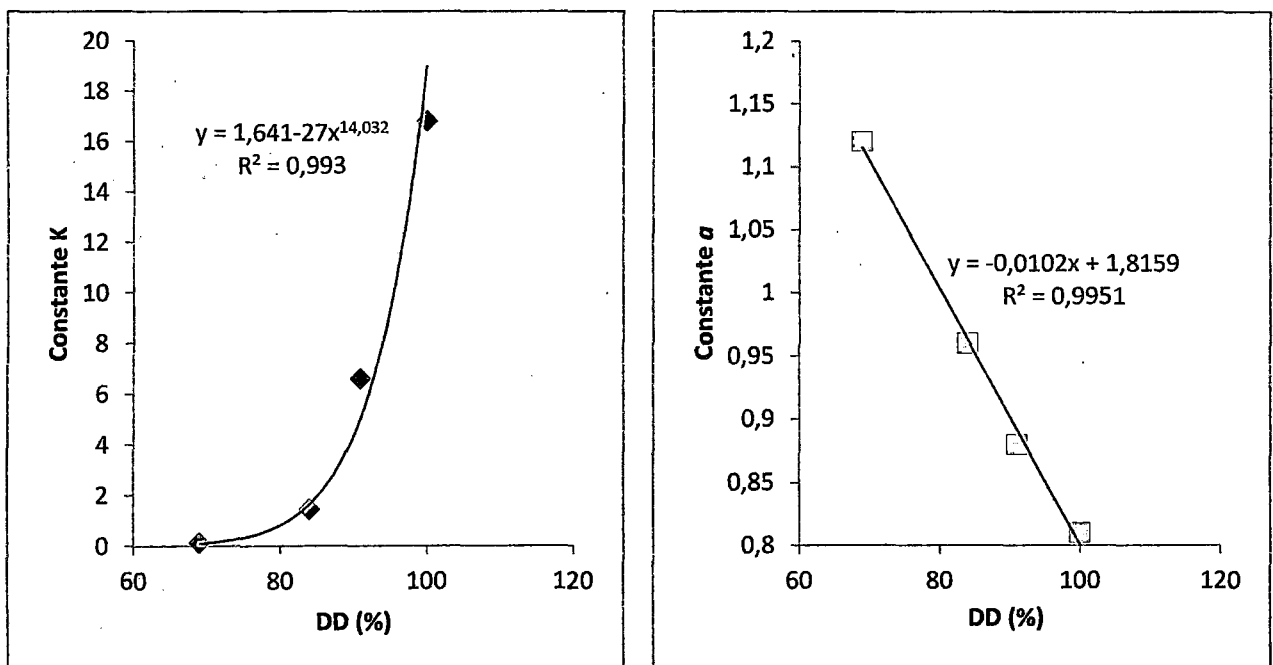


Fig III.4. Gráfico de Constantes  $K$  y  $a$  en función del grado de desacetilación (DD).

Mediante la Fig III.4 podemos derivar las siguientes ecuaciones

$$K(10^6 L/g) = 1,641 \times 10^{-27} x DD^{14,032} \quad (\text{III.4})$$

$$a = -0,0102DD + 1,8159 \quad (\text{III.5})$$

Mediante estas ecuaciones podemos calcular las constantes necesarias para determinar el peso molecular del quitosano trabajado, sólo basta conocer los parámetros ya mencionados como el tipo de solvente, la temperatura de trabajo, pH, entre otros y hacer una determinación del grado de desacetilación de la muestra.



### Determinación del peso molecular de quitosano

En la Tabla III.4 se muestran las medidas de densidad tomadas de la muestra de quitosano a diferentes concentraciones.

Tabla III.4. Datos tomados de las soluciones de quitosano

Muestra	Concentración (g/100mL)	V (mL)	M (g)	Tiempo (s)
H <sub>2</sub> O	0	10	9,6729	12,10
Buffer	0	10	9,7200	12,40
CS1	0,1260	10	9,7243	23,09
CS2	0,2519	10	9,7328	42,47
CS3	0,5039	10	9,7484	114,59
CS4	1,0078	10	9,7561	360,12

Utilizando la Ecuación (I.12) calculamos la Viscosidad de las soluciones tomadas.

Las demas viscosidades las calculamos de las siguiente manera:

$$\text{Viscosidad relativa: } \eta_r = \frac{\eta_{sol}}{\eta_{ste}} \quad \text{III.6}$$

$$\text{Viscosidad específica: } \eta_{sp} = \frac{\eta_{sol}}{\eta_{ste}} - 1 \quad \text{III.7}$$

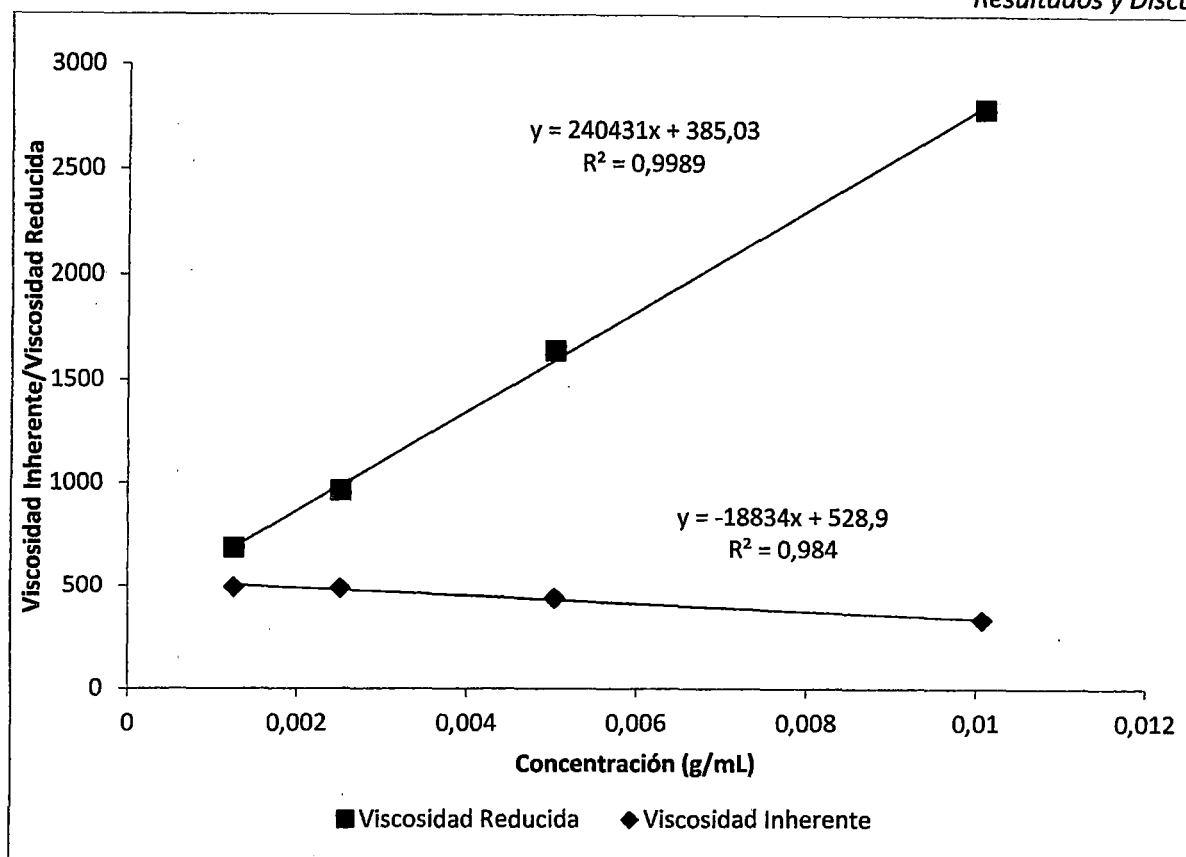
$$\text{Viscosidad inherente: } \eta_{inh} = \ln(\eta_r)/C \quad \text{III.8}$$

$$\text{Viscosidad reducida: } \eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad \text{III.9}$$

Tabla III.5. Densidad y Viscosidad de las soluciones de quitosano

Muestra	Densidad (g/mL)	Viscosidad (Pa s)	$\eta_{inh}$	$\eta_{red}$
H <sub>2</sub> O	0,9673	0,0007369	-	-
Buffer	0,9720	0,0007583	-	-
CS1	0,9724	0,0014137	494,19	685,60
CS2	0,9733	0,0026019	489,23	964,54
CS3	0,9748	0,0070323	441,93	1641,38
CS4	0,9756	0,0221170	334,59	2793,42

Con estos valores se pudo calcular la viscosidad relativa, viscosidad específica, viscosidad inherente y viscosidad reducida para posteriormente realizar el siguiente gráfico.



**Fig III.5.** Gráfico de concentración de quitosano vs Viscosidad reducida e Inherente

Con las dos rectas, se puede estrapolar hasta  $C=0$ , se utilizan  $K = 853,97 \times 10^{-6}$  y  $a = 0,997$  correspondiente a un  $DD = 80,16$  utilizando las ecuaciones (III.5) y (III.6):

$$[\eta] = (\eta_{sp}/C)_{C=0} = (\eta_{inh})_{C=0} = 457,1 \text{ mL/g}$$

$$[\eta] = K (M_v)^a$$

$$M_v = \frac{457,1}{853,97 \times 10^{-6}}^{\frac{1}{0,997}}$$

$$M_v \approx 554,22 \text{ kDa}$$

En la siguiente tabla se resume los resultados de la caracterización del quitosano

**Tabla III.6.** Resultados de Caracterización de Quitosano

Análisis	Resultado Experimental	
<b>Grado de Desacetilación</b>	Conductimetría 78,87%	Infrarrojo 80,16%
<b>Masa molecular</b>	554,22 kDa	
<b>Estructura</b>		

## 1.2. Caracterización de Quitosano Depolimerizado (CSD-II).

Con la finalidad de obtener oligómeros y materiales de bajo peso molecular basados en este biopolímero, se realiza la depolimerización del quitosano, esta es un área de mucho interés actual por diversas razones. Una de ellas, se sustenta en que varios derivados de bajo peso molecular muestran mayor solubilidad en medios acuosos de pH neutro que sus homólogos de mayor tamaño. Las soluciones de quitosano que podríamos obtener sólo están limitadas por su viscosidad, es decir que ahora podríamos preparar soluciones con mayor concentración.

En este apartado se muestran los resultados de la caracterización del quitosano depolimerizado por los diversos métodos indicados en los materiales y métodos.

### 1.2.1. Espectroscopía Infrarroja

Se caracterizó el quitosano obtenido mediante espectroscopía infrarroja, se determinaron los picos principales:

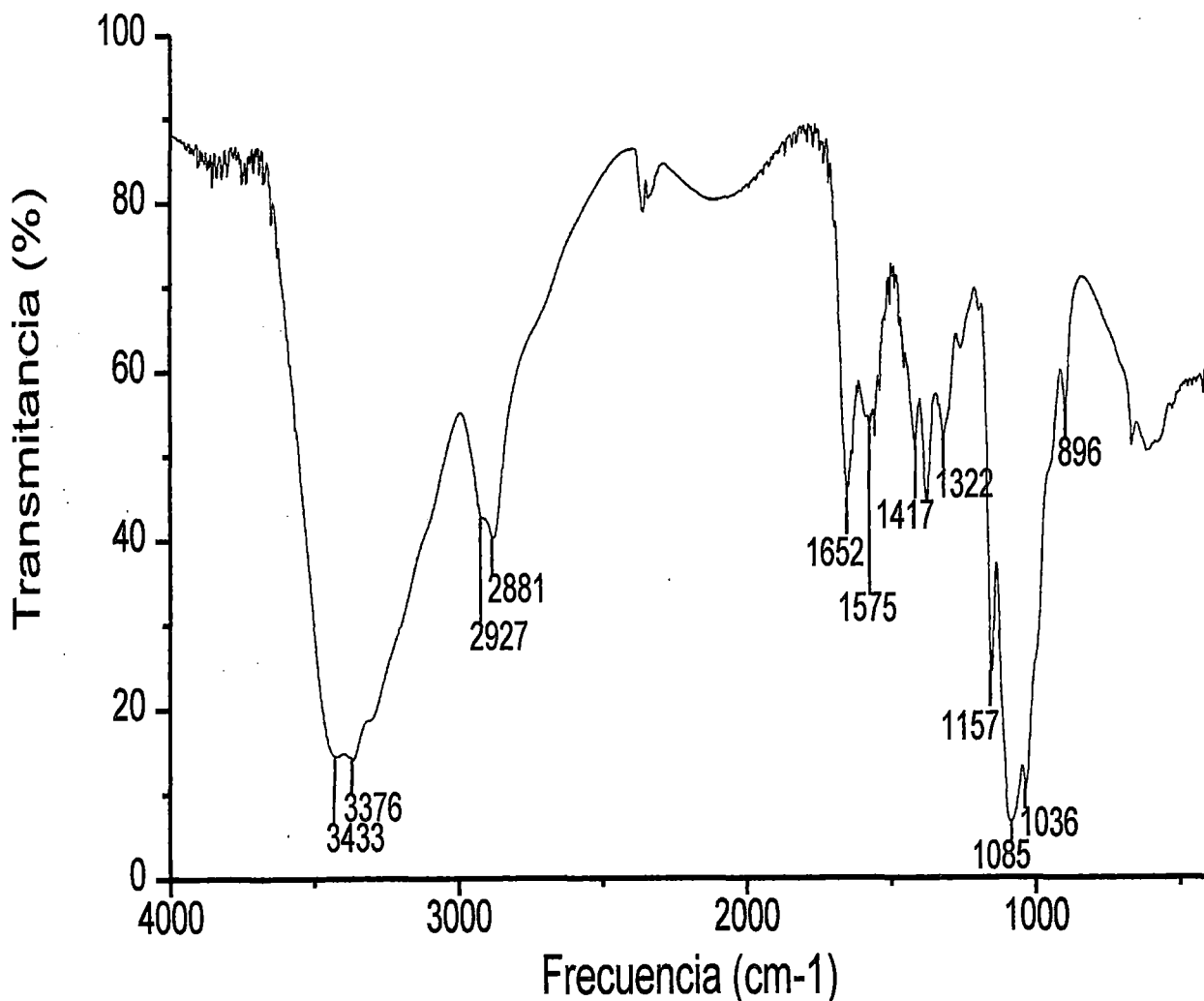


Fig III.6. Espectro IR de quitosano

A continuación se muestran los principales grupos funcionales en el espectro, con sus respectivas longitudes de onda.

Tabla III.7. Grupos funcionales del espectro IR del quitosano depolimerizado

Grupo Funcional	Tipo de vibración	$\nu$ Experimental ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu$ referencia[23] ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad del pico
Grupo -OH	V. Tensión de O-H	3433	3450	Fuerte
Grupo -NH	V. Tensión de N-H	3376	3292	Fuerte
Grupo -CH	V. Tensión simétrica C-H	2927	2919	Media
Grupo -CH	V. Tensión Asimétrica de C-H	2881	2862	Media
Grupo -(C=O)NH-	V. Tensión (C=O) Banda de Amida I	1652	1655	Media fuerte
Grupo -NH-	V. Flexión N-H	1575	1580	Media fuerte
Grupo -CH <sub>3</sub>	V. Tensión C-CH <sub>3</sub>	1417	1450-1400	Media
Grupo -(C=O)NH-	V. Flexión N-H Banda de Amida II	1322	1313	Media
Grupo C-O-C	V. Tensión asimétrica del C-O-C	1157	1154	Fuerte
	Vibraciones de su estructura piranósica	1085 y 1036	1082 y 1032	Fuertes
	Tensión C-H de grupos anoméricos	896	896	Débil

### 1.2.2. Grado de Desacetilación: Conductimetría

Se realizó una valoración conductimétrica del quitosano depolimerizado disuelto en un volumen en exceso de ácido clorhídrico, titulando con hidróxido de sodio. (Fig III.7)

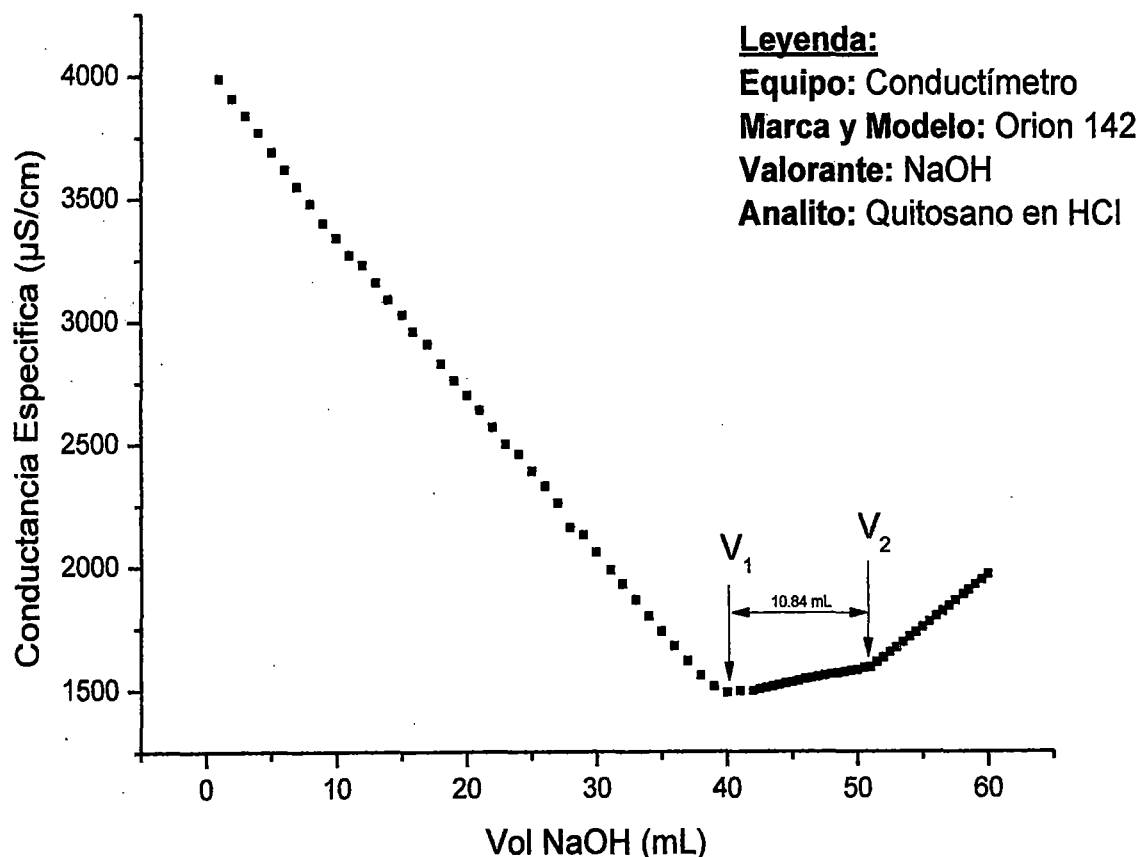


Fig III.7. Valoración Conductimétrica de quitosano depolimerizado

Obtenemos el grado de desacetilación, utilizando la siguiente ecuación [79]:

$$\text{NH}_2\% = \frac{C_{\text{NaOH}} \times \Delta V_{\text{NaOH}}}{w \text{ quitosano}} \times 16,1$$

Donde 16.1 es una constante que relaciona el peso equivalente del quitosano.

Se obtuvo el siguiente cuadro de resultados ( $\text{NH}_2\% = \text{DD}$ )

**Tabla III.8.** Datos y Resultados de Grado de desacetilación por conductimetría de quitosano depolimerizado(CSD)

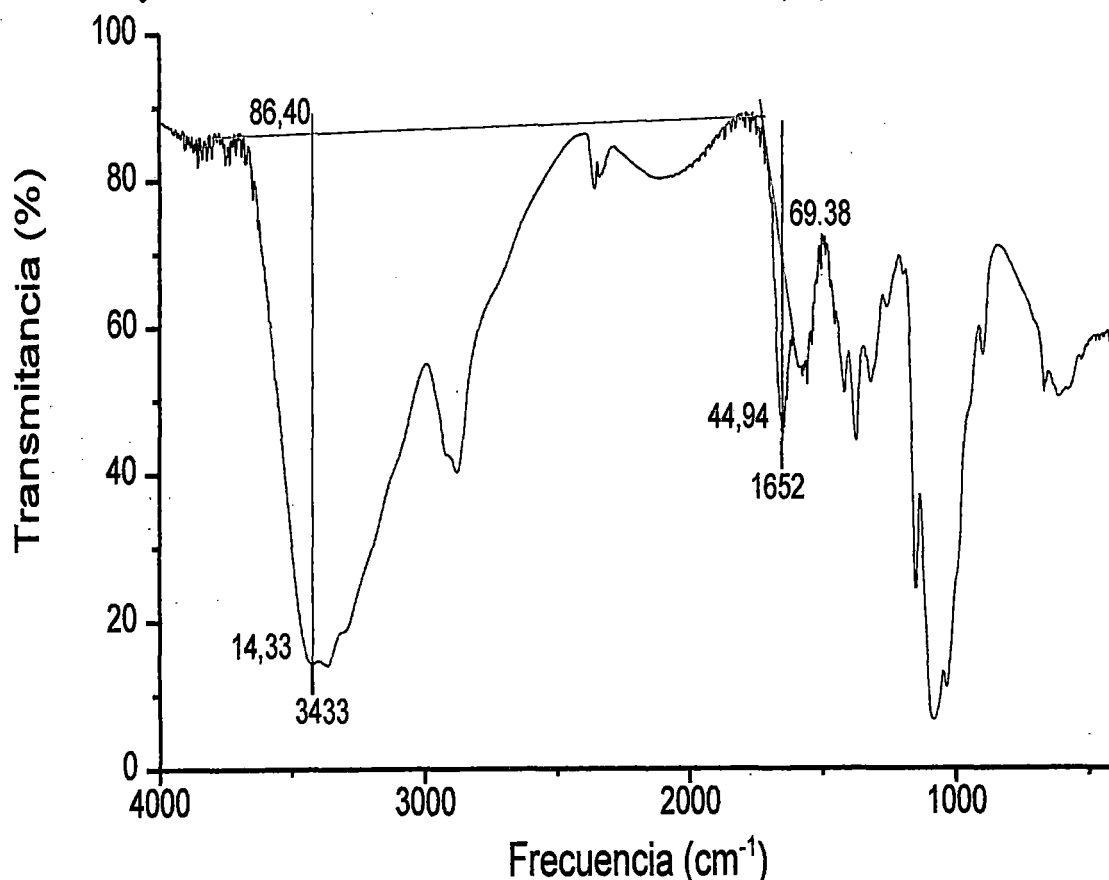
Muestra	$C_{\text{NaOH}}$	w quitosano	$\Delta V_{\text{NaOH}}$	DD(%)
CSD-1	0,0929	0,1865	11,83	94,96

### 1.2.3. Grado de Desacetilación: Espectroscopía Infrarroja

El grado de desacetilación es calculado usando las líneas bases Baxter et. al. [27], la ecuación (I.2) que involucran la línea base es:

$$\text{DD} (\%) = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33] - \text{Línea base}$$

En la Fig III.3 procedemos a trazar las líneas bases y procedemos a calcular las absorbancias a 165 y 3456  $\text{cm}^{-1}$  e introducimos los datos la ecuación (I.2).



**Fig III.8.** Cálculo del grado de desacetilación por IR de quitosano depolimerizado

Así obtenemos los siguientes datos:

$$A_{3368} = -\log(14,33/86,40) = 0,78$$

$$A_{1652} = -\log(44,94/69,38) = 0,19$$

$$DD = 100 - [(A_{1652} \times 100 / A_{3368}) / 1,33]$$

$$DD = 81,78\%$$

#### 1.2.4. Determinación del peso molecular

##### Determinación del peso molecular de quitosano depolimerizado

En la Tabla III.9 se muestran las medidas de densidad tomadas de la muestra de quitosano depolimerizado a diferentes concentraciones.

Tabla III.9. Datos tomados de las soluciones de quitosano depolimerizado

Muestra	Concentración (g/100mL)	V (mL)	M (g)	Tiempo (s)
H <sub>2</sub> O	0	10	9,6599	13,38
Buffer	0	10	9,7139	13,67
CSD-II-1	0,1196	10	9,7202	15,83
CSD-II-2	0,2392	10	9,7253	18,31
CSD-II-3	0,4784	10	9,7300	24,42
CSD-II-4	0,9568	10	9,7504	42,43

Utilizando la Ecuación (I.12) calculamos la Viscosidad de las soluciones tomadas.

Las demas viscosidades las calculamos de las siguiente manera:

Tabla III.10. Densidad y Viscosidad de las soluciones de quitosano depolimerizado

Muestra	Densidad (g/mL)	Viscosidad (Pa s)	$\eta_{inh}$	$\eta_{red}$
H <sub>2</sub> O	0,9660	0,0007928	-	-
Buffer	0,9714	0,0008145	-	-
CSD-II-1	0,9720	0,0009431	122,65	132,10
CSD-II-2	0,9725	0,0010919	122,56	142,42
CSD-II-3	0,9730	0,0014571	121,59	164,93
CSD-II-4	0,9750	0,0025367	118,74	221,01

Con estos valores se pudo calcular la viscosidad relativa, específica, inherente y reducida y posteriormente realizar el gráfico de la Fig III.9.

Cabe resaltar que en este cálculo se utilizará otro valor de  $K$  y  $a$ , puesto que en la despolimerización del quitosano se obtuvo un pequeño porcentaje de desacetilación debido muy

probablemente a la ruptura de los grupos acetilo por el nitrito, la diferencia en los resultados obtenidos para el grado de desacetilación en el método conductimétrico se debe muy probablemente a la presencia de hidróxido en la muestra de Quitosano despolimerizado, puesto que en el análisis infrarrojo no encontramos tal diferencia, ver Tabla III.11.

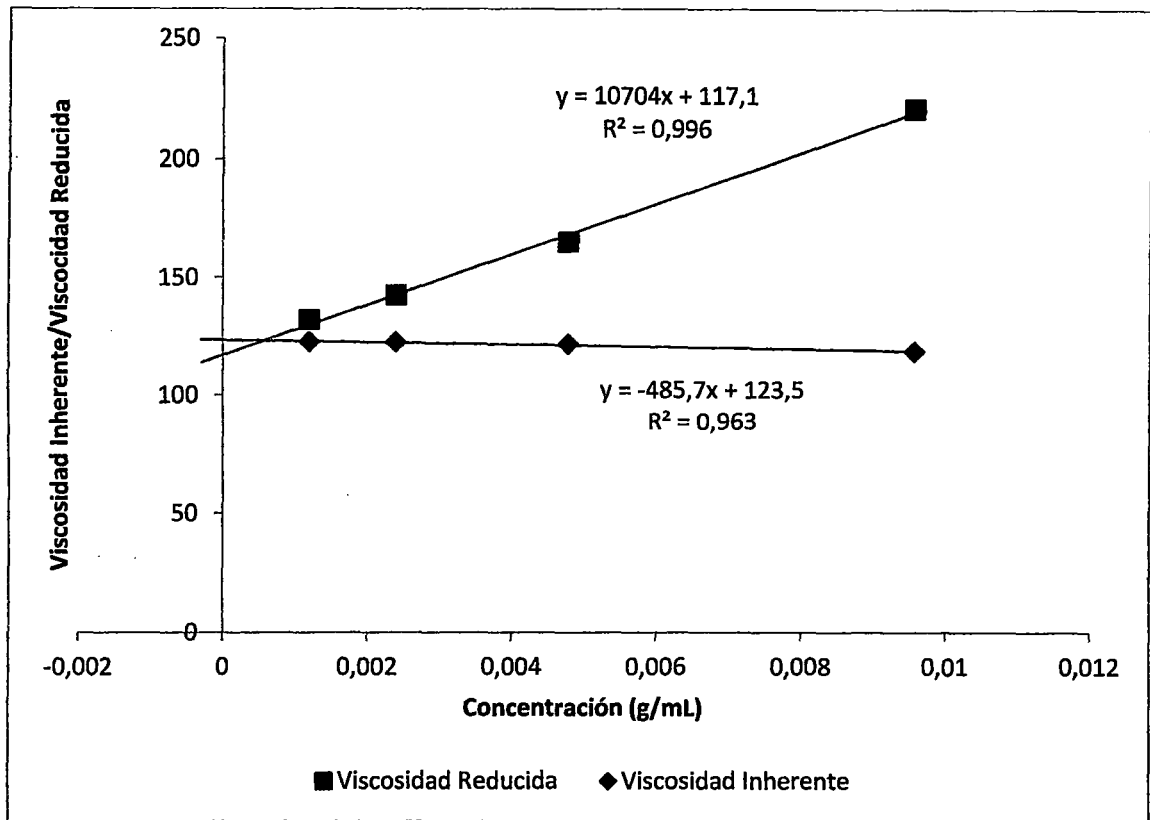


Fig III.9. Gráfico de concentración de quitosano despolimerizado vs Viscosidad reducida e Inherente

Con las dos rectas, se puede estrapolar hasta  $C=0$ , se utilizan  $K = 1131,77 \times 10^{-6}$  y  $a = 0,9808$  correspondiente a un DD = 81,78 utilizando las ecuaciones (III.5) y (III.6):

$$[\eta] = (\eta_{sp}/C)_{C=0} = (\eta_{inh})_{C=0} = 120,3 \text{ mL/g}$$

$$[\eta] = K (M_v)^a$$

$$M_v = \frac{120,3}{1131,77 \times 10^{-6}}^{\frac{1}{0,9808}}$$

$$M_v \approx 133,37 \text{ kDa}$$

En la siguiente tabla se resume los resultados de la caracterización del quitosano despolimerizado.

Tabla III.11: Resultados de Caracterización de quitosano despolimerizado

Análisis	Resultado Experimental	
Grado de Desacetilación	Conductimetría 94,96%	Infrarrojo 81,78%
Masa molecular	133,37kDa	
Estructura		

## 2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO.

En el campo de la farmacia, las películas de quitosano podrían ser utilizadas para el recubrimiento de comprimidos y como sistemas de liberación controlada de fármacos. En los últimos años, el uso de películas de quitosano para el tratamiento de heridas e infecciones cutáneas ha suscitado un gran interés puesto que se puede administrar el fármaco de forma localizada y sostenida en el sitio de acción [84]. Además, el carácter antimicrobiano y cicatrizante del quitosano aporta propiedades favorables a los sistemas de liberación de uso tópico [85].

El objetivo de este capítulo del trabajo ha sido la obtención de películas de quitosano, por el método de evaporación de solvente, para utilizarlas en la encapsulación de antocianinas.

### 2.1 Obtención de películas quitosano:

Las películas fueron cargadas en el momento de la preparación de las películas, adicionando una determinada cantidad de antocianinas antes del procedimiento de secado.

En la Tabla III.12 y Tabla III.13 se muestran las características de las películas obtenidas a diferentes concentraciones de TPP, tiempos de entrecruzamiento y espesores con los quitosanos obtenidos del capítulo anterior.

Tabla III.12. Condición de preparación de las películas de quitosano (CS) y cargadas con Antocianinas (CAT)

Películas	CS (% p/v)	CAT (% p/v)	TPP (% p/p)	V(mL)	Tiempo (h)
CP1	1	0	0	25	0
CP2	1	0	1,0	25	0,5
CP3	1	0	1,0	25	1
CP4	1	0	1,0	25	4
CP5	1	0	1,0	50	1
CP6	1	0	2,0	25	1
CP7	1	0	2,5	25	1
CP8	1	0	5,0	25	1
CP9	1	0	5,0	25	4
CP10	1	0	7,5	25	1
CP11	1	0	10	25	1
CP12	1	0,4	0	25	1
CP13	1	0,4	1,0	25	1
CP14	1	0,4	1,0	25	2
CP15	1	0,4	1,0	50	1
CP16	1	0,4	2	25	1
CP17	1	0,4	5	25	1



Tabla III.13. Condición de preparación de las películas de quitosano depolimerizado(CSD) y cargadas con Antocianinas (CAT)

Películas	CSD (% p/v)	CAT (% p/v)	TPP (% p/p)	V(mL)	Tiempo (h)
CDP1	1	0	0	25	0
CDP2	1	0	1,0	25	0,5
CDP3	1	0	1,0	25	1
CDP4	1	0	1,0	25	4
CDP5	1	0	1,0	50	1
CDP6	1	0	2,0	25	1
CDP7	1	0	5,0	25	1
CDP8	1	0,4	0	25	1
CDP9	1	0,4	1,0	25	1
CDP10	1	0,4	1,0	25	2
CDP11	1	0,4	1,0	50	1
CDP12	1	0,4	2,0	25	1
CDP13	1	0,4	5,0	25	1

Una de las características importantes observadas en el proceso de reticulación de una película de quitosano (Fig III.10), en el proceso adquieren una coloración blanca, no translúcida y no removible al ser lavada con agua, esta característica solo se presenta mientras la película permanezca húmeda, luego del proceso de secado la película vuelve a adquirir la tonalidad amarillenta y translúcida característica de las películas de quitosano. Esta observación nos hace llevar a la suposición de que dicha coloración es debido a una interacción intermolecular entre el reticulante (TPP) y la matriz polimérica (quitosano), la permanencia de dicha coloración después del lavado con agua con el fin de remover TPP sin interaccionar refuerza la hipótesis de una interacción puente hidrógeno.

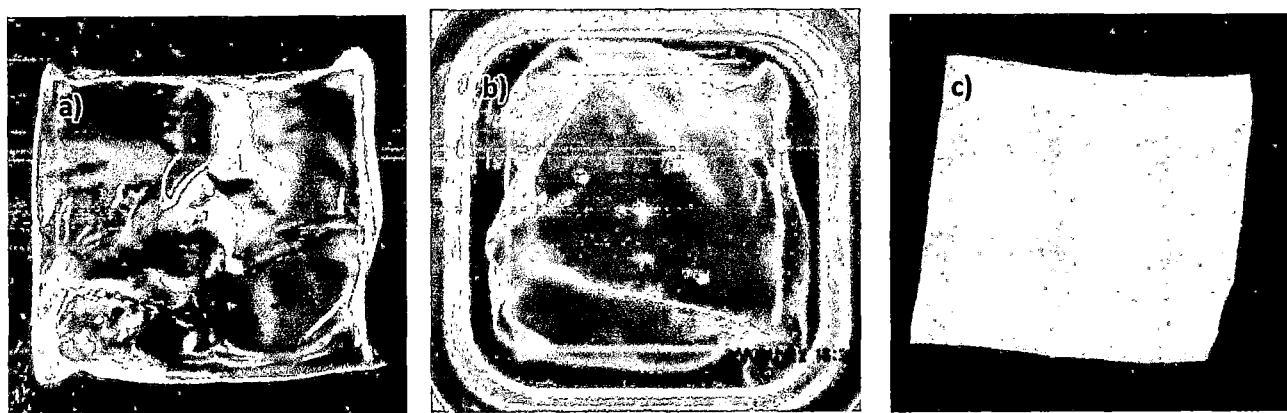


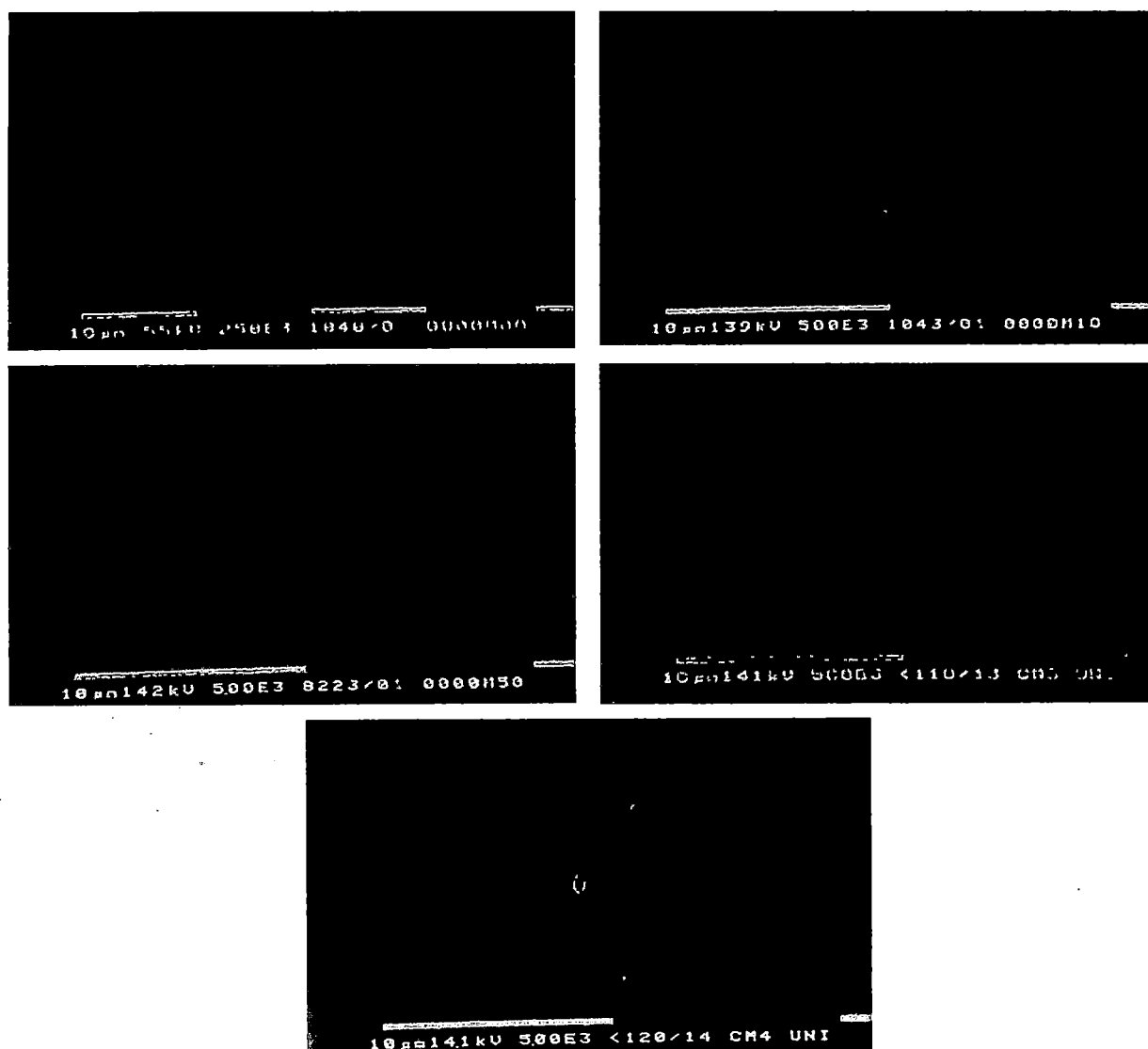
Figura III.10. Películas de quitosano a) antes de reticulación b) durante la reticulación c) después de la reticulación

## 2.2 Estudios de Morfología.

En la Figura III.11 se muestran las microfotografías de diferentes películas de quitosano; CP1, CP7, CP8, CP10 y CP11; las cuales se diferencian en la concentración de Tripolifosfato adicionado para la reticulación de las películas en concentraciones de 0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10% respectivamente. Las películas de quitosano entrecruzadas con TPP, sin fármaco, presentaron una superficie lisa casi indistinguible.

La interacción puente de hidrógeno entre las aminas de las cadenas de quitosano con el oxígeno del Tripolifosfato es homogénea prácticamente en toda su morfología, esta observación nos hace pensar que la característica plana y homogénea de los filmes generan una interacción puente de hidrógeno entre la superficie de la película de Quitosano con el Tripolifosfato de manera homogénea, es decir, sin acumulaciones debido a imperfecciones o irregularidades en la superficie; esta fenómeno empieza con el hinchamiento del film, su hidratación y posterior interacción, lográndose formar una pequeña capa de complejo Quitosano/TPP, después de la pérdida de agua a causa del secado la película retoma la morfología inicial, debido a que el Tripolifosfato no es lo suficientemente grande como para modificar la superficie del quitosano. A pesar de este fenómeno la presencia de la interacción se hace más notable en los demás análisis.

Las partículas insolubles de la solución de quitosano son las mostradas en las Fig III.11. en las fotografías d) y e). En contraposición con esta afirmación a nivel macroscópico la interacción se puede asociar con el cambio de coloración en la película húmeda en el proceso de reticulación.



**Fig III.11.** Microfotografías de Barrido Electrónico de películas de quitosano reticuladas a PH 6,5 con TPP 0% a), 2.5% b), 5.0% c), 7.5% d) y 10% e) entrecruzadas durante una hora

### 2.3 Espectroscopía Infrarroja:

Para empezar esta parte de la caracterización primero obtuvimos el espectro infrarrojo del tripolifosfato de sodio, luego procedemos a compararlo con el de las películas que han sido reticuladas con este polianión.

#### 2.3.1 Espectro IR del Tripolifosfato de Sodio:

Se caracterizó el reticulante Tripolifosfato de Sodio utilizado mediante espectroscopia infrarroja, se determinaron los picos principales:

Tabla III.14. Grupos funcionales del espectro IR del Tripolifosfato de Sodio [86]

GRUPO FUNCIONAL	Tipo de vibración	$\nu$ Experimental ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu$ referencia ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad del pico
Grupo -OH	V. Tensión OH	3253	3278	Débil
Grupo -OH	V. Flexión OH	1650	1686	Débil
Grupo -P=O	V. Tensión P=O	1211	1212 y 1158	Media
Grupo -R-O-P-O	V. Tensión R-O-P-O	1134 y 1092	1130 y 1102	Fuerte
Grupo P-O-P	V. Tensión P-O	883	1000-870	Fuerte
Grupo P-O-P	V. Flexión de P-O-P	753 y 710	772 716	Débil

Se puede ver la de los principales picos del Tripolifosfato. Fig III.12.

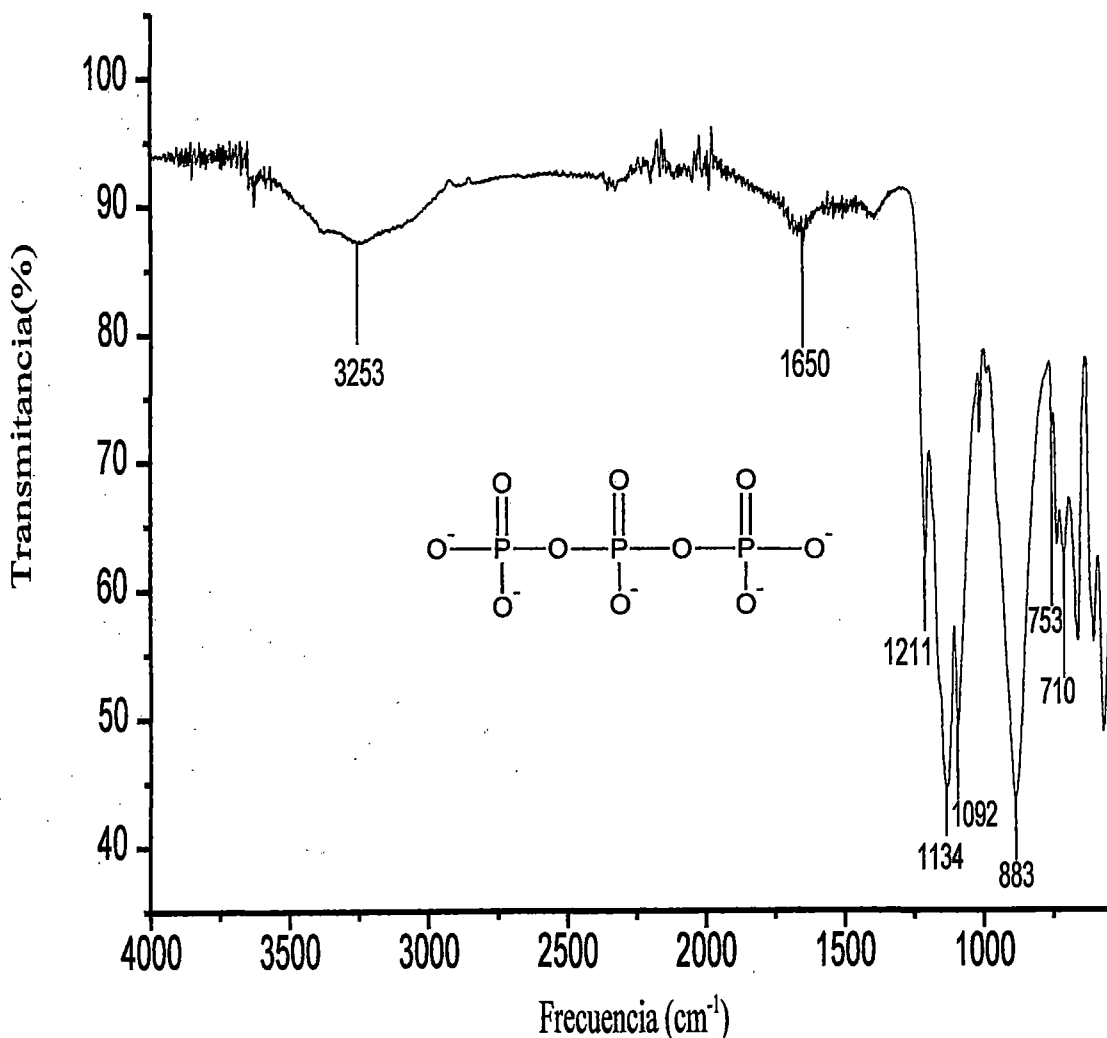


Fig III.12. Espectro FTIR del Tripolifosfato de Sodio

### 2.3.2 Espectro IR de Película de Quitosano Reticulado con Tripolifosfato:

Se caracterizó el quitosano obtenido mediante espectroscopía infrarroja, se determinaron los picos principales:

Tabla III.15. Bandas del espectro IR del quitosano depolimerizado reticulado con TPP

GRUPO FUNCIONAL	Tipo de vibración	$\nu$ Experimental ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\nu$ referencia [23, 86] ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad del pico
Grupo -OH	V. Tensión de O-H	3252	3450	Fuerte
Grupo -NH	V. Tensión de N-H	3210	3292	Fuerte
Grupo -CH	V. Tensión simétrica C-H	2936	2919	Media
Grupo -CH	V. Tensión asimétrica de C-H	2881	2862	Media
Grupo -NH	V. Flexión amina	1629	1645	Media débil
Grupo -NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	V. Tensión amina protonada	1534	1554	Media débil
Grupo -CH <sub>3</sub>	V. Tensión C-CH <sub>3</sub>	1378	1450-1400	Débil
Grupo -(C=O)NH-	V. Flexión N-H Banda de Amida III	1319	1313	Débil
Grupo -P=O	V. Tensión asimétrica del P=O	1208	1212 y 1158	Débil
Grupo -R-O-P-O	V. Tensión R-O-P-O	1151	1130 y 1102	Débil
Grupo C-O-C	V. Tensión asimétrica del C-O-C	1063 y 1021	1082 y 1032	Fuerte
Grupo -P-O-P	V. Tensión P-O-P	890	1000-870	Fuerte

Los principales picos se muestran en la Fig III.13.

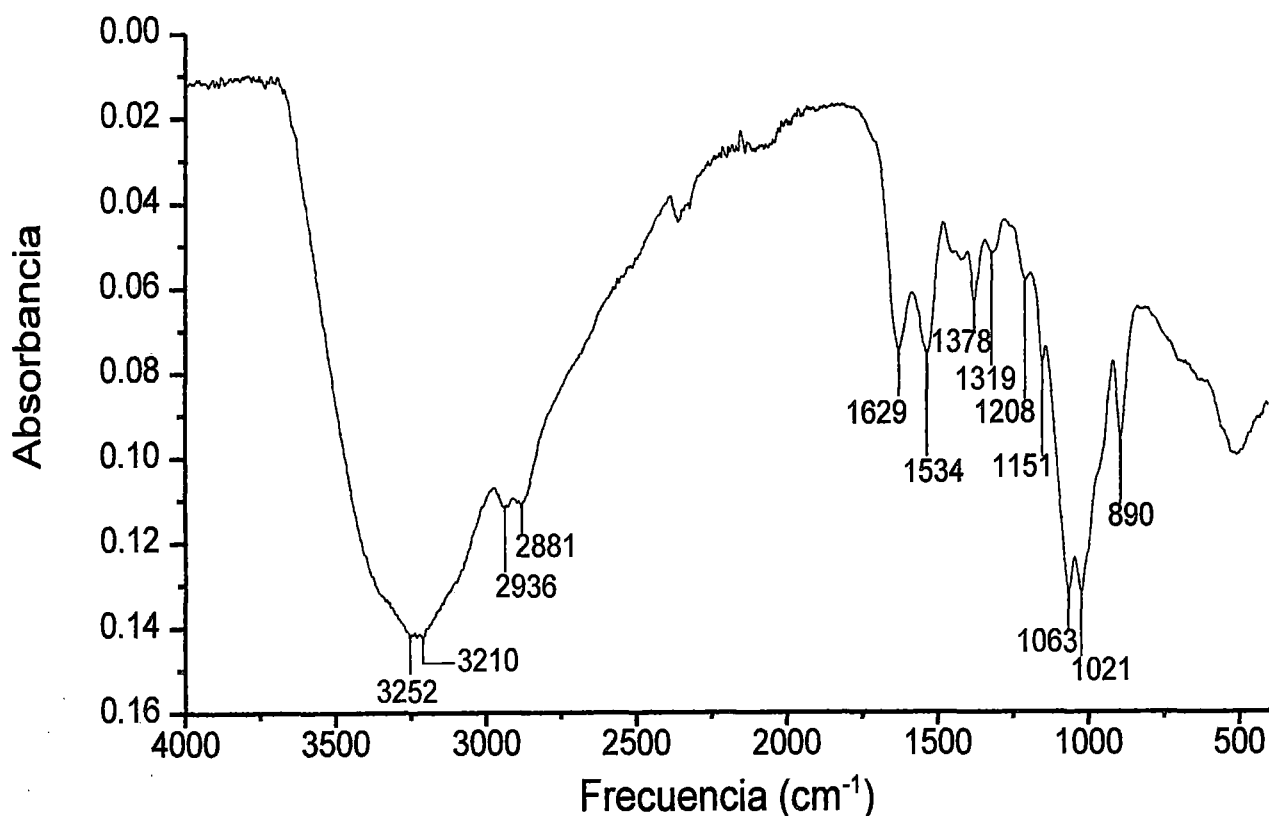


Fig III.13. Espectro FTIR de Quitosano reticulado con Tripolifosfato

En la Fig III.14 se observa los espectros correspondientes a las películas de quitosano CP1 y CP3 (peso molecular de 553.24 kDa). A partir de estos espectros se puede observar en el espectro de Quitosano/TPP que el pico vinculado a las amidas a  $1653\text{ cm}^{-1}$  desaparece, se muestra un pico a  $1629\text{ cm}^{-1}$  atribuido a la vibración de flexión de la amina de Quitosano, esta ha sufrido un corrimiento hacia mayores frecuencias debido a una interacción externa con otra molécula, también se muestra otro nuevo pico a  $1534\text{ cm}^{-1}$ , este está atribuido a la vibración de tensión grupo de la amina protonada. El espectro también mostró un pico a  $1208\text{ cm}^{-1}$  y  $1151\text{ cm}^{-1}$  para el enlace  $\text{P}=\text{O}$  y  $\text{R}-\text{O}-\text{P}-\text{O}$ . Xu et al [87], Knaul et al [88], y Wang et al [89] observaron resultados similares en su estudio de la formación de nanopartículas de quitosano y películas de quitosano tratados con fosfato. También se observan el pico a  $888.92\text{ cm}^{-1}$  atribuido al enlace  $\text{P}-\text{O}-\text{P}$ , dada la intensidad media del mismo.

Otra característica importante que no podemos dejar de mencionar es el corrimiento nuevamente observado en el pico del grupo amínico, desplazándose de  $3302$  a  $3212\text{ cm}^{-1}$ , este fenómeno nos indica claramente una interacción externa en este grupo, en este caso dada la naturaleza del reticulante se trata de un puente hidrógeno entre la amina y el Oxígeno del Tripolifosfato.

En esta figura se puede apreciar con bastante claridad que existe diferencia entre los principales picos de las películas de quitosano y las que aparecen en el quitosano reticulado, corroborando nuestra hipótesis de interacción puente hidrógeno.

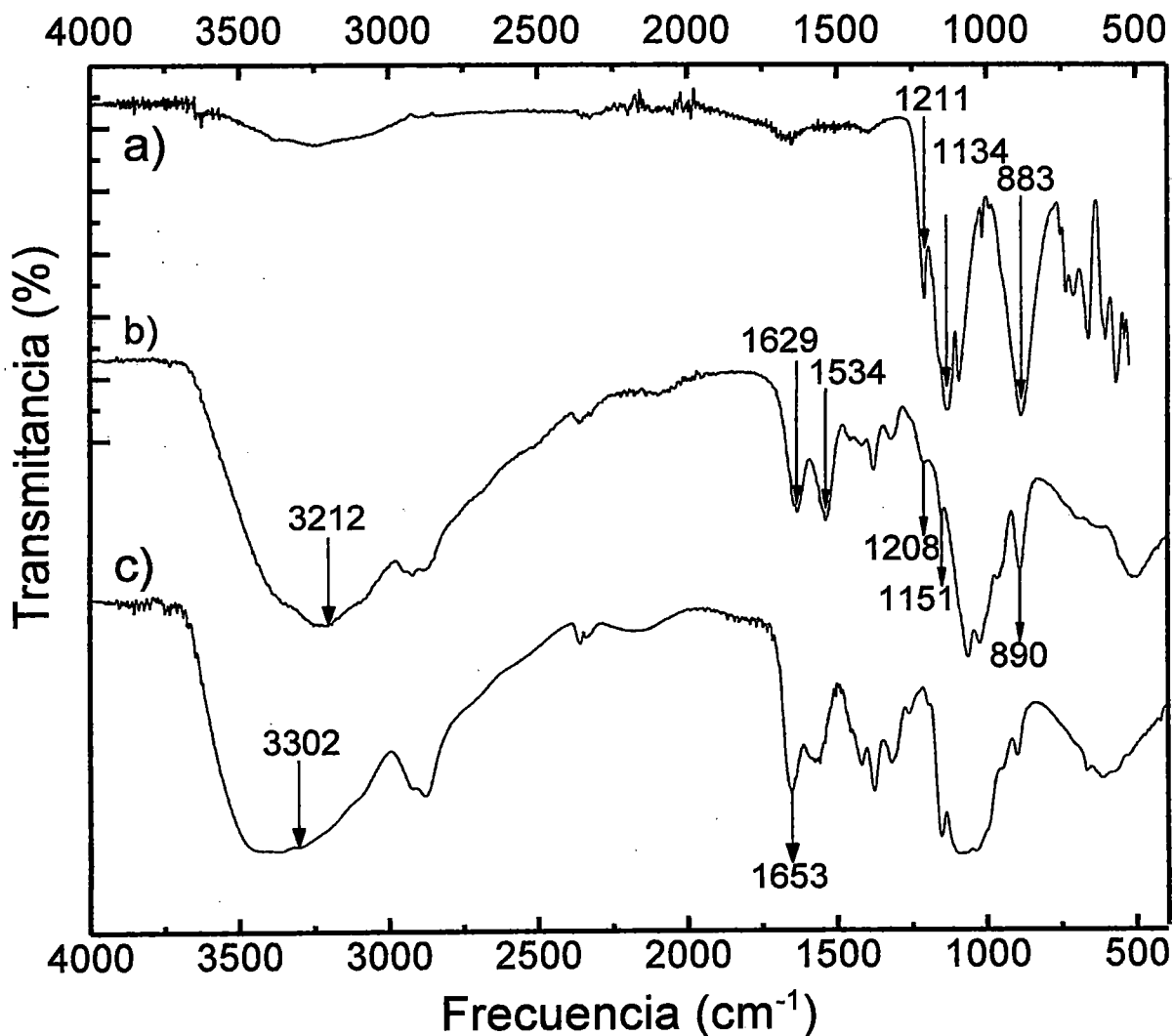
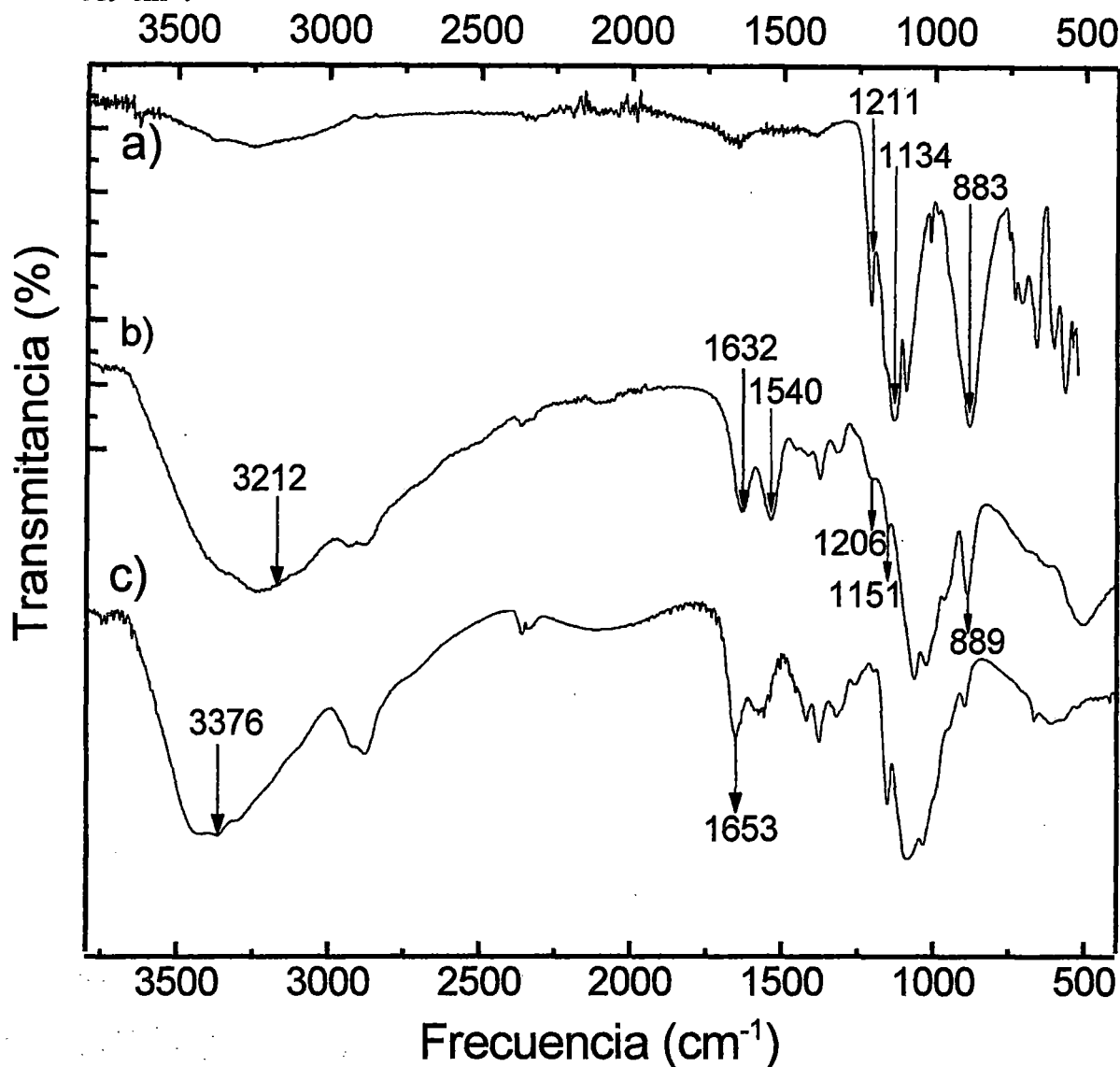


Fig III. 14. Espectro FTIR de a) Tripolifosfato de Sodio, b) película de Quitosano/TPP CP3 y c) película de Quitosano CP1

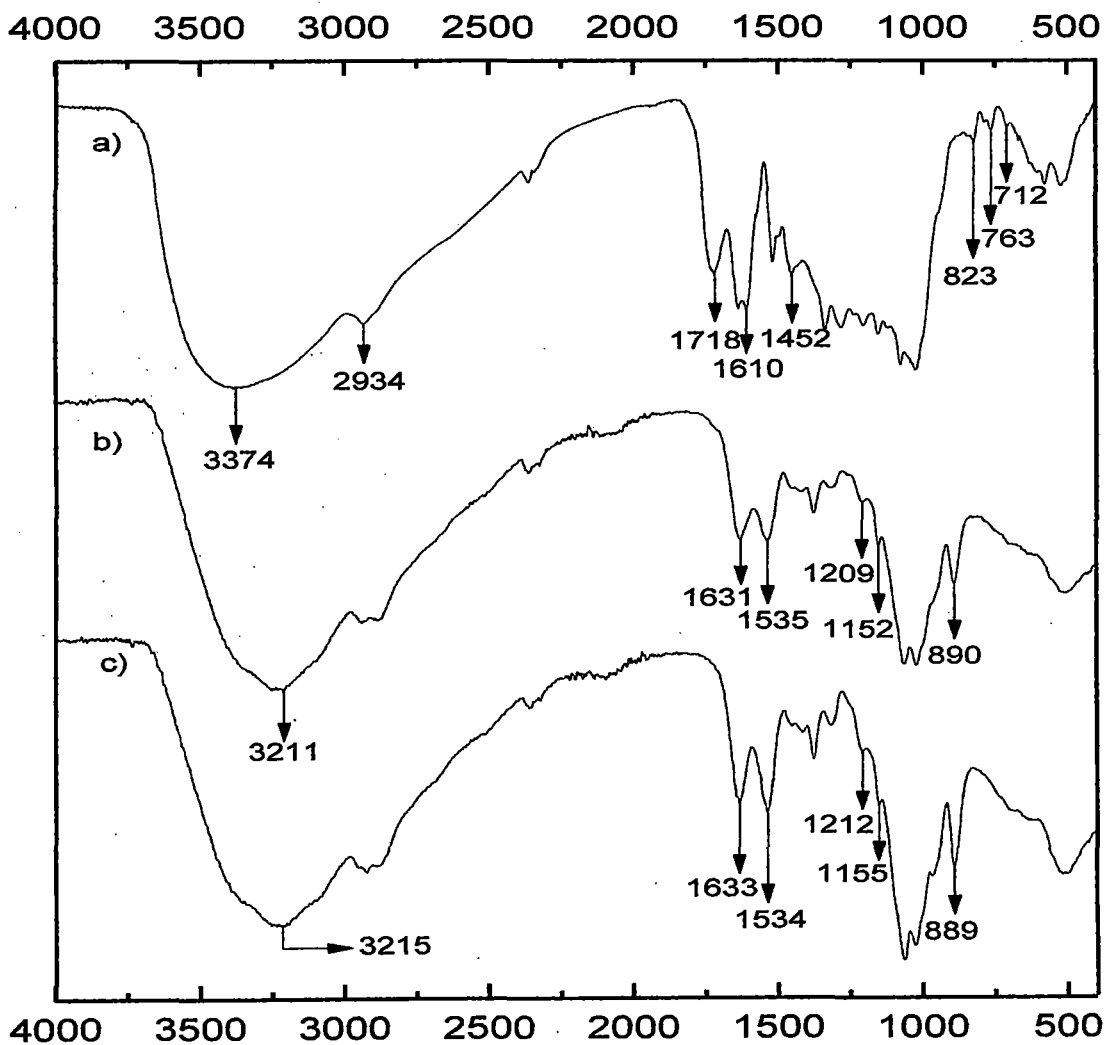
En la Fig III.15 se observa la comparación de los espectros de las películas de quitosano correspondientes a las películas CDP1 y CDP3 en la cual se compara el efecto de la reticulación en películas de quitosano depolimerizadas, el quitosano en estos casos es de 133.37 kDa. Podemos ver, al igual que en el caso anterior que el pico vinculado a las amidas a  $1653\text{ cm}^{-1}$  desaparece, observamos dos nuevos picos a  $1632\text{ cm}^{-1}$  y  $1540\text{ cm}^{-1}$  que al igual que en la Fig III.15 se atribuye a los a la vibración de flexión de la amina y a la vibración de tensión de la amina protonada. El espectro nuevamente mostró un pico a  $1206\text{ cm}^{-1}$  y  $1151\text{ cm}^{-1}$ , otra vez, se observa el pico atribuido al enlace P—O—P a  $889\text{ cm}^{-1}$ .



**Fig III. 15:** Espectro FTIR de a) Tripolifosfato de Sodio, b) película de Quitosano depolimerizado/TPP CDP3 y c) película de Quitosano depolimerizado CDP1

En la Fig III.16 y III.17 se observa la comparación de los espectros infrarrojo del extracto de maíz morado (antocianinas), película de quitosano reticulada con TPP cargada y no cargadas con antocianina, en primer lugar vemos los picos principales en el espectro de las antocianinas, la banda de  $3374\text{ cm}^{-1}$  es atribuida a la vibración de tensión del grupo O-H, el pico a  $2929\text{ cm}^{-1}$  es atribuida a la deformación de tensión del enlace C-H del anillo aromático, los picos a  $1610$  y  $1452\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la vibración tensión de los dobles enlaces C=C, los picos a  $712$  y  $823\text{ cm}^{-1}$  corresponden a

la vibración de tensión de los grupos de disustitución meta y el pico a  $763\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la vibración de tensión de la disustitución orto, otra cosa que es importante recalcar es la presencia de un pico de intensidad mediana a  $1718\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración de tensión de un grupo carbonilo, si bien recordamos las antocianinas en general no presentan el grupo carbonilo en su estructura, sin embargo también recordamos que estas pueden degradarse cambiando su estructura a la forma chalcona, en cuyo caso, está presente el grupo carbonilo, esto nos indica que en nuestro caso las antocianinas presentan una degradación en la muestra tomada. Se puede apreciar en este mismo gráfico que los picos principales en la película Quitosano/Tripolifosfato también se encuentran en la película cargada. Los principales picos correspondientes a los grupos característicos de las antocianinas tales como el oxidrilo y otros están superpuestos con los oxidrilos y amins propios de las cadenas poliméricas; la baja concentración de antocianinas en la película no es perceptible en el espectro, por lo que las diferencias no son tan apreciables. Los picos cercanos a  $1209$ ,  $1152$  y  $890\text{ cm}^{-1}$  nuevamente aparecen para confirmarnos la interacción con el tripolifosfato en todas las películas.



**Fig III. 16:** Espectro FTIR de a) Antocianinas, b) película de quitosano reticulado con Tripolifosfato CP12 y cargada con Antocianinas, c) película de quitosano reticulado con Tripolifosfato CP3

El mismo fenómeno ocurre en el caso de las películas preparadas con quitosano depolimerizado, no existe diferencia apreciable en los espectros de Quitosano/TPP cargado y sin cargar con antocianinas, nuevamente la baja concentración y la proximidad de los principales picos hacen que las antocianinas no sean perceptibles.

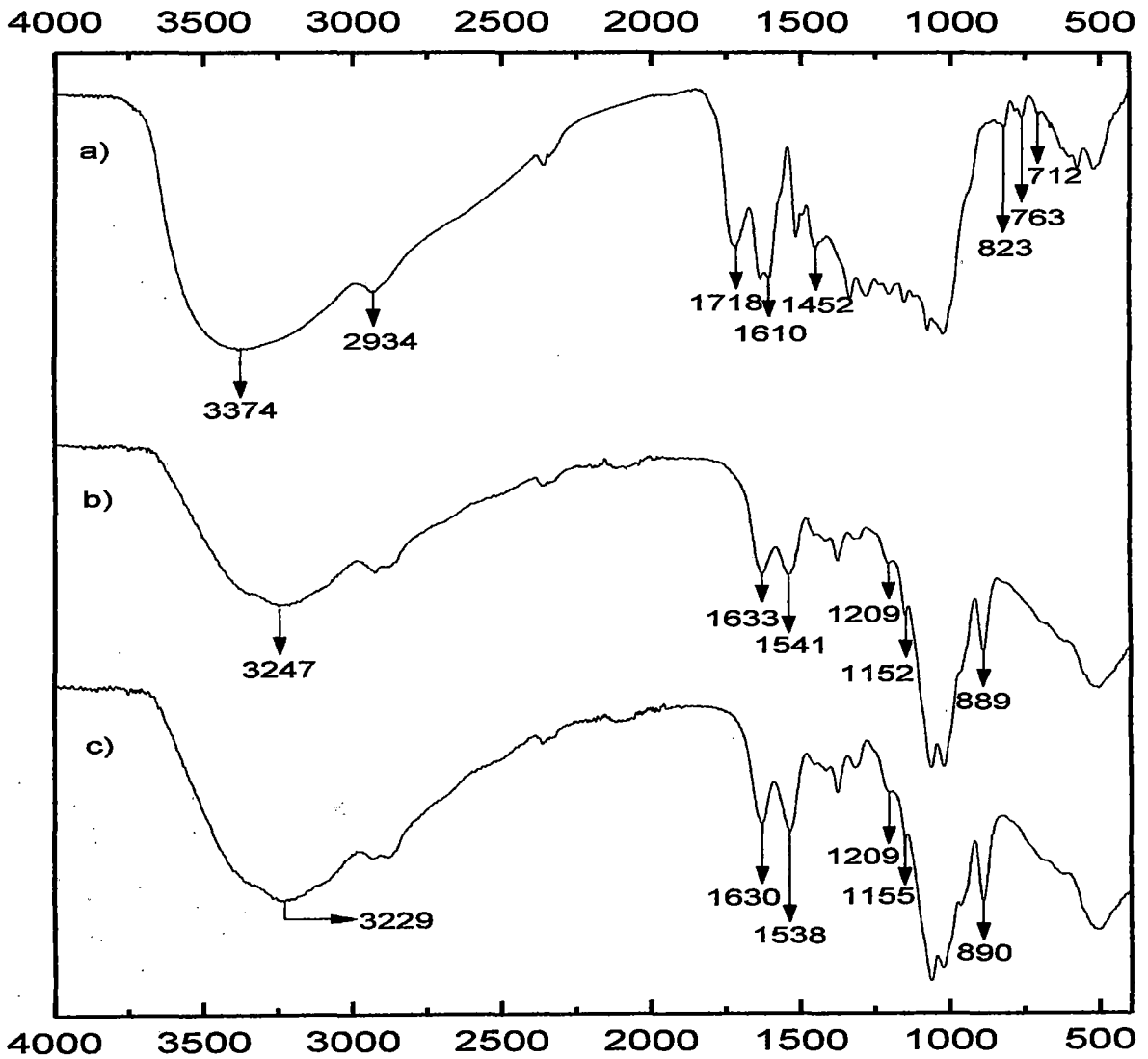


Fig III. 17. Espectro FTIR de a) Antocianinas, b) película de quitosano depolimerizado reticulado con Tripolifosfato CDP8 y cargado con Antocianinas, c) película de quitosano depolimerizado reticulado con Tripolifosfato CDP3



## 2.4 Análisis Termogravimétrico:

Los termogramas obtenidos de las películas de quitosano se muestran a continuación. La Fig III.18 muestra el análisis de una película de quitosano y una de quitosano depolimerizado

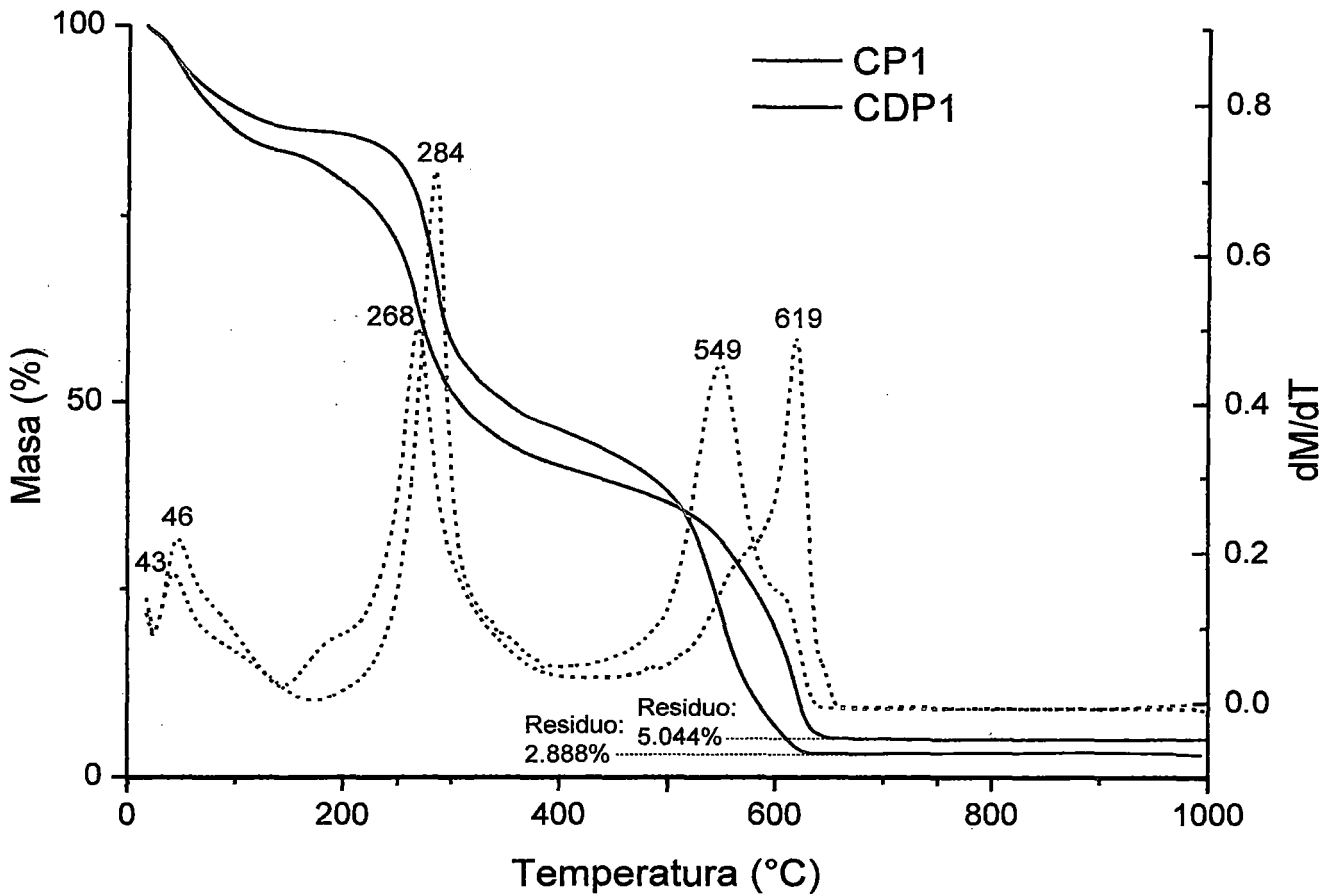


Fig III. 18. Termográmame de película de Quitosano CP1 y película de quitosano depolimerizado CDP1

Como se puede ver en las curvas termogravimétricas la descomposición se lleva a cabo en tres eventos térmicos diferentes. El primero se lleva a cabo entre temperatura ambiente y 143 °C que corresponde a la pérdida de agua, de todas las moléculas enlazadas al quitosano, luego entre los 143 °C y 430 °C aparece la degradación causante de la depolimerización térmica del polímero, el fenómeno continúa hasta la termo-oxidación de la película entre los 430 °C y 700 °C aproximadamente. El quitosano presenta residuo inorgánico al término de la descomposición, propios de diferentes fuentes implicadas en el proceso, tales como los residuos inorgánicos encontrados en el solvente, así como los residuos inorgánicos del propio polímero.

En la Fig III. 19 se observan los termogramas de las películas de quitosano reticuladas con tripolifosfato a diferentes concentraciones, lo primero que debemos destacar es que los eventos térmicos son muy similares, el primero que abarca de la temperatura ambiente hasta a 157 °C corresponde a la pérdida de agua, se puede ver que en el caso del CP11, la pérdida de agua ocurre en dos eventos térmicos, la primera pérdida ocurre en las moléculas de agua que están absorbidas en el quitosano, después ocurre la pérdida del agua que está en interacción electrostática con el Tripolifosfato, es

reconocida debido a que la energía necesaria para evaporarla es mayor, dicho fenómeno ocurre solo en este caso dada la alta concentración de Tripolifosfato en esta película; siguiente evento térmico comprende de 157 °C a 562 °C corresponde nuevamente a la depolimerización del quitosano, como se puede apreciar en la Fig. III.19 los picos de las derivadas del peso son prácticamente los mismos, por lo que podemos afirmar que el quitosano presente se despolimeriza normalmente, el último evento térmico corresponde a la termo-oxidación de la materia orgánica, esta sufre una prolongación en el intervalo de temperatura de descomposición de 562 °C a 979 °C aproximadamente, que es mucho mayor que el de una película en la cual solamente se tiene quitosano, dicho fenómeno nos sugiere que existe una nueva energía invertida en la ruptura de una fuerza extra que retrasa la descomposición normal de la película, en este caso, la fuerza causante es la interacción puente de hidrógeno entre los oxígenos del tripolifosfato y las aminas protonadas de los monómeros del quitosano; mediante este análisis se pone en evidencia nuevamente la formación del complejo Quitosano/Tripolifosfato.

Otra contribución de este análisis es la determinación del grado de reticulación en los termogramas analizados, la cantidad de residuos presentes en las películas corresponde al grado de materia inorgánica presente, perteneciente a las cenizas de la película y al Tripolifosfato de Sodio utilizado como reticulante.

Tomamos los porcentajes de residuos de los espectros y los comparamos de acuerdo a la concentración de Tripolifosfato utilizado en la interacción, cabe resaltar que el método planteado sólo nos da una idea del grado de reticulación de las películas analizadas en el termograma

**Tabla III.16.** Grado de reticulación de películas de quitosano/TPP

Película	Concentración de TPP (%)	Residuos (%)	Grado de Reticulación (%)
CP1	0	2,88	0
CP8	5	13,16	10,28
CP10	7,5	18,74	15,86
CP11	10	25,14	22,26

Mediante la Fig III.20 podemos controlar la cantidad de reticulación deseada en la película de quitosano, basta con utilizar la ecuación del gráfico, y determinar la concentración de tripolifosfato a requerida.

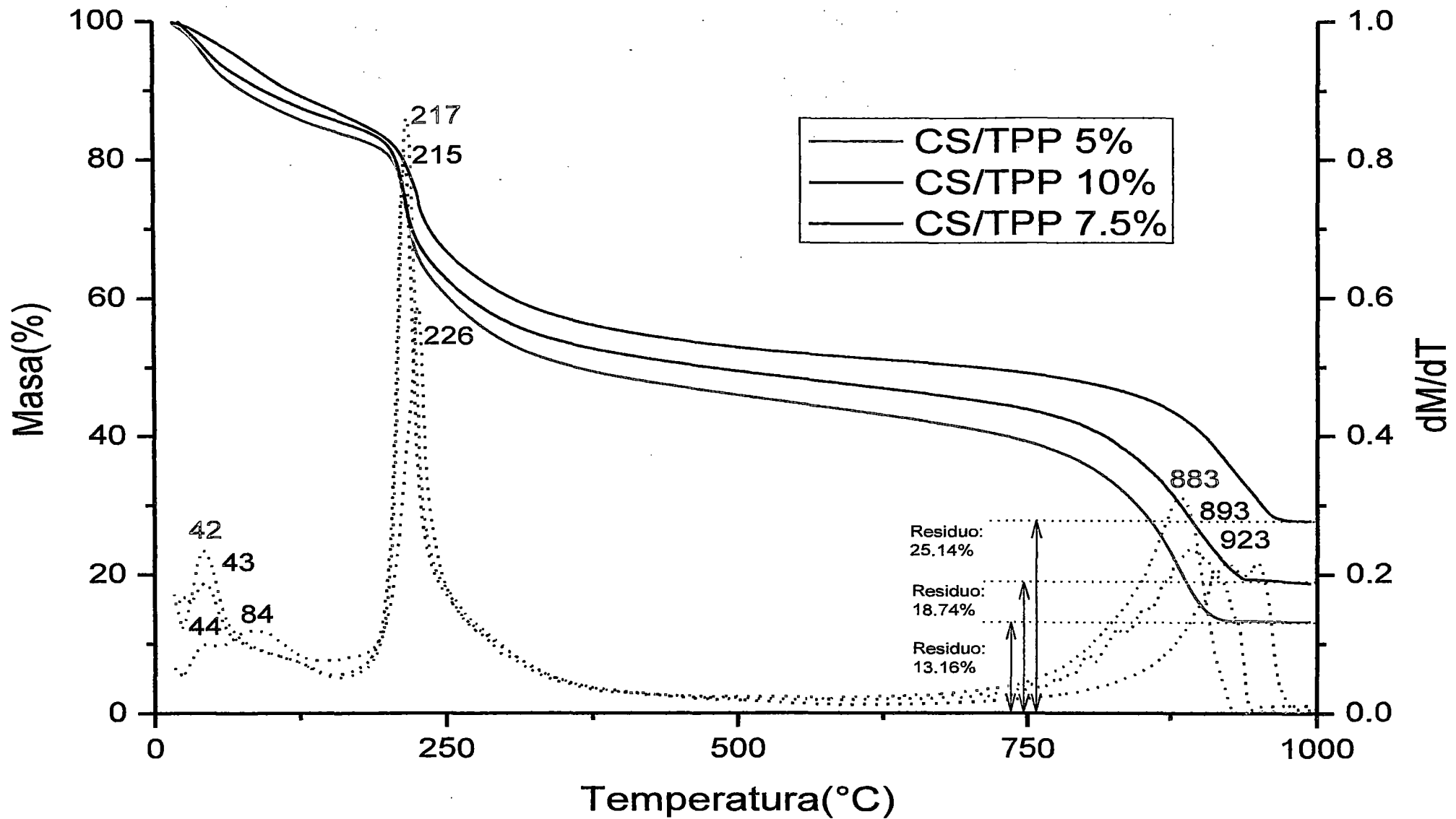


Fig III. 19. Termograma película de Quitosano reticulado con tripolifosfato 5% CP8, 7.5% CP10 y 10% CP11

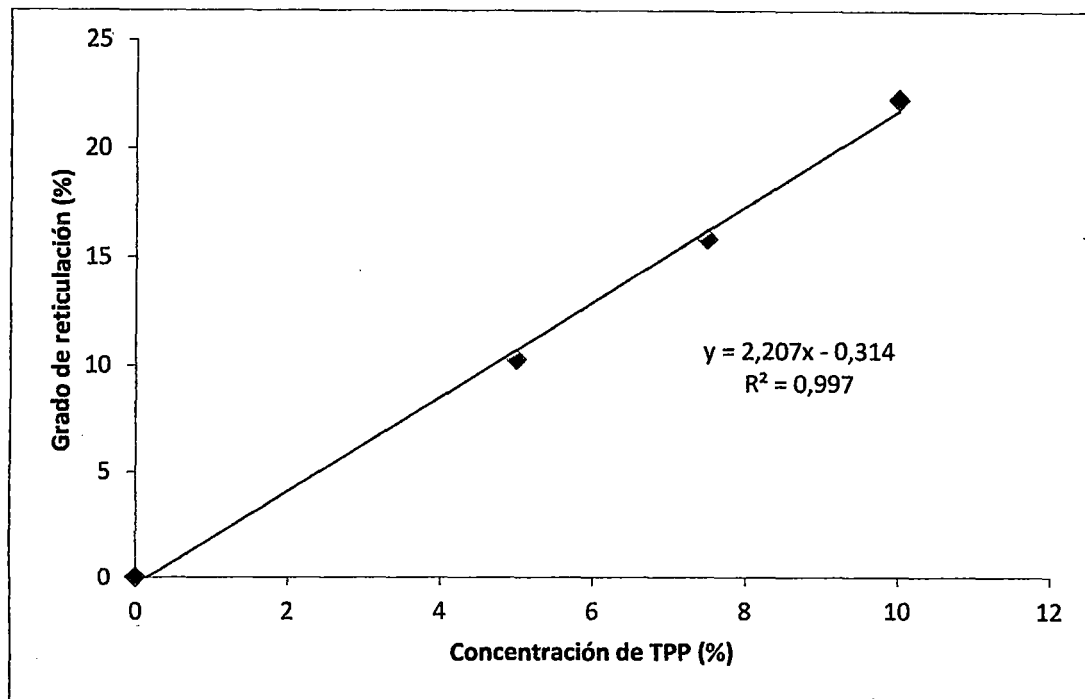


Fig III. 20. Grado de reticulación en función de la concentración de Tripolifosfato

En la Fig III.21 se muestra el termograma de una muestra de Tripolifosfato, como se puede ver el fenómeno ocurre en 5 etapas, la primera que comprende entre la temperatura ambiente y 60 °C corresponde a la primera pérdida de agua, correspondiente a el agua fisiabsorbida con del Tripolifosfato, la segunda etapa comprendida entre 60 y 73 °C corresponde a el agua quimiabsorbida con el Tripolifosfato en este caso con algún tipo de interacción electrostática débil, la siguiente etapa entre 73 y 94 °C corresponde a la pérdida del agua enlazada por medio de puente hidrógeno con el Tripolifosfato. La cuarta etapa comprendida entre 94 y 301 °C corresponde a la rápida degradación del Tripolifosfato, en este caso la materia perdida es el oxígeno de su estructura, después de esta etapa se forma el  $P_4O_{10}$  y este compuesto se mantiene estable hasta casi 751 °C en donde empieza su última degradación, que corresponde a una pequeña liberación de oxígeno para cambiar la configuración del óxido a  $P_4O_6$ , etapa que termina en 900 °C, donde finalmente termina el termograma.

En la Fig III.22 podemos observar el termograma de una muestra de antocianinas. Los eventos térmicos en este caso son tres, el primer es el atribuido a la pérdida de agua, evento comprendido entre temperatura ambiente y 118 °C, el segundo evento térmico empieza en 118 °C y continua hasta 332 °C, en donde aparece acoplado un tercer evento hasta 671 °C, estos representan la descomposición de las antocianinas, pérdida de oxidrilos en forma de agua de la estructura y posterior descomposición de toda la materia orgánica presente. Hay que resaltar que esta muestra posee una cantidad de 5,640% de residuos inorgánicos, que indican la presencia muy probable de alguna sal u otro compuesto en las antocianinas.

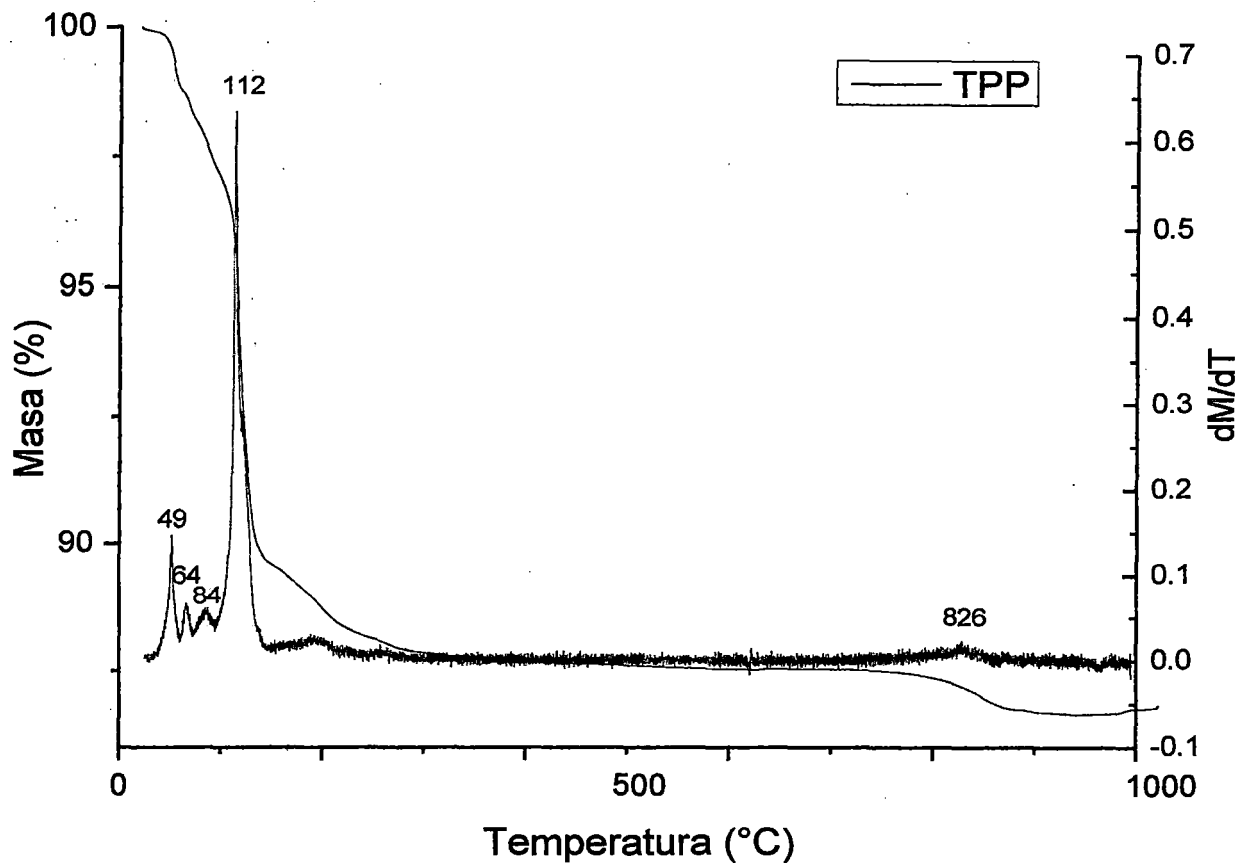


Fig III. 21. Termograma Tripolifosfato

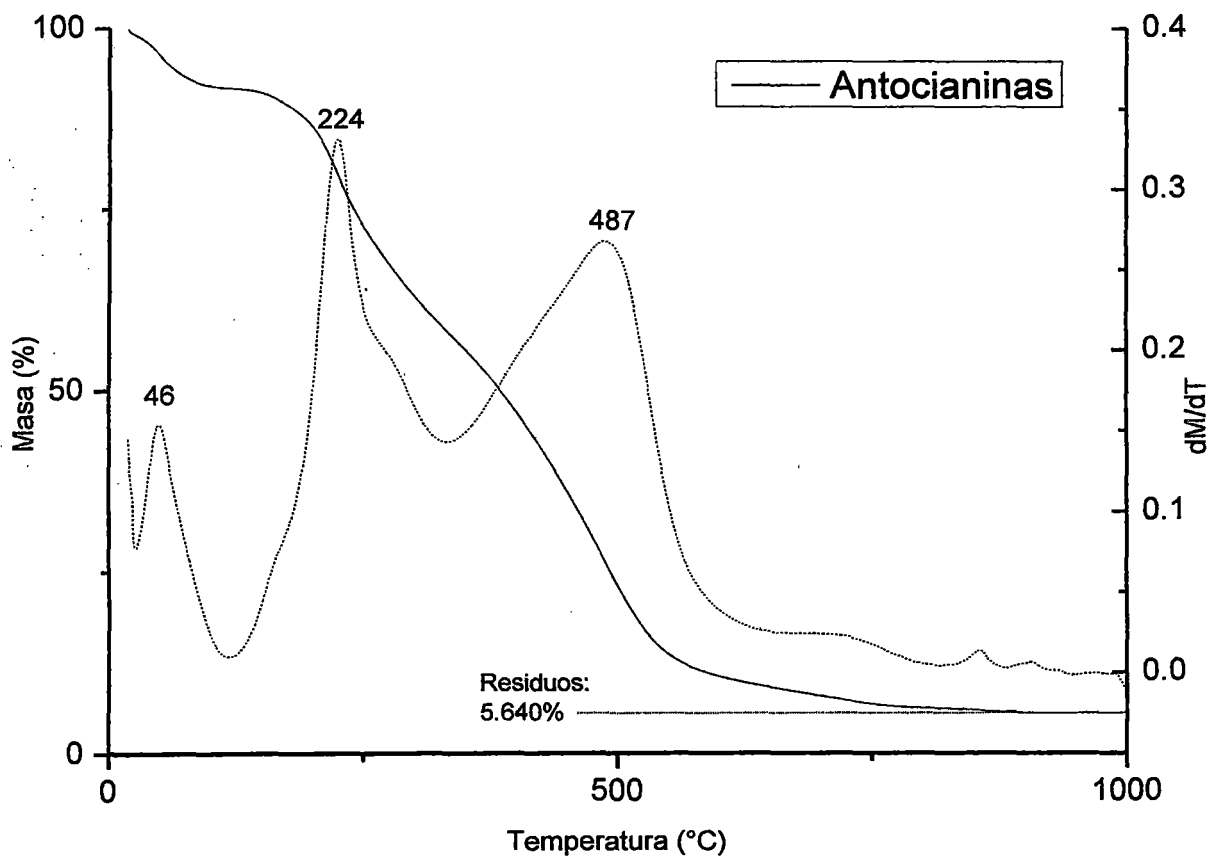
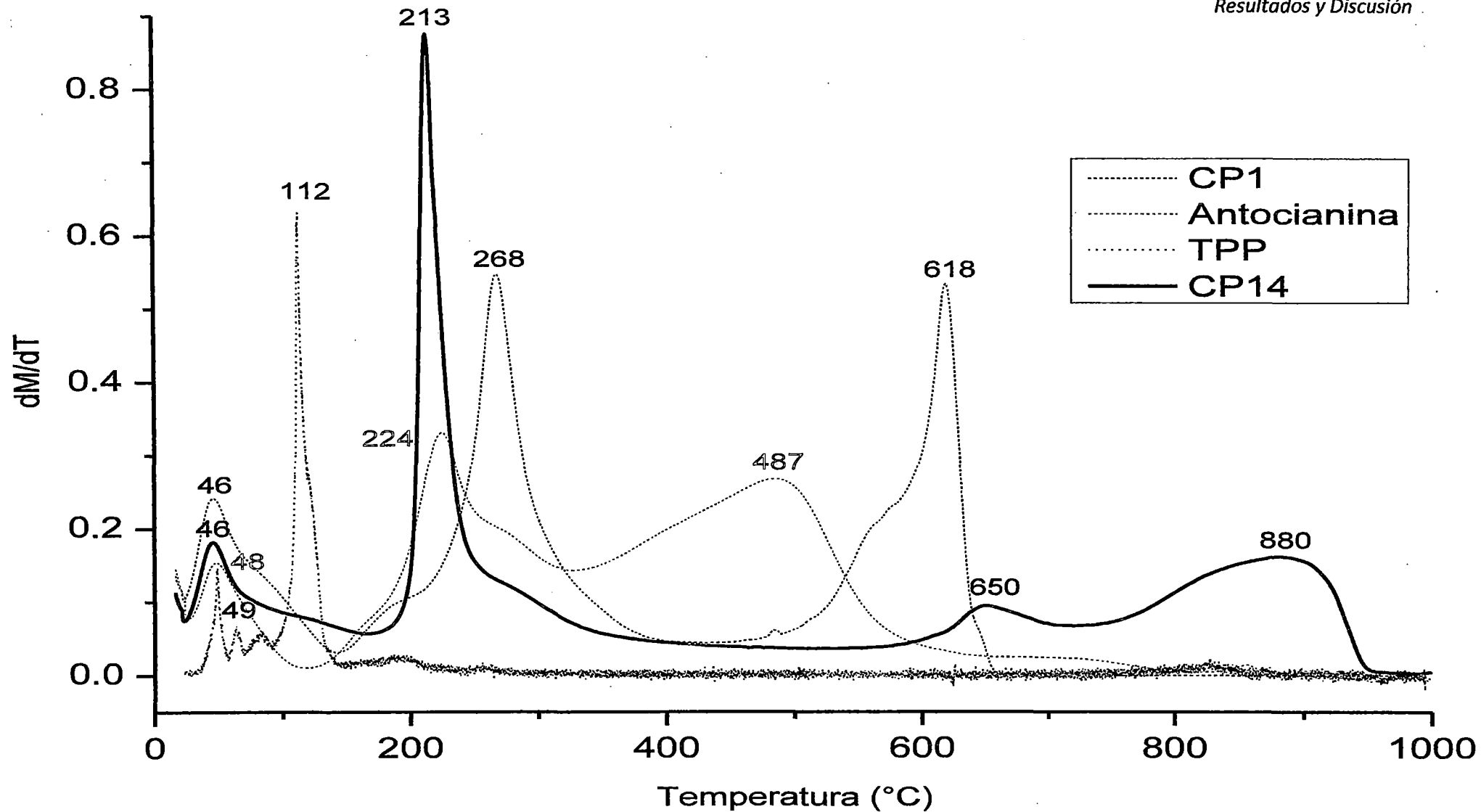


Fig III. 22. Termograma Antocianinas

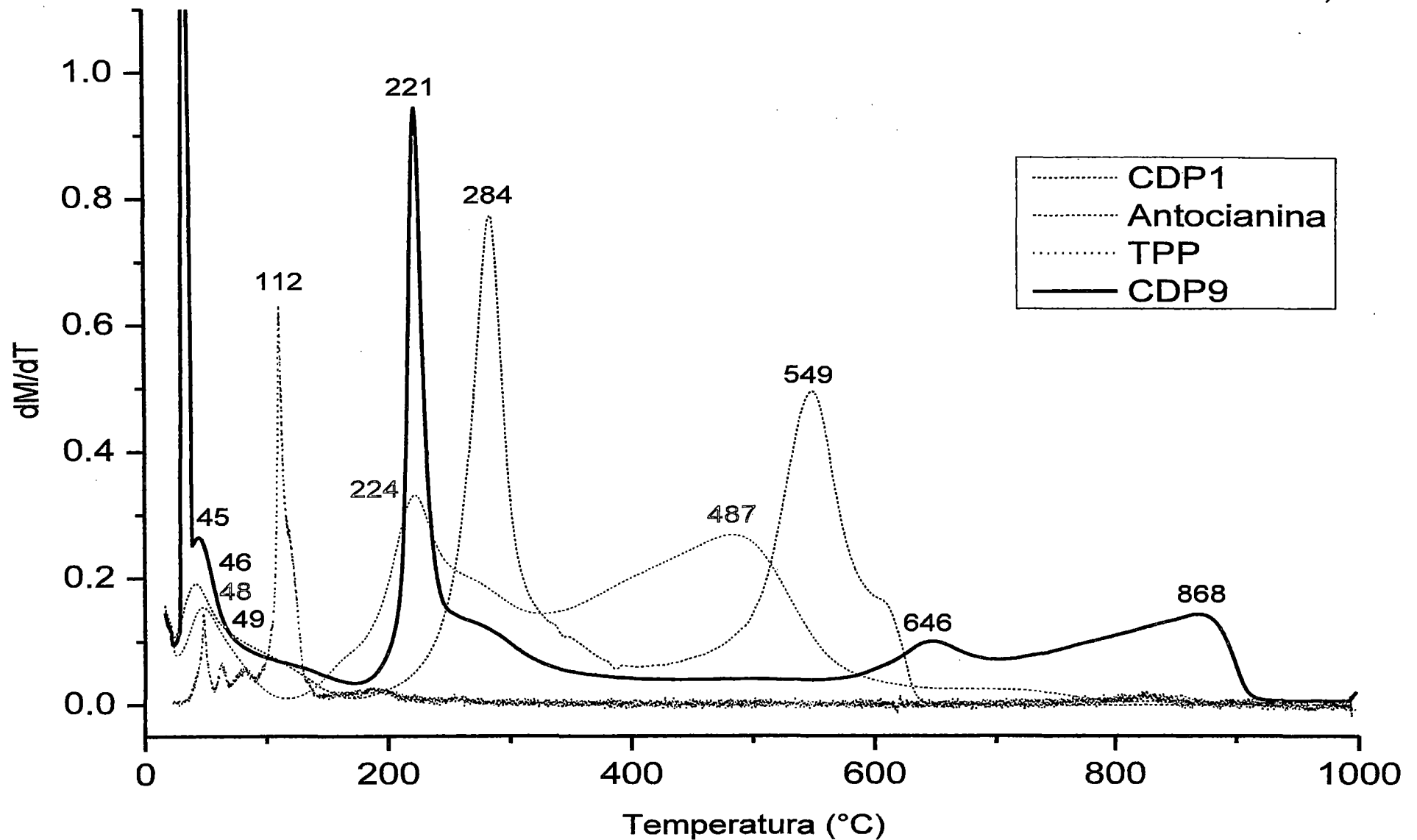
Para poder estudiar y analizar los fenómenos existentes en la degradación térmica de una película de quitosano cargada y reticulada con Tripolifosfato tenemos la Fig III.23 y III.24. En la primera gráfica podemos observar una primera degradación entre la temperatura ambiente y 163 °C correspondiente a la pérdida de agua, el segundo evento térmico comprendido entre 163 y 504 °C corresponde la degradación de despolimerización de las cadenas de quitosano en la película, junto con degradación parcial de las antocianinas. Podemos notar que la pérdida de oxígeno del Tripolifosfato a una temperatura promedio de 112 °C no se presenta ya que está protegido por el enlace de puente hidrógeno existente con las aminas del quitosano. También notamos que la segunda degradación de las antocianinas que ocurre a una temperatura promedio de 487 °C ha sufrido un corrimiento ya que el tercer evento térmico de nuestra película presenta un intervalo de 504 a 731 °C, que indica que la degradación de las antocianinas está térmicamente impedido por una fuerza de interacción intermolecular, este último fenómeno nos hace pensar que el ambiente electronegativo generado por la deslocalización de electrones en la estructura de la antocianina sufre una interacción con las aminas protonadas del quitosano, generando así un corrimiento en dicho evento térmico. El último evento presentado comprende de 731 a 963 °C que según el espectro de quitosano debió ocurrir a 618 °C aproximadamente, ahora nos confirma la existencia de la interacción de puente hidrógeno entre las aminas de quitosano y el oxígeno de Tripolifosfato, una vez quebrada la interacción la materia restante se degrada junta mediante una termooxidación.

La Fig III.24 presenta el mismo fenómeno explicado anteriormente, solo que esta vez la película utilizada ha sido preparada con quitosano despolimerizado, los eventos térmicos nuevamente son cuatro, el primero entre la temperatura ambiente y 173 °C atribuido a la pérdida de agua, el segundo entre 173 y 488 °C corresponde a la depolimerización del quitosano, el tercero entre 488 y 700 °C corresponde a la segunda degradación de las antocianinas, el cuarto evento comprendido entre 700 y 927 °C atribuido a la ruptura del enlace puente hidrógeno y degradación de la materia orgánica restante.

Podemos ver que en estos fenómenos no existe diferencia apreciable entre las películas preparadas con quitosano y quitosano depolimerizado, los espectros y eventos térmicos son similares, esto nos hace pensar que el entrecruzamiento en la preparación de la película no depende del peso molecular y que probablemente la liberación presente eventos similares.



**Fig III. 23.** Termograma de película de quitosano reticulado con tripolifosfato y cargado con Antocianinas CP13 comparado con los termogramas de Quitosano CP1, Tripolifosfato y Antocianinas



**Fig III. 24.** Termograma de película de quitosano reticulado con tripolifosfato y cargado con Antocianinas CDP9 comparado con los termogramas de Quitosano depolimerizado CDP1, Tripolifosfato y Antocianinas



## 2.5 Estudio de Hinchamiento:

Es necesario realizar un estudio del grado de hinchamiento de las películas en el medio en el que se realizan los estudios de liberación *in vitro*, puesto que su comportamiento en dicho medio va a afectar a la liberación del fármaco. El hinchamiento de las películas de quitosano y TPP dependerá del pH del medio de liberación, debido a que las interacciones electrostáticas existentes entre ambos polianiones están controladas por el pH del medio. Se estudió el efecto de la concentración de TPP, el tiempo de entrecruzamiento y el grosor de la película sobre el hinchamiento de las películas en ausencia de las antocianinas, utilizando PBS a pH 6,5. El hinchamiento se determinó por la ecuación I.17:

$$W = \frac{M - M_0}{M_0}$$

donde M es el peso de la película a un tiempo t y M<sub>0</sub> es el peso de la película antes del proceso de hinchamiento.

### 2.5.1. Efecto de la concentración de tripolifosfato sobre el grado de hinchamiento.

En la Fig III. 25 se muestran los perfiles de hinchamiento de las películas CP1, CP3, CP6 y CP8, cuya diferencia únicamente es la concentración de Tripolifosfato utilizado para entrecruzar el polímero, en este caso 0, 1, 2 y 5% p/v respectivamente. La película CP1 no entrecruzada presentó un grado de hinchamiento de 0.81, mientras que las películas reticuladas con soluciones de TPP al 1, 2, y 5% (p/v) presentaron un grado de hinchamiento más bajo, 0.42, 0.42 y 0.40 respectivamente, esto nos hace pensar que la interacción iónica entre el quitosano y el TPP nos dio lugar a una matriz que impidió la entrada del agua, por este motivo las películas se hincharon menos. Por otra parte el hinchamiento no fue significativamente distinto, son prácticamente los mismos para las concentraciones estudiadas en este caso. Esto puede deberse a que la reticulación con 1% (p/v) de TPP diese lugar a una matriz lo suficientemente entrecruzada como para no permitir la entrada de agua.

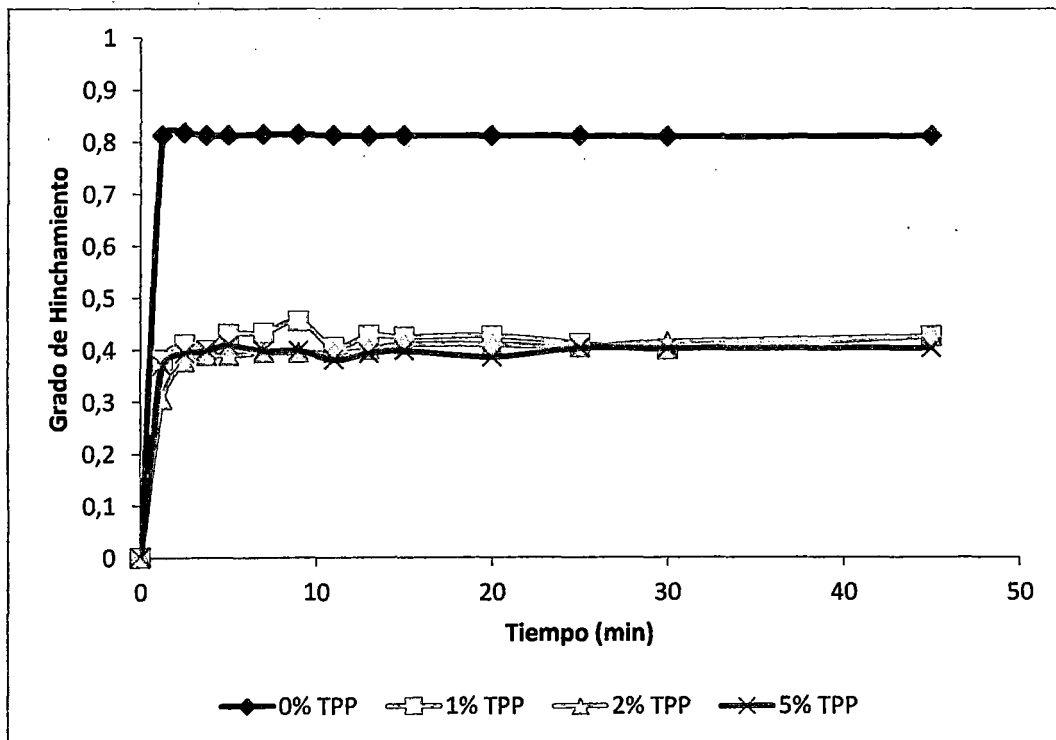
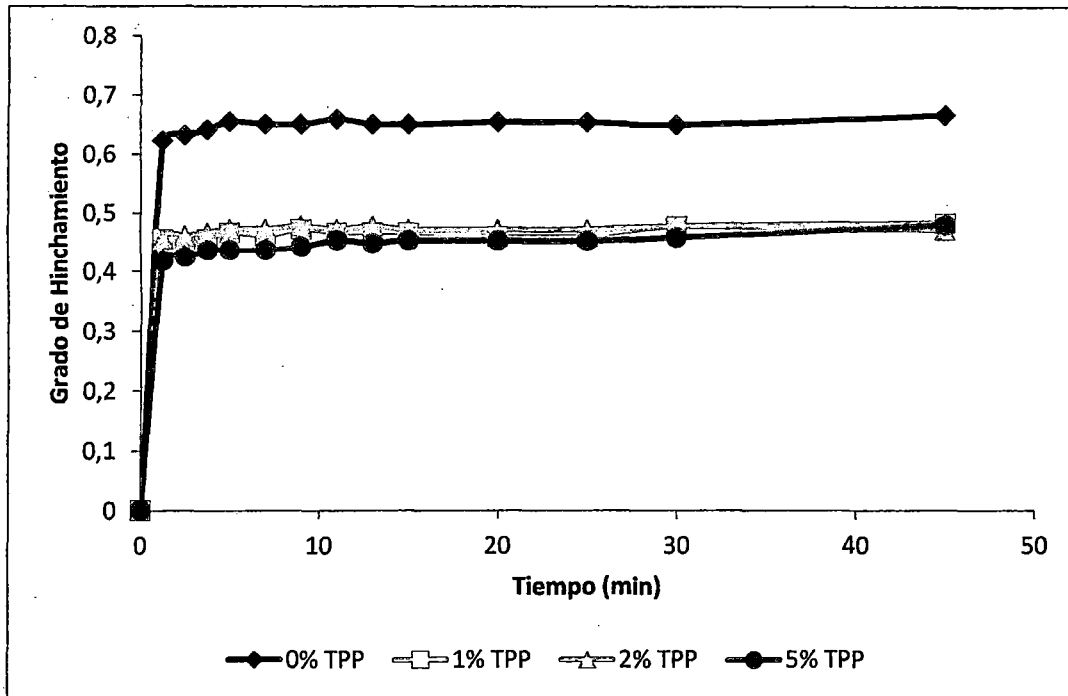


Fig III. 25. Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (1% p/v) entrecruzadas con 0, 1, 2 y 5%(p/v) de TPP, en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de agitación.

También comprobamos en la Fig III.26 que las películas de quitosano depolimerizado poseen un comportamiento similar que sus homólogos de alto peso molecular. La película CDP1 no entrecruzada presentó un grado de hinchamiento de 0.66, mientras que las películas CDP3, CDP6 y CDP7 reticuladas con soluciones de TPP al 1, 2, y 5% (p/v) presentaron un grado de hinchamiento más bajo, 0.48, 0.47 y 0.48 respectivamente. Por lo tanto, podemos concluir que el entrecruzamiento de las películas con polianiones da lugar a un bajo grado de hinchamiento, y este hecho favorecerá el control de la liberación de compuesto encapsulado.



**Fig III. 26.** Grado de hinchamiento de las películas de quitosano depolimerizado (1% p/v) entrecruzadas con 0, 1, 2 y 5%(p/v) de TPP, en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de agitación.

### 2.5.2. Efecto del tiempo de entrecruzamiento sobre el grado de hinchamiento.

La Fig III.27 y Fig III.28 muestra el hinchamiento de las películas CP2 y CP3, entrecruzadas con 1% (p/v) de TPP a pH 6,5 y sometidas a distintos tiempos de entrecruzamiento (0,5 y 1 hora). El grado de hinchamiento a 45 minutos, para las películas sumergidas en la solución de TPP durante 0,5 y 1 hora fue de 0,46 y 0,42, respectivamente. Como se puede observar, un aumento del tiempo de entrecruzamiento provocó una ligera disminución del grado de hinchamiento, aunque no existen diferencias significativas entre los perfiles de hinchamiento. Lo mismo sucede en el caso de las películas con quitosano depolimerizado CDP2 y CDP3, en donde los grados de hinchamiento a condiciones similares son 0,56 y 0,48 para 0,5 y 1 hora de reticulación,

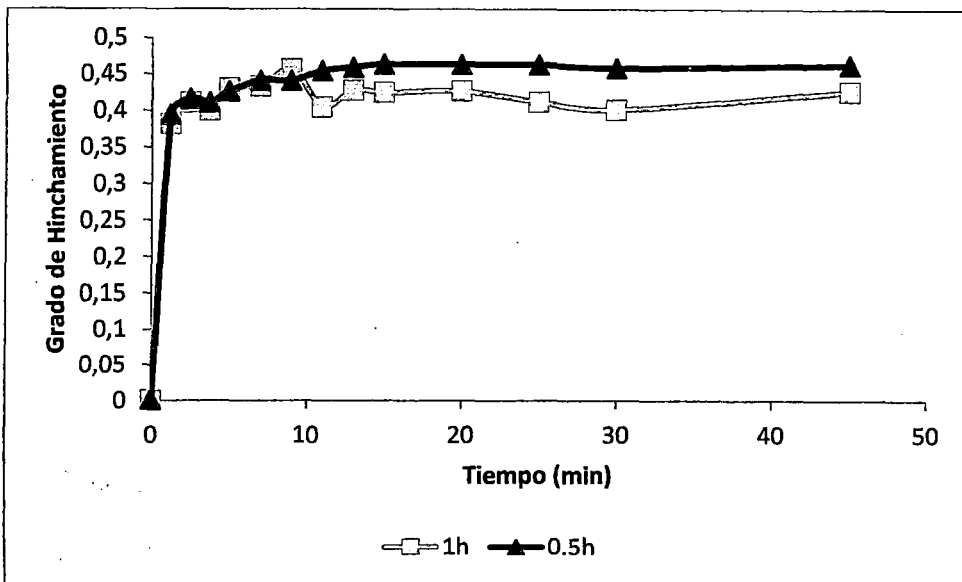


Fig III. 27. Grado de hinchamiento de las películas de quitosano (1% p/v) entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 0.5 y 1 hora, en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de agitación.

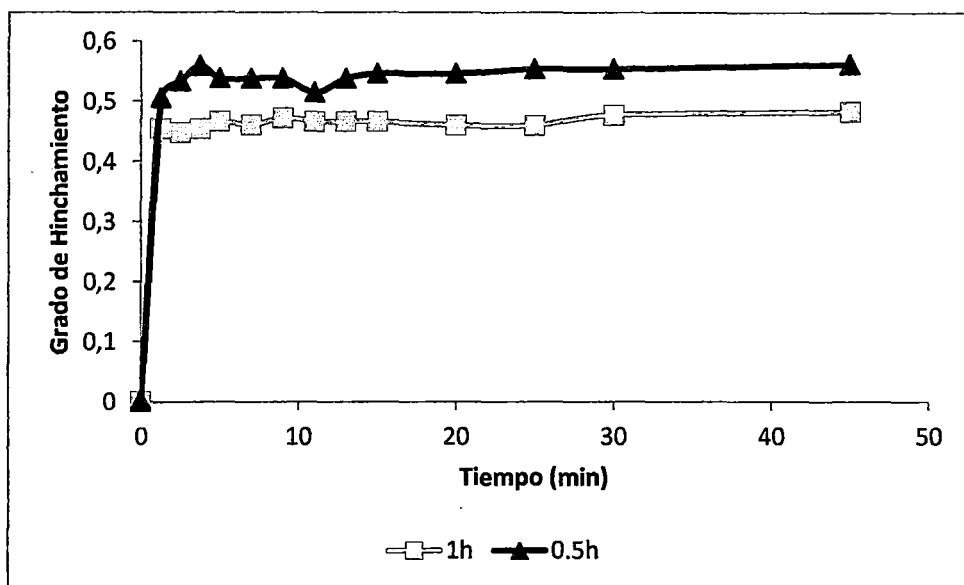
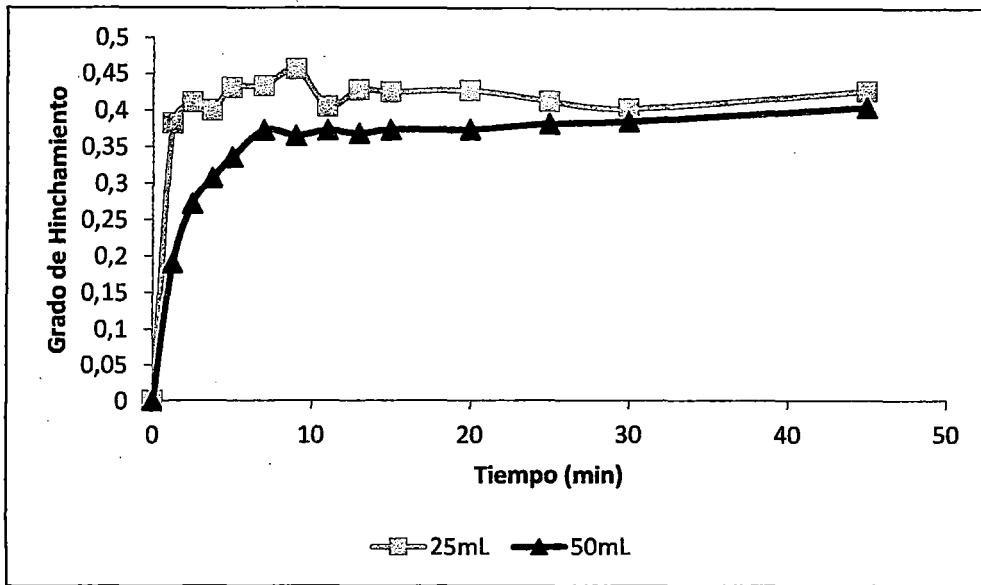


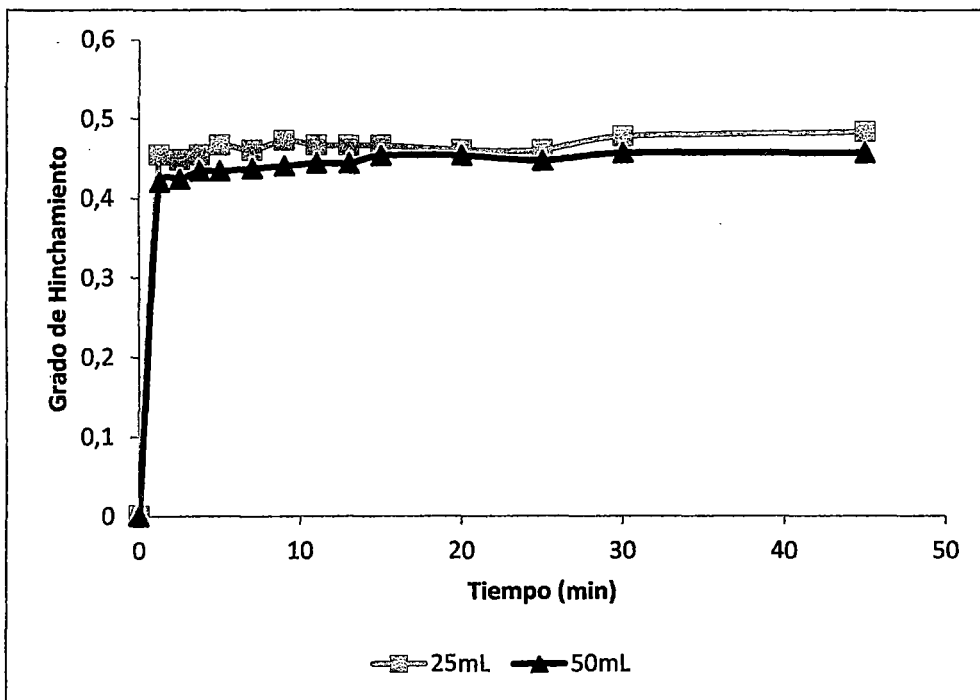
Fig III. 28. Grado de hinchamiento de las películas de quitosano depolimerizado (1% p/v) entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 0,5 y 1 hora, en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de agitación.

### 2.5.3. Efecto del espesor de las películas sobre el grado de hinchamiento

En la Fig III.29 y Fig III.30, se puede apreciar el efecto del espesor en la reticulación de las películas, para eso se compara las películas CP3 y CP5, en las cuales se utilizó diferente volumen de solución de quitosano para prepararlas, 25 y 50 mL respectivamente, estas son correspondientes a un espesor de 0,1 y 0,05 mm. Como se puede apreciar las películas de 25 mL y 50 mL poseen un grado de hinchamiento de 0,42 y 0,39 respectivamente, podemos deducir que la película CP5 demora un poco más en dejar pasar el agua al interior de la matriz debido al mayor espesor que posee, comparada con su homóloga más delgada. El mismo efecto se aprecia para las películas CDP3 y CDP5 cuyos grados de reticulación son 0,48 y 0,46.



**Fig III. 29.** Grado de hinchamiento de las películas de quitosano 25 mL (CP3) y 50 mL (CP5) al 1% p/v entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 1 hora, en PBS (pH 6,5) a 37°C y 100 rpm de agitación.



**Fig III. 30.** Grado de hinchamiento de las películas de quitosano depolimerizado 25 mL (CDP3) y 50 mL (CDP5) 1% p/v entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 1 hora, en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de agitación.

#### 2.5.4. Efecto del peso molecular de las películas sobre el grado de hinchamiento:

Como se pueden apreciar en las comparaciones de las figuras del estudio de hinchamiento, para los casos presentados las condiciones son similares, por cada efecto se compara quitosano con quitosano depolimerizado, podemos resumir los resultados en el siguiente cuadro.

Tabla III.17. Grado de hinchamiento de películas de quitosano y quitosano reticulado

Película de quitosano	Grado de Hinchamiento	Película de quitosano depolimerizado	Grado de Hinchamiento
CP1	0,81	CDP1	0,66
CP2	0,46	CDP2	0,56
CP3	0,42	CDP3	0,48
CP5	0,39	CDP5	0,46
CP6	0,42	CDP6	0,47
CP8	0,40	CDP7	0,48

Como podemos apreciar casi, todas las películas de quitosano preparadas correspondientes al quitosano y quitosano depolimerizado presentan hinchamientos similares, las condiciones en las comparaciones fueron similares. La variación en el hinchamiento es bastante bajo, no existe mucha diferencia en los hinchamientos de las películas preparadas, el entrecruzamiento producido por el quitosano y el tripolifosfato es prácticamente el mismo, el pequeño aporte del menor peso molecular genera una mayor movilidad en las cadenas de quitosano, logrando así una mayor entrada de agua y por lo tanto un mayor hinchamiento, pero este efecto es poco apreciable como para ser considerado, estos resultados nos hacen pronosticar efectos similares, para la liberación de las antocianinas en estudio.

#### 2.5.5. Modelo Cinético:

Los perfiles de Hinchamiento se ajustaron a la ecuación de Schott (I.16).

$$\frac{t}{W} = A + Bt$$

Donde W representa al hinchamiento en el tiempo t y B es el inverso del hinchamiento máximo.

Como se observa en las Fig III.31 y III.32, los ajustes presentaron altos coeficientes de correlación ( $R^2 \geq 0.99$ ). Por consiguiente, el proceso de hinchamiento de estas películas está gobernado por la relajación de las cadenas del polímero. Como se vió en los fundamentos teóricos, los materiales que se ajustan a la ecuación de Schott siguen una cinética de 2do orden [47], esto quiere decir que la cantidad de agua que se incorpora a la matriz de quitosano está gobernada por la ecuación I.16 hecho que cumplen los resultados de este apartado.

Dependiendo de los valores obtenidos en la constante B, podemos deducir el hinchamiento máximo alcanzado en las películas, como podemos ver en las Fig III 30 y III.31 estas son muy similares, por lo que muy probablemente encontraremos comportamientos similares o muy poco apreciables en la liberación del fármaco.

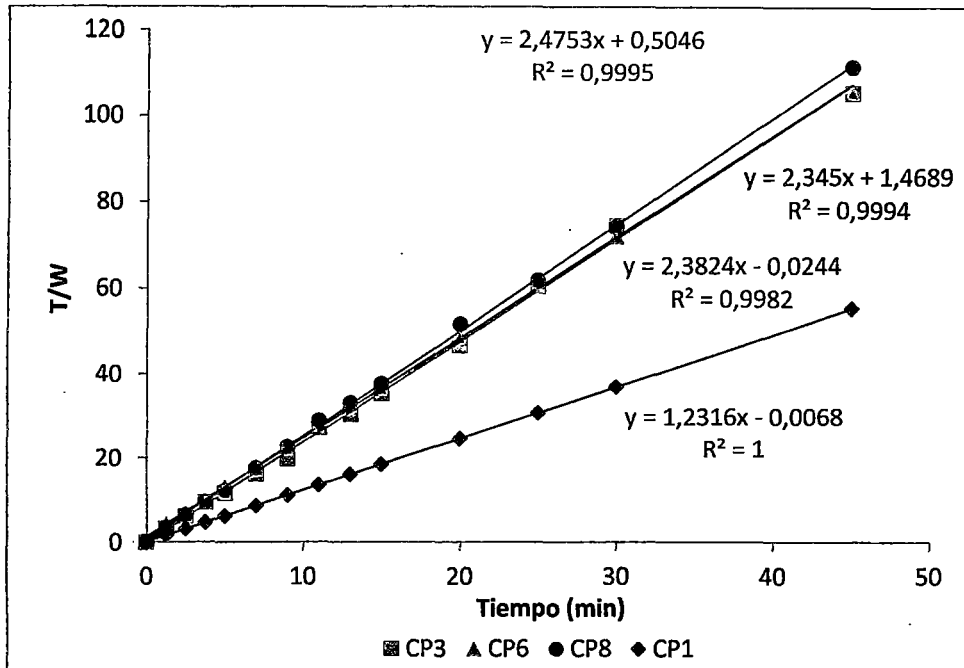


Fig III. 31: Perfiles de hinchamiento de las películas de quitosano 1% p/v entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 1 hora, en PBS (pH 6,5) ajustados a la ecuación de Schott.

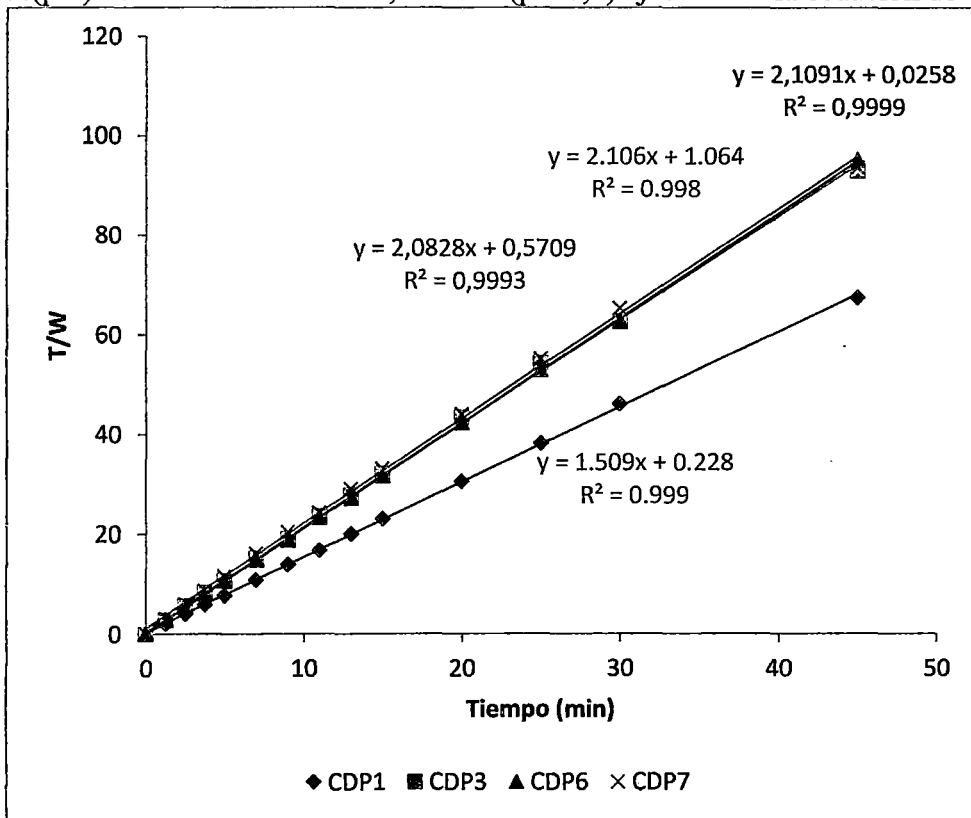


Fig III. 32. Perfiles de hinchamiento de las películas de quitosano depolimerizadas 1% p/v entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 1 hora, en PBS (pH 6,5) ajustados a la ecuación de Schott.

## 2.6 [Ensayo citotóxico:

Se tomaron los datos de viabilidad celular en muestras de películas de quitosano, en este caso CP1 y CP3, la finalidad de este ensayo es verificar la citotoxicidad de las películas preparadas, como un indicativo de la viabilidad aplicativa del trabajo en sistemas biológicos.

Tabla III.18. Resultados de ensayo de citotoxicidad

Concentración del extracto (%)	Viabilidad Celular $\pm$ cv			
	Control negativo	Control positivo	Película CP1	Película CP3
100	100 $\pm$ 09	20 $\pm$ 10	95 $\pm$ 04	100 $\pm$ 14
50	65 $\pm$ 03	100 $\pm$ 04	87 $\pm$ 04	76 $\pm$ 16
25	68 $\pm$ 09	100 $\pm$ 17	77 $\pm$ 05	91 $\pm$ 03
12.5	100 $\pm$ 11	98 $\pm$ 16	89 $\pm$ 06	65 $\pm$ 04
6.25	96 $\pm$ 14	97 $\pm$ 16	90 $\pm$ 14	80 $\pm$ 14

Como podemos ver en la Fig III.33, las películas de quitosano no emiten ningún compuesto tóxico, incluso se puede observar proliferación de las células en algunos datos, pero no están consideradas en la Tabla III.18, lo mismo se puede ver en el caso de la película CP3, en cuyo caso la película presenta una reticulación con tripolifosfato al 1% durante 1 h. Con estos resultados podemos ver que las películas de quitosano preparadas no presentaran ningún daño en un sistema vivo al cual se le quisiera aplicar la película para un fin determinado.

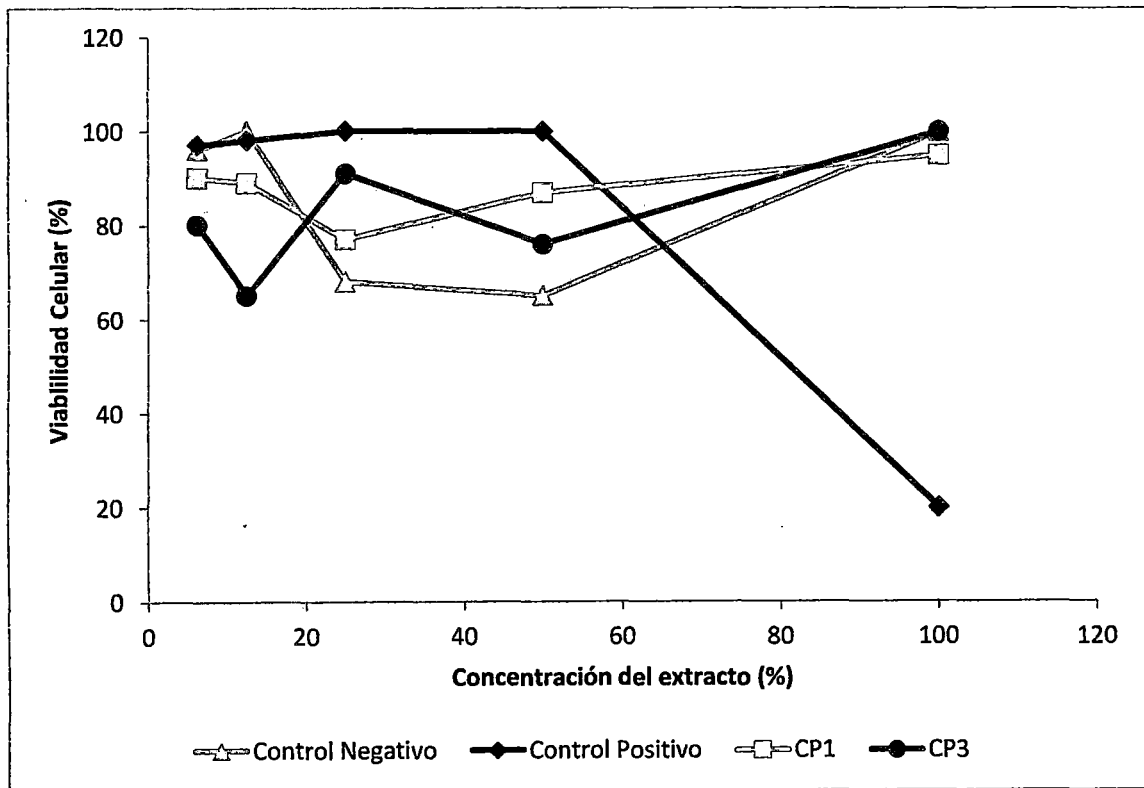


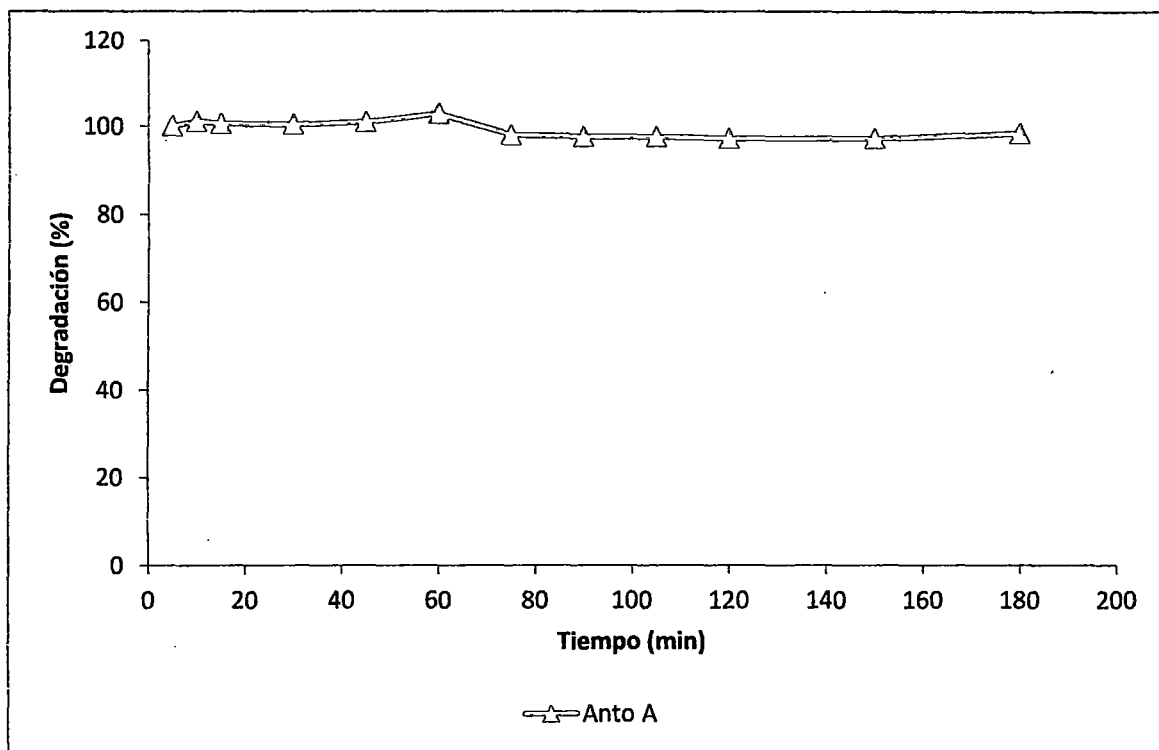
Fig III.33: Curvas de Viabilidad celular obtenidas del ensayo de citotoxicidad

### 3. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*.

Los ensayos de liberación se llevaron a cabo en PBS (pH 6,5). Se estudió la liberación de antocianinas en películas de quitosano, sin embargo antes de presentar las curvas de liberación realizamos un estudio del efecto de la degradación de las antocianinas en los sistemas de liberación controlada.

La Fig III.34 muestra el efecto del tiempo sobre la concentración de antocianinas en un sistema análogo al aplicado en este trabajo para la liberación de antocianinas, la misma que fue cuantificado con ácido clorhídrico.

Como podemos observar tanto el tiempo, la temperatura, luz y las condiciones de liberación provocan una mínima degradación en las antocianinas.



**Fig III.34.** Curva de degradación de antocianinas en PBS (pH 6,5) a 37 °C y 100 rpm de revolución.

También hay que considerar que en el proceso generamos una dilución al sustituir 2 mL de la muestra por otros 2 mL del buffer, hecho que debe ser considerado en los cálculos para la construcción de las curvas de liberación. Las antocianinas se cuantificaron con HCl, ya que mantiene la degradación prácticamente nula en el periodo de las tres primeras horas.

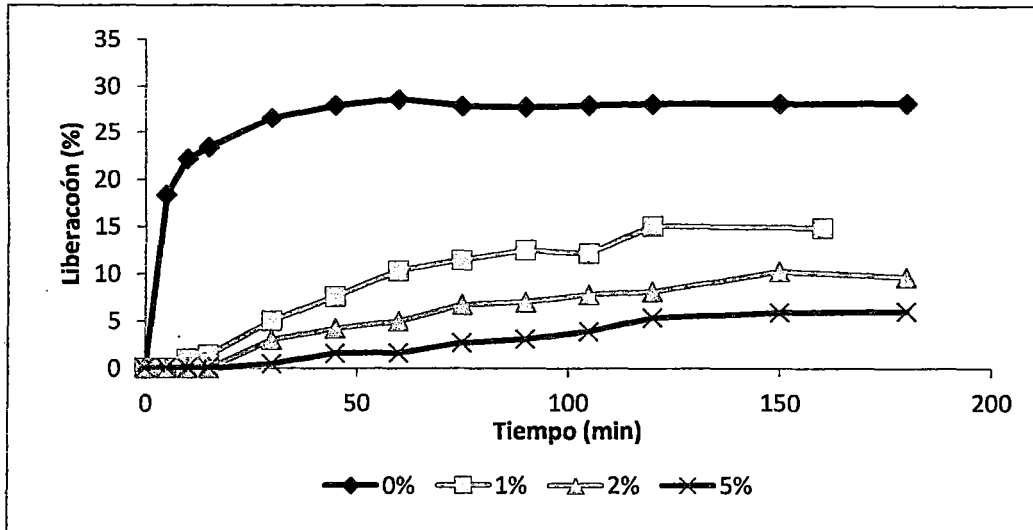
Una vez considerados estos hechos, presentamos el estudio de los siguientes efectos en la liberación *in vitro* de las antocianinas:

- La concentración de TPP
- El tiempo de entrecruzamiento
- El espesor de las películas
- El peso molecular del Quitosano



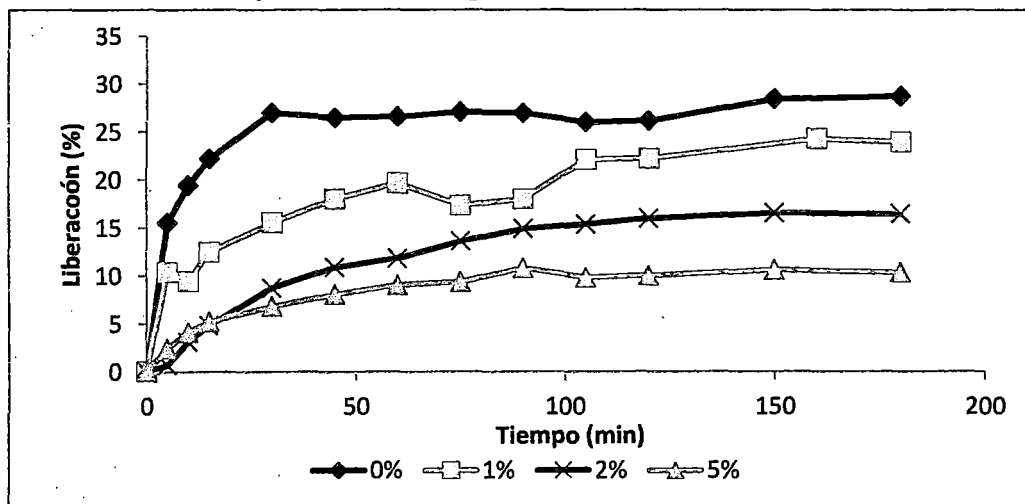
### 3.1. Efecto de la Concentración:

La Fig III.35 y III.36 muestran los perfiles de liberación de antocianinas en un periodo de tres horas a partir de películas de quitosano entrecruzadas con diferentes concentraciones de TPP (0, 1, 2 y 5% p/v). Las diferentes concentraciones de TPP provocaron una reducción significativa en la liberación de antocianinas con respecto a la película sin TPP. Un aumento de la concentración del agente entrecruzante dio lugar a una liberación más lenta del principio activo observándose que después de 3 horas de ensayo, se liberó el 28, 15, 10 y 5% de antocianinas a partir de películas de quitosano reticuladas con TPP cuya concentración de antocianinas fue cuantificada con el método espectrofotométrico mostrado en el Anexo 4.



**Fig III.35.** Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano 1% p/v reticuladas durante 1 hora con diferentes concentraciones de TPP (0%, 1%, 2% y 5%) en PBS (pH 6.5) a 37 °C y 100 rpm de revolución.

Las películas de quitosano depolimerizadas presentaron un comportamiento similar, obteniéndose una liberación de 28, 24, 16 y 10% de antocianinas para las películas reticuladas con 0, 1, 2 y 5% de TPP respectivamente.



**Fig III.36.** Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano depolimerizado 1% p/v reticuladas durante 1 hora con diferentes concentraciones de TPP (0%, 1%, 2% y 5%) en PBS (pH 6.5) a 37 °C y 100 rpm de revolución.

En la Fig III. 37, se muestra la fotografía de una película de quitosano destruida, la película inicialmente deja entrar solvente en su matriz, en este caso agua, posteriormente libera a las antocianinas en forma paulatina, sin embargo a medida que pasa el tiempo, dicha película termina destruyéndose, y haciéndose pedazos por falta de la estabilización superficial que genera el tripolifosfato. Este es un importante indicativo del aumento de la resistencia mecánica atribuida a la interacción de puente hidrógeno del Tripolifosfato.

Los gráficos presentados anteriormente muestran el efecto que presenta la concentración de tripolifosfato en la liberación, como podemos apreciar un aumento en la concentración genera en las matrices preparadas una mayor reticulación, un menor hinchamiento, y en este caso un tiempo más retardado de liberación de las antocianinas presentes.

Por lo tanto, películas de quitosano entrecruzadas con TPP presentaron una liberación controlada del principio activo utilizado.

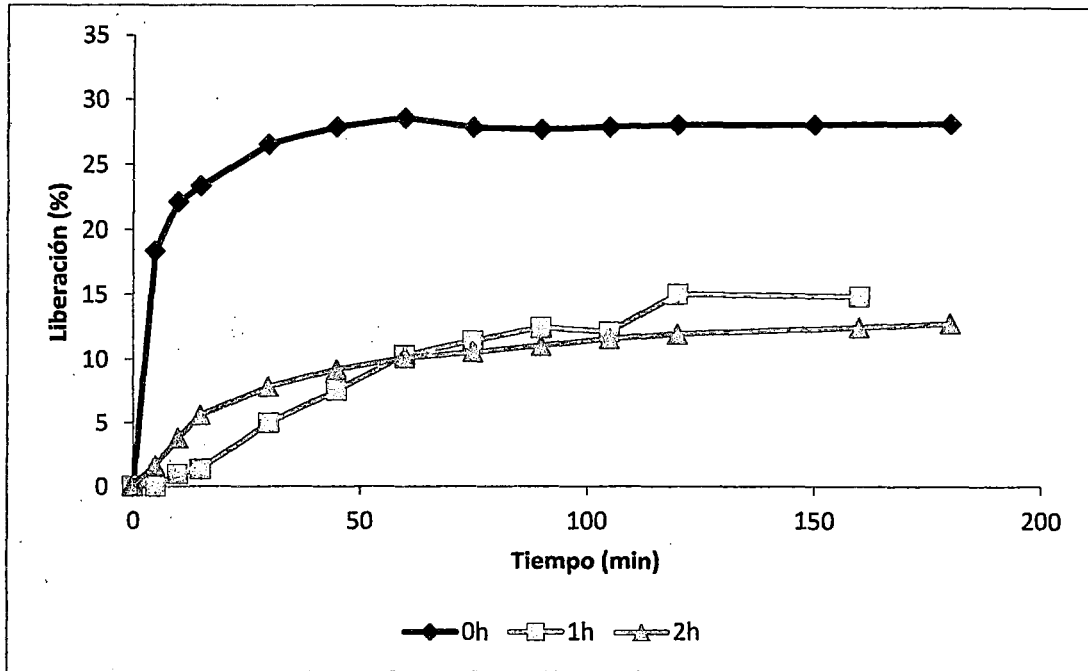


**Fig III.37.** Película de quitosano CP12 destruida, cargada con 0.4% de antocianinas, después de la liberación de tres horas.

### 3.2. El tiempo de entrecruzamiento

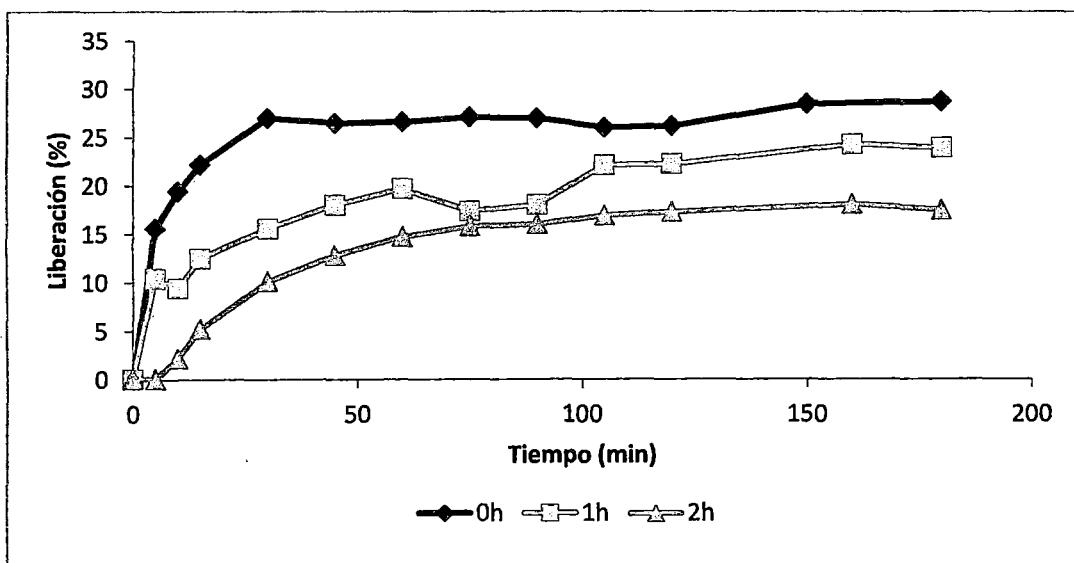
Se observaron diferencias en la liberación en función del tiempo de entrecruzamiento en la solución de TPP. En la Fig III.38 se muestran los perfiles de liberación de películas sumergidas en TPP al 1% (p/v) durante distintos períodos de tiempo (0, 1 y 2 horas).

La cantidad de fármaco liberado fue menor para las películas entrecruzadas durante los diferentes tiempos de entrecruzamiento. A los 180 minutos se liberó el 28, 15 y 13% del total de las antocianinas cargadas de las películas sumergidas en TPP al 1% (p/v) durante 0, 1 y 2 horas respectivamente.



**Fig III.38.** Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano 1% p/v reticuladas con TPP 1% en PBS (pH 6,5) durante 1 y 4 horas a 37 °C y 100 rpm de revolución.

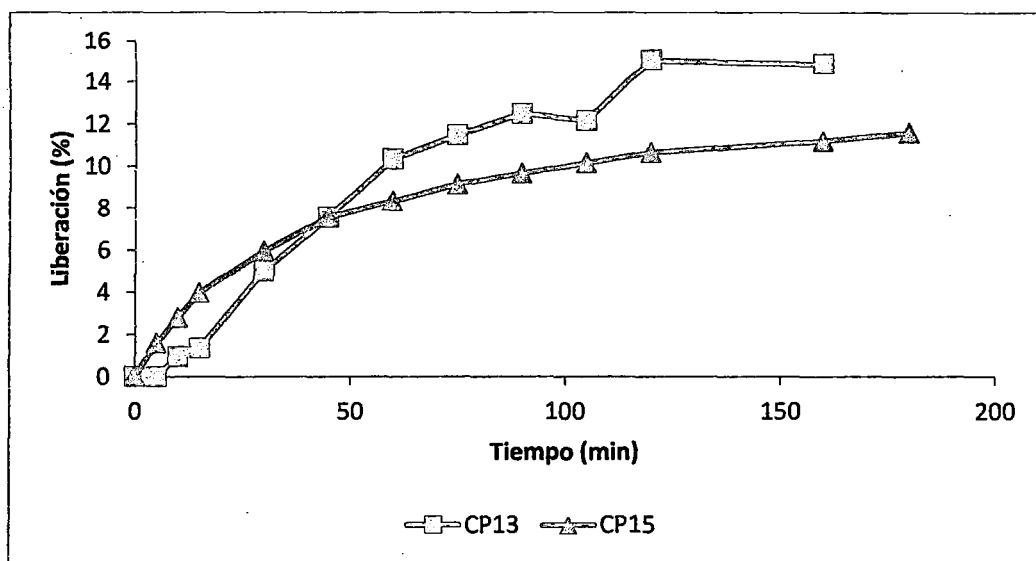
Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los estudios de hinchamiento, ya que las películas que no fueron sometidas a entrecruzamiento presentaron un rápido hinchamiento y por lo tanto una liberación más rápida del fármaco que las películas entrecruzadas. Esto es debido a que un mayor grado de entrecruzamiento dio lugar a una matriz más reticulada y compacta, controlando por tanto el hinchamiento de las películas y la cantidad de fármaco liberado. El efecto es similar para las películas de quitosano depolimerizado entrecruzadas con tripolifosfato a 0, 1 y 2 horas respectivamente, que presentaron una liberación de 29, 24 y 18% de liberación de la antocianina ( Fig III.39).



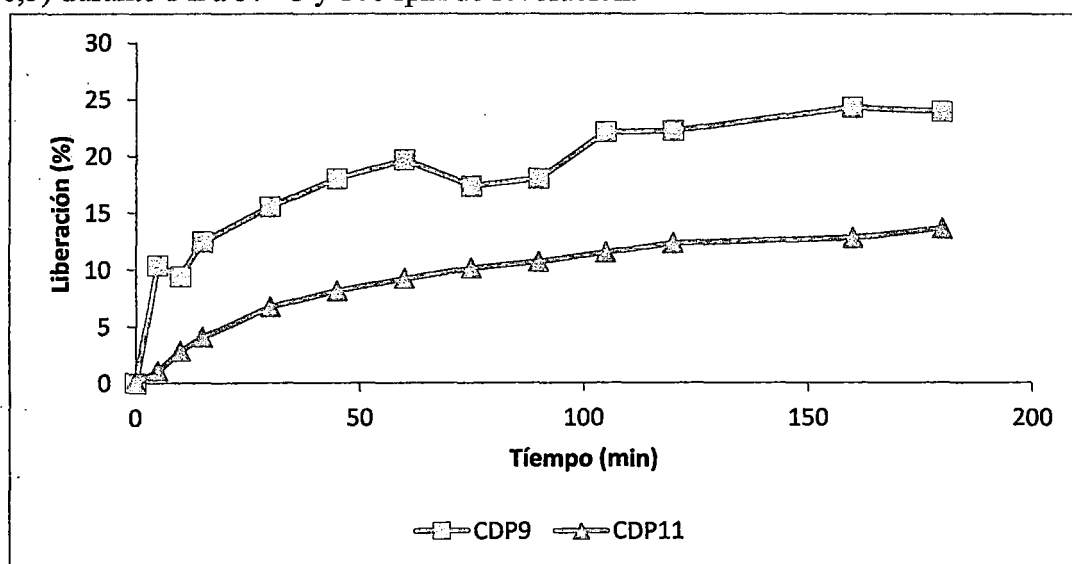
**Fig III.39.** Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano depolimerizadas al 1% p/v reticuladas con TPP 1% en PBS (pH 6,5) durante 0, 1 y 4 horas a 37 °C y 100 rpm de revolución.

### 3.3. Efecto del espesor de las películas

Se estudió el efecto del espesor de las películas sobre la liberación de antocianinas. Se prepararon soluciones de distintos volúmenes, 25 y 50 mL, para obtener películas de quitosano de distinto espesor, aproximadamente 50 y 100  $\mu\text{m}$ . En la Fig III.40 se muestran los perfiles de liberación de películas de diferentes grosores. En los ensayos de liberación se observó cómo, efectivamente, las películas de menor espesor liberaron las antocianinas de forma más rápida que las películas de mayor espesor. Las primeras liberaron, después de 180 minutos, un 15% del total de antocianinas cargadas, mientras que las segundas liberaron un 11,6% en 180 min, debido a la mayor distancia que debe recorrer el fármaco para atravesar la matriz de quitosano y TPP. Lo mismo se observa en la Fig III.41 donde películas preparadas con quitosano depolimerizado, después de 180 minutos, las películas de 25 mL liberan un 24% del total de antocianinas cargadas, mientras que las de 50 mL liberan 13,6% en 24 horas



**Fig III.40.** Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano al 1% p/v con diferente espesor 50  $\mu\text{m}$  (CP13) y 100  $\mu\text{m}$  (CP15), reticuladas con TPP 1% en PBS (pH 6,5) durante 1 h a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 100 rpm de revolución.



**Fig III.41.** Perfiles de liberación de Antocianinas de películas de quitosano depolimerizadas al 1% p/v con diferente espesor 50  $\mu\text{m}$  (CDP9) y 100  $\mu\text{m}$  (CDP11), reticuladas con TPP 1% en PBS (pH 6,5) durante 1 h a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 100 rpm de revolución.

### Efecto del peso molecular del Quitosano

Si observamos de la Fig III. 35 hasta la Fig III. 41 podemos observar el efecto del peso molecular en la liberación de las películas de quitosano, todas preparadas bajo las mismas condiciones, diferenciadas únicamente en los pesos moleculares de quitosano utilizado, en un grupo de 554,22 kDa y en el otro de 133,37 kDa.

Esto nos permite hacer el siguiente cuadro comparativo:

**Tabla III.19.** Liberación de películas de quitosano y quitosano reticulado

Película de quitosano	Liberación (%)	Película de quitosano depolimerizado	Liberación (%)
CP12	28	CDP8	29
CP13	15	CDP9	24
CP14	13	CDP10	18
CP15	11,6	CDP11	13,6
CP16	10	CDP12	16
CP17	5	CDP13	10

Como podemos ver en la Tabla III.19 las películas preparadas a partir de quitosano de alto peso molecular presentan una liberación ligeramente más retardada que sus homólogas de menor peso molecular, esto debido a que las películas presentan un menor tamaño en sus cadenas, que como ya se explicó anteriormente generan un mayor hinchamiento y por lo tanto una mayor liberación. Estos hechos han sido pronosticados anteriormente dado el comportamiento similar en la comparación de la caracterización de las películas preparadas. Nuevamente recalamos que estas diferencias son poco apreciables.

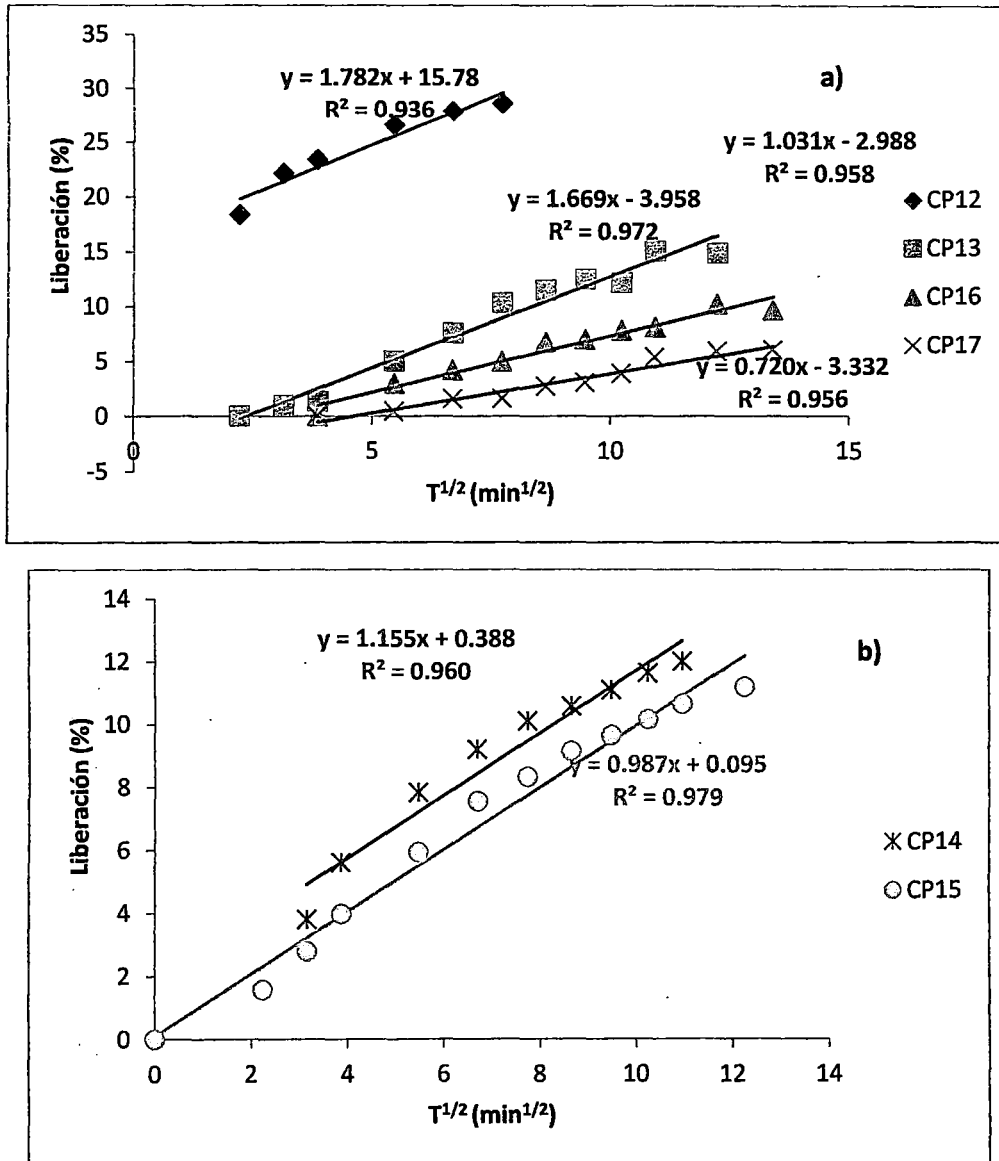
Otro fenómeno importante presente en la liberación de antocianinas en éstas películas es que el porcentaje de liberación es bajo, llegando solo a 29% en el caso de las películas de quitosano depolimerizadas, en el resto de películas, dependiendo del grado de reticulación estos valores son menores; lo que indica que el mayor porcentaje de las antocianinas queda atrapada en la red polimérica. El método de preparación de estas películas deja atrapada a las antocianinas en una red bien compacta que impide su salida, adicional a este hecho consideramos una interacción entre las antocianinas y el quitosano, ya que como vimos anteriormente en el termograma de las películas cargadas (Fig III.25 y III.26) se puede observar la degradación de las antocianinas a una temperatura mayor que lo esperado, lo cual indica claramente una interacción intermolecular entre el quitosano y las antocianinas reflejada en la poca liberación de este tipo de películas. El origen de este enlace intermolecular está en la interacción de las aminas del quitosano con la carga negativa generada por la deslocalización de electrones en la antocianina, motivo por el cual es difícil liberar la mayor parte del compuesto.

### 3.4. Ajustes de los perfiles de liberación a modelos matemáticos

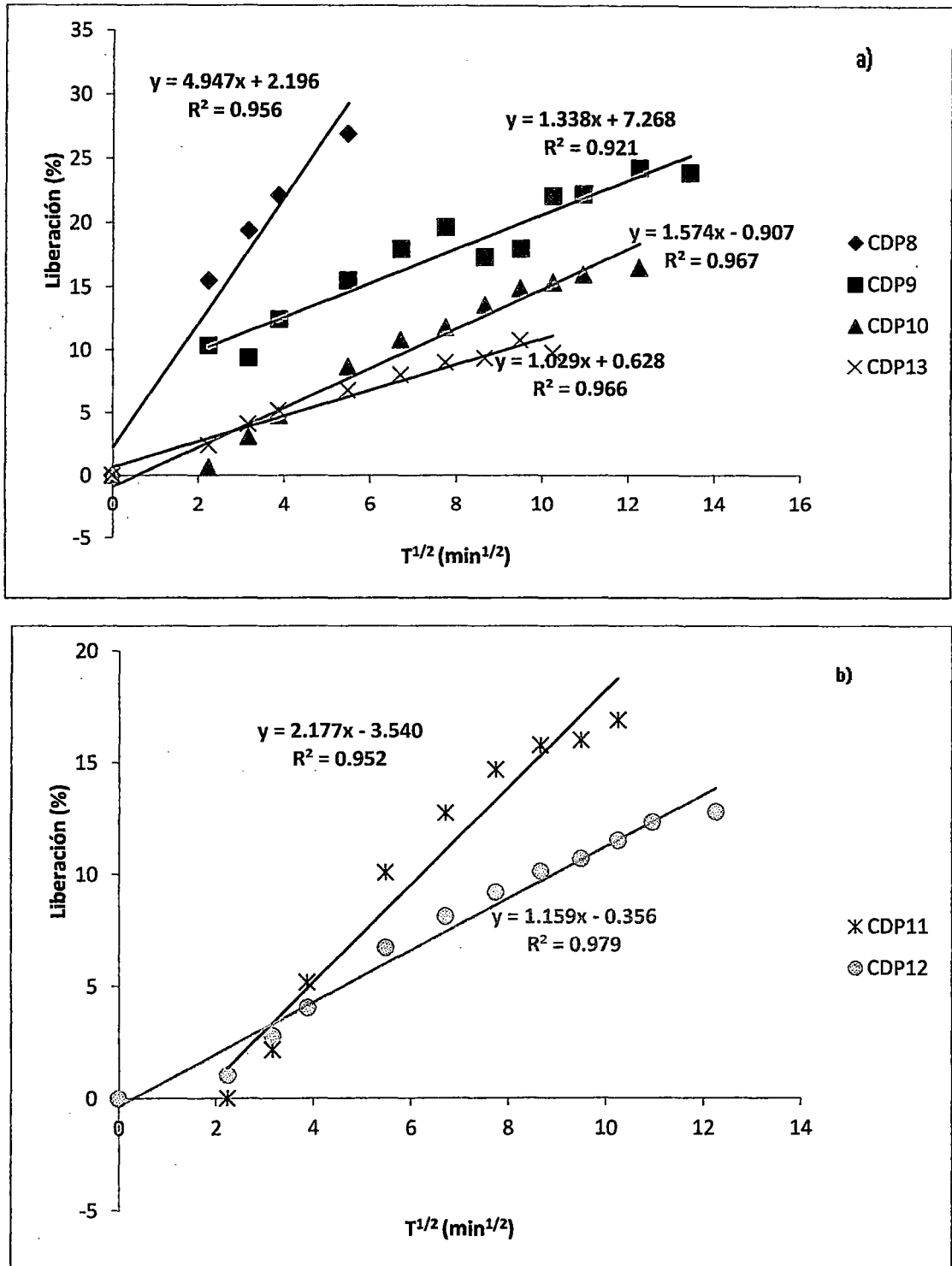
Los perfiles de liberación de las antocianinas se ajustaron a la ecuación simplificada de Higuchi (I.25).

$$Q = K_H t^{1/2}$$

Donde  $Q$  es la cantidad de fármaco liberado y  $K_H$  es la constante de disolución de Higuchi, que describe la liberación por un proceso de difusión basado en la ley de Fick. Como se puede observar en la Fig III.42, los coeficientes de correlación obtenidos para todas las películas CP12, CP13, CP14, CP15, CP16 y CP17 resultaron altos, también en la Fig III.43 se muestran los coeficientes de correlación para las películas CDP8, CDP9, CDP10, CDP11, CDP12 y CDP13, también mayores que 0,91. Esto significa que la liberación del principio activo desde la matriz siguió un mecanismo de difusión.



**Fig III.42.** Perfiles de liberación de antocianinas de películas de quitosano CP12, CP13, CP16, CP17, CP14 y CP15 ajustadas al modelo de Higuchi.



**Fig III.43.** Perfiles de liberación de antocianinas de películas de quitosano CDP8, CP9, CP10, CP13, CP11 y CP12 ajustadas al modelo de Higuchi.

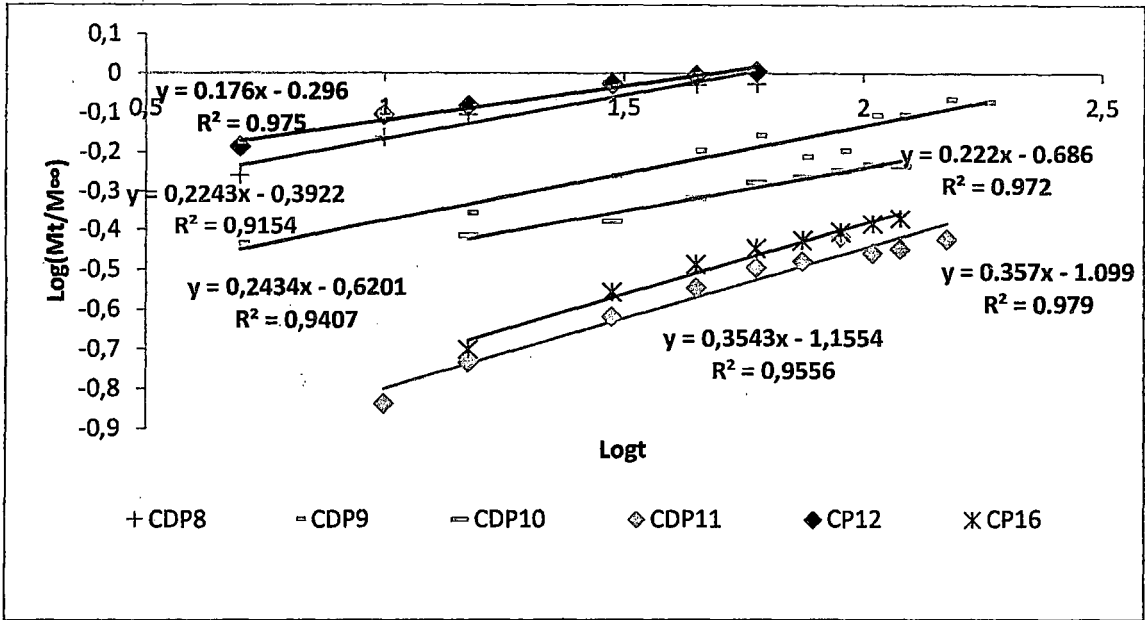
Con el fin de determinar el mecanismo de difusión, los datos se ajustaron a la ecuación de Korsmeyer-Peppas (I.28 , I. 29).

$$M_t/M_\infty = Kt^n$$

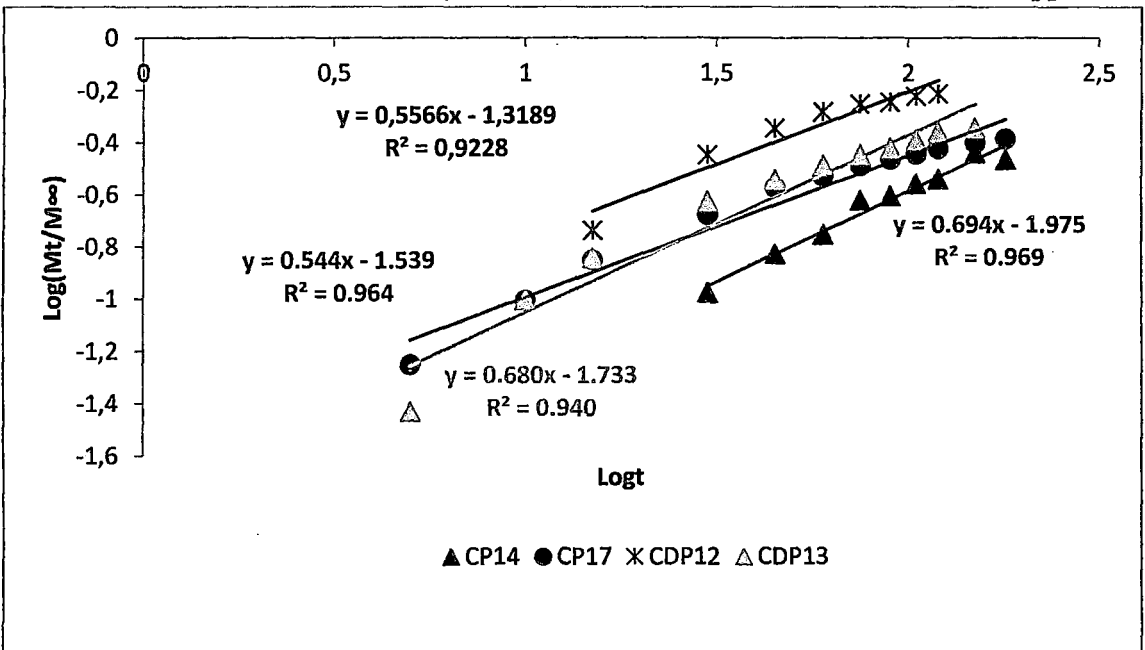
$$\text{Log}M_t/M_\infty = \text{Log}K + n\text{Log}t$$

Donde  $M_t$  es cantidad de fármaco liberado a tiempo  $t$ ,  $M_\infty$  es la cantidad de fármaco que se liberaría a tiempo infinito,  $K$  es la constante del sistema y  $n$  es el exponente difusional.

Las Fig. III.44, III. 45 y III. 46 muestran los ajustes de las películas mencionadas anteriormente al modelo de Korsmeyer-Peppas.

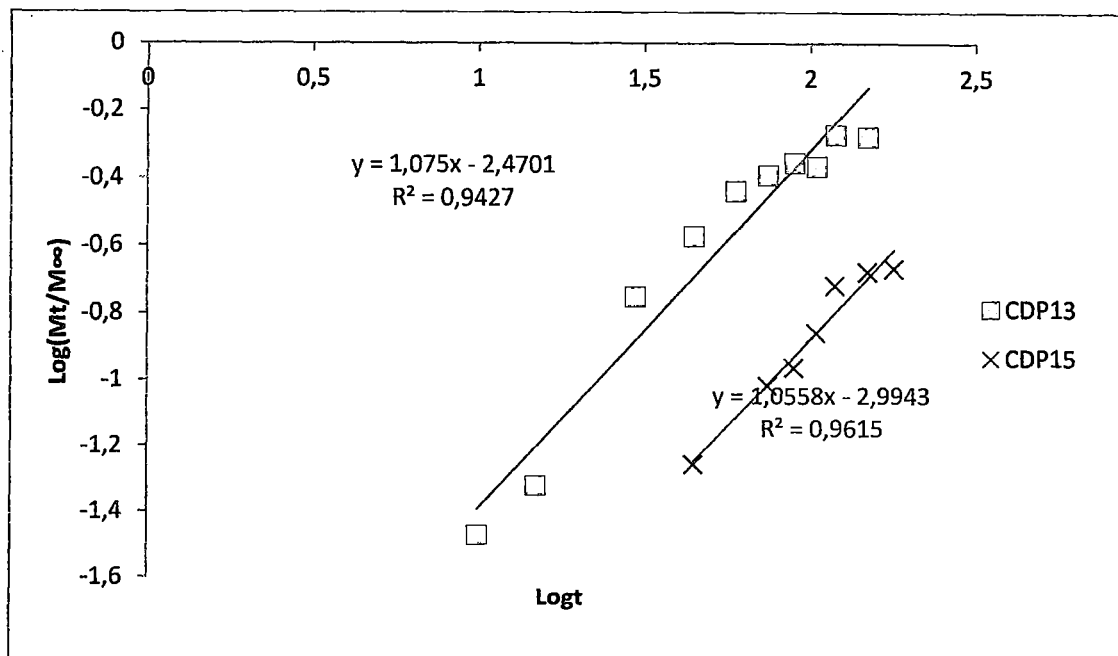


**Fig III.44.** Perfiles de liberación de antocianinas de películas de quitosano CDP8, CDP9, CDP10, CDP11, CP12 y CP16 ajustadas al modelo de Korsmeyer-Peppas.



**Fig III.45.** Perfiles de liberación de antocianinas de películas de quitosano CP14, CP17, CDP12 y CDP13 ajustadas al modelo de Korsmeyer-Peppas.





**Fig III.46.** Perfiles de liberación de antocianinas de películas de quitosano CP13 y CP15 ajustadas al modelo de Korsmeyer-Peppas.

Los valores obtenidos para el exponente difusional ( $n$ ) se muestran en la Tabla III.23. Las películas presentaron un exponente compartido, en el caso de las películas que presentan valores para  $n < 0,5$  se trata de un sistema dominado por procesos de difusión y relajación de las cadenas poliméricas, asociados a la presencia de poros en la matriz polimérica y su posterior difusión simultánea a través de la matriz hinchada y a través de estos poros llenos de disolución; este es el caso de la mayor parte de los films analizados, CDP8, CDP9, CDP10, CDP11, CP12 y CP16. Las que presentan valores  $0,5 < n < 1,0$ , son denominados mecanismos de difusión anómalo (no Fickniano), en cuyo caso aplicable a las películas CP14, CP17, CDP12 y CDP13. Las películas CP13 y CP15 presentan un mecanismo de liberación de Transporte Caso II, que nos pronostica un tiempo de liberación elevado. En la Tabla III.20 podemos ver el resumen de los ajustes cinéticos en la liberación de antocianinas en los films preparados

**Tabla III.20:** Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste de los perfiles de liberación de antocianinas de las películas de quitosano a los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas

Películas	Higuchi		Peppas	
	$K_H$ (%·min <sup>2</sup> )	$R^2$	$n$	$R^2$
CP12	1,782	0,936	0,176	0,975
CP13	1,669	0,972	1,075	0,942
CP14	1,155	0,960	0,694	0,969
CP15	0,987	0,979	1,055	0,961
CP16	1,031	0,958	0,357	0,979
CP17	0,720	0,956	0,544	0,964
CDP8	4,947	0,956	0,224	0,915
CDP9	1,338	0,921	0,243	0,940
CDP10	1,574	0,967	0,222	0,972
CDP11	2,177	0,952	0,354	0,955
CDP12	1,159	0,979	0,556	0,922
CDP13	1,029	0,966	0,680	0,940

Tenemos que hacer mención después de ver el análisis de la liberación de antocianinas y los perfiles de los modelos matemáticos que en este tipo de cargado, la matriz no consigue liberar todo las antocianinas, pues de los resultados podemos obtener tan solo una liberación de 28 y 29% como máximo para tan solo 50 minutos, que es el correspondiente a las películas de quitosano sin reticulación; los demás complejos de Quitosano/TPP presentan una menor cantidad de antocianinas en el mismo tiempo; este hecho se puede explicar debido a que el cargado de las antocianinas en la matriz se realiza en el proceso de preparación de la misma, dando como resultado un enrejado muy compacto para la antocianina. Adicional a esto tenemos que agregar la interacción entre el quitosano y las antocianinas.

La solubilidad de la misma en ácido clorhídrico es alta, sin embargo, presenta una cantidad de partículas insolubles, que luego son atrapadas en las películas de quitosano, estos resultados conlleva a la conclusión de que los perfiles de liberación presentan un mecanismo de difusión Fickniano en algunos casos y no-Fickniano en otros.

## ***IV. CONCLUSIONES***

---

Los objetivos de esta tesis surgieron directamente del interés del sector farmacéutico para generar conocimiento en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de principios activos para verificar su potencial en caracteres aplicativos. Se han obtenido resultados con interesantes aportes e innovaciones en el campo de la tecnología farmacéutica.

De los resultados obtenidos se pueden extraer una serie de conclusiones que se exponen a continuación y que muestran el potencial empleo de las películas de quitosano para la administración de fármacos o sustancias con algún principio activo por vía tópica.

- Se logró caracterizar y depolimerizar quitosano, bajando el peso molecular de 554,22 kDa a 133,37 kDa utilizando el método de despolimerización oxidativa con nitrito de sodio.
- Se obtuvieron películas de quitosano de bajo y alto peso molecular, reticulado con tripolifosfato y cargado con antocianinas por el método de evaporación de solvente. Los estudios de espectroscopía de infrarrojo, termogravimetría e hinchamiento, mostraron que el tripolifosfato reacciona electrostáticamente con el quitosano mediante puente hidrogeno.
- Las películas de quitosano lograron liberaron 29% de las antocianinas cargadas como máximo en 3 horas, las posteriores reticulaciones con Tripolifosfato retrasan la liberación; el efecto del peso molecular en la liberación no es muy significativo por lo que las matrices se comportan de la misma forma.
- Los perfiles de liberación se ajustaron a la ecuación simplificada de Higuchi. El principio activo fue liberado siguiendo un mecanismo de difusión.

## ***V. BIBLIOGRAFÍA***

---

- [1]. Ministerio de Sanidad y Consumo, Monografías de formas farmacéuticas. Formas farmacéuticas. in: Real Farmacopea Española. 3ª Edición. Madrid, 2005. 645.
- [2]. X. Ding, A.W.G. Alani, J.R. Robinson, Extended-release and targeted drug delivery system, in: D.B. Troy (Ed.), The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Remington, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2002. 939-964.
- [3]. I. Paños, N. Acosta, A. Heras, New drug delivery systems based on chitosan, *Curr. Drug Discov.* 2008; 5: 333-341.
- [4]. I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras, Functional Characterization of Chitin and Chitosan, *Current Chemical Biology* 3. 2009; 2: 203-230.
- [5]. Re. Wrolstad. GJ. Lauro, FJ. Francis, editors. Natural Food Colorants. New York, N.Y.: Marcel Dekker, Inc.; 2000. 237-252.
- [6]. Ba Cevallos-Casals, L. Cisneros-Zeballos. Stability of Anthocyaninbased Aqueous Extract of Andean Purple Corn and Red Fleshed Sweet Potato Compared to Synthetic and Natural Colorants. *Food Chem.* 2004; 86:69-77.
- [7]. J. Doménech, J. Martínez and J.M. Pla, Biofarmacia y Farmacocinética. Vol II. Síntesis, Madrid, 1998. 317-347.
- [8]. M.T. Viseras Iborra, Desarrollo galénico de preparados obtenidos por interacción del ácido 5-amino salicílico con halloysita, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 2008.
- [9]. I. Paños, Diseño de sistemas hidrofílicos basados en quitosano para la liberación específica de moléculas activas a nivel del tracto gastrointestinal, Departamento de Física-Química, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. 2007.
- [10]. K. Okuyama, K. Noguchi, M. Kanenari, T. Egawa, K. Osawa, K. and Ogawa, Structural diversities of chitosan and its complexes, *Carbohydr. Polym.* 41. 2000; 3: 237-247.
- [11]. M.G. Peter, Applications and environmental aspects of chitin and chitosan, *J. M. S. Pure Appl. Chem.* A32. 1995;4: 629-640.
- [12]. N. Acosta, C. Jiménez, V. Borau, A. Heras, Extraction and characterization of chitin from crustaceans, *Biomass and Bioenergy* 5. 1993; 2: 145-153.
- [13]. E. Agulló, R. Mato, C. Peniche, C. Tapia, A. Heras, J. San Román, W. Arquielles, F. Goycoolea, A. Mayorga, J. Nakamatsu, A.P. de Abram, Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú, 2004.
- [14]. H.K. No, S.P. Meyers, Application of chitosan for treatment of waste-waters, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2000; 163: 1-28.
- [15]. I. Helander, E. Nurmiäho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller, Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2001 ; 71: 235-244.
- [16]. M.N.V.R. Kumar, R.A.A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A.J. Domb, Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives, *Chem.* 2004; 104:6017-6084.
- [17]. L. Illum, Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharm.* 1998; 15:1326-1331.
- [18]. X.Z. Shu, K.J. Zhu, A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery, *Int. J. Pharm.* 2000; 201: 51-58.
- [19]. Farmacopea Europea. Consejo de Europa, 4ª Ed. 2002.
- [20]. H. Hirano, Y. Seino, Akiyama, Y. Nonaka, Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration, in: C.G. Gebelein and R.L. Dunn (Eds.), Progress in Biomedical Polymers, Plenum Press, New York, 1990. 283-289.
- [21]. S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosanbased micro- and nanoparticles in drug delivery, *J. Controlled Release* 2004; 100: 5-28.

- [22]. A.M. Dyer, M. Hinchcliffe, P. Watts, J. Castile, I. Jabbal-Gill, R. Nankervis, A. Smith, L. Illum, Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: A comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 19. 2002; 7: 998-1008.
- [23]. Aguiló , E. et al. Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú: Perú, 2004.26-29.
- [24]. T. Sannan, K. Kurita, K. Ogura y Y. Iwakuura, Studies on Chitin. 7. Infrared Spectroscopic Determination of Degree of Deacetylation, *Polymer*, 1978; 19: 458-459
- [25]. J. Brugnerotto, J. Lizardi, F.M.Goycoolea, W.Argüelles-Monal, J. Desbriers y M. Rinaudo and Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization, *Polymer*. 2001; 42: 3569-3580
- [26]. L. Raymond, F.G. Morin y R. H. Marchessault. Degree of Deacetylation of Chitosan Using Conductimetric Titration and Solid-State NMR, *Carbohydr.* 1993;246: 331-336
- [27]. A. Baxter, M. Dillo, K. D. A. Taylor y G.A.F. Robrst. Improved method for I.R. Determination of the degree of N-Acetylation of chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.* 1992; 14: 166-169
- [28]. San Andrés, M. Y de La Viña, S. Fundamentos de Química y Física para la Conservación y Restauración. Madrid: Síntesis, 2004.
- [29]. McNeill, I.C. "Fundamental Aspects of Polymer Degradation". En: Allen, N.S.; Edge, M.; Horie, C.V. (eds.): Polymers in Conservation. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1992. 14-31.
- [30]. W. Argüelles, Estudio de tres propiedades básicas de la quitina, 1991.
- [31]. P.R. Austin, United States Patent 4309534. 1983.
- [32]. R.A.A. Muzzarelli, Chitosan membranes, Ion. Exch. Membr. 1974.
- [33]. R.A.A. Muzzarelli, R. Rocchetti, Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry, *Carbohydr. Polym.* 1985; 5: 461-472.
- [34]. M. Berger, United States Patent 4383022.1983.
- [35]. C.B. Abletshauer, R. Schneider, H. Rupprecht, Film coating of pellets with insoluble polymers obtained in situ crosslinking in the fluidized bed, *J. Controlled Release*, 1993; 27: 149-156.
- [36]. C. Remuñán-López, R. Bodmeier, Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films, *J. Controlled Release*, 1997; 44: 215-225.
- [37]. S. Aoyagi, H. Onishi, Y. Machida, Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds, *Int. J. Pharm.* 2007; 330: 138-145.
- [38]. M. Jmaa, F.H. Furkert, B.W. Mueller, A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002; 53: 115-123.
- [39]. M.T. Qurashi, H.S Blair, S.J Allen, Studies on modified chitosan membranes I. Preparation and characterization, *J. Appl. Pol. Sci.* 46. 1992; 2: 255-261.
- [40]. R.A.A. Muzzarelli, Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydr. Polym.* 2009; 76: 167-182.
- [41]. R.F. Diegelman, Analysis of the effects of chitosan on inflammation, angiogenesis, fibroplasia and collagen deposition in polyvinyl alcohol sponge implants in rat wounds, *Wound Rep.* 1996; 4: 48-52.
- [42]. C. Chatelet, O. Damour, A. Domard, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials.* 2001; 22: 261-268.
- [43]. M. Burkatovskaya, G.P. Tegos, E. Swietlik, T.N. Demidova, A.P. Castano, M.R. Hamblin, Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice, *Biomaterials.* 2006; 27: 4157-4164.
- [44]. J. Comyn, Introduction to polymer permeability and the mathematic of diffusion, in: J. Comyn (Ed.), Polymer Permeability, Elsevier Applied Science Publishers, 1985. 1-11.

- [45]. N.A. Peppas, A.R. Khare, Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release, *Adv. Drug Deliv.* 1993; 11: 1-35.
- [46]. H. Schott, Swelling kinetics of polymers, *J. Macromol. Sci, Part B: Phys* 22.1992; 2: 1-9.
- [47]. J. Nunthanid, S. Puttipipatkachorn, K. Yamamoto, G.E. Peck, Physical properties and molecular behavior of chitosan films, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2001; 27:143-157.
- [48]. R.A.A. Muzzarelli, Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids, *Carbohydr. Polym.* 2009; 77: 1-9.
- [49]. R. Bodmeier, K.H. Oh, Y. Prammar, Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1989; 15: 1475-1494.
- [50]. J.A. Ko, H.J. Park, S.J. Hwang, J.B. Park, J.S. Lee, Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery, *Int. J. Pharm.* 2002; 249: 165-174.
- [51]. F.L. Mi, S.S. Shyu, S.T. Lee, T.B. Wong, Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method, *J. Polym. Sci, Part B: Polym Phys* 1999; 37: 1551-1564.
- [52]. J.A. Dean, Lange's Handbook of Chemistry 13th Edition, McGraw-Hill, New York, 1972.
- [53]. J. Berger, M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gummy. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2004; 57: 19-34
- [54]. D. Strack, V. Wray. The Anthocyanins. In: HARBONE JB, editor. The Flavonoides. Advances in Research Since 1986. Boca Raton FL: CRC Press; 1994.
- [55]. GJ. Wagner, Cellular and Subcellular Location in Plant Metabolism. In: Creasy L, Hrazdina G. editors. Recent advances in Phytochemistry. New York: Plenum Press; 1982.. 1-45.
- [56]. R Durst, Re. Wrolstad. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: Handbook of Food Analytical Chemistry. New Jersey: John Wiley & Sons; 2001. 33-45.
- [57]. Timberlake Cf. Anthocyanins - Occurrence, Extraction and Chemistry. *Food Chem.* 1980;1:69-80.
- [58]. E, Sondheimer, Zi Kertesz. Participation of Ascorbic Acid in the Destruction of Anthocyanin in Strawberry Juice and Model Systems. *Food Res.* 1953; 18: 475.
- [59]. P. Markakis, Ge. Livingston, Rc Fellers. Quantitative Aspects of Strawberry Pigment Degradation. *Food Res.* 1957; 22: 117-130.
- [60]. Ga. Garzón, Re Wrolstad. Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. *J Food Sci.* 2002; 67:1288-1299.
- [61]. Ms. Poesi-Langston, Re Wrolstad. Color Degradation in an Ascorbic Acid-Anthocyanin-Flavanol Model System. *J. Food Sci.* 1981;46:1218-1222, 1236.
- [62]. T. Miyazawa, K. Nakagawa, M. Kudo, K. Muraishi, K. Someya. Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-Glucoside and Cyanidin- 3,5-Diglucoside, Into Rats and Humans. *J Agric Food Chem.* 1999; 47:1083-1091.
- [63]. A. Ghiselli, M. Nardini, A. Baldi, C. Scaccini. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated From an Italian Red Wine. *J Agric Food Chem.* 1998; 46: 361-367.
- [64]. As. St. Leger, Al. Cochrane, F. Moore. Factors Associated with Cardiac Mortality in Developed Countries with Particular Reference to the Consumption of Wines. *Lancet.* 1979;1 :1017-1020.
- [65]. J. Xia, B. Allenbrand, Gy. Sun. Dietary Supplementation of Grape Polyphenols and Chronic Ethanol Administration on LDL Oxidation and Platelet Function. *Life Sci.* 1998; 63: 383-390



- [66]. Sy. Wang, H. Jiao. Scavenging Capacity of Berry Crops on Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, Hydroxyl Radicals, and Singlet Oxygen. *J Agric Food Chem.* 2000; 48: 5677-5684.
- [67]. Sy. Wang, Hs. Lin. Antioxidant Activity in Fruit and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry is Affected by Cultivar and Maturity. *J Agric Food Chem.* 2000; 48: 140-146.
- [68]. A. Hagiwara, H. Yoshino, T. Ichiharam, M. Kawabe, S. Tamano, H. Aoki, et al. Prevention by Natural Food Anthocyanins, Purple Sweet Potato Color and Red Cabbage Color, of 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-B]Pyridine (Phip)-Associated Colorectal Carcinogenesis in Rats. *J Toxicol Sci.* 2002; 27: 57-68.
- [69]. T. Koide, H. Kamei, Y. Hashimoto, T. Kojima, M. Hasegawa. Antitumor Effect of Anthocyanin Fractions Extracted from Red Soybeans and Red Beans in vitro And in vivo. *Cancer Biother Radio.* 1997; 12: 277-280.
- [70]. H. Kamei, Y. Hashimoto, T. Koide, T. Kojima, M. Hasegawa. Anti-Tumor Effect of Methanol Extracts from Red and White Wines. *Cancer Biother Radiopharm* 6. 1998; 13: 447-52.
- [71]. F. Tristan, B. Kraft, Brn. Schmidt, Gg. Yousef, Ctg. Knigh, M. Cuendet, et al. Chemopreventive Potential of Wild Lowbush Blueberry Fruits in Multiple Stages of Carcinogenesis. *J Food Sci* 3. 2005; 70: 159-S166.
- [72]. J. Wang, G. Mazza. Inhibitory Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on Nitric Oxide Production in LPS/IFN Gamma-Activated RAW 264.7 Macrophages. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 850-857.
- [73]. S. Vuorela, K. Kreander, M. Karonen, R. Nieminen, M. Hämäläinen, A. Galkin, et al. Preclinical Evaluation of Rapeseed, Raspberry, and Pine Bark Phenolics for Health Related Effects. *J Agric Food Chem* 15. 2005; 53: 922-5931.
- [74]. F. Tristan, D. Moul, Rbd Rogers, Dm Ribnicky, Wt Gipp, Cefaluo, et al. Phytochemical Composition and Metabolic Performance-Enhancing Activity of Dietary Berries. *J Agric Food Chem* 3. 2008; 56: 654-660.
- [75]. K. Ohgami, I. Ilieva, K. Shiratori, Y. Koyama, Xh Jin, K. Yoshida. et al., 2005. Anti-inflammatory Effects of Aronia Extract on Rat Endotoxin-Induced Uveitis. *Inv Ophth Vis Sci.* 2005; 46: 275-281.
- [76]. P. Costa and J. M. Sousa Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13. 2001; 2: 123-133.
- [77]. M. Gibaldi and S. Feldman, Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms, *J. Pharm. Sci* 56. 1967; 10: 1238-1242.
- [78]. T. Higuchi, Mechanism of sustained- action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *J. Pharm. Sci* 52. 1963; 12:1145-1149.
- [79]. A.W. Hixon, J.H. Crowell, Dependence of reaction velocity upon surface and agitation, *Ind. Eng. Chem.* 1931; 23: 923-931.
- [80]. R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E.M. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* 1983; 15: 25-35.
- [81]. N.A. Peppas, Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers, *Pharm. Acta Helv.* 1985; 60: 110-111.
- [82]. M. Shiriu, S. Xintau, U. Florian, S. Michael, Bi Dianzhou, K. Thomas. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. *Int. J. Pharm.* 2004; 281: 45-54.
- [83]. R. Mohammad. Kasaai. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers.* 2007; 68: 477–488.

- [84]. S. Aoyagi, H. Onishi, Y. Machida, Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of severe burn wounds, *Int. J. Pharm.* 2007; 330: 138-145.
- [85]. M. Jmaa, F.H. Furkert, B.W. Mueller, A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002; 53: 115-123.
- [86]. R. M. Silverstein, F. X. Webster. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Sexta edição. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. Rio de Janeiro. 2000; 128-134.
- [87]. Y. Xu, Y. Du. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm .* 2003; 250: 215-226.
- [88]. JZ. Knaul, SM. Hudson, KAM Creber. Improved mechanical properties of chitosan fibres. *J Appl Polym Sci.* 1999; 72: 1721-1731.
- [89]. X. Wang, J. Ma, Y. Wang, B. He. Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. *Biomaterials.* 2001; 22: 2247-2255.
- [90]. R. Expósito. Quitosano, un Biopolimero con aplicaciones en sistemas de liberacion controlada de fármacos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Bioquímica yBiología molecular I. 2010.
- [91]. C. Jacinto, Mg. Sc. Liberación Controlada de difosfato de Cloroquina a través de micropartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehido. Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ciencias, 2010.

## ***VI. ANEXOS***

---

## ANEXO 1: CONSTRUCCIÓN DE SUPERFICIE DE ACRÍLICO ADAPTADO CON UN NIVEL:

### Equipos y Materiales:

- Plancha de acrílico de 3 mm
- Patas de balanza analítica
- Tres tuercas
- Un nivel de balanza (circular)
- Equipo para cortar acrílico

### Reactivos Químicos:

- Cloroformo
- Pegamento Triz

### Preparación del pegamento:

- Se sumergió un pedazo de acrílico en aproximadamente 100mL de Cloroformo.
- Se dejó reaccionar por 24h, se agitó un poco y se diluyó con cloroformo hasta obtener una viscosidad adecuada para su uso.

### Preparación de la Superficie de acrílico adaptado a un nivel:

- Se cortó un pedazo de acrílico de 10x10 cm, dos de 1,3 x10 cm, dos de 1,3 x 10,6 cm y tres de 5,5x4,0 cm con un equipo para cortar acrílico.
- Se hizo un agujero de 7 mm de diámetro en los tres pedazos de 5,5x4,0 cm.
- Se pegó las esquinas de los otros pedazos con Triz con tal de formar una cubeta con paredes de 1,3 cm y 10x10 cm de área superficial.
- Se reforzó las aristas de la estructura con el pegamento en base de cloroformo.
- Se pegó los tres rectángulos de 5,5x4,0 cm a la base de la cubeta dejando libre los agujeros.
- Se pegó a la base de la cubeta el nivel de balanza en forma circular.
- Se pegaron las tuercas de refuerzo a los agujeros de la estructura.
- Se introdujo las patas de la balanza por los agujeros libres, para poder nivelar el sistema.

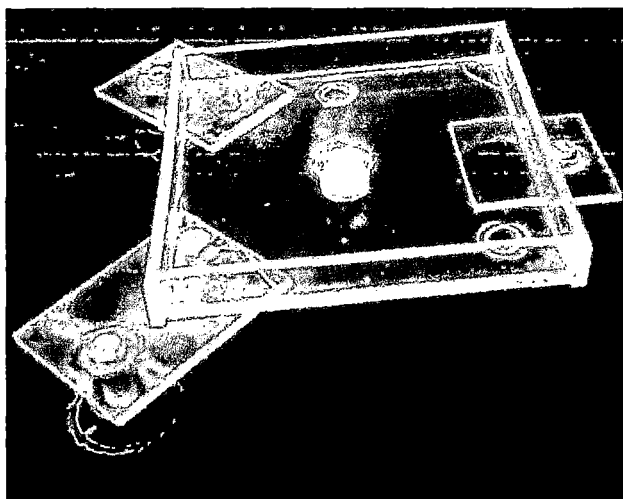


Fig VI.1. Superficie de acrílico para la preparación de películas de quitosano

## ANEXO 2: ANALISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE ANTOCIANINAS Y CURVA DE CALIBRACIÓN

### Materiales:

- Espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV-1800
- Balanza Analítica
- Agitador magnético
- 01 fioles de 50 mL
- 06 fioles de 25 mL
- 01 pipetas graduadas de 10 mL

### Reactivos:

- Agua destilada
- Estándar de Antocianinas, suministrado por Globenatural Internacional S.A.(Perú)

Soluciones preparadas:

- Solución de HCl 0.5M

### Procedimiento Experimental:

Pesar aproximadamente 50mg de estandar de antocianinas y llevar a 50 mL con HCl 0.5M. Tomar alicuotas de 0.5, 1.25, 2.5, 5 y 12.5 mL y llevar a 25 mL con HCl 0.5M. hacer un barrido espectral, para determinar la longitud de onda de lectura, y se lee las absorbancias de las soluciones preparadas como estandares.

### Resultados:

En la siguiente Fig VI.2 se muestra el espectro visible de las antocianinas, pudiendo determinar el pico máximo para la determinación de la concentración de los estándares.

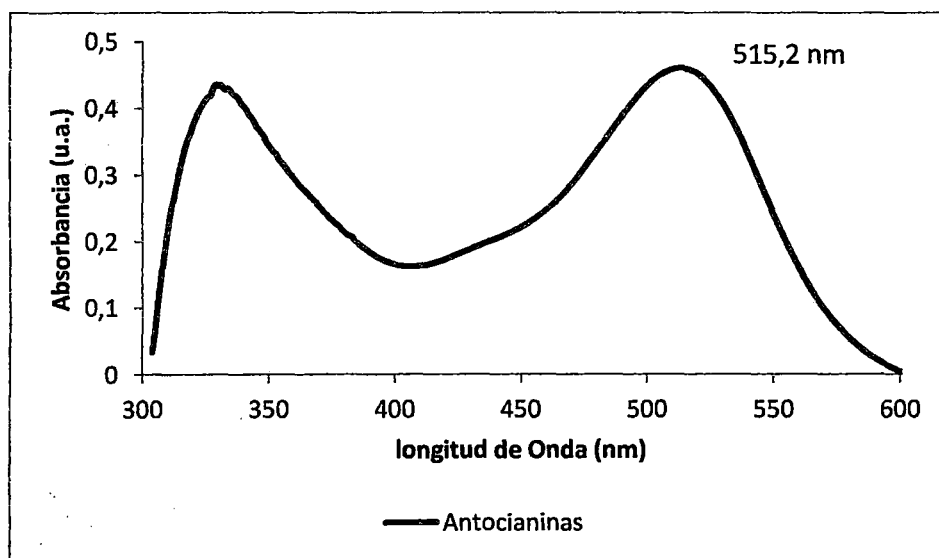


Fig VI.2. Espectro Visible de antocianinas

En la Fig VI.3 se muestra la curva de calibración de los estándares tomados mediante el método I, así como la ecuación para determinar la concentración de antocianinas presentes en las soluciones preparadas.

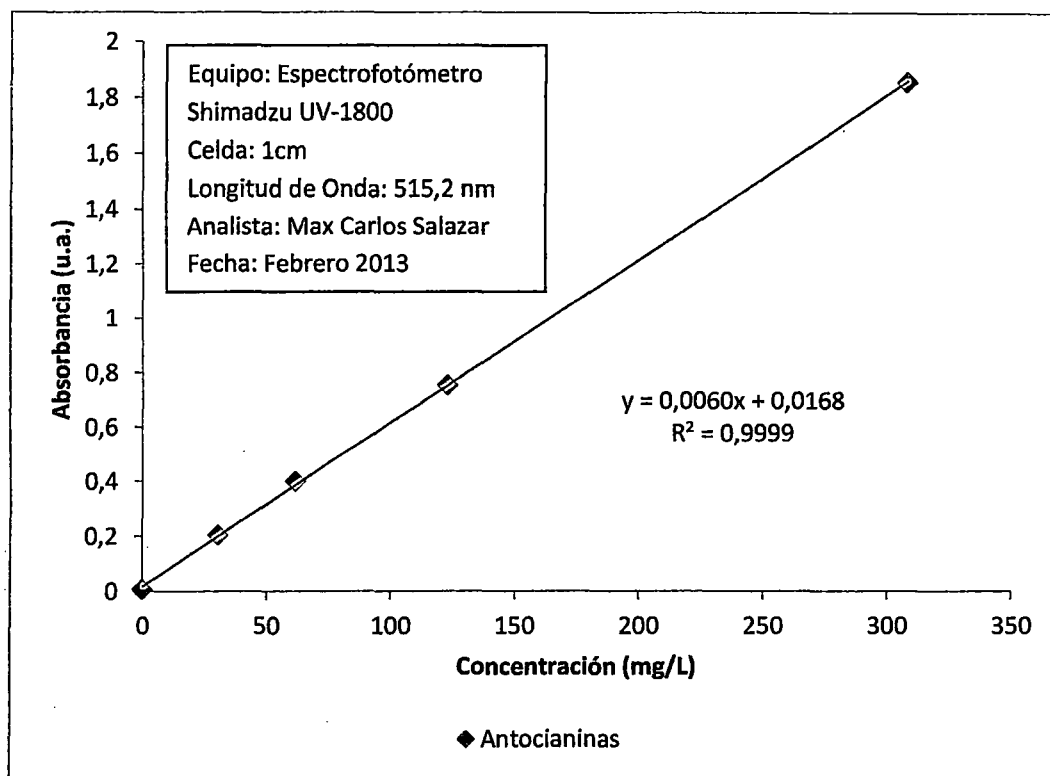
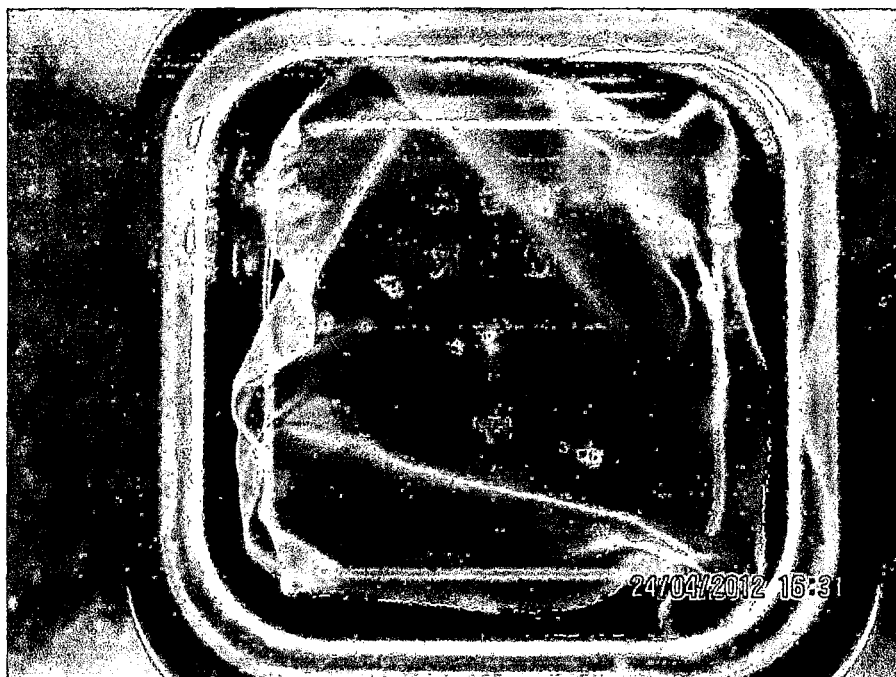


Fig VI.3. Curva de calibración de antocianinas en HCl

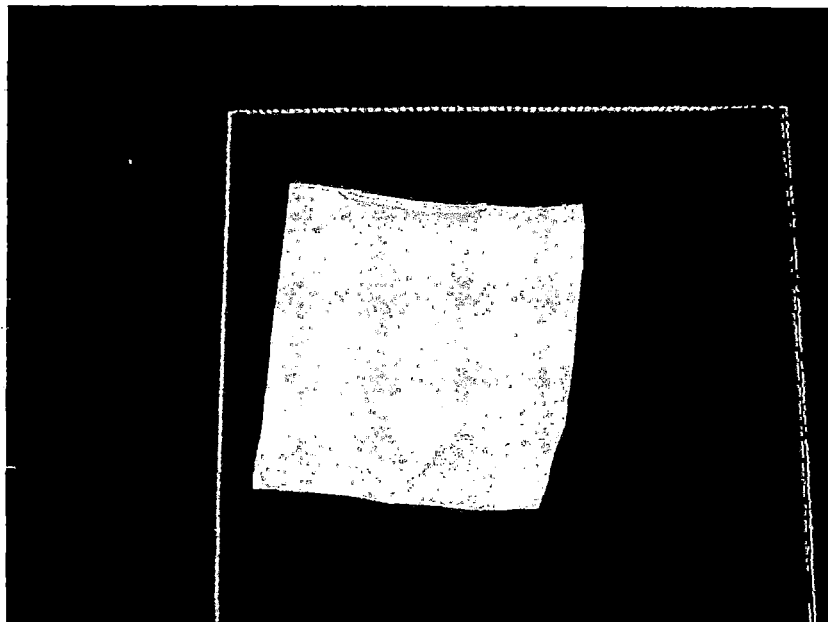
**ANEXO 3: FOTOGRAFÍAS DE PELÍCULAS DE QUITOSANO**



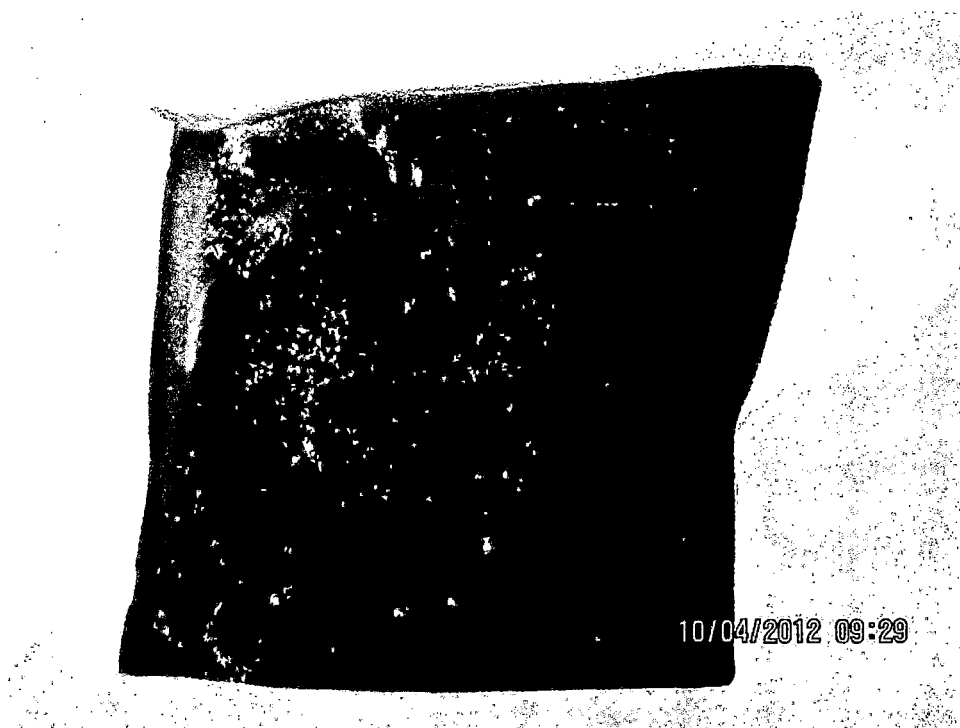
**Fig VI.4.** Película de quitosano CDP1, antes de reticular



**Fig VI.5.** Película de quitosano CP1, en el proceso de entrecruzado con tripolifosfato



**Fig VI.6.** Película de quitosano CP8, entrecruzado con tripolifosfato 5% durante 1 hora, después del proceso de entrecruzado con tripolifosfato, antes del secado.



**Fig VI.7.** Película de quitosano CP14, cargada con 0.4% de antocianinas antes del entrecruzado con tripolifosfato

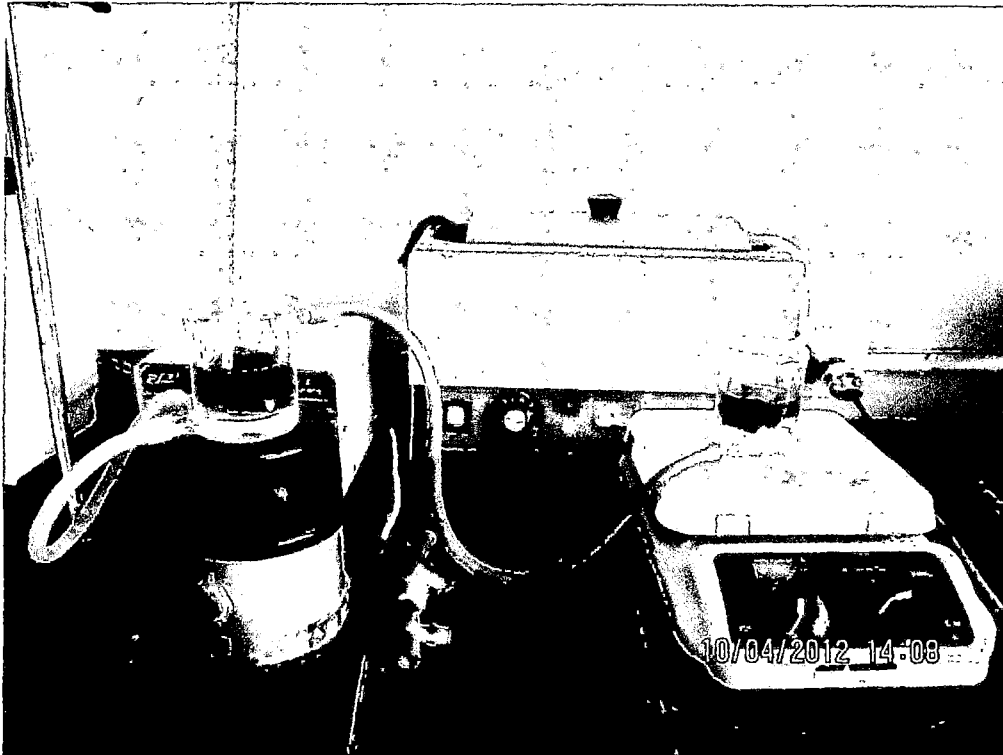




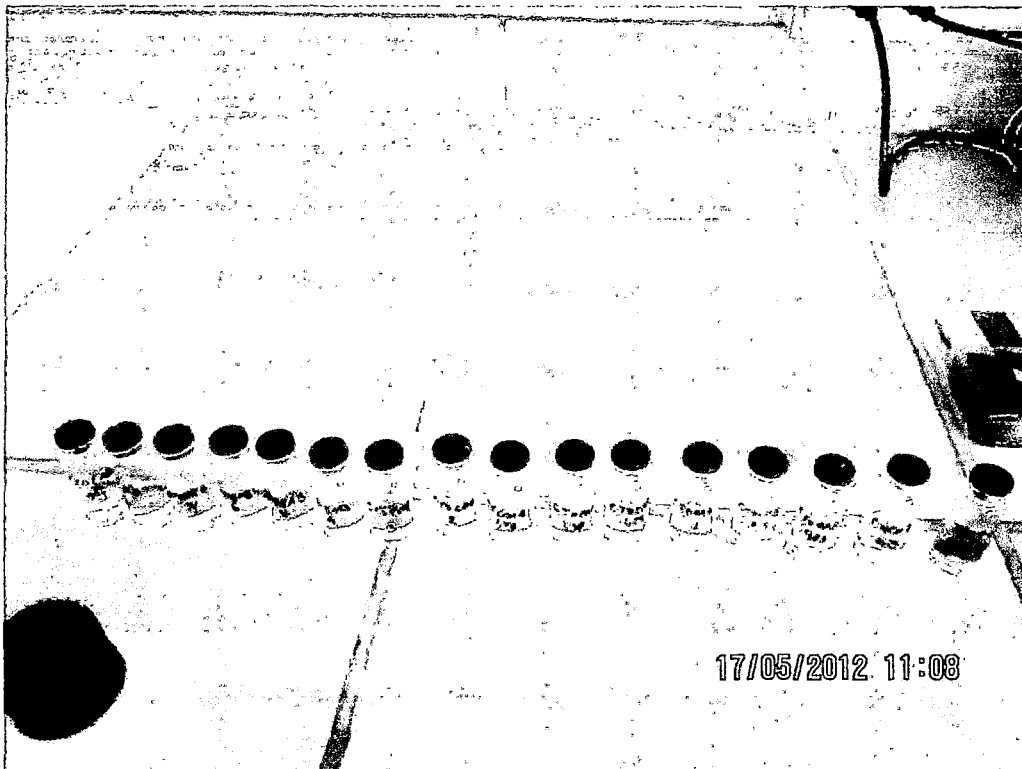
**Fig VI.8.** Película de quitosano CP14, cargada con 0.4% de antocianinas entrecruzado con tripolifosfato 1% durante 1 hora, después del secado.



**Fig VI.9.** Película de quitosano CP12 destruida, cargada con 0.4% de antocianinas, después de la liberación de tres horas.



**Fig VI.10.** Sistema de liberación de películas de quitosano.



**Fig VI.11.** Soluciones extraídas del sistema de liberación antes de ser medidas.