

Propiedades emulsificantes del quitosano para la preparación de partículas de poli(ácido láctico) cargadas con curcumina

Beatriz E. Reyes-Vielma¹, Mónica A. Cenicerós-Reyes¹, Abril Fonseca-García^{2*}, María Esther Treviño Martínez^{1*}

¹Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA), Departamento de Química Macromolecular y Nanomateriales, Blvd. Enrique Reyna 140, Col. San José de los Cerritos, Saltillo, Coah., México, 25294

²CONAHCYT-CIQA. Blvd. Enrique Reyna, 140, San José de los Cerritos, Saltillo, 25294

Correspondencia: abril.fonseca@ciqa.edu.mx y esther.treviño@ciqa.edu.mx

Resumen: El quitosano (QTS) es el único polímero catiónico de origen natural. Se obtiene de la desacetilación de la quitina, un polisacárido que se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos. El QTS es biocompatible, biodegradable, mucoadhesivo y antimicrobiano, por lo que se ha utilizado en la industria alimentaria como aditivo en alimentos desde 1983. También se ha estudiado en sistemas de administración controlada de fármacos y se ha propuesto como un excelente biomaterial para tratamiento y protección de heridas. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la preparación de partículas de poli(ácido láctico) (PLA) cargadas con curcumina (CUR) a partir de emulsiones del tipo aceite en agua (O/W). Las emulsiones se formaron utilizando energía de ultrasonido, donde la fase orgánica (O) estaba constituida por una solución de PLA, al 1, 3 y 5 % p en una solución de CUR en diclorometano (DCM) al 0.1 % p, mientras que la fase acuosa (W), estaba constituida por una solución de QTS al 1% p, en una solución acuosa de ácido cítrico (AC) al 1 % p. La relación O/W fue de 20/80 (p/p). Inmediatamente después de que se formó cada emulsión, esta se calentó a 37 °C por 30 min para eliminar el DCM. De esta manera, se obtuvo una dispersión acuosa de partículas de PLA/CUR. Los látex se caracterizaron por DLS, potencial Z y SEM. En este estudio se demostró que el QTS puede funcionar como emulsificante para estabilizar las partículas de PLA, no obstante su alta hidrofiliidad.

Introducción

El quitosano (QTS) es el único polímero catiónico de origen natural, se obtiene de la desacetilación de la quitina que es el segundo polisacárido más abundante en el mundo, después de la celulosa, y se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos y en la pared celular de hongos. De manera general, QS se obtiene de desechos de crustáceos, lo que lo convierte en un polisacárido atractivo para su industrialización¹. El QTS es biocompatible, biodegradable y mucoadhesivo. Además, se ha reportado que tiene propiedades como antimicrobiano, antioxidante, anticancerígeno y antiinflamatorio², por lo que ha sido utilizado desde 1983 como aditivo para alimentos³; también se ha utilizado en el desarrollo de sistemas de administración controlada de fármacos⁴ y ha sido propuesto como un biomaterial potente para el tratamiento de

heridas⁵. Para mejorar su resistencia al agua, se ha entrecruzado o combinado con otros polímeros⁶. Asimismo, al ser un polielectrolito catiónico; al QTS se le ha considerado en los últimos 15 años como un buen emulsificante⁷, y que tiene un equilibrio hidrófilo-lipofílico (HBL) de ~ 34 a 36.7. Recientemente, se ha publicado que el QTS puede utilizarse como emulsificante, aunque no tan eficaz debido a su alta hidrofiliidad⁸.

Por otro lado, la curcumina (CUR) es el principal componente de la *Curcuma longa* y algunos estudios indican que es un agente antimicrobiano extremadamente eficaz y potente; además, se ha demostrado que tiene numerosas propiedades terapéuticas como antiinflamatorio, anticancerígeno, antiartrítico y antidiabético. Aunado a esto, la CUR ayuda a la regeneración de piel ya que participa en las tres etapas de la cicatrización (la

inflamación, proliferación y la remodelación tisular)⁹. Sin embargo, la CUR es una molécula hidrófoba con una solubilidad en agua extremadamente baja; esto, aunado a su inestabilidad química y rápida metabolización, provocan limitaciones importantes en cuanto a su biodisponibilidad¹⁰. Asociado a esto, la CUR a pH >7 es aún más susceptible a la degradación¹¹. Como una estrategia para mejorar la biodisponibilidad de la CUR, se ha optado por su encapsulamiento¹².

Con base en los antecedentes presentados, en este trabajo se presentan los resultados obtenidos al estudiar el efecto emulsificante del QTS en la preparación de partículas de PLA cargadas con CUR a partir de emulsiones de tipo aceite en agua (O/W), donde la fase continua (W) estuvo constituida por una solución acuosa de QTS y la fase dispersa (O) por una solución de PLA en diclorometano (DCM). En este trabajo se demuestra que el QTS actuó como emulsificante para la formación de las partículas y matriz polimérica en las películas obtenidas a partir de los látex.

Parte experimental.

Materiales. QTS (peso molecular medio con $\geq 75\%$ grado de desacetilación), CUR y ácido cítrico (AC) de Sigma Aldrich, PLA 3952D de Ingeo Nature Works Company

Metodología. Para la preparación de las emulsiones se usaron las formulaciones de la Tabla 1. Para la fase orgánica se disolvió la CUR en DCM al 0.1 % p/p, con la cantidad requerida de PLA (1, 3 y 5% p/p). La fase acuosa se preparó disolviendo el QTS al 1% p/p en una solución acuosa de ácido cítrico al 1% p/p. Se estudió la relación O/W de 20/80 p/p. La emulsión se formó utilizando un vaso de precipitado de forma alta, el cual se colocó en un baño de hielo para evitar la evaporación del DCM. Se aplicó energía de ultrasonido en un equipo Qsonica modelo Q-700, utilizando una amplitud de 60W durante 5 min; una vez formada la emulsión, se llevó a cabo la evaporación del DCM, colocando el vaso de precipitado en un baño de agua a 39°C colocado sobre una parrilla de agitación magnética. La agitación se mantuvo en 1000 rpm hasta que se evaporó el DCM. Al final se obtuvo una dispersión de partículas de PLA cargadas con CUR en una solución acuosa de QTS (látex).

Tabla 1: Formulaciones empleadas para la formación de las emulsiones O/W (20/80; p/p).

Componente (p/p)	PLA 0%	PLA 1%	PLA 3%	PLA 5%
Fase Acuosa				
AC	79.20	79.20	79.20	79.20
QS	0.80	0.80	0.80	0.80
Fase Orgánica				
PLA	0.00	0.20	0.60	1.00
DCM	20.00	19.80	19.40	19.00
CUR	0.10	0.10	0.10	0.10

El potencial Z de los látex se midió en un equipo Zetacheck de Microtrac, además se midió el pH con un potenciómetro Oakion. Para la preparación de las películas, el látex se vertió en cajas Petri y se permitió que el agua se evaporara bajo condiciones de humedad y temperatura controladas (50 +/- 5 %HR y 23 +/- 2°C). Las películas se analizaron, para identificar la estructura química de los componentes, en un espectrómetro Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Fisher Scientific) con accesorio de reflectancia totalmente atenuada (ATR). La estructura cristalina en las películas se determinó en un difractómetro de rayos X modelo D500 (Siemens) y la morfología de las partículas de PLA se determinó en un microscopio modelo Quanta 200 3D Dual Beam SEM (FEI).

Resultados y Discusión.

En todas las formulaciones estudiadas se logró la formación de las emulsiones, con lo cual se comprobó que el QTS actuó como un agente emulsificante que estabilizó las gotas de DCM que contenían al PLA y la CUR.

En la Figura 1 se observa: a) una imagen del sistema precursor de la formación de la emulsión antes de la sonicación y b) el látex obtenido después de la evaporación del DCM. En la Tabla. 2 se presentan los resultados de la caracterización de los látex, donde se demuestra que, independientemente de la concentración de PLA, los látex obtenidos fueron coloidalmente estables, ya que el potencial Z fue mayor a +100 mV. Además, estos valores indican que se trata de látex estabilizados con cargas catiónicas¹³.

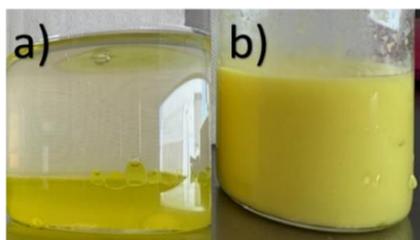


Figura 1. a) Soluciones de QTS 1% p y de PLA 5% p/p + CUR antes de ultrasonificar, y b) látex de partículas de PLA cargadas con CUR, dispersas en una solución acuosa de QTS 1% p/p.

Tabla 2: Resultados de pH, Potencial Z y Contenido de sólidos.

Látex	pH	Sólidos Totales (%)	Potencial Z (mV)
PLA 0%	3.24	1.78	102.7
PLA 1%	3.18	2.04	101.7
PLA 3%	3.15	2.52	108.8
PLA 5%	3.14	2.94	118.9

A pesar de la estabilidad coloidal de los látex, se observó un precipitado después de un mes de almacenamiento. En la Figura 2 se presentan resultados de la caracterización por SEM del sedimento formado en los látex; después de un mes de almacenamiento a temperatura ambiente. Utilizando el software ImageJ se midió el tamaño de las partículas de las micrografías y se determinó el tamaño promedio y la distribución de tamaños para las muestras de sedimento de látex con diferente contenido de PLA. De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede decir que el tamaño promedio de las partículas fue de 1.3 a 1.5 μm .

En la Figura 3 se presentan fotografías de películas preparadas a partir de los látex con diferente concentración de partículas de PLA cargadas con CUR. Para efectos de comparación, se preparó un látex sin PLA ni CUR y se preparó la película que se presenta en la fotografía de la izquierda (a). El incremento en la tonalidad amarilla de la película, así como en su opacidad, indica la

presencia un incremento en el contenido de partículas de PLA cargadas con CUR. Se hizo una criofractura de las películas para lograr una mejor visualización de las partículas de PLA embebidas en la película de QTS. A pesar de que se trabajó con una relación O/W fija en 20/80 p/p, el contenido de PLA en la fase orgánica fue incrementando; razón por la cual los látex tuvieron un incremento en el contenido de sólidos totales (ver Tabla 2). El cambio en el espesor de las películas a mayor contenido de PLA se debe al incremento en el contenido de sólidos en los látex. Al analizar las micrografías es indudable la formación de partículas de PLA cargadas con CUR. También se aprecia que aumenta la concentración de partículas a medida que se incrementó la concentración de PLA en la fase orgánica.

De manera general, se observó que las películas tuvieron una apariencia homogénea, libre de grietas e imperfecciones. En la micrografía f), que corresponde a la película obtenida de la solución de QTS a la que no se agregó PLA, puede apreciarse que el QTS forma a nivel microscópico una película homogénea libre de poros. Por otra parte, en las micrografías de las películas preparadas con látex que contenían partículas de PLA cargadas con CUR, se aprecia la presencia de los poros que corresponden a los espacios donde se encontraban las partículas y que quedaron libres por la criofractura.

Las películas que se prepararon a partir de las emulsiones también se caracterizaron por FTIR-ATR para determinar, de manera cualitativa, la presencia del CUR encapsulada en las partículas de PLA. En la Figura 4 se presentan los espectros de FTIR-ATR de las películas obtenidas a partir de los látex. Se asume que el proceso de ultrasonificación degradó las cadenas del QTS, debido a que se observa que la banda de los 3300 cm^{-1} , asociada a una amina presente en la cadena del QTS, disminuye (Fig. 4a).

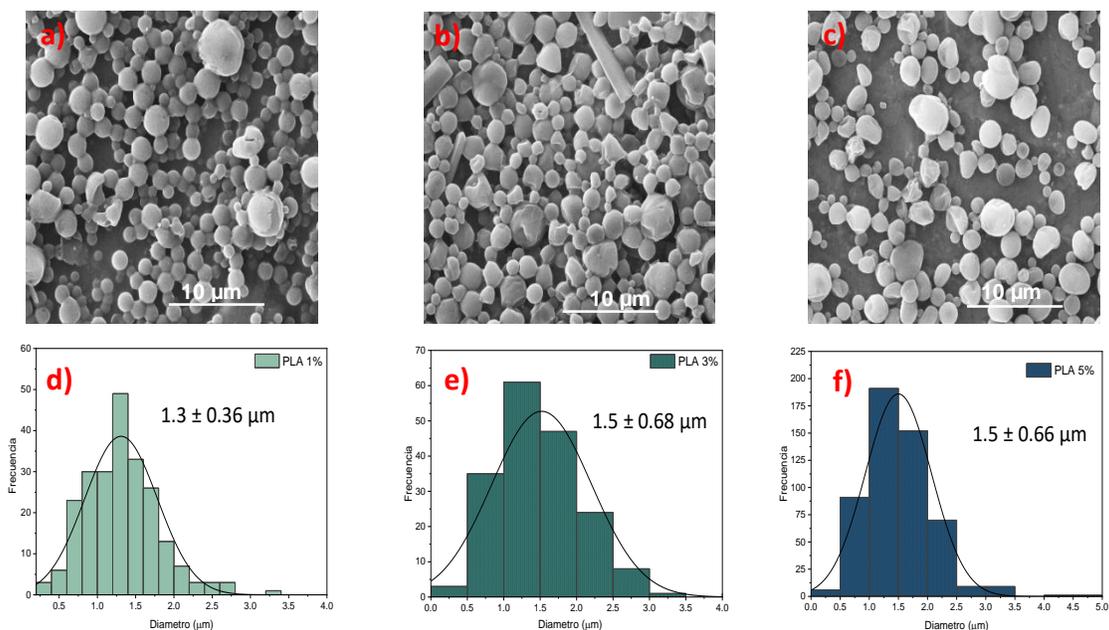


Figura 2. Micrografías de SEM de muestras de sedimento de los látex con diferente concentración de partículas de PLA cargadas con CUR: a) 1 % p, b) 3% p, c) 5 % p y; Distribución del tamaño de las partículas correspondientes: d) 1 % p, e) 3% p y f) 5 % p.

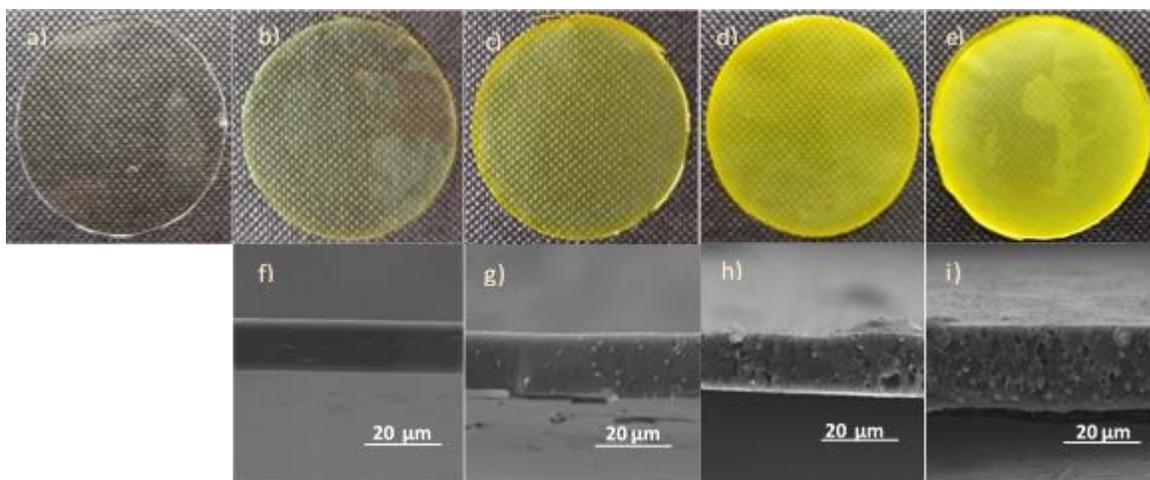


Figura 3. Fotografías de películas preparadas a partir de los látex con diferente concentración de partículas de PLA cargadas con CUR: a) 0 % p sin CUR, b) 0% p, c) 1 % p, d) 3 % p y e) 5 % p y; micrografías de SEM del espesor de las películas correspondientes: f) 0% p, g) 1 % p, h) 3 % p e i) 5 % p.

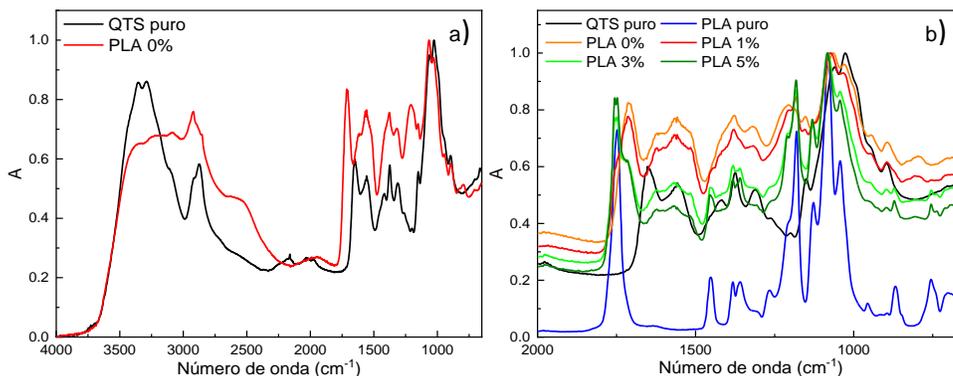


Figura 4. Espectros de FTIR-ATR de: a) QTS y QTS-PLA 0% y b) películas de QTS preparadas a partir de látex que contienen diferentes concentraciones de partículas de PLA cargadas con CUR.

Además, la banda de los 1017 cm^{-1} que corresponde al enlace glucosídico C-O-C¹⁴ del QTS también disminuye, lo que se asocia a una depolimerización del QTS. Respecto al PLA, se identificó una banda de absorción en los 1750 cm^{-1} que se asocia al grupo carbonilo (C=O) presente en el PLA¹⁵. En cuando a la CUR, se identificó una banda ancha en los 1700 cm^{-1} , la cual se asocia a un traslape de bandas correspondientes a los grupos carbonilo (C=O) y C=C presentes en la CUR^{16,17}, esta banda se presenta bien definida en las películas con PLA 0% y PLA 1%, mientras que para las películas PLA 3 % y PLA 5% esta banda difícilmente se aprecia y se ve como un hombro en la banda de los 1750 cm^{-1} . Esto se atribuye a la mayor presencia de PLA, ya que se enmascara la presencia de la CUR que se encuentra en una concentración muy baja.

En la Figura 5 se muestran los patrones de difracción de rayos X de las muestras de QTS puro y QTS-PLA 0% ultrasonificado, así como también para las muestras de las películas preparadas con los látex. De acuerdo con la Figura 5, se aprecia que el proceso de ultrasonificación realizado para la formación de las emulsiones modifica la poca cristalinidad del QTS, debido a que en la película de QTS EM se muestra amorfo ya que no muestra picos de difracción, mientras que el QTS puro muestra dos picos anchos en 9.4° y 20° a 2θ que corresponden a las formas cristalinas I y II presentes en QTS de manera natural. En relación con las películas de QTS con partículas de PLA cargadas con CUR, se

aprecia que a mayor concentración de PLA se comienza a ver un pequeño pico cerca de los 17° a 20° y corresponde a los planos 200/110 característicos de la estructura α pseudoortorrómbica en PLA.

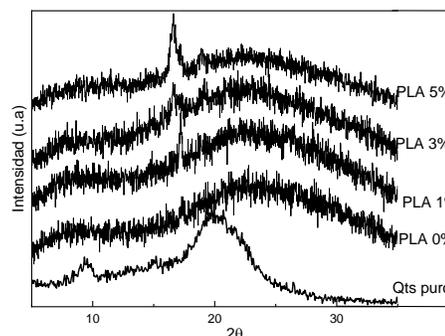


Figura 5. Patrones de difracción de rayos X. de QTS y películas de QTS con diferentes concentraciones de partículas de PLA.

Conclusiones.

El demostró la factibilidad de utilizar al QTS como emulsificante para la preparación de látex de partículas de PLA cargadas con CUR. Las películas formadas a partir de estos látex consisten de una matriz de QTS donde se encuentran embebidas las partículas de PLA/CUR. Estos materiales tienen potencial para la liberación controlada de CUR en aplicaciones terapéuticas.

Agradecimientos.

Los autores agradecen al M.C. José Guadalupe Téllez y a la M.C. Bertha Alicia Puente, por su apoyo en la caracterización de los materiales obtenidos. Además, se agradece al CIQA por el financiamiento de la investigación a través del Proyecto Interno No. 6746 (2024) “Evaluación de las propiedades emulsificantes del quitosano para la potenciación de la biodisponibilidad oral de principios activos”.

Referencias.

1. Rinaudo, M., Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science* **2006**, 31 (7), 603-632.
2. Zhang, M.; Li, X.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X., Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. *Biomaterials* **2002**, 23 (13), 2641-2648.
3. Kumar, M. N. R., A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers* **2000**, 46 (1), 1-27.
4. Kumar, M. R.; Muzzarelli, R. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A., Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews* **2004**, 104 (12), 6017-6084.
5. Croisier, F.; Jérôme, C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European polymer journal* **2013**, 49 (4), 780-792.
6. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.; Felt, O.; Peppas, N.; Gurny, R., Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* **2004**, 57 (1), 19-34.
7. Payet, L.; Terentjev, E. M., Emulsification and stabilization mechanisms of O/W emulsions in the presence of chitosan. *Langmuir* **2008**, 24 (21), 12247-12252.
8. Yang, Y.; Gupta, V. K.; Amiri, H.; Pan, J.; Aghbashlo, M.; Tabatabaei, M.; Rajaei, A., Recent developments in improving the emulsifying properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* **2023**, 239, 124210.
9. Akbik, D.; Ghadiri, M.; Chrzanowski, W.; Rohanzadeh, R., Curcumin as a wound healing agent. *Life sciences* **2014**, 116 (1), 1-7.
10. Panahi, Y.; Fazlolahzadeh, O.; Atkin, S. L.; Majeed, M.; Butler, A. E.; Johnston, T. P.; Sahebkar, A., Evidence of curcumin and curcumin analogue effects in skin diseases: A narrative review. *Journal of cellular physiology* **2019**, 234 (2), 1165-1178.
11. Heger, M.; van Golen, R. F.; Broekgaarden, M.; Michel, M. C., The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacological reviews* **2014**, 66 (1), 222-307.
12. Krausz, A. E.; Adler, B. L.; Cabral, V.; Navati, M.; Doerner, J.; Charafeddine, R. A.; Chandra, D.; Liang, H.; Gunther, L.; Clendaniel, A., Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2015**, 11 (1), 195-206.
13. Clogston, J. D.; Patri, A. K., Zeta potential measurement. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery* **2011**, 63-70.
14. Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Malek, K. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochimica acta part a: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2017**, (185), 317-335.
15. Fonseca-García, A., Osorio, B. H., Aguirre-Loredo, R. Y., Calambas, H. L., Caicedo, C. (2022). Miscibility study of thermoplastic starch/polylactic acid blends: thermal and superficial properties. *Carbohydrate Polymers*, **2022**, 293, 119744.
16. Fugita, R. A., Gálico, D. A., Guerra, R. B., Perpétuo, G. L., Treu-Filho, O., Galhiane, M. S., Bannach, G. Thermal behaviour of curcumin. *Brazilian Journal Thermal Analysis*, **2012**, 1(1), 19-23.
17. Benassi R., Ferrari E., Lazzari S., Spagnolo F., Saladini M. Theoretical study on Curcumin: A comparison of calculated spectroscopic properties with NMR, UV-vis and IR experimental data. *Journal of Molecular Structure*. **2008**, 892:168-76.