



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**INFLUENCIA DE LAS VARIABLES DE PROCESO  
SOBRE LA ELABORACIÓN DE PARTÍCULAS DE  
QUITINA CON ALTO GRADO DE  
DESACETILACIÓN Y SU CORRESPONDIENTE  
INJERTO CON ÁCIDO 2-HIDROXIPROPANOICO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**LUIS FERNANDO BRAVO DUQUE**

**Ciudad Universitaria, CD.MX.**

**2017**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD**  
**VOCAL: JORGE ESTEBAN MIRANDA CALDERON**  
**SECRETARIO: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS**  
**1er. SUPLENTE: LUZ ANTONIA BORJA CALDERON**  
**2° SUPLENTE: CARLOS JUAREZ OSORNIO**

ESTE TEMA SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO 001 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, EDIFICIO F-1 DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

**ASESOR DEL TEMA:**

**MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**CARLOS JUAREZ OSORNIO**

**SUSTENTANTE:**

**LUIS FERNANDO BRAVO DUQUE**

Resumen.	1
Introducción.	2
1. Antecedentes.	3
1.1. Sistemas de liberación modificada.	3
1.1.1. Micro/Nanoacarreadores.	5
1.2. Polímeros.	7
1.3. Quitina y Quitosano.	9
1.3.1. Propiedades funcionales del Quitosano.	11
1.4. Micro/Nanopartículas de Quitosano.	13
1.4.1. Fabricación.	13
1.4.1.1 Emulsificación y entrecruzamiento covalente o iónico.	13
1.4.1.2 Coacervación/precipitación.	14
1.4.1.3 Coalescencia de gotas en emulsión.	14
1.4.1.4 Secado por aspersión (spray-drying).	15
1.4.1.5 Gelificación iónica.	16
1.5. Derivados de Quitosano.	17
1.5.1. Copolimerización por injerto.	18
1.6. Diseño de experimentos.	19
1.5.1. Diseño de experimentos factoriales.	20
2. Planteamiento del problema.	23
3. Objetivos.	24
3.1. Objetivo general.	24
3.2. Objetivos particulares.	24
4. Hipótesis.	25
5. Metodología.	26
5.1. Materiales.	26
5.2. Diseño de experimentos.	26
5.2.1. DoE Factorial fraccionado $2^{(5-1)}$ .	26
5.2.2. DoE Factorial completo $2^3$ .	27
5.3. Fabricación de partículas de quitosano mediante gelificación iónica.	28

5.3.1.	Fabricación del DoE factorial fraccionado $2^{(5-1)}$ .	28
5.3.2.	Fabricación del DoE factorial completo $2^3$ .	28
5.3.3.	Análisis estadístico.	29
5.3.4.	Caracterización de partículas.	30
5.3.4.1	Tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS).	30
5.3.4.2	Morfología por microscopia electrónica de barrido (SEM).	30
5.3.5.	Fabricación de injertos de Quitosano-PLA.	30
5.5.6.	Caracterización de injertos de Quitosano-PLA.	31
5.5.6.1	Espectroscopia de infrarrojo.	31
6.	Resultados y discusión.	32
6.1.	DoE Factorial fraccionado $2^{(5-1)}$ .	32
6.2.	DoE Factorial completo $2^3$ .	37
6.3.	Injerto Quitosano-PLA.	45
7.	Conclusiones.	48
8.	Perspectivas.	48
9.	Bibliografía.	49
10.	Anexos	54

## Resumen

A partir de la quitina es obtenido el quitosano, un polímero que posee propiedades de gran interés para el área farmacéutica, por ejemplo, ser biodegradable, biocompatible, bioadhesivo y antimicrobiano [1], [2]. El quitosano (QS) ha cobrado gran interés por su uso en la fabricación de micro/nanopartículas mediante la técnica de gelificación iónica. A pesar de esto actualmente la utilización del quitosano en sistemas de liberación controlada es muy baja, a que la técnica, aunque es sencilla, involucra muchas variables del proceso, y su influencia sobre el tamaño de partícula e índice de polidispersión (PDI), variables de gran importancia en sistemas multiparticulados, no está establecido del todo. Por tal motivo se realizó una evaluación de las variables de proceso, utilizando diseños de experimentos factoriales. Para una evaluación inicial se realizó un diseño factorial fraccionado  $2^{(5-1)}$  para las variables: concentración de QS, concentración del entrecruzador (politrifosfato, TPP), concentración de ácido acético, relación de volúmenes TPP:QS y tipo de agitación. A partir de este se determinó que la única variable significativa, de las evaluadas, fue el QS; además se observó que otra variable de mayor importancia es la relación molar de los grupos amino del QS y el TPP, aunado a esto se decidió evaluar el efecto de la adición de una sal monovalente (NaCl). Para la evaluación de estas tres variables se realizó un diseño factorial fraccionado completo  $2^3$  con una réplica. Como resultado se obtuvo que estas tres variables de formulación son estadísticamente significativas, además se construyó el gráfico de contornos sobrepuestos para ambas variables de respuesta, en función de la concentración de QS y de la relación molar TPP:QS. Los límites de respuesta de este gráfico para el tamaño de partícula es de 10 nm-10  $\mu$ m y de PDI 0-1. También se realizó la modificación química del QS, mediante la copolimerización con ácido poliláctico (PLA), a partir de ácido 2-hidroxi-propanoico; se obtuvieron injertos QS-PLA, insolubles en agua y disolución de ácido acético, sin embargo, debido a sus buenas propiedades mecánicas y de hinchamiento en función del pH, estos injertos tienen un uso potencial dentro de las ciencias farmacéuticas.

## Introducción.

La quitina es el segundo polímero natural más abundante de la tierra (después de la celulosa). Las fuentes principales de quitina son los crustáceos, moluscos y hongos [3]. Estas fuentes de obtención constituyen desperdicios de otros procesos de producción, como lo son: la industria del procesamiento de mariscos, el cual representa un 45% de su producción; y en la industria alimentaria los hongos generan desperdicios de aproximadamente 50 000 toneladas métricas por año, durante su cosecha y producción. A partir de la quitina es obtenido el QS, un polímero que posee propiedades de gran interés para el área farmacéutica, por ejemplo, ser biodegradable, biocompatible, bioadhesivo y antimicrobiano [1], [2].

El QS ha cobrado gran interés por su uso en la fabricación de micro/nanopartículas desde la primera vez que se reportó la técnica de gelificación iónica por Bodmeier y colaboradores [4], se han publicado varios artículos en los cuales utilizan esta técnica para la fabricación de micro/nanopartículas de QS; el alguno de los cuales se ha intentado identificar los efectos de diferentes variables de fabricación sobre las características de las partículas de QS. En sistemas de liberación controlada el tamaño de partícula y la dispersión poblacional de la misma son características estrechamente relacionadas con los perfiles de liberación del fármaco y por tal motivo del efecto terapéutico.

Desde la primera vez que se reportó la técnica, se ha observado que las principales variables sobre el tamaño son: la concentración de QS y del entrecruzador iónico, sin embargo, no está bien establecido su efecto. Un primer acercamiento para establecer la influencia de las variables de fabricación sobre el tamaño, fue la realizada por Calvo y colaboradores [5], quien utilizó tripolifosfato de sodio (TPP) como entrecruzador. Desde entonces se ha intentado identificar y evaluar las diferentes variables de fabricación sobre las variables de respuesta, de entre las cuales se encuentran el tamaño de partícula y el PDI.

## **1. Antecedentes.**

### **1.1. Sistemas de liberación modificada.**

El mecanismo por el cual un fármaco es liberado puede tener un efecto significativo en su eficacia. Algunos fármacos poseen un intervalo de concentración óptima, en la cual se alcanzan un máximo de beneficios (ventana terapéutica) y concentraciones por arriba o por debajo de este intervalo pueden: ser tóxicas o no tener un efecto terapéutico, respectivamente [6]. Por muchas décadas se han utilizado formas farmacéuticas convencionales (cápsulas, tabletas, ungüentos, supositorios, soluciones orales, e inyectables) para el tratamiento de diversas enfermedades; es bien sabido que estas formas farmacéuticas liberan el fármaco contenido de manera inmediata, sin embargo, para mantener una concentración del fármaco dentro de la ventana terapéutica, es necesario administrar el medicamento varias veces al día, dando como resultado una fluctuación en los niveles sistémicos [7].

Estas limitaciones que presentan las formas farmacéuticas convencionales han provocado una creciente necesidad de un enfoque multidisciplinario, para la liberación de fármacos a sitios de acción específicos, a una velocidad determinada y bajo la presencia de estímulos. Es por esto que nuevos sistemas para el control de la farmacocinética, farmacodinamia, toxicidad no específica, inmunogenicidad, bioreconocimiento y eficacia de los fármacos han sido desarrolladas [8]. Estas nuevas estrategias convergen en los sistemas de liberación modificada de fármacos, los cuales se basan en una estrategia que combina la ciencia de polímeros, la farmacia, la química de bioconjugación y la biología molecular, entre otras, para minimizar la degradación y la pérdida del fármaco, y así disminuir los efectos secundarios e incrementar la biodisponibilidad y la fracción del fármaco acumulado en la zona requerida [9], además del comportamiento comentado con anterioridad.

El término sistema de liberación modificada, es usado para describir sistemas farmacéuticos que tienen la característica de liberar fármacos basados en el tiempo, trayecto y ubicación; los cuales son diseñados para alcanzar un objetivo terapéutico

no ofrecido por los sistemas de liberación inmediata [10]. Dentro de los sistemas de liberación modificada existe una confusión entre dos términos: liberación prolongada y liberación controlada. El término liberación prolongada es utilizado en sistemas o formas farmacéuticas las cuales fueron formuladas para retardar la liberación del fármaco, de tal forma que la aparición de dicho fármaco en circulación sistémica es retardada y prolongada, por lo tanto, su perfil plasmático tiene una duración sostenida. La liberación controlada, por otra parte, tiene un alcance más allá de una acción sostenida del fármaco, este término también implica una cinética de liberación previsible y reproducible, de una unidad a otra. [7]. Los sistemas de liberación controlada de fármacos pueden ser clasificados en [7]:

- Sistemas de liberación de velocidad pre-programada.  
La liberación del fármaco ha sido pre-programada a un perfil específico de velocidad. Esto puede lograrse utilizando un diseño del sistema capaz de controlar la difusión molecular del fármaco contenido dentro del mismo a través de una barrera.
- Sistemas de liberación de activación modulada.  
La liberación del fármaco es activada por algún proceso físico (temperatura, presión osmótica, p. hidrodinámica, p. de vapor, magnéticamente, sonoforesis, entre otras), químico (pH, hidrólisis intercambio iónico) o bioquímico (enzimático). La velocidad de liberación es controlada por la regulación del proceso de activación.
- Sistemas de liberación regulados por retroalimentación.  
La liberación del fármaco es activada por un agente desencadenante, como lo es una sustancia bioquímica presente en el cuerpo, la cual a su vez es regulada por su propia concentración mediante mecanismos fisiológicos de retroalimentación.

- Sistemas de liberación vectorizados.

Este tipo de sistemas permite la liberación del fármaco en un sitio o tejido específico del cuerpo, en donde el efecto farmacológico es llevado a cabo sin exponer el fármaco en otros sitios y así evitar posibles efectos tóxicos. Las estrategias para obtener sistemas de liberación dirigidos son: administración en la zona de interés, direccionamiento físico hacia condiciones fisiológicas anormales del sitio de interés y el uso de vectores, los cuales tienen una gran afinidad específica a la zona afectada.[11]

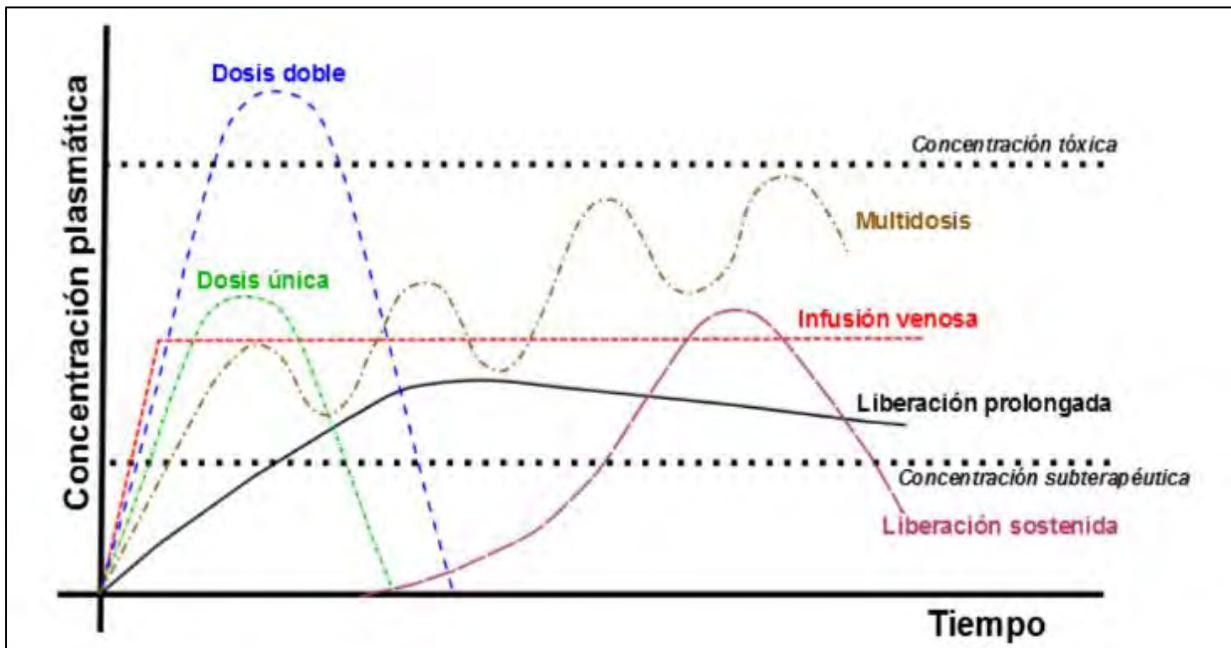


Figura 1. Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas del fármaco, de diferentes sistemas de liberación y de diferentes dosis de formas farmacéuticas convencionales.

### 1.1.1. Micro/Nanoacarreadores.

En los sistemas de liberación controlada, las estructuras que transportan el fármaco al sitio de acción, son conocidos como acarreadores farmacéuticos. De acuerdo con su composición, los acarreadores se clasifican en sistemas moleculares (ciclodextrinas, dendrímeros y nanoestructuras de carbono) y sistemas coloidales (micro/nano partículas, liposomas, niosomas, cristales líquidos, etc.). Dentro de los acarreadores farmacéuticos coloidales, las micro/nano partículas se han convertido en sistemas de liberación controlada más prometedores, este tipo de acarreadores

se clasifica con base en la naturaleza del material que lo constituye, ya sea de tipo polimérico, lipídico, cerámico, metálico (puede ser magnético), entre otros [12]. Otra forma de clasificación es el tamaño de partícula, pero existe una controversia para definir el rango de medida que debe de tener una partícula para ser considerada micrométrica o nanométrica, incluso hacer una distinción entre ambos términos resulta complicado, según lo reportado en la literatura [13], [14].

De acuerdo con la IUPAC las nanopartículas suelen definirse como los sistemas que poseen longitudes entre 1-100 nm, sin embargo, existen algunas partículas menores a 10  $\mu\text{m}$  que son consideradas como nanopartículas [13], [14]. Por otro lado, para ser consideradas como micropartículas, una partícula debe de tener una longitud entre 1-1000  $\mu\text{m}$ , sin embargo, en la mayoría de los sistemas de liberación controlada, las micropartículas poseen un diámetro menor a 100  $\mu\text{m}$ . Se ha demostrado que la captación celular de las partículas es dependiente del tamaño de las mismas, favorecida por tamaños pequeños ( $0.1 \mu\text{m} > 1 \mu\text{m} > 10 \mu\text{m}$ ). En contraste, las partículas grandes permiten una mayor cantidad de fármaco cargado y una liberación controlada más prolongada; las nanopartículas en promedio, presentan un perfil de liberación de orden de horas a días; mientras que las micropartículas lo pueden presentar en orden de semanas. La elección de partículas de tamaño micrométrico o nanométrico, realmente depende del sitio de acción al cual se desea que lleguen las partículas (y por ende el fármaco) y por cuánto tiempo se desea la liberación controlada del fármaco [14].

A su vez las partículas poliméricas han recibido una gran atención por diferentes investigadores, ya que en décadas recientes, los polímeros han sido ampliamente utilizados como biomateriales por sus propiedades favorables, como una buena biocompatibilidad, fácil diseño y preparación, gran variedad de estructuras, algunos biodegradables, y un interesante carácter biomimético [15]. De acuerdo a la forma en la que el fármaco ha sido incorporado a las partículas poliméricas, estas se clasifican en: micro/nano capsulas y micro/nano partículas sólidas, en donde el

fármaco se encuentra disperso en un sistema polimérico monolítico (matriz), respectivamente.

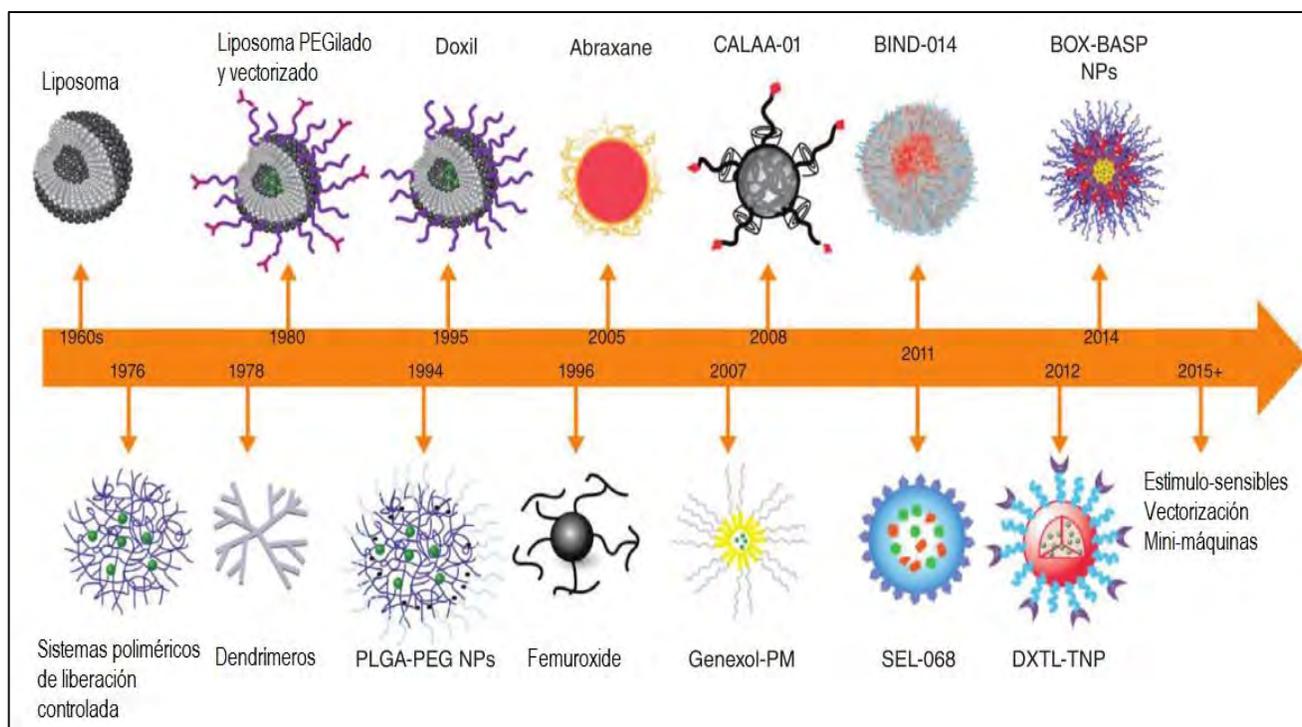


Figura 2. Línea del tiempo de nanoacarreadores. Doxil, primer liposoma aprobado por la FDA; Ferumoxide, agente de contraste para imagenología de resonancia magnética compuesta de óxido de hierro; Abraxane, sistema de liberación controlada a base de proteínas; Genexol-PM, micela polimérica; CALAA-01, híbrido polímero-ciclodextrina vectorizado; BIND-014, nanopartícula polimérica vectorizada; SEL-068, vacuna completamente encapsulada en partícula polimérica; DXTL-TNP, nanopartícula con docetaxel vectorizada; DOX-BASP NPs, nanopartícula polimérica estrella con brazos de cepillo degradable en medio ácido cargadas con doxorubicina, estudios invitro [16].

## 1.2. Polímeros.

Los polímeros (del griego poly *-muchos-* y meros *-partes-*) son macromoléculas compuestas de muchas subunidades repetidas, las cuales se les denomina monómeros. Los monómeros son moléculas pequeñas que pueden ser iguales formando así homopolímeros o moléculas diferentes, dando lugar a copolímeros. Los polímeros representan una parte fundamental en la naturaleza, desde la existencia de los seres vivos, con el ADN (ácidos nucleicos) y proteínas

(aminoácidos), hasta la fabricación de diversos productos indispensables para el desarrollo humano. Los polímeros han ganado gran importancia debido a que poseen propiedades físicas y químicas únicas que representan una ventaja sobre otro tipo de materiales [17]. Dentro de la industria farmacéutica los polímeros son compuestos altamente utilizados, por ejemplo, en materiales de empaque de medicamentos, excipientes con diferentes funciones y por supuesto en la elaboración de micro/nano partículas como sistemas de liberación controlada.

Las características ideales que debe tener un polímero para ser utilizado en la fabricación de micro/nano partículas son: biocompatibilidad, biodegradabilidad, ser económico, fácil obtención y caracterización [18]. La biocompatibilidad hace referencia a la capacidad de un material para desempeñar su función con una respuesta apropiada del huésped en una situación específica, es decir, que el polímero en cuestión no presente una toxicidad o desencadene una respuesta inmune en el paciente. La biodegradación es definida como la ruptura de una sustancia, in vitro o in vivo, mediada por desencadenantes internos; algunos desencadenante son enzimas, pH y condiciones oxidativas/reductoras [19]. De las características antes mencionadas la biocompatibilidad es una característica crucial, sin la cual el polímero no puede ser utilizado; la biodegradabilidad sin duda es una característica deseable, aunque se puede prescindir de ella si existe la suficiente evidencia científica de que el polímero es eliminado completamente del paciente; las dos últimas características son subjetivas, por lo que se tiene que realizar una evaluación costo-beneficio, de la enfermedad a tratar y su terapéutica. La solubilidad en agua es otra característica que representa una ventaja, debido a que se evita el uso de disolventes orgánicos, sin embargo, el uso de éstos se puede realizar si se demuestra que son eliminados en su totalidad o que las trazas remanentes son seguras.

Los polímeros usados para la preparación de micro/nano partículas se pueden dividir en dos grupos: polímeros naturales y polímeros sintéticos. Los polímeros naturales o biopolímeros se obtienen directamente de recursos naturales, tales como plantas

verdes, animales, algas, bacterias y hongos; entre éstos se encuentran las proteínas como la gelatina, la lecitina, la legumina y la vicilina; y también los polisacáridos como el alginato, el dextrano, la agarosa, el pululano y el QS, entre otros [18]. Los polímeros sintéticos son aquellos polímeros que son sintetizados en el laboratorio partiendo de los monómeros que los constituyen, entre ellos se encuentran los poliésteres tales como poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), ácido poliglicólico (PGA), poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (PHBV), polihidroxi-butirato (PHB) u otras familias tales como policianoacrilatos, poli-p-dioxanona (PPDO), ácido poliacrílico (PAA), poliamidas (PA), polianhídridos, polietilenglicol (PEG), poli-orto-ésteres (PES) y alcohol polivinílico (PVA). Muy a menudo la estructura básica de los polímeros naturales puede modificarse químicamente para evitar las limitaciones sufridas durante la administración del fármaco o durante la fabricación del propio sistema de liberación, a este tipo de polímeros también se le conocen como semisintéticos [20].

### **1.3. Quitina y Quitosano.**

La quitina se aisló por primera vez de los hongos en 1811 y aproximadamente 12 años más tarde fue encontrada en algunos insectos, sin embargo, el QS no fue aislado (por ebullición de quitina en una solución de hidróxido de potasio) hasta 1859; desde entonces ha quedado claro que el QS puede derivarse de la quitina por desacetilación, la cual representa su fuente principal de obtención [21]. La quitina es un polisacárido formado de muchos grupos N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa unidos a través de enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1,4). El QS se obtiene cuando un porcentaje de los monómeros de glucosamina en la quitina (generalmente más del 60%) es desacetilado, esto le confiere la capacidad de disolverse en disoluciones acidas diluidas, el cual es otro criterio de diferenciación entre la quitina y el QS [3]. Por lo tanto, el QS es un copolímero de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa y de 2-amino-2-desoxi-D-glucosa, unidos de igual manera por enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1,4). Cuando el grado de desacetilación alcanza el 100% el polímero se conoce como quitano [22].

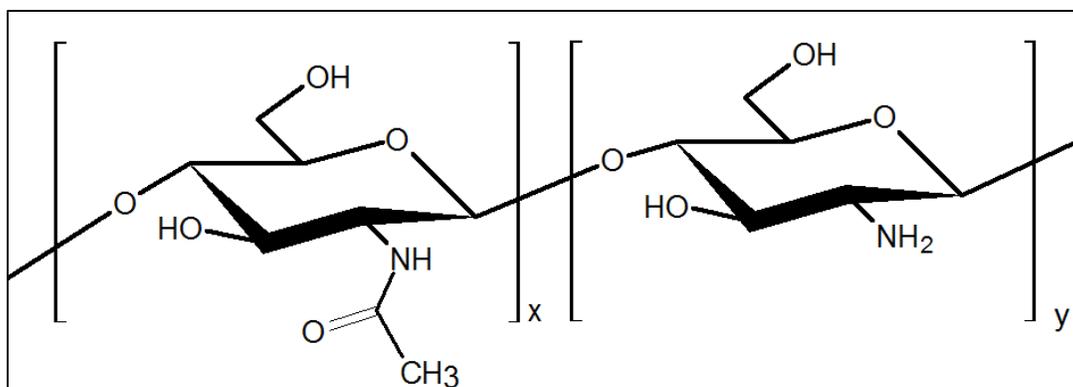


Figura 3. Estructura química del quitosano.

La quitina es el segundo polímero natural más abundante de la tierra (después de la celulosa) se estima que aproximadamente 10 billones de toneladas de quitina pueden ser biosintetizadas en la naturaleza cada año. Las fuentes principales de quitina son las siguientes [3].

- Artrópodos: la fuente primaria son los crustáceos (como el camarón y el cangrejo) cuyo contenido de quitina es del 58-85%, y la fuente secundaria son los insectos (por ejemplo, la langosta, la mariposa, la abeja, la mosca y la crisálida del gusano de seda) cuyo contenido es del 60%.
- Los hongos incluyendo ascomicetos, basidiomicetos y ficomicetes cuyo contenido de quitina es de hasta un 45%.
- Otras especies marinas como moluscos, presentan un contenido de quitina de 3-26% y anélidos con un 20-38%.

La mayoría de las fuentes de obtención de quitina, antes mencionadas, constituyen desperdicios de otros procesos de producción. En la industria del procesamiento de mariscos, este desperdicio (conchas, cabezas y patas) representa un 45% de su producción, dichos desperdicios contaminan el medioambiente y se convierten en una carga económica, si son eliminados fuera de las costas. En la industria alimentaria, los hongos generan desperdicios (tallos y hongo de formas irregulares) de aproximadamente 50 000 toneladas por año, durante su cosecha y producción.

También en la industria apicultora, se generan residuos entre 6000-10000 toneladas por año [23], [24].

Toda la quitina que se encuentran en la naturaleza no existe de manera aislada, sino como compuestos complejos. En las conchas de insectos y los exoesqueletos de crustáceos, las quitinas se combinan con proteínas y carbonato de calcio; en los hongos, las quitinas se combinan con proteínas y otros polisacáridos como la celulosa. La purificación de la quitina y la obtención del QS, que es el derivado de mayor valor, puede ser realizada mediante un método químico y uno biológico. El método químico involucra un tratamiento ácido (desmineralización), un tratamiento alcalino (deproteínización), una decoloración y una desacetilación, la cual se realiza mediante un tratamiento alcalino fuerte a altas temperaturas [21]. En el método biológico la desmineralización se realiza mediante el uso de ácidos orgánicos producidos por bacterias, mientras que la desproteínización es realizada mediante proteasas bacterianas y la desacetilación mediante la enzima quitina desacetilasa [23]. En la actualidad se exploran métodos alternativos para reducir los tiempos de desacetilación y la cantidad de álcali utilizada, éstos hacen uso de la radiación con microondas o de tratamiento termo-mecánicos, entre otros [25]. Aunque el método biológico representa una alternativa interesante porque evita condiciones químicas extremas, sin embargo, el contenido proteico residual remanente y los tiempos de reacción, son mayores en comparación al método químico [23].

### **1.3.1. Propiedades funcionales del Quitosano.**

Dentro de las propiedades de gran interés del QS se encuentran:

- Biodegradabilidad y biocompatibilidad. Dentro del organismo los enlaces glicosídicos son hidrolizados enzimáticamente por  $\beta$ -glucosidasas, dando lugar a monómeros no tóxicos, debido a que se encuentran presentes de manera endógena en órganos y tejidos. La velocidad de degradación disminuye al aumentar el grado de desacetilación [1].
- Mucoadhesión y promotor de la absorción de fármacos. El QS se une a la mucina (principal componente de tejidos mucosos) mediante interacciones

electrostáticas, principalmente, entre los grupos amino del QS y las subestructuras de la mucina (ácido siálico y ácido sulfónico). Esta mucoadhesión, aumenta el tiempo de permanencia en los tejidos, lo que favorece la absorción de los fármacos, y transporte intercelulares a través del epitelio [2].

- Hemostático. La formación del coágulo en presencia del QS es independiente a la vía intrínseca de coagulación, la formación de éste se debe a la gran afinidad del QS por la pared celular de glóbulos rojo y plaquetas [26].
- Antimicrobiano. La actividad antimicrobiana se debe a esta afinidad del QS con los componentes de las paredes celulares de algunas bacterias, hongos y levaduras, lo cual modifica la permeabilidad de la misma [21].
- Antioxidante. La actividad antioxidante del QS es proporcional al grado de desacetilación, por la eliminación de radicales libres debido a la acción del nitrógeno (de la amina) unido al C-2 de cada monómero.
- Anticolesterolémico. Esta propiedad se debe a la disminución de la absorción de colesterol y una interferencia con la absorción con el ácido biliar [23].

Las aplicaciones del QS son muy diversas, algunas de éstas constituyen nuevas áreas de investigación, mientras que en otras su uso es amplio y conocido. En la agricultura el QS es utilizado como recubrimiento en la conservación de semillas y plántulas, así como en sistemas de liberación de fertilizantes. En tratamientos de aguas para la remoción de partículas coloidales sólidas, aceites de pescado, metales pesados y pesticidas, también es utilizado en la fabricación de biosensores para acoplar diferentes enzimas sobre QS, como la tirosinasa para la detección de fenoles en aguas residuales. En la industria alimentaria como modificador reológico y fibra alimentaria. En medicina en la producción de gasa y vendajes tratados con QS como agente bactericida y promotor de la cicatrización [22], [24], [27]. En farmacia una de las aplicaciones mejor conocidas del QS es en el desarrollo de sistemas multiparticulados de liberación controlada, debido a sus propiedades funcionales antes mencionadas [28].

#### **1.4. Micro/Nanopartículas de Quitosano.**

Las micro/nanopartículas de QS se han desarrollado para su uso como acarreadores farmacéuticos, para fármacos anticancerígenos, fármacos antiinflamatorios, antibióticos, factores de crecimiento, proteínas, péptidos, genes, vacunas y en imagenología. Estos sistemas acarreadores de fármacos se diseñaron para administrar agentes terapéuticos a través de la mucosa nasal, colon, vía oral, vaginal o rutas parenterales [28]. Las micro/nanopartículas de QS son partículas esféricas sólidas, por lo que también son llamadas micro/nanoesferas, dependiendo de la técnica de fabricación estas pueden ser estructuras rígidas o geles [21]. Las técnicas de fabricación incluyen: emulsificación con entrecruzamiento iónico y covalente, coacervación/precipitación, coalescencia de gotas en emulsión, secado por aspersión (spray drying) y gelificación iónica.

##### **1.4.1. Fabricación.**

###### **1.4.1.1. Emulsificación y entrecruzamiento covalente o iónico.**

Las micro/nanopartículas de QS se han obtenido utilizando emulsiones agua en aceite (w/o), la disolución acuosa de QS se emulsiona por adición gota a gota en una fase oleosa adecuada que contiene una pequeña cantidad de tensoactivo bajo agitación magnética o agitación vigorosa a temperatura ambiente, o superior a esta. Las interacciones entre los entrecruzadores y el QS pueden ser covalentes o iónicos. Los entrecruzadores covalentes son el glutaraldehído, glioxal, etilenglicol diglicidil éter, diisocianato y diacrilato. Aunque estas moléculas son muy buenos entrecruzantes químicos, pueden presentar ciertas respuestas de toxicidad cuando se implantan, como la irritación de las membranas, por ejemplo. Entre los entrecruzadores iónicos más comunes se encuentran los aniones como el citrato, politrifosfato (TPP) y sulfato [28], [29].

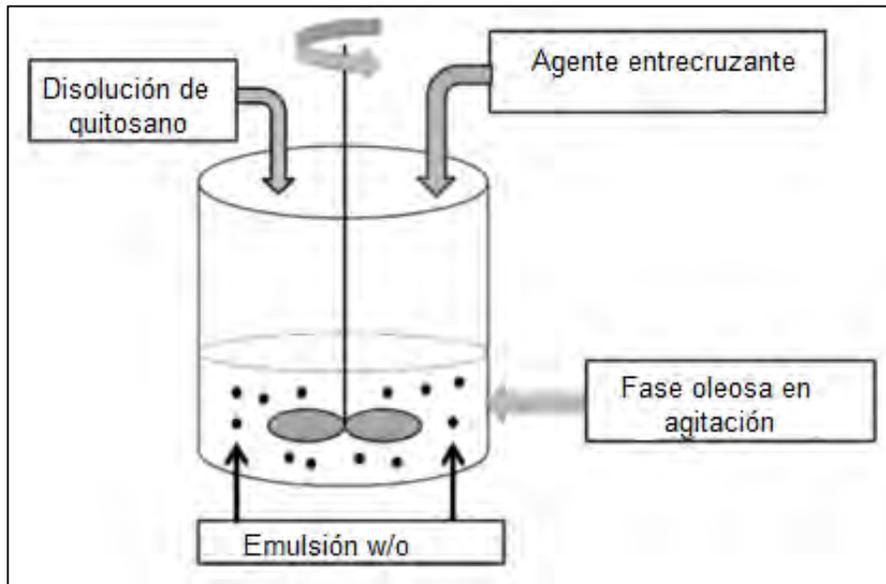


Figura 3. Esquema de la técnica emulsificación y entrecruzamiento (iónico o covalente) [28].

#### 1.4.1.2. Coacervación/precipitación.

Este método se favorece de que el QS es insoluble en medios con pH alcalino. El QS es disuelto en disoluciones ácidas ( $\text{pH} < 6.5$ ) y es coacervado/precipitado en contacto con una disolución alcalina para formar sólidos insolubles. Las partículas de QS son producidas mediante la adición de pequeñas gotas de la disolución de QS en una disolución alcalina, utilizando un aspersor de aire comprimido. El tamaño de las partículas se modifica controlando el tamaño de las gotas agregadas, la liberación del fármaco puede ser controlada mediante el tratamiento de las partículas obtenidas con algún entrecruzante, iónico o covalente [21], [28].

#### 1.4.1.3. Coalescencia de gotas en emulsión.

Esta técnica utiliza los principios de la emulsión y la preparación de partículas por precipitación. En lugar del entrecruzamiento de la partícula de QS por las interacciones químicas o iónicas después de la emulsificación, la precipitación del QS se consigue mediante la coalescencia de gotas de QS con NaOH. Se preparan dos emulsiones w/o separadas: una que contiene disolución acuosa de QS (donde el fármaco es incorporado) en parafina líquida, y la otra que contiene una disolución acuosa de NaOH en parafina líquida. Ambas emulsiones se mezclan bajo agitación

rápida, dando lugar a colisiones aleatorias y la coalescencia de partículas. La velocidad de agitación y el tiempo de agitación se pueden variar para cambiar el tamaño de las partículas formadas (nano o micrométricas) [28].

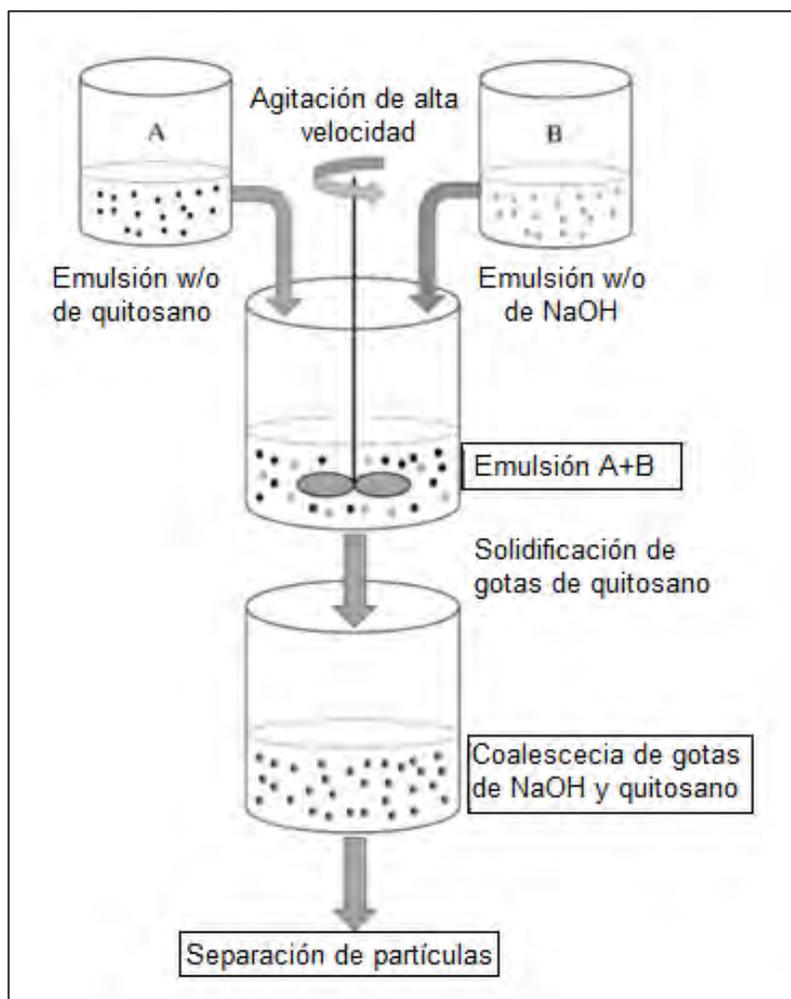


Figura 4. Esquema de la técnica de coalescencia de gotas en emulsión [28].

#### 1.4.1.4. Secado por aspersion (spray-drying).

El proceso de *spray-drying* es rápido y reproducible, dando lugar a partículas con una distribución de tamaños relativamente estrecha y fácil de escalar, en comparación con otros métodos de preparación; éste involucra tres pasos básicos: el primer paso empieza con la atomización de la solución de QS en gotas finas; en seguida la aspersion pasa a través de una corriente de aire caliente, lo que provoca la rápida evaporación del disolvente, dejando partículas sólidas secas; y por ultimo las partículas secas son recolectadas. Existen cuatro tipos diferentes de métodos de

atomización que pueden ser empleados: atomizadores rotatorios, boquillas de presión, atomizadores ultrasónicos y boquillas de fluido; las instalaciones que utilizan boquillas de fluido pueden utilizar boquillas de dos o tres fluidos, en donde uno de estos puede ser una disolución de entrecruzante. El tamaño de las partículas obtenidas por este método pueden ser micro y nanométricas, según las especificaciones del equipo utilizado [21],[30].

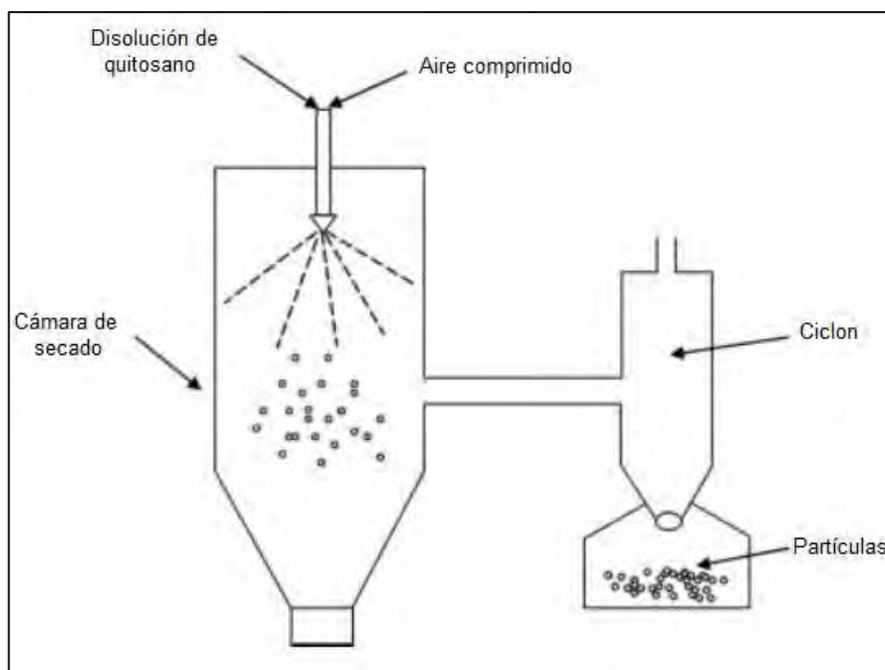


Figura 5. Esquema de la técnica de secado por aspersión (spray-drying) [21].

#### 1.4.1.5. Gelificación iónica.

La gelificación iónica se produce entre los grupos amino cargados positivamente en el QS y moléculas aniónicas (entrecruzadores iónicos); estos entrecruzadores se clasifican en: moléculas de bajo peso molecular, como TPP, citrato o sulfato; y macromoléculas aniónicas, como el alginato de sodio, ácido hialurónico, sulfato de dextrano y ácido poli- $\gamma$ -glutámico [29] Estas interacciones electrostáticas pueden formar hidrogeles a través del entrecruzamiento físico entre moléculas con carga opuesta. La gelificación iónica usando TPP es la técnica más frecuente para fabricar nanopartículas de QS. Las partículas de QS se forman instantáneamente dejando caer gotas de la solución de QS en solución de TPP, bajo agitación suave a temperatura ambiente [21]. Ésta técnica es sencilla de realizar y de escalar e

ampliarse y es simple, además tiene menor toxicidad en comparación con los métodos que utilizan entrecruzadores covalentes, como el glutaraldehído, además de evitar el uso de disolventes orgánicos, por otra parte al tener un entrecruzado presentan un mejor control en la liberación del fármaco, en comparación a las que no, por ejemplo como las obtenidas por coacervación/precipitación y spray-drying [29]

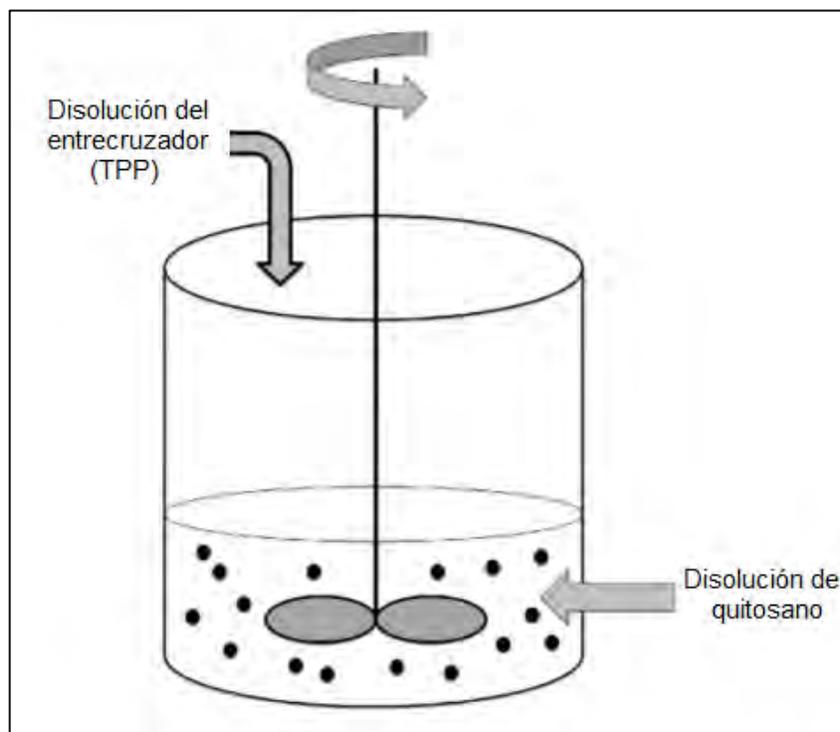


Figura 6. Esquema de la técnica de gelificación iónica [21].

### 1.5. Derivados de quitosano.

Como ya se ha mencionado el QS posee propiedades de gran interés para el desarrollo de partículas para sistemas de liberación controlada, entre otras aplicaciones. Sin embargo la insolubilidad del QS en agua (ya que sólo es soluble en disoluciones ácidas diluidas) además de sus pobres propiedades mecánicas, son algunos retos para su óptimo uso [31]. Por tal motivo la modificación química del QS se ha convertido en un tema creciente de interés, pues se pretende modificar las propiedades limitantes del QS, conservando propiedades favorables como la mucoadhesión, biocompatibilidad y biodegradabilidad. En sistemas de liberación controlada las modificaciones del QS son un herramienta para controlar la

interacción del polímero con los fármacos, mejorar la capacidad de carga y adaptar el perfil de liberación [23]. El QS posee tres grupos funcionales reactivos que permiten la modificación química; grupos amino y amido en C-2, y grupos hidroxilo primario y secundario en C-6 y C-3 respectivamente. Existen varias modificaciones reportadas, entre las cuales se encuentran: N-alquilación, cuaternización de aminos, N/O-carboxialquilación, N/O-sulfatación, N/O-fosforilación, N-tiolación, unión con azúcares, unión a ciclodextrinas y copolimerización por injerto [3], [23], [28], [32].

### **1.5.1. Copolimerización por injerto.**

La copolimerización por injerto es el método usado principalmente para la modificación química del QS y uno de los más importantes [1]. Uno de los polímeros utilizados en copolimerización por injerto es el PLA, no solo en QS, sino para otros polímeros naturales [33]. El PLA, un poliéster termoplástico alifático lineal, está constituido de monómeros de ácido 2-hidroxipropanoico (ácido láctico), además es un homopolímero sintético biodegradable con buenas propiedades mecánicas. Existen varias reacciones químicas para polimerizar el injerto PLA-QS, las cuales involucran el uso de ácido D,L-láctico como monómero PLLA telequérico, y el uso de disolventes como dimetilsulfóxido (DMSO) o N,N-dimetilformamida (DMF), en presencia de catalizadores como el 2-etilhexanoato de estaño ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ), además de la aplicación de energía mediante calentamiento o radiación por microondas [33].

Una forma de obtener el injerto QS-PLA (QS-g-PLA), es mediante el método de policondensación, en el cual no es necesario el uso de un disolvente orgánico ni de un catalizador, ya que solo usa calentamiento al vacío para su reacción [33]–[35]. El método de policondensación consiste en la dispersión de QS en una disolución acuosa de ácido láctico (AL), para promover la formación de iones de lactato y la protonación de los grupos amino del QS, posteriormente se realiza un primer calentamiento para formar una película, dicha película resultante es calentada por segunda vez al vacío, para promover la deshidratación y la formación de la unión amida entre ambos iones [34].

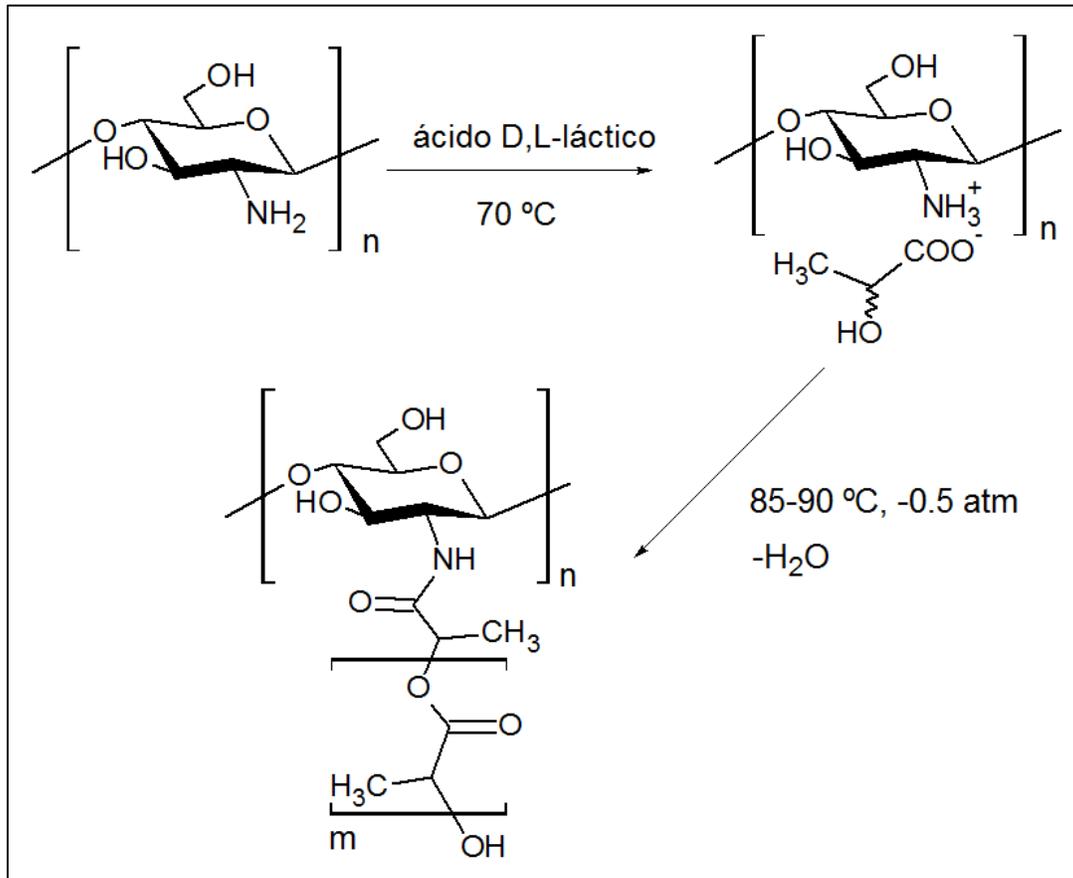


Figura 7. Reacción química de la formación de QS-g-PLA, mediante la técnica de policondensación.

### 1.6. Diseño de experimentos.

En el método científico es indispensable realizar experimentos o pruebas con la intención de resolver un problema o comprobar una idea (hipótesis), es común que estas pruebas o experimentos se hagan sobre la marcha, con base en el ensayo y error, apelando a la experiencia y a la intuición; en algunas ocasiones, esto basta para alcanzar los objetivos planteados, sin embargo, en situaciones de cierta complejidad no es suficiente aplicar este tipo de experimentación, por lo que es mejor proceder siempre en una forma eficaz que garantice la obtención de las respuestas a las interrogantes planteadas en un lapso corto de tiempo y utilizando pocos recursos. El diseño estadístico de experimentos o simplemente diseño de experimentos, consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen

evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras. [36]. Existe varios diseños de experimentos, los cuales se enfocan a problemas específicos, por lo tanto, la elección de entre ellos se deberá: al objetivo del experimento, el número de factores a evaluar, el número de niveles de cada factor, los efectos de interés a investigar, el costo del experimento y tiempo, entre otras.

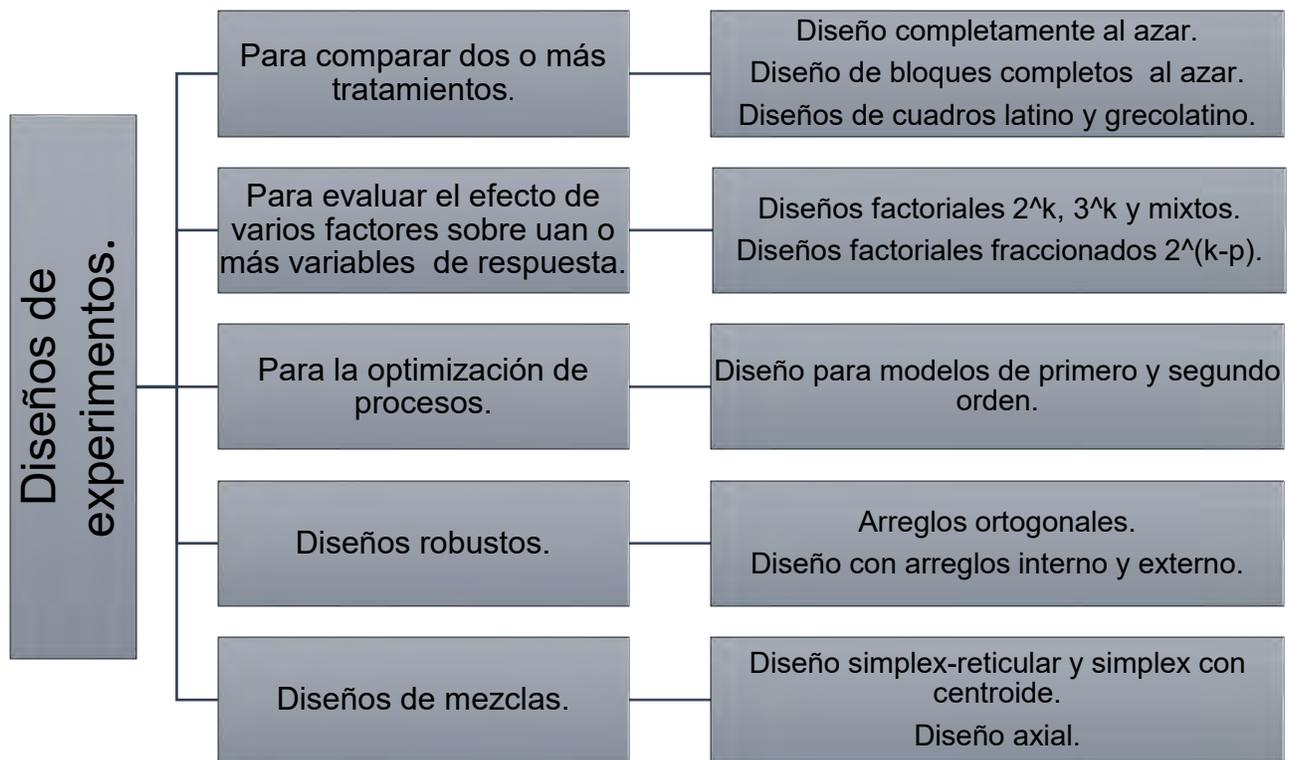


Figura 8. Esquema de la clasificación de diseños de experimentos.

### 1.6.1. Diseño de experimentos factoriales.

El diseño factorial es aquel en el que el conjunto de tratamientos está formado de todas las combinaciones posibles de los niveles de varios factores, el objetivo de este diseño de experimentos es el de estudiar el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas, cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores; así como los efectos de la interacción de dos o más factores. Los factores pueden ser cuantitativos o cualitativos, y cada uno de estos representan una clase de

tratamiento; para estudiar la manera en que influye cada factor sobre la(s) variable(s) de respuesta es necesario elegir a los menos dos niveles (diferentes tratamientos dentro de un factor) de prueba, para cada uno de ellos. La familia de los diseños factoriales  $2^k$  consiste en  $k$  factores, todos con dos niveles de prueba, por otra parte, la familia de diseños factoriales  $3^k$  consiste en  $k$  factores, todos con tres niveles de prueba; cuando los  $k$  factores no poseen el mismo número de niveles de prueba, al diseño se le conoce como mixto. Al conjunto de puntos experimentales o tratamientos que pueden formarse considerando todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores, se le conoce como matriz de diseño o arreglo fraccional [36], [37].

Cuando la matriz del diseño considera todas las posibles combinaciones que pueden formarse con los niveles de los factores a evaluar, se le conoce como diseño factorial completo; por ejemplo, suponiendo un diseño  $2^3$ , el número de combinaciones posibles para este diseño es:  $2 \times 2 \times 2 = 8$ , es decir que si para este ejemplo son considerados los ocho experimentos este diseño tendrá un arreglo completo. Sin embargo, cuando el número de factores de un diseño factorial incrementan, el número de experimentos necesarias para realizar una réplica completa del diseño rebasa con rapidez los recursos de la mayoría de los experimentadores, por ejemplo, suponiendo un diseño  $2^6$ , el número combinaciones posibles es de 64, comparando con el ejemplo anterior, el duplicar los factores a evaluar aumento ocho veces el número de experimentos necesarios realizar una réplica completa. En el diseño anterior, solo 6 de los 63 grados de libertad corresponden a los efectos principales, y solo 15 a las interacciones de dos factores, los 42 grados de libertad restantes se asocian a la interacción de tres o más factores.

Se puede suponer razonablemente que ciertas interacciones de orden superior son insignificantes, es posible obtener información de los efectos principales y las interacciones de orden inferior corriendo únicamente una fracción de del experimento factorial completo. Estos diseños factoriales fraccionados se encuentran entre los tipos de diseños de uso más generalizado en el diseño de productos y procesos, una

de las principales aplicaciones de este tipo de diseños es en los experimento de tamizado o exploración, se tratan de experimentos en los que se consideran muchos factores y el objetivo es identificar aquellos factores que tienen grande efectos [38]. La notación  $2^{(k-1)}$  significa una fracción a la mitad del diseño factorial completo  $2^k$ , no tiene sentido fraccionar el diseño factorial  $2^2$  porque prácticamente desaparece: al tener sólo cuatro tratamientos, fraccionarlo a la mitad implicaría correr dos tratamientos y con ellos no se podrían estimar ni siquiera los dos efectos principales; generalmente es adecuado fraccionar un diseño experimental  $2^k$ , cuando  $k \geq 5$  [36].

En la literatura científica hay al menos diez mil artículos reportados, que informan el uso DoE en diferentes áreas de investigación; desde la ciencia de los materiales, por sí misma, como en la industria textil, la construcción, y por supuesto las ciencias de la salud, esta última representa solo 7% del total. Dentro de este porcentaje la gran mayoría se enfoca en la elaboración de micro/nanopartículas, de los cuales solo una pequeña fracción está dirigida al desarrollo de medicamentos. Específicamente para formación de micro/nanopartículas de QS por la técnica de gelificación iónica, se han reportado la utilización de DoE [39]–[41], sin embargo, el número de variables es pequeña o los intervalos de los niveles de trabajo son pequeños.

## 2. Planteamiento del problema

A pesar de que son conocidas las propiedades funcionales del quitosano, así como la gran disponibilidad de este biopolímero (y por ende su bajo costo), el uso del mismo en la fabricación de partículas micro/nanométricas, mediante la técnica de gelificación iónica es muy bajo, a pesar de que la técnica es sencilla. Esto es debido a que la influencia de las variables de fabricación y formulación, y la interacción entre ellas, sobre las variables de respuesta como lo son el tamaño de partícula y PDI, no han sido establecidas del todo. Otra limitación es la insolubilidad del quitosano en disoluciones acuosas con  $\text{pH} > 6.5$ , y en otros disolventes orgánicos.

El propósito de esta investigación es evaluar diferentes variables de fabricación de micro/nanopartículas de quitosano, mediante la técnica de gelificación iónica; identificar las variables de fabricación y formulación, con mayor significancia sobre el tamaño de partícula y PDI, y establecer un espacio de diseño para la fabricación de micro/nanopartículas de quitosano. Como alternativa a la baja solubilidad de quitosano en disoluciones neutras o básicas, se propone también la modificación química del quitosano, mediante la copolimerización por injerto con PLA, utilizando la técnica de policondensación a partir de quitosano y ácido 2-hidroxiopropanoico.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo general.

Determinar la influencia de las variables de fabricación y formulación, en la fabricación de partículas nano/micrométricas de quitosano (QS) y quitosano-poli(ácido láctico) (QS-PLA), por el método de gelificación iónica.

#### 3.2. Objetivos particulares.

- Desarrollar un diseño de experimentos factorial fraccionado  $2^{(k-1)}$  con una réplica, para la evaluación inicial de la concentración de quitosano, concentración de TPP, concentración de ácido acético, relación de volúmenes TPP:QS y tipo de agitación.
- Desarrollar un diseño fraccionado completo  $2^k$  con dos replicas, para la evaluación de las variables, las cuales mostraron una significancia en el DoE  $2^{(k-1)}$ , además de la relación molar TPP:QS, y adición de NaCl.
- Fabricar micro/nanopartículas de quitosano mediante la técnica de gelificación iónica, según los experimentos establecidos en ambos DoE.
- Caracterizar los tamaños de las partículas de quitosano fabricadas, mediante dispersión dinámica de luz (DLS), para obtener las dos variables de respuesta (tamaño y PDI). Además de la morfología de algunas muestras mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Determinar el efecto de las variables experimentales sobre las variables de respuesta, y Elaborar un gráfico de contornos mixtos para tamaño de partícula y PDI, en función de las variables significativas, con el fin de establecer un espacio del diseño.
- Fabricación del injerto QS-PLA, mediante el método de policondensación.
- Caracterización instrumental de ingreso QS-PLA, mediante espectroscopia de infrarrojo (FTIR) y resonancia magnética nuclear (MNR).
- Fabricar partículas de QS-PLA, mediante la técnica de gelificación iónica, con base en el gráfico de contornos mixtos obtenido.

#### **4. Hipótesis.**

La elaboración de partículas de QS de tamaño micro/nanométrico, mediante la técnica de gelificación iónica, puede ser controlado mediante la variación de diversos factores de fabricación. La modificación química del QS representara una alternativa viable para disolverlo a pH superiores a 6.5.

## 5. Metodología.

### 5.1. Materiales.

Quitosano ( $\geq 75\%$  DD de caparazón de camarón), tripolitrifosfato de sodio pentabásico ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ , pureza 90-95%), ácido-D,L-láctico ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ , pureza 85-95%), ácido poliláctico (PLA), ácido acético ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  pureza  $\geq 99.7\%$ ), metanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ , pureza  $\geq 99.8\%$ ), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ , pureza  $\geq 99.8$ ) adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA) y utilizados sin purificación posterior; Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$  pureza 99.95%) adquirido de J.T. Baker (USA), y agua desionizada ( $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) obtenida de un equipo Nanopure Diamond (Barnstead®).

### 5.2. Diseño de Experimentos (DoE).

Antes de la realización de los experimentos del diseño factorial fraccionado, se realizaron pruebas para establecer lo siguiente: la disolución de quitosano fue la disolución receptora, ya que por su viscosidad no fue posible adicionarlo mediante el uso de la bomba peristáltica con la que se contó; la adición de la disolución de TPP dentro de la disolución de quitosano; y para el caso de la agitación magnética la velocidad de 900 rpm fue la mínima, a las concentraciones de quitosano trabajada, para tener una agitación homogénea.

#### 5.2.1. DoE Factorial fraccionado $2^{(5-1)}$ .

Se utilizó un diseño de experimentos factorial fraccionado  $2^{(5-1)}$ , con una réplica, para evaluar el efecto de cinco variables de entrada, sobre dos condiciones de repuesta. Las variables a evaluar fueron la concentración de QS (0.15-0.75 % w/v), concentración de TPP (0.1-0.3 % w/v), concentración de ácido acético (0.1-0.3 M), relación de volúmenes de TPP:QS (2:5-1:1) y tipo de agitación (magnética-alto corte); mientras que las variables de respuesta fueron el tamaño de partícula y el índice de polidispersión (PDI). Se obtuvieron un total de 16 experimentos, con el fin de minimizar el efecto de variable externas los experimentos fueron aleatorizados. La tabla I muestra las condiciones y el orden de cada experimento.

**Tabla I. Condiciones de fabricación y orden de secuencia para el DoE 2<sup>5</sup>(5-1).**

<i>Orden de experimento</i>	[QS] %m/v	[Acético] M	[TPP] %m/v	Relación vol. TPP:QS	Tipo de agitación
1	0.75	0.1	0.1	1.0	Ultraturrax
2	0.75	0.3	0.1	1.0	Magnética
3	0.75	0.1	0.3	0.4	Ultraturrax
4	0.15	0.1	0.3	1.0	Ultraturrax
5	0.15	0.1	0.1	1.0	Magnética
6	0.15	0.3	0.1	1.0	Ultraturrax
7	0.75	0.1	0.1	0.4	Magnética
8	0.15	0.1	0.3	0.4	Magnética
9	0.15	0.3	0.3	1.0	Magnética
10	0.15	0.1	0.1	0.4	Ultraturrax
11	0.15	0.3	0.3	0.4	Ultraturrax
12	0.75	0.1	0.3	1.0	Magnética
13	0.75	0.3	0.3	0.4	Magnética
14	0.75	0.3	0.3	1.0	Ultraturrax
15	0.15	0.3	0.1	0.4	Magnética
16	0.75	0.3	0.1	0.4	Ultraturrax

### 5.2.2. DoE Factorial completo 2<sup>3</sup>.

Después de realizar el análisis de datos del anterior diseño de experimentos, se decidió llevar a cabo un nuevo diseño de experimentos, el cual evaluó los efectos de tres variables de entrada sobre las mismas variables de respuestas, tamaño de partícula y PDI. Se optó por utilizar un diseño de experimentos factorial completo 2<sup>3</sup>, con dos replicas, donde las variables de entrada fueron la concentración de QS (0.50-0.75 % w/v), la relación molar entre cada ion de PPT y los aminos libres del QS (2:10-3:10, TPP:QS) y la utilización de NaCl (0-0.15 M). Se obtuvieron un total de 16 experimentos, los cuales se realizaron de manera aleatoria, tal como lo muestra la tabla II.

**Tabla II. Condiciones de fabricación y orden de secuencia para el DoE 2<sup>3</sup>**

<b>Experimento</b>	<b>[QS] %m/v</b>	<b>Molar TPP:QS</b>	<b>[NaCl] M</b>
1, 8	0.75	0.3	0.15
2, 12	0.50	0.2	0.15
3, 16	0.50	0.3	0.15
4, 10	0.50	0.2	0.00
5, 11	0.75	0.3	0.00
6, 13	0.75	0.2	0.00
7, 14	0.75	0.2	0.15
9, 15	0.50	0.3	0.00

### **5.3. Fabricación de partículas de quitosano mediante gelificación iónica.**

#### **5.3.1. Fabricación del DoE factorial fraccionado 2<sup>5</sup>(5-1).**

Se prepararon disoluciones de QS con una concentración de 0.15 y 0.75 % w/v en disoluciones de ácido acético 0.1 y 0.3 M, y disoluciones de TPP a concentraciones de 0.1 y 0.3 %w/v en agua desionizada. Para la formación de las nanopartículas se adicionó la disolución de TPP sobre la disolución de QS a una velocidad de 1.4ml/min, mediante una bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson®, Francia), a relaciones de volúmenes TPP:QS de 2:5 y 1:1, para obtener un volumen final de 28 ml. Durante la adición de la disolución de TPP la disolución de QS se mantuvo en constante agitación magnética a 1000rpm o agitación de alto corte a 5000rpm (Ultraturrax® IKA® T-25, Alemania); el tiempo de agitación fue de 10 minutos para cada uno de los 16 experimentos.

#### **5.3.2. Fabricación del DoE factorial completo 2<sup>3</sup>.**

Para este DoE se prepararon disoluciones de quitosano a concentraciones de 0.5 y 0.75 % w/v en ácido acético 0.1M y de TPP a concentraciones necesarias para obtener una relación molar TPP:QS de 2:10 y 3:10 en agua desionizada, para cada concentración de QS. Cada una de las disoluciones antes mencionadas se prepararon por duplicado; al duplicado se le adicionó la cantidad necesaria de NaCl

para obtener una concentración final de 0.15 M (0.9%*m/v*), ya que se sabe que a esta concentración presenta un efecto estabilizador por el contrario-iones [42]. Para la formación de las nanopartículas se adicionó 10 ml de la disolución de TPP en 20ml de disolución de QS, a una velocidad de 1ml/min con la bomba peristáltica antes mencionada, fue elegida esta velocidad para que el tiempo final de agitación fuesen 10 minutos. La velocidad de agitación fue de 5000rpm alcanzada mediante el Ultraturax® T-25, la cual se llevó a cabo por 10 minutos. Para determinar las concentraciones necesarias de TPP para alcanzar una relación molar TPP:QS de 2:10 y 3:10, para cada una de las muestras de QS, se utilizó la siguiente ecuación:

$$[TPP] = 2[QS] * 0.88 * (179.17)^{-1} * 367.86 * 1.11 * (\text{relacion molar TPP: QS})$$

Ecuación 1.

Dónde: [QS] es la concentración de QS, la cual está multiplicada al doble ya que la relación de volúmenes TPP:QS es 1:2; 0.88 es la fracción molar de los monómeros de glucosamina desacetilada, obtenida a partir del porcentaje de desacetilación (%DD), es decir, los grupos amino disponibles para interaccionar con los iones de TPP;  $179.17^{-1}$  es el inverso del peso molecular de la glucosamina, 367.86 corresponde al peso molecular del tripolifosfato de sodio, el valor de 1.11 es el ajuste de la pureza de TTP (90%) y la relación molar TPP:QS puede adoptar el valor de 0.2 para la relación 2:10; y 0.3 para la relación 3:10. Aplicando la ecuación 1, obtenemos que para una [QS]=0.5%*m/v* tenemos una [TPP]=0.40 y 0.60 %*m/v* y para una [QS]=0.75%*m/v* tenemos una [TPP]=0.60 y 1 %*m/v*, para las relaciones 0.2 y 0.3, respectivamente.

### 5.3.3. Análisis Estadístico.

El diseño de experimentos y el análisis de datos se llevó a cabo en el programa estadístico Minitab®, mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Las variables de respuesta fueron obtenidas mediante el promedio de tres mediciones, para cada una de ellas. Particularmente para el tamaño de partícula se utilizó la distribución del 50% de la población ( $D_{50}$ )

para tamaño de partícula, para muestras de 1nm-10µm; y el Z-average para muestras con tamaño >10µm.

#### **5.3.4. Caracterización de partículas.**

##### **5.3.4.1. Tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS).**

La medición de tamaño se llevó a cabo mediante la técnica de dispersión dinámica de luz, mediante el equipo Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instrument Co. UK), con ángulo de medición de 173° con láser rojo a 633 nm, las muestras fueron dispersadas en agua desionizada a una temperatura de 25°C. Los resultados

##### **5.3.4.2. Morfología por microscopía electrónica de barrido.**

Las imágenes microscopía electrónica de barrido fueron obtenidas mediante el equipo JSM-35 CF de JEOL, a 10 kV y una resolución de 10nm. La gota de la muestra en dispersión, fue colocada sobre una película de carbono, se dejó secar a temperatura ambiente, y se recubrió con oro.

#### **5.4. Fabricación de injertos de quitosano-ácido láctico**

En la preparación de los injertos se evaluaron diferentes relaciones molares AL:QS, los moles de cada componente fueron calculados mediante la ecuación 2 para el QS, y con la ecuación 3 para el AL. Para la preparación de los injertos se siguió la metodología reportada por Bhattarai y colaboradores [43].

$$\text{moles QS} = \text{masa QS} * 0.88 * (179.17)^{-1} \quad \text{Ecuación 2.}$$

$$\text{moles AL} = \text{volumen AL} * 1.209 * 0.905 * (90.08)^{-1} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde, para la ecuación 2, el valor de 1.209 corresponde a la densidad de la disolución stock de AL (1.209 g/ml), el valor de 0.905 corresponde a la pureza de la disolución de AL, y el último término corresponde al inverso de la masa molar del AL;

para la ecuación 3 el valor de 0.88 es la fracción molar de la glucosamina desacetilada, y  $179.17^{-1}$  es el inverso del peso molecular de la glucosamina.

El QS se disolvió en una disolución de AL en agua desionizada, para tener una concentración final de QS de 2%*m/v*, y la mezcla permaneció en agitación magnética (400rpm) durante 12 horas. La disolución resultante se colocó en una caja de Petri y se calentó a 70°C por 5 horas, en este tiempo la muestra formó una película (1mm de grosor aproximadamente). La película formada se sometió a un calentamiento a 85-90°C al vacío (-0.53 atm) por 5 horas. A la película resultante se le realizó lavados con metanol y cloroformo usando un Soxhlet, para eliminar AL sin reaccionar y oligómeros de PLA formados.

## **5.5. Caracterización de injertos de Quitosano-Ácido láctico.**

### **5.5.1. Espectroscopia de infrarrojo (FTIR).**

Las muestras fueron analizadas en un Espectrofotómetro de FTIR / FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer, a  $450\text{ cm}^{-1}$ . Debido a que la técnica fue de mediante reflectancia difusa, no hubo necesidad de alguna preparación específica de la muestra.

## 6. Resultados y Discusión.

### 6.1. DoE Factorial fraccionado $2^{(5-1)}$ .

Para la evaluación del efecto de las cinco variables de fabricación propuestas, sobre el tamaño de partícula así como también del PDI, se decidió realizar un DoE fraccionado a la  $\frac{1}{2}$  (16 experimentos en lugar de 32) sin ninguna replica, ya que es el mínimo de experimentos recomendado para la evaluación de 5 variables[36].

Una vez realizados los 16 experimentos y determinados las variables de respuesta (tamaño de partícula y PDI), mediante DLS. En la figura 9 se observan dos gráficos de Pareto de efectos estandarizados para cada variable de respuesta, los cuales fueron construidos a partir del ANOVA (anexo 1). Tanto para el tamaño de partícula (figura 9A), como para el PDI (figura 9B), no existe evidencia estadística de que las variables evaluadas, así como la interacción de estas en dos términos, sean significativas para el tamaño de partícula y para el PDI de los sistemas obtenidos. A pesar de esto se puede apreciar que, para el tamaño de partícula, los efectos principales se deben a [QS], [TPP] y la interacción de ambas variables; mientras que para el PDI el principal efecto proviene de [QS].

Para evaluar la tendencia que tienen cada uno de los efectos principales, antes mencionados, sobre las variables de respuesta correspondiente, se construyeron graficas de efectos principales para cada una de la respuesta (figura 10). La grafica de efectos principales para tamaño de partícula (figura 10A), muestra que se obtiene menores tamaños de partícula a concentraciones altas de QS y viceversa, mientras que el efecto de la concentración de TPP es proporcional a tamaño de partícula obtenido. Según lo reportado en la bibliografía [36], [37], [39], se esperaría que ambas concentraciones (QS y TPP) tuvieran un efecto proporcional sobre el tamaño de partícula, ya que al aumentar la concentración de cada componente se tendrían más iones de cada uno en un mismo volumen, propiciando la formación de partículas más grandes o favoreciendo la aglomeración de partículas [45].

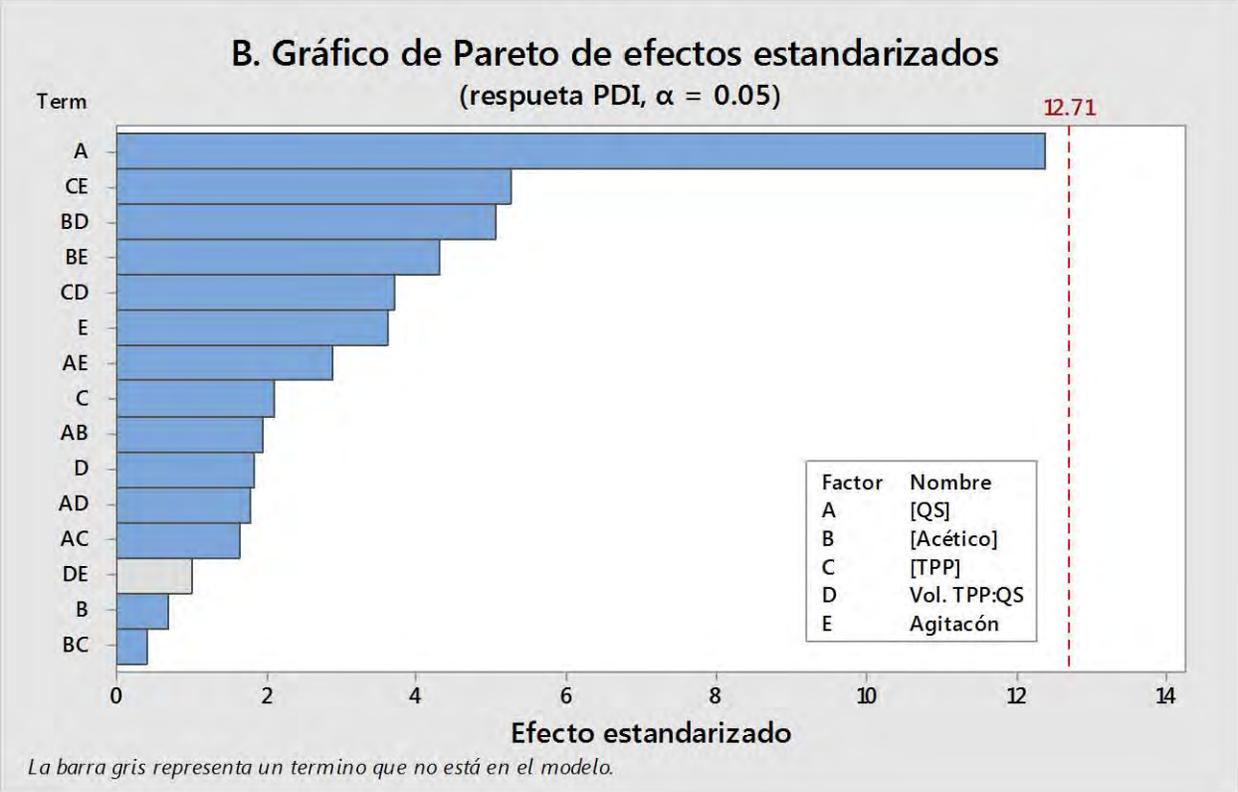
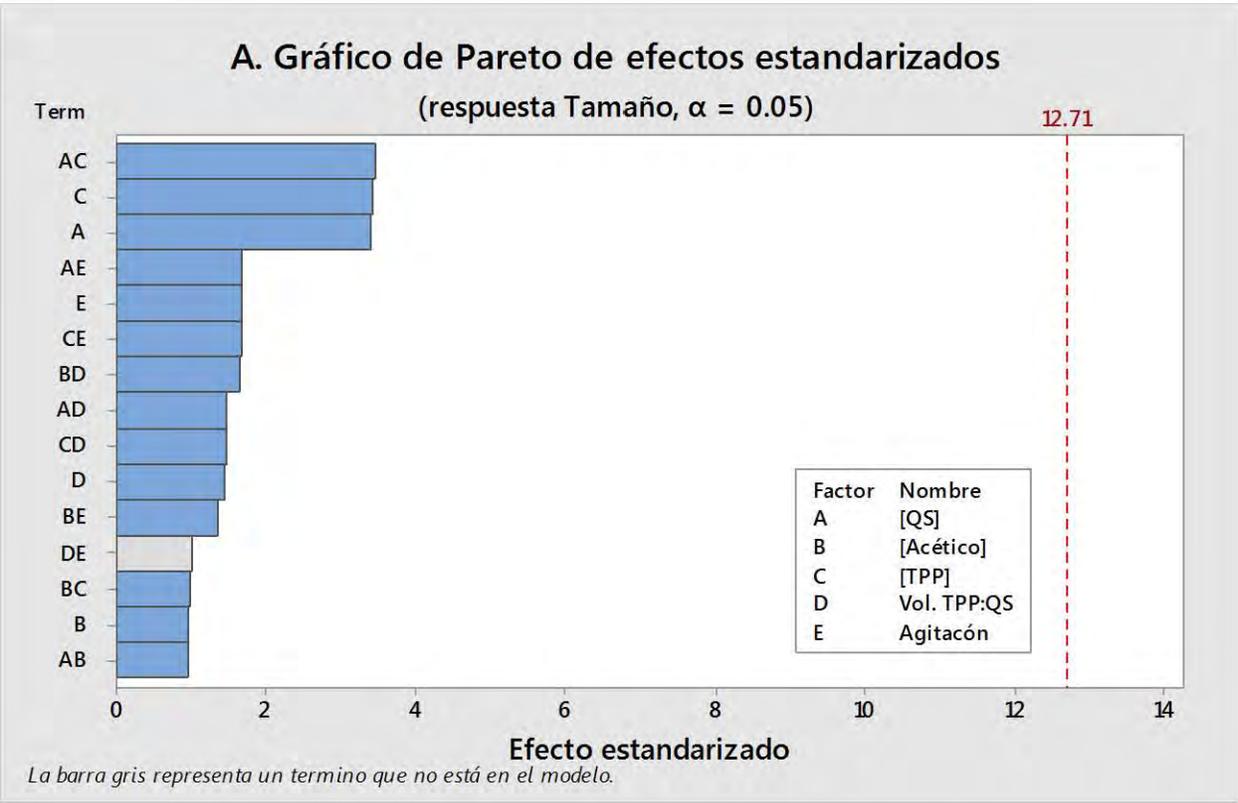


Figura 9. Gráficos de Pareto de efectos estandarizados para: tamaño de partícula (A), y PDI (B).

En cuanto al PDI, tiene un efecto proporcional a la [QS], probablemente esto es debido a que al aumentar la [QS] se tienen más grupos amino disponibles, manteniendo los mismos grupos de TPP, por lo que las interacciones entre ambos iones serán aleatorias, formando partículas pequeñas en las zonas de menor interacción y viceversa, esta interacción también es impedida por el aumento de la viscosidad del medio, debido al aumento de la [QS].

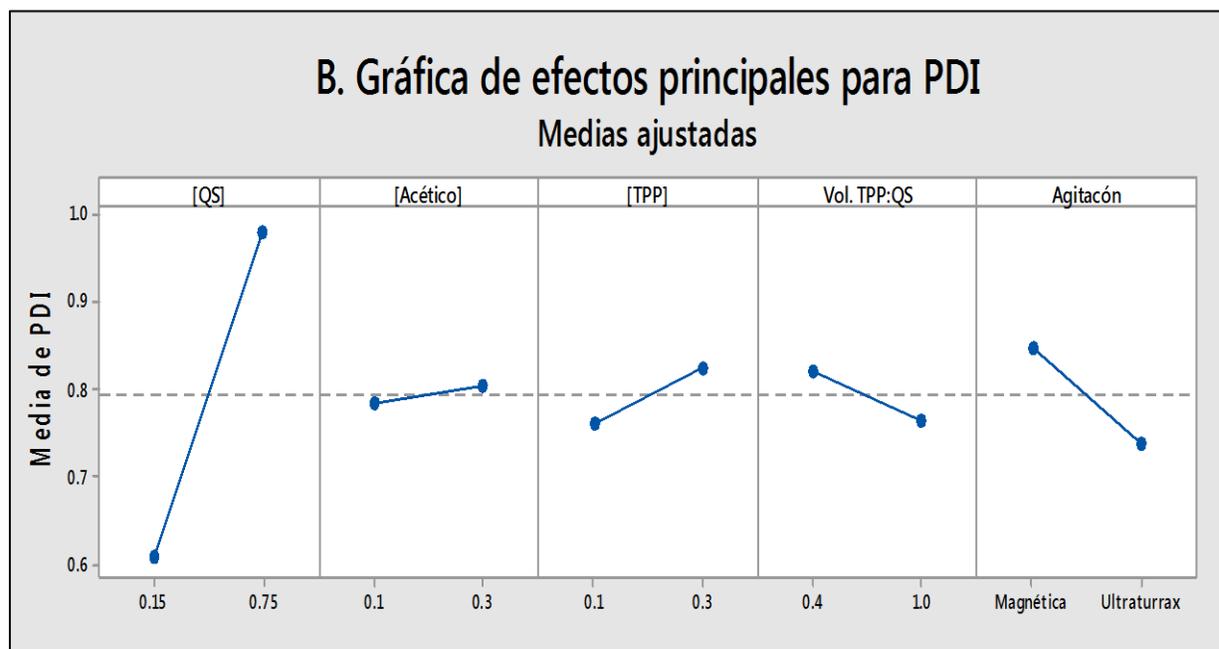
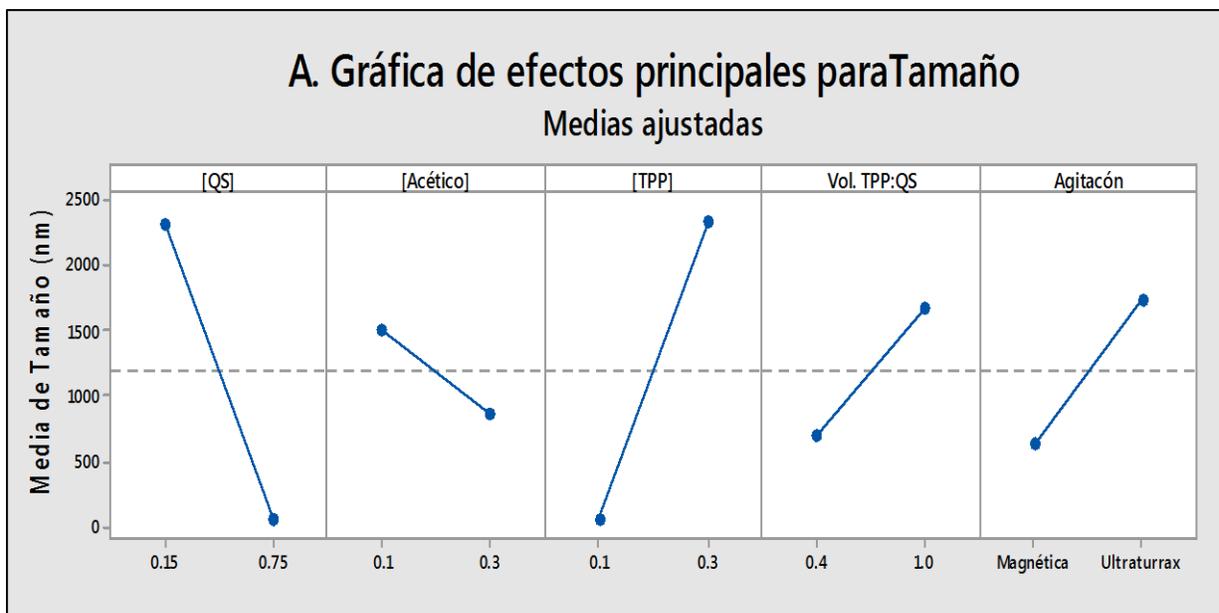


Figura 10. Gráfico de efectos principales para: Tamaño de partícula (A) y PDI (B).

Durante el análisis de las muestras se observó que algunas presentaban una coloración ámbar claro, un color muy parecido a la disolución inicial de QS, esta observación había sido reportada con anterioridad por Calvo y colaboradores [5], cuando trabajo con concentraciones altas de QS y bajas de TPP. Lo anterior sugirió que las cantidades utilizadas de TPP no eran suficientes para reaccionar con todo el QS disponible, por lo que se decidió evaluar el porcentaje de formación (%F), mediante una técnica gravimétrica. Se colocó una muestra de 2 ml de cada experimento en tubos de centrifuga, por duplicado, se centrifugo a 15000rpm/20min, se descartó el sobrenadante, y se secó a 50°C por 12 horas. La diferencia en masa del tubo vacío y la muestra seca, se relacionó con la masa inicial del QS. En la tabla 3 se muestra el promedio y la desviación estándar del %F de cada experimento; las casillas de color azul corresponden a los experimentos que presentaron una coloración ámbar claro, físicamente. Como lo muestra la tabla III, los menos porcentajes de fabricación ( $\leq 31\%$ ), corresponden a los experimentos que presentaron la coloración ámbar, lo que sugieren que aún estaba presente QS sin reaccionar, por la poca cantidad de TPP; por otro lado, los experimentos que no presentaron dicha coloración, obtuvieron %F >100%, esto es porque en la masa inicial solo se consideró al QS y no a la masa de TPP utilizada para la formación de las partículas. Con base en lo anterior, no queda duda que la relación TPP:QS es parámetro muy importante sobre el tamaño de partícula en los sistemas de QS obtenidos por gelificación iónica; por tal motivo esta relación TPP:QS ha sido abordada desde diferentes maneras por ejemplo, relación en masa [44], [46] y relación en volumen [40], [47]. Sin embargo, estas aproximaciones presentan ciertas limitaciones ya que dependen de; la pureza del TPP y %DD para el caso de relación en masa y, de las concentraciones de QS y TPP para la relación en volumen, lo cual impide extrapolar los resultados en procesos de fabricación con valores diferentes de las variables, antes mencionadas. Un acercamiento más acertado es la relación molar TPP:QS, la cual relaciona los iones de TPP con un monómero de glucosamina desacetilada del QS; Huang y Lapitsky [42] demostraron, mediante una calorimetría de titulación isotérmica que a una relación molar 1:5 (TPP:QS), existía una disminución en la señal exotérmica, lo que se interpreta como una saturación en los

sitios de unión del QS, y que cada ion de TPP interacciona con cinco grupos catiónicos del QS. En la tabla III se muestra la relación molar TPP:QS, para cada experimento, la cual fue obtenida mediante la ecuación 1, se observa que las muestras que presentaron una coloración ámbar, que a su vez tuvieron un  $\%F \leq 31\%$ , presentaron una relación molar TPP:QS  $< 0.2$ , es decir que los las aminos protonadas del QS no se encontraban saturadas ya que la cantidad de TPP no fue el adecuado para reaccionar con todo el QS disponible. Lo anterior explica la tendencia de la [QS] sobre el tamaño de partícula; al aumentar la [QS] la diferencia de moles de TPP:QS era mayor, aunado al aumento de viscosidad, el número de colisiones entre los componentes disminuye, lo que resulta en una disminución en el tamaño de partícula [48].

Tabla III. Porcentaje de formación ( $\%F \pm DS$ ,  $n=2$ ) y relación molar TPP:QS, para el DoE factorial fraccionado  $2^{5-1}$ .

Experimento	$\%F \pm SD$	Relación molar TPP:QS
1	19.3 ± 10.4	0.074
2	30.7 ± 1.9	0.074
3	21.5 ± 7.9	0.089
4	150.0 ± 14.1	1.107
5	133.3 ± 9.4	0.369
6	116.7 ± 33	0.369
7	24.3 ± 7.9	0.030
8	158.7 ± 0.4	0.443
9	173.3 ± 18.9	1.107
10	14.0 ± 6.6	0.148
11	154.0 ± 26.4	0.443
12	118.7 ± 13.2	0.221
13	18.2 ± 3.3	0.089
14	119.3 ± 0.9	0.221
15	11.7 ± 3.3	0.148
16	8.9 ± 8.6	0.030

## 6.2. DoE Factorial completo 2<sup>3</sup>.

Con la información obtenida anteriormente se decidió realizar un DoE factorial completo 2<sup>3</sup> con dos réplicas, dando como resultado 16 experimentos, el número mínimo recomendado para este arreglo [36]. Se descartaron las variables que en el anterior DoE no fueron estadísticamente significativas ([Acético], Vol.TPP:QS y el tipo de agitación). Las tres variables experimentales a evaluar fueron: la [QS] (0.5-0.75%), con base en el DoE anterior es una variable de gran impacto para ambas respuestas; la relación molar TPP:QS (0.2-0.3) con respecto a cada nivel de [QS], por lo que se prepararon cuatro concentraciones diferentes de TPP; y por último la presencia de NaCl a una concentración fisiológica (0-0.15 M) la cual se reporta aumenta la estabilidad de la dispersión coloidal [42], [46]. Después de realizar los 16 experimentos y determinados las variables de respuesta (por DLS), el promedio de tres mediciones de cada experimento para cada variable de respuesta, fue utilizado para el análisis estadístico del diseño experimental. En la figura 4 se observan dos gráficos normales de efectos estandarizados para cada variable de respuesta, los cuales fueron construidos a partir del ANOVA (anexo 2).

Para la respuesta de tamaño de partícula (figura 11A) se aprecia que las tres variables y la interacción entre ellas, a 2 y a 3 términos, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el tamaño de partícula. Dado que las variables [QS] y relación molar TPP:QS se encuentran situadas a la derecha de la línea ajustada, el efecto es proporcional, es decir, que al aumentar la [QS] y la relación molar TPP:QS, aumentara el tamaño de partícula obtenido. Estos efectos fueron esperados ya que al aumentar la [QS] existen más grupos amino disponibles en el mismo volumen de fabricación, por lo tanto, las interacciones iónicas aumentan, incrementado así el tamaño de partícula; en el caso de la relación molar TPP:QS, al aumentar la relación molar encima del punto de saturación de los grupos amino del QS (TPP:QS>1:5) existen iones de TPP libres en el medio de fabricación, los cuales interaccionan con las cadenas de quitosano presentes en la superficie de las partículas formando agregados [45].

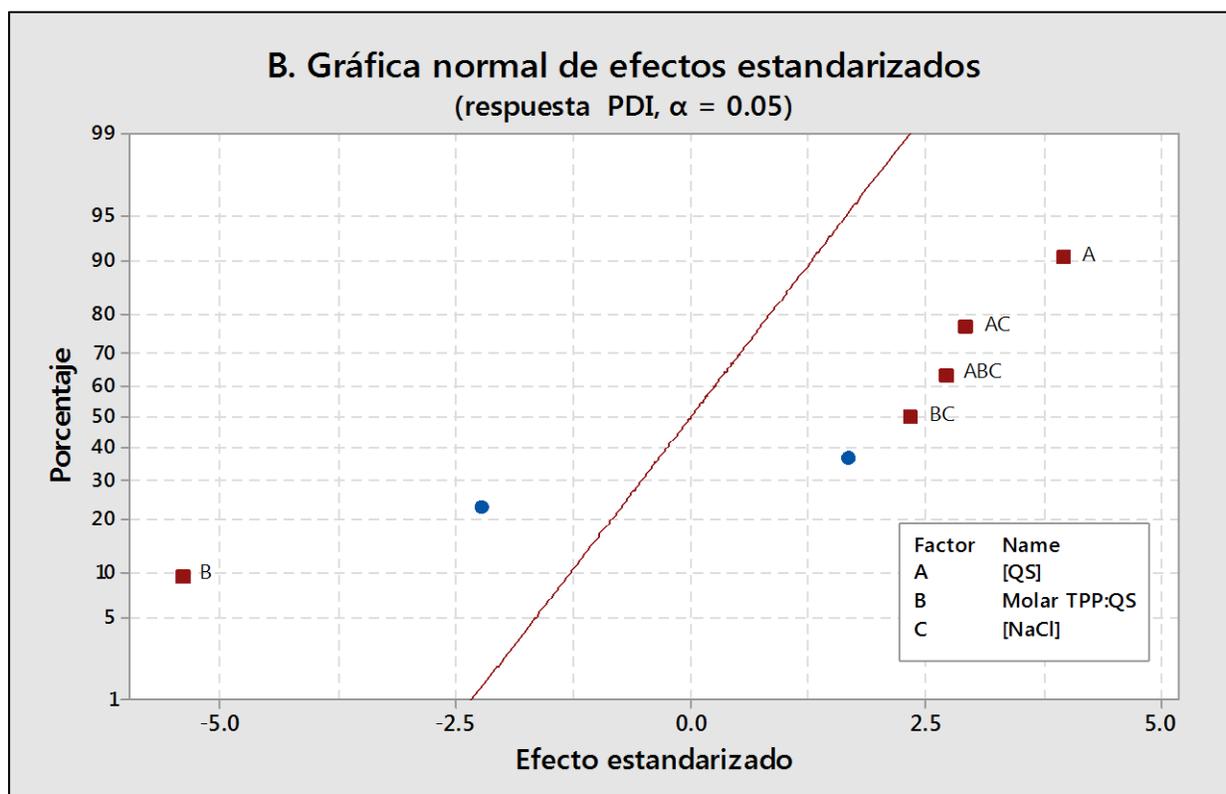
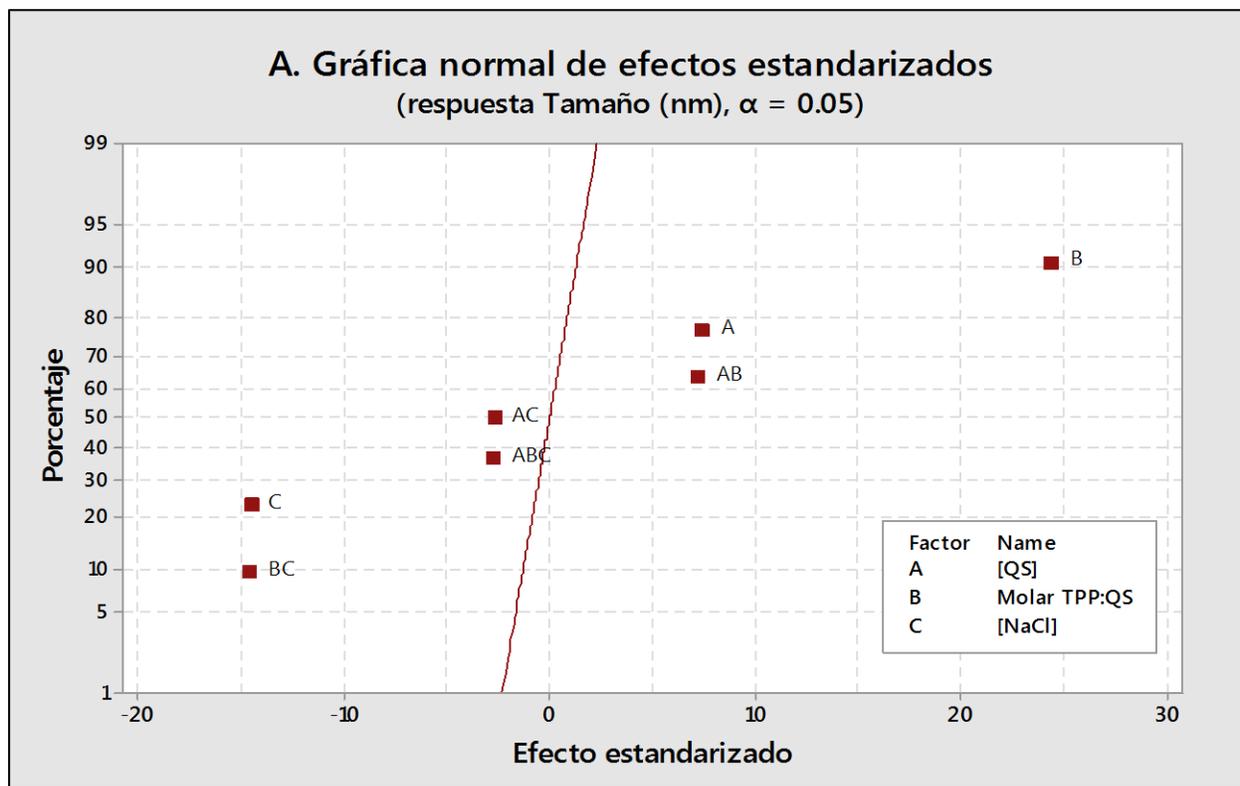


Figura 11. (A) Grafico normal de efectos estandarizados para Tamaño de partícula (nm).  
 (B) Grafico normal de efectos estandarizados para PDI. Variables en rojo tienen una significancia estadística sobre la variable de respuesta.

Por el lado contrario la variable [NaCl] tiene un efecto inverso, es decir que el tamaño disminuyó al aumentar la [NaCl], lo anterior es debido al efecto estabilizante de NaCl debido a que existe una competición entre los iones del TPP, por el QS, evitando que las partículas formen aglomerados o retrasando la formación de los mismos [45]. En la figura 12A se muestra un gráfico de interacción de medias ajustadas, en donde se pueden evaluar las interacciones de las variables a dos términos. Para la interacción [QS]\*Molar TPP:QS (figura 12A superior), se puede observar que la [QS] tiene un mayor efecto en el tamaño cuando se utiliza una relación molar TPP:QS de 3:10, lo anterior debido a la formación de aglomerados ya que no existe un exceso de TPP [42]. En cuanto a la interacción de la variable [NaCl] al nivel alto, con las variables [QS] y Molar TPP:QS (figura 12A inferior izquierda y derecha respectivamente) el efecto el efecto inverso al tamaño de partícula es debido principalmente a la presencia del NaCl, como estabilizador coloidal [42], ya que las líneas que esquematizan su efecto presentan un pendiente baja, es decir que a cualquier nivel de [QS] y relación molar TPP:QS el tamaño de partícula se modifica discretamente con los efectos de las interacciones previamente discutidas.

Para el caso del PDI (figura 11B) las variables estadísticamente significativas fueron la [QS] y la relación molar TPP:QS, así como la interacción de cada una de ellas con la tercera variable [NaCl], y la interacción entre las tres variables. De las variables antes mencionadas solo la relación molar TPP:QS tiene un efecto inverso sobre el PDI, es decir, que al aumentar la relación molar el PDI disminuye, debido a que después de alcanzar el punto de saturación de las aminas disponibles en el QS lo iones TPP libres propician una aglomeración de las partículas, esta aglomeración se realiza fácilmente en partículas de menor tamaño debido a su área superficial de interacción, lo que resulta en una disminución en las clase de menor tamaño reduciendo así la distribución del tamaño de partícula, caso contrario a la [QS] el cual tiene un efecto proporcional sobre el PDI. Según la figura 11B, las interacciones a dos términos estadísticamente significativos son: [QS]\*[NaCl], y Molar TPP:QS\*[NaCl], estas interacciones están representadas en la figura 12B (parte inferior izquierda y derecha, respectivamente).

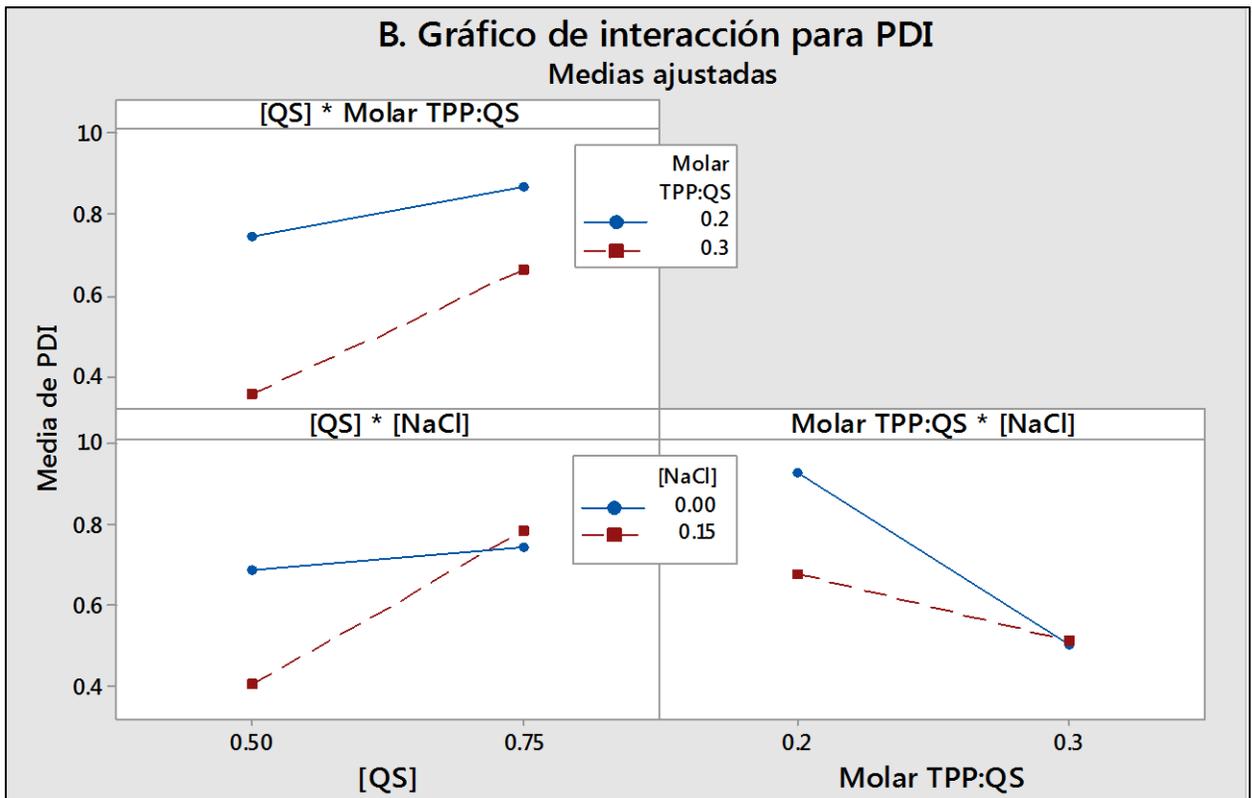
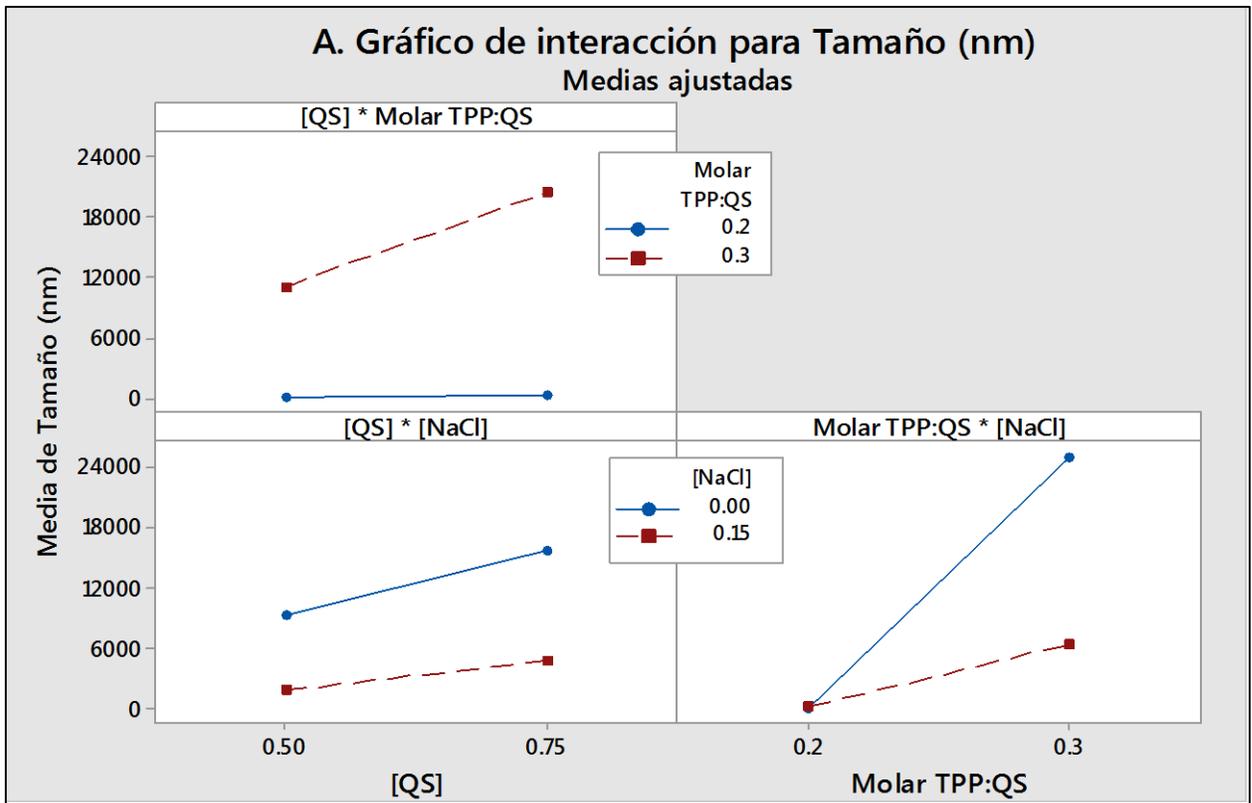


Figura 12. (A) Gráfico de interacción para Tamaño de partícula (nm). (B) Gráfico de interacción para PDI.

Para la interacción  $[QS]^* [NaCl]$ , a niveles bajos de  $[QS]$ , el efecto del  $NaCl$ , en su nivel alto, disminuye significativamente el valor de PDI, sin embargo, a niveles altos de  $[QS]$  la presencia de  $NaCl$  no implica ninguna diferencia, incluso aumenta ligeramente el PDI; lo anterior sugiere que debido al gran número de aminas de  $QS$  presentes en el medio de reacción, una  $[NaCl]=0.15M$  no es suficiente para que dicha sal ejerza su efecto de estabilizador. Para la interacción, Molar  $TPP:QS^*[NaCl]$ , la presencia de  $NaCl$  al nivel bajo de relación molar  $TPP:QS$  tiene un efecto significativo favorable sobre el PDI, lo disminuye; sin embargo, los menores PDI son alcanzados al nivel alto de relación molar, independiente a la presencia del  $NaCl$ . Lo anterior se debe a que una vez alcanzado el punto de saturación (a la relación molar  $TPP:QS =0.2$ ) la viscosidad del medio disminuye ya que no existe  $QS$  disuelto en el medio, lo que permite que los iones restantes de  $TPP$  se distribuyan homogéneamente, por lo que la disminución del PDI solo depende de esta relación molar y no del efecto estabilizante del  $NaCl$ . En el gráfico 12B también se muestra la interacción  $[QS]^*Molar TPP:QS$ , en donde se puede observar que los menores PDI son obtenidos en una relación molar  $TPP:QS=0.3$ , y a su vez en  $[QS]$  bajas, lo cual concuerda con el comportamiento de las interacciones anteriores.

Después de conocer los efectos de las variables estadísticamente significativas, sobre las variables de respuesta se construyó un gráfico de contornos superpuestos; el cual se trata de una representación gráfica para múltiples respuestas (tamaño de partícula y PDI), con límites definidos, en función de dos variables móviles (las demás variables permanecen en un valor fijo). Para la construcción del gráfico de contornos superpuestos para tamaño de partícula y PDI (figura 13), se eligió a las variables  $[QS]$  y relación molar  $TPP:QS$ , como las variables móviles, ya que según lo obtenido en el DoE estas variables influyen en mayor proporción al tamaño; la variable de valor fijo fue la  $[NaCl]=0.15M$ , ya que se comprobó estabilizante, por lo que se obtendrán menores valores de PDI, en futuras predicciones.

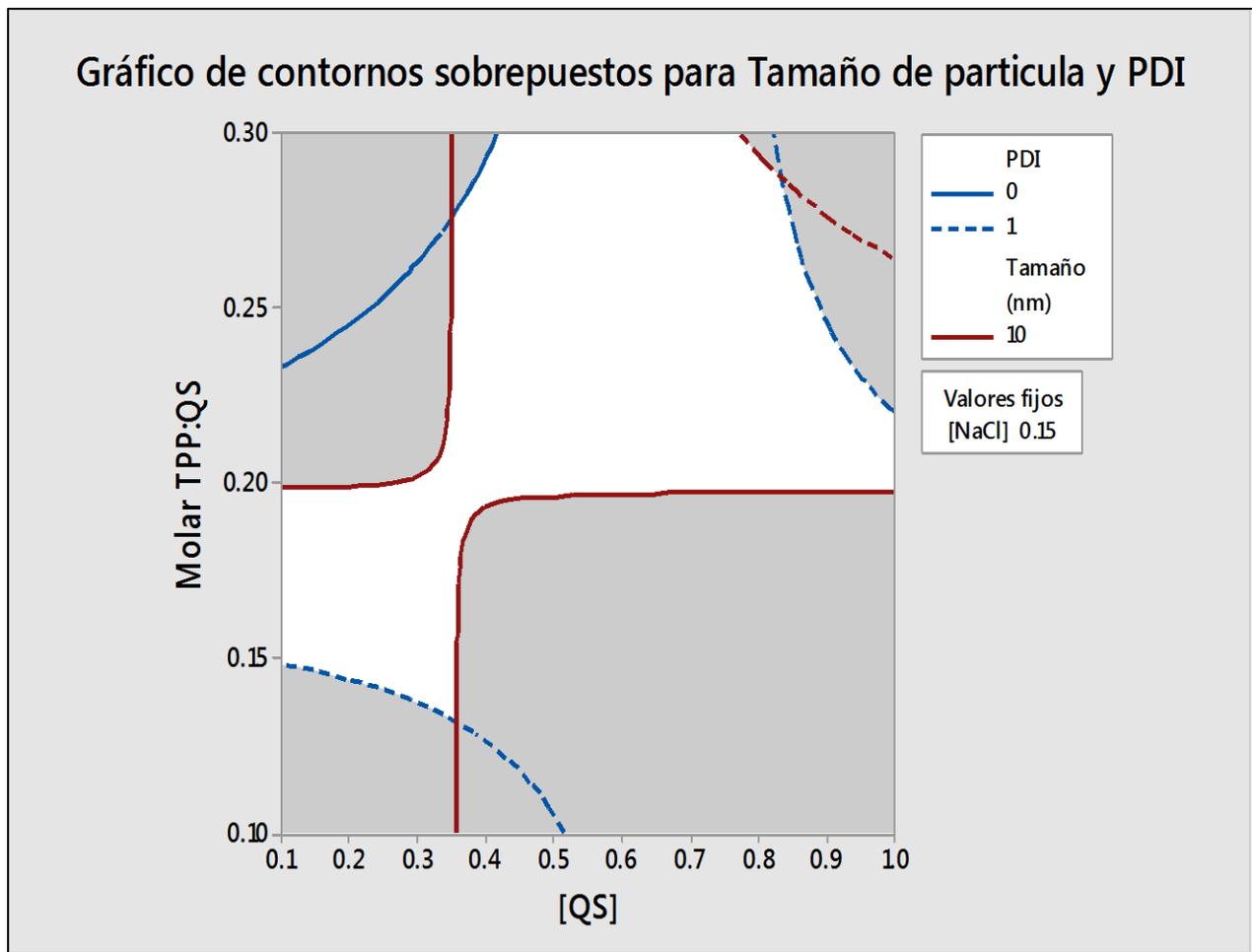


Figura 13. Gráfico de contornos sobrepuestos, el área blanca representa el espacio de diseño, para un intervalo de tamaño de 10nm (línea roja continua) a 10 $\mu$ m (línea punteada roja), y para un PDI de cero (línea continua azul) a uno (línea punteada azul).

El intervalo de respuesta para el tamaño de partícula fue de 10-10000nm (10nm-10 $\mu$ m), intervalo en el cual se encuentran los tamaños de partículas potenciales en el uso de sistemas de liberación controlada. En cuanto al PDI se propuso un intervalo de 0-1, ya que el sesgar más el PDI descartaría tamaños de partícula mayores a 8 $\mu$ m, es decir se disminuirá el espacio del diseño (un ejemplo se muestra en la figura 14).

Como resultado se obtiene el gráfico de contornos sobrepuestos (figura 13) donde el área de color blanco representa el espacio del diseño delimitada por los valores de respuesta determinados, la ventaja de este tipo de gráficos es que situándose en algún punto de éste arroja las respuestas simultaneas de tamaño y PDI (mediante extrapolación a los

ejes cartesianos) según las condiciones seleccionadas, con lo cual se puede tener una optimización en el proceso de fabricación, mediante gelificación iónica, de micro/nanopartículas de quitosano.

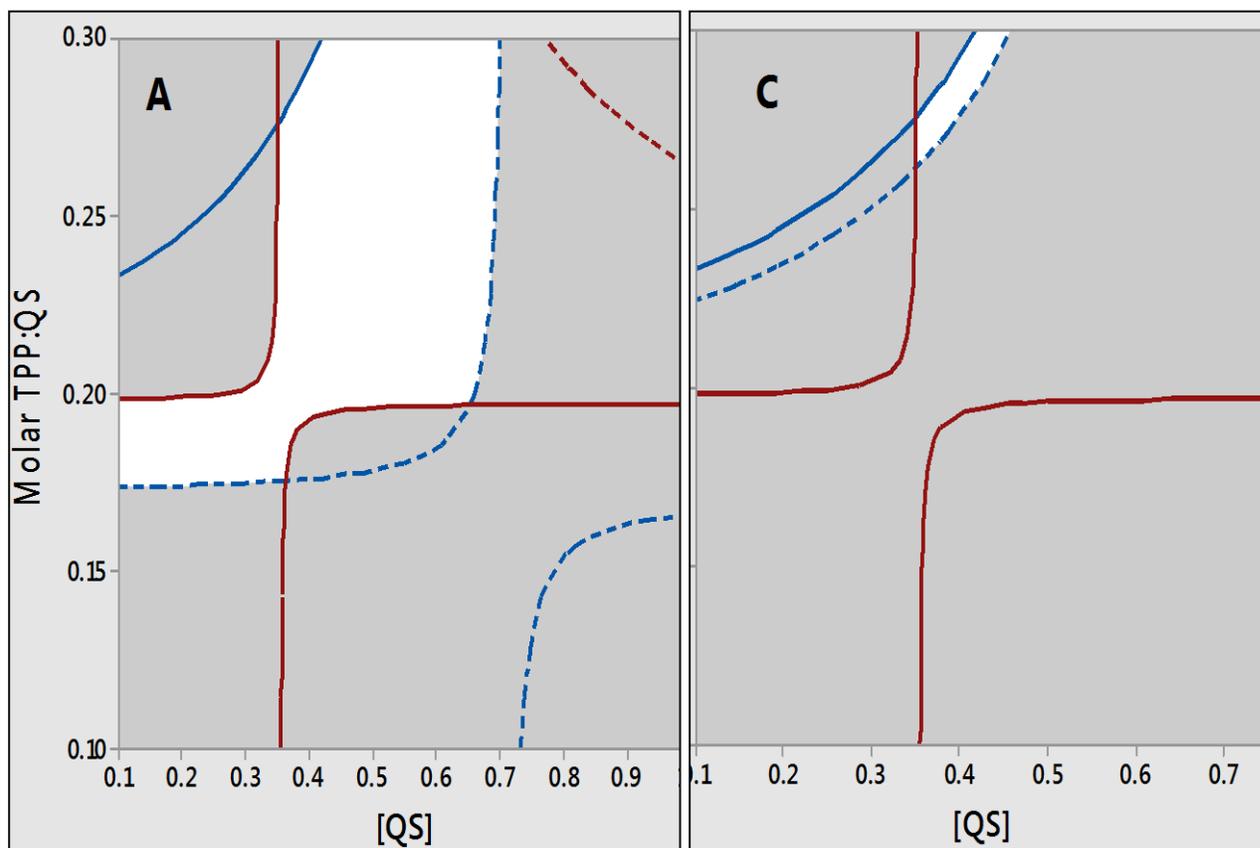


Figura 14. Gráficos de contornos superpuestos, el área blanca representa el espacio de diseño, para un intervalo de tamaño de 10nm (línea roja continua) a 10 $\mu$ m (línea punteada roja), para ambos gráficos; con límites en PDI de 0-0.7(A) y 0-0.1 (C). Al disminuir el intervalo de PDI se disminuye el espacio del diseño.

En la figura 15 se muestra imágenes de SEM, a un aumento de x2400 (figura 15 A) y x7800 (figura 15 B), como se aprecian en las imágenes las partículas presentan una morfología esférica, también se puede notar la presencia de agregados alargados y otros en forma de “zarzamora”; estos aglomerados se deben a que en la superficie de las partículas están presente cadenas de QS, que al entrar en contacto con TPP favorecen la unión con cadenas superficiales de partículas contiguas, favoreciendo así la formación de agregados [45], [49], [50]

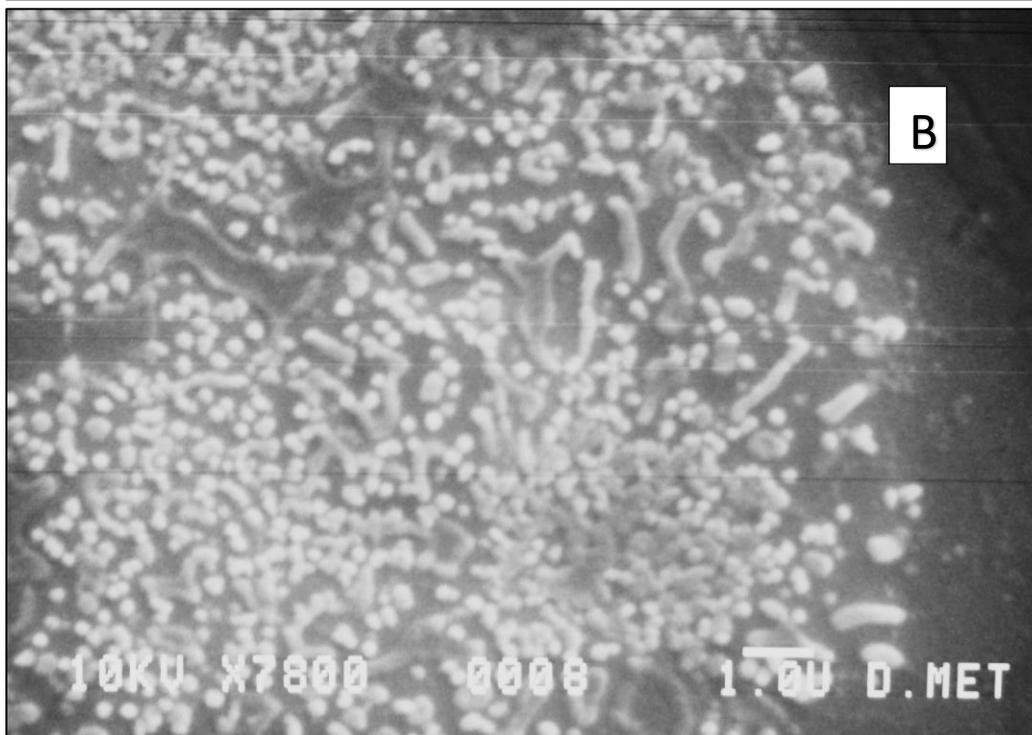
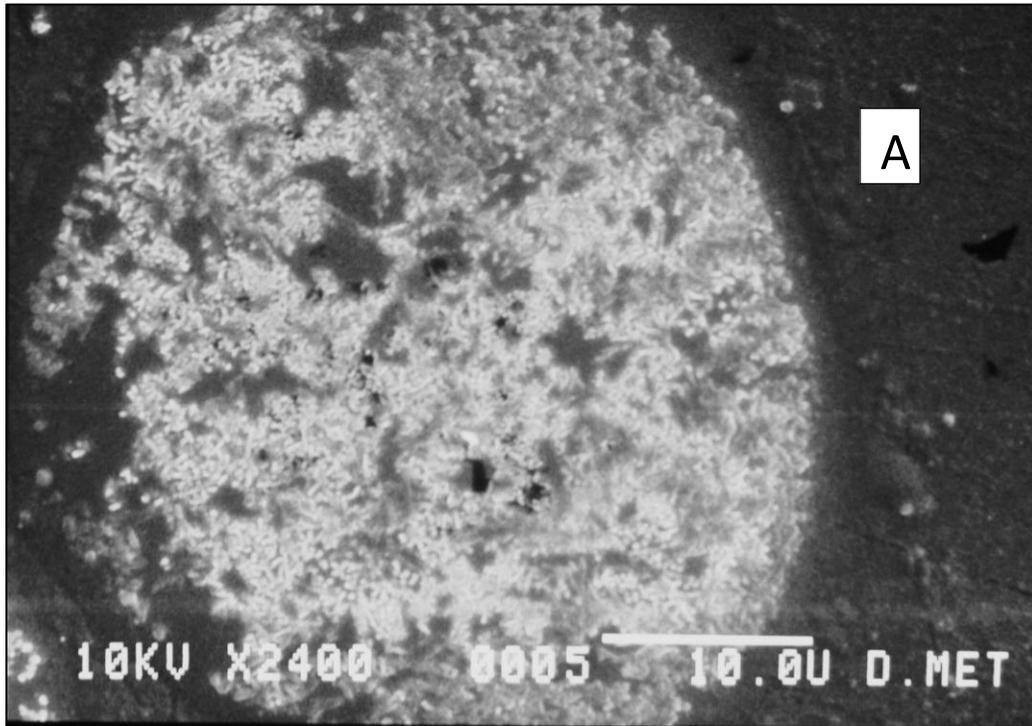


Figura 15. Imágenes de SEM, aumentos de x2400 (A) y x7800 (B).

### 6.3 Injerto QS-PLA

La copolimerización del injerto de QS con AL se realizó a diferentes relaciones molares AL:QS, En la tabla IV se muestran las cantidades de QS, AL y su relación molar entre ellos. Además, en las últimas columnas se muestran los resultados de solubilidad, al cual fueron sometidos los injertos. Según lo reportado por Bhattarai [43] a bajas relaciones molares de AL:QS, los injertos obtenidos son solubles o ligeramente solubles a  $\text{pH} \leq 7.5$ , este mismo comportamiento se observó a las relaciones molares de trabajo utilizada. Con base en la insolubilidad de los injertos obtenidos, se puede asegurar que para relaciones molares AL:QS  $>2.7$ , existe la copolimerización por injerto del QS, ya que al unirse segmentos de PLA a los grupos amino vuelve insoluble a la muestra en disoluciones acidas, caso homólogo a la quitina y a los grupos aminos acetilados.

**Tabla IV. Condiciones de fabricación de injertos y resultados de pruebas de solubilidad.**

<i>Injerto</i>	Masa QS (g)	Vol. AL (ml)	mmoles QS	mmoles AL	Rel. Molar AL:QS	Solubilidad	
						Agua desionizada	Ác. Acético 0.2M
A	1.0367	1.1	5.1	13.4	2.62	S	S
B	0.9667	1.5	4.7	18.2	3.84	NS	NS
C	1.0137	2.1	5.0	25.5	5.12	NS	NS
D	0.5807	2.9	2.9	35.2	12.35	NS	NS
E	0.5333	3.347	2.6	40.7	15.52	NS	NS

S=soluble, NS=no soluble.

Con la diferencia de que al adicionar grupos hidrófobos (PLA), crea interacciones hidrófobas internas, formado entrecruzamientos entre las cadenas de QS, por tal motivo las muestras se volvieron insolubles, además de conferirle una propiedad de hinchamiento en función del pH y fuerza iónica [35], [51]. En cuanto a la menor relación molar (AL:QS=2.6), la copolimerización fue muy baja, prácticamente nula, y seguramente la solubilidad del “injerto” A se deba a la protonación de los grupos amino propiciada por las condiciones ácidas de la disolución de AL, es decir que no se llevó a cabo la

condensación de las sales para formar grupos amida, por lo tanto la muestra obtenida fue fácilmente solubilizada incluso en agua desionizada.

En la figura 15 se muestran los espectros de infrarrojo para QS, PLA y AL, y para los injertos A y E. Para el caso de QS se observan señales en  $3400\text{ cm}^{-1}$  los cuales corresponden a las vibraciones de los grupos hidroxilo del QS; la señal en  $1655\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes al estiramiento C=O las N-acetilaciones, y la señal en  $1585\text{ cm}^{-1}$  corresponde a los grupos amino libres (desacetilados). En el espectro del injerto E aparece una señal alrededor de  $1750\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento C=O de grupos carbonilos de esteres; y una señal en  $1150\text{ cm}^{-1}$  debida a estiramientos simétricos y asimétrico de los mismos, que también está presente en el PLA, estas señales está ausente para el injerto A, lo que reafirma el supuesto de que no existió la formación de nuevos enlaces amida entre QS-PLA o estos fueron insignificantes en comparación con el injerto E. La disminución en la anchura de la señal cercana  $1585\text{ cm}^{-1}$ , en el injerto E, sugiere que los grupos aminos libres disminuyeron, aunado a esto el incremento en la señal de amida I ( $1655\text{ cm}^{-1}$ ), es debida a la formación de nuevos enlaces amida [31], [43], [52].

Figura 15. Espectros de FTIR para QS(negro), injerto A (rojo), injerto D (azul), PLA (verde) y AL (rosa).

A pesar de que la señal alrededor de  $1750\text{ cm}^{-1}$  está presente en los espectros de PLA y AL (debida a los grupos carbonilo de esteres), se puede hacer una distinción entre ambas señales, porque existe una mayor resolución en la del PLA debido que los esteres están unidos covalentemente (polimerizados), además de que está señal perteneciente al AL presenta un corrimiento hacia longitudes de onda menores; lo anterior confirma la presencia de PLA en el injerto E. Con base en lo obtenido en los resultados de la espectroscopia IR, se decidió trabajar con el injerto A, ya que no se tenía la certeza de que este no se trataba de un injerto con PLA, sino la forma iónica del quitosano. En cuanto a los injertos B-E, tampoco se pudieron utilizar por ser insolubles en agua y en la disolución de ácido acético, por lo que se imposibilitó su en la formación de partículas por el método de gelificación iónica.

## 7. Conclusiones.

- Se determinó el efecto de las variables del proceso de fabricación de partículas de QS por el método de gelificación iónica; las variables de formulación: [QS], relación molar TPP:QS y [NaCl], fueron las de mayor significancia sobre las variables de respuesta.
- Con la información obtenida del diseño experimental  $2^3$ , se logró construir un gráfico de contornos superpuestos, cuya área del diseño abarca las condiciones necesarias de (concentración de quitosano, relación molar TPP:QS) para la fabricación de partículas con tamaño de partícula, desde 10 nm hasta 10  $\mu\text{m}$ , con diferentes PDI, mediante la fabricación de gelificación iónica.
- Se obtuvieron injertos de QS-g-PLA, mediante el método de policondensación (a partir de ácido láctico y quitosano), a diferentes relaciones molares AL:QS. Sin embargo, debido a su insolubilidad de estos no se logró fabricar nano/micropartículas con estos injertos.

## 8. Perspectivas.

Evaluar el porcentaje de encapsulación, eficiencia de carga y perfiles de liberación; y realizar la optimización de estos parámetros en función de tamaño de partícula y PDI. Caracterizar las propiedades mecánicas del injerto, aprovechar las propiedades de hinchamiento en función de pH y fuerza iónica, para el uso de estos injertos como sistemas de liberación controlada o en regeneración de tejidos.

## 9. Referencias.

- [1] P. Cerezo, "Nanocomposites de quitosano/montmorillonita como promotores de la permeabilidad celular de oxitetraciclina.," Universidad de Granada, 2013.
- [2] V. V. Khutoryanskiy, *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems*, 1st ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2014.
- [3] K. Yao, J. Li, F. Yao, and Y. Yin, *Chitosan-Based Hydrogels*, 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2012.
- [4] R. Bodmeier, H. G. Chen, and O. Paeratakul, "A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles.," *Pharmaceutical research*, vol. 6, no. 5. pp. 413–417, 1989.
- [5] P. Calvo and C. Remunan-Lopez, "Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers," *J. Appl. ...*, pp. 125–132, 1997.
- [6] F. Rossi, G. Perale, and M. Masi, *Controlled Drug Delivery Systems Towards New Frontiers in Patient Care*. Milano, 2016.
- [7] Y. W. Chien, *Novel Drug Delivery Systems.*, 2a ed., vol. 48, no. 3. 1993.
- [8] M. Rangasamy and K. G. Parthiban, "RECENT ADVANCES IN NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEMS," *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.*, vol. 1, no. 12, pp. 316–326, 2010.
- [9] R. R. Bhagwat and I. S. Vaidhya, "NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEMS: AN OVERVIEW," vol. 4, no. 3, pp. 970–982, 2013.
- [10] H. C. Ansel, N. G. Popovich, and L. V. Allen, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 9th ed. 2011.
- [11] C. Zhai, J. Yuan, and Q. Gao, "Stimuli-Sensitive Chitosan-based Systems for biopharmaceuticals," *Chitosan-Based Syst. Biopharm. Deliv. Target. Polym. Ther.*, pp. 319–332, 2012.
- [12] S. R. Mudshinge, A. B. Deore, S. Patil, and C. M. Bhalgat, "Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery," *Saudi Pharm. J.*, vol. 19, no. 3, pp. 129–141, 2011.
- [13] A. Van Herk, J. Forcada, and G. Pastorin, *Controlled Release Systems; Advances in Nanobottles and Active Nanoparticles*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2016.

- [14] R. A. Bader and D. A. Putman, *Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery*. 2014.
- [15] A. D. Sezer, "Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery," in *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, B. Devasier and K. Sanghyo, Eds. InTech, 2014, p. 552.
- [16] B. L. Banik, P. Fattahi, and J. L. Brown, "Polymeric nanoparticles: The future of nanomedicine," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 8, no. 2, pp. 271–299, 2016.
- [17] C. E. Carraher Jr., *Introduction to Polymer Chemistry*, 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2017.
- [18] N. Jawahar and S. Meyyanathan, "Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review," *Int. J. Heal. Allied Sci.*, vol. 1, no. 4, p. 217, 2012.
- [19] B. Voit, R. Haag, D. Appelhans, and P. B. Welzel, *BIO- AND MULTIFUNCTIONAL POLYMER ARCHITECTURES. Preparation, Analytical Methods, and Applications*, 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- [20] S. Bhatia, *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. 2016.
- [21] J. A. Jennings and J. D. Bumgardner, *Chitosan Based Biomaterials Volume 1: Fundamentals*, 1st ed. Kidlington, 2017.
- [22] C. Lárez-Velásquez, "Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro," *Av. en química*, vol. 1, no. 2, pp. 15–21, 2006.
- [23] S.-K. Kim, *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives. Biological Activities and Applications.*, 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- [24] Z. Mármol, G. Páez, M. Rincón, K. Araujo, and C. Aiello, "Quitina y Quitosano polímeros amigables . Una revisión de sus aplicaciones Chitin and Chitosan friendly polymer . A review of their applications," *Rev. Tcnocientífica URU*, no. August 2016, pp. 53–58, 2011.
- [25] C. F. Berghoff, "Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/polimero sintético para regeneración de tejido óseo," pp. 1–229, 2011.
- [26] S. B. Rao and C. P. Sharma, "Use of chitosan as a biomaterial : Studies on its safety and hemostatic potential," vol. 34, pp. 21–28, 1997.

- [27] R. Expósito-Harris, *Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos.*, vol. 17, no. 1. 2007.
- [28] S. P. Davis, *Chitosan : manufacture, properties, and usage*, 1st ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011.
- [29] R. A. A. Muzzarelli, "Chemical and Technological Advances in Chitins and Chitosans Useful for the Formulation of Biopharmaceuticals," *Chitosan-Based Syst. Biopharm. Deliv. Target. Polym. Ther.*, pp. 1–21, 2012.
- [30] O. Ka??par, M. Jakubec, and F. ??t??p??nek, "Characterization of spray dried chitosan-TPP microparticles formed by two- and three-fluid nozzles," *Powder Technol.*, vol. 240, p. 3140, 2013.
- [31] J. Li, M. Kong, X. J. Cheng, J. J. Li, W. F. Liu, and X. G. Chen, "A facile method for preparing biodegradable chitosan derivatives with low grafting degree of poly(lactic acid)," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 49, no. 5, pp. 1016–1021, 2011.
- [32] S.-K. Kim, *CHITIN and CHITOSAN DERIVATIVES Advances in Drug Discovery and Developments*, 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2014.
- [33] T. Maharana, S. Pattanaik, A. Routaray, N. Nath, and A. K. Sutar, "Synthesis and characterization of poly(lactic acid) based graft copolymers," *React. Funct. Polym.*, vol. 93, pp. 47–67, 2015.
- [34] F. Yao, W. Chen, H. Wang, H. Liu, K. Yao, P. Sun, and H. Lin, "A study on cytocompatible poly(chitosan-g-l-lactic acid)," *Polymer (Guildf).*, vol. 44, no. 21, pp. 6435–6441, 2003.
- [35] X. Qu, A. Wirsén, and A.-C. Albertsson, "Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water," *Polymer (Guildf).*, vol. 41, no. 12, pp. 4589–4598, 2000.
- [36] Gutiérrez, H. Pulido, and R. De la Vara Salazar, *Análisis y Diseño de Experimentos*, 2a ed. Mèxico: Mc Graw Hill, 2008.
- [37] M. H. Badii, J. Castillo, M. Rodríguez, A. Wong, and P. Villalpando, "Diseños experimentales e investigación científica ( Experimental designs and scientific research )," *InnOvacíOnes de NegOciOs*, vol. 4, no. 2, pp. 283–330, 2007.
- [38] D. C. Montgomery, "Diseño Y Análisis De Experimentos," *Limusa Wiley*. pp. 21–692, 2004.

- [39] B. K. Patel, R. H. Parikh, and P. S. Aboti, "Development of oral sustained release rifampicin loaded chitosan nanoparticles by design of experiment.," *J. Drug Deliv.*, vol. 2013, p. 370938, 2013.
- [40] A. L. de Pinho Neves, C. C. Milioli, L. Müller, H. G. Riella, N. C. Kuhnen, and H. K. Stulzer, "Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 445, pp. 34–39, 2014.
- [41] A. M. Elwerfalli, A. Al-Kinani, R. G. Alany, and A. ElShaer, "Nano-engineering chitosan particles to sustain the release of promethazine from orodispersables," *Carbohydr. Polym.*, vol. 131, pp. 447–461, 2015.
- [42] Y. Huang and Y. Lapitsky, "Monovalent salt enhances colloidal stability during the formation of chitosan/tripolyphosphate microgels," *Langmuir*, vol. 27, no. 17, pp. 10392–10399, 2011.
- [43] N. Bhattarai, H. R. Ramay, S. H. Chou, and M. Zhang, "Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 1, no. 2, pp. 181–187, 2006.
- [44] L. Bugnicourt, P. Alcouffe, and C. Ladavière, "Elaboration of chitosan nanoparticles: Favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely divided, spherical, and colloidally stable objects," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 457, pp. 476–486, 2014.
- [45] Y. Huang and Y. Lapitsky, "On the kinetics of chitosan/tripolyphosphate micro- and nanogel aggregation and their effects on particle polydispersity," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 486, pp. 27–37, Jan. 2017.
- [46] H. Jonassen, A. L. Kjøniksen, and M. Hiorth, "Effects of ionic strength on the size and compactness of chitosan nanoparticles," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 290, no. 10, pp. 919–929, 2012.
- [47] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, and H. Ni, "Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 90, no. 1, pp. 21–27, 2012.
- [48] Z. S. Sheikholeslami, H. Salimi-Kenari, M. Imani, M. Atai, and A. Nodehi, "Exploring the effect of formulation parameters on the particle size of

- carboxymethyl chitosan nanoparticles prepared via reverse micellar crosslinking,” *J. Microencapsul.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–10, 2017.
- [49] P. Gao, G. Xia, Z. Bao, C. Feng, X. Cheng, M. Kong, Y. Liu, and X. Chen, “Chitosan based nanoparticles as protein carriers for efficient oral antigen delivery,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 91, pp. 716–723, 2016.
- [50] S. B. Subramanian, A. P. Francis, and T. Devasena, “Chitosan–starch nanocomposite particles as a drug carrier for the delivery of bis-desmethoxy curcumin analog,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 114, pp. 170–178, 2014.
- [51] Q. Xin, A. Wirsén, and A. C. Albertsson, “Synthesis and characterization of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 74, no. 13, pp. 3193–3202, 1999.
- [52] J. Li, M. Kong, X. J. Cheng, Q. F. Dang, X. Zhou, Y. N. Wei, and X. G. Chen, “Preparation of biocompatible chitosan grafted poly(lactic acid) nanoparticles,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, no. 3, pp. 221–227, 2012.

## 10. Anexos

### Anexo 1. ANOVA de DoE factorial fraccionado 2^(5-1)

#### Analysis of Variance

Source	DF	Seq SS	Contribution	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	14	100819541	98.29%	100819541	7201396	4.11	0.371
Linear	5	51283473	50.00%	51283473	10256695	5.85	0.304
[QS]	1	20387257	19.88%	20387257	20387257	11.62	0.182
[Acético]	1	1614742	1.57%	1614742	1614742	0.92	0.513
[TPP]	1	20710008	20.19%	20710008	20710008	11.81	0.180
Vol. TPP:QS	1	3670002	3.58%	3670002	3670002	2.09	0.385
Agitación	1	4901464	4.78%	4901464	4901464	2.79	0.343
2-Way Interactions	9	49536068	48.29%	49536068	5504008	3.14	0.414
[QS]*[Acético]	1	1612710	1.57%	1612710	1612710	0.92	0.513
[QS]*[TPP]	1	20787444	20.27%	20787444	20787444	11.85	0.180
[QS]*Vol. TPP:QS	1	3815869	3.72%	3815869	3815869	2.18	0.379
[QS]*Agitación	1	4971674	4.85%	4971674	4971674	2.83	0.341
[Acético]*[TPP]	1	1682274	1.64%	1682274	1682274	0.96	0.507
[Acético]*Vol. TPP:QS	1	4752509	4.63%	4752509	4752509	2.71	0.348
[Acético]*Agitación	1	3275829	3.19%	3275829	3275829	1.87	0.402
[TPP]*Vol. TPP:QS	1	3813916	3.72%	3813916	3813916	2.17	0.379
[TPP]*Agitación	1	4823844	4.70%	4823844	4823844	2.75	0.345
Error	1	1753837	1.71%	1753837	1753837		
Total	15	102573378	100.00%				

#### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	PRESS	R-sq(pred)
1324.32	98.29%	74.35%	448982197	0.00%

#### Coded Coefficients

Term	Effect	Coef	SE Coef	95% CI	T-Value	P-Value	VIF
Constant		1190	331	(-3017, 5397)	3.59	0.173	
[QS]	-2258	-1129	331	(-5336, 3078)	-3.41	0.182	1.00
[Acético]	-635	-318	331	(-4524, 3889)	-0.96	0.513	1.00
[TPP]	2275	1138	331	(-3069, 5344)	3.44	0.180	1.00
Vol. TPP:QS	958	479	331	(-3728, 4686)	1.45	0.385	1.00
Agitación	1107	553	331	(-3653, 4760)	1.67	0.343	1.00
[QS]*[Acético]	635	317	331	(-3889, 4524)	0.96	0.513	1.00
[QS]*[TPP]	-2280	-1140	331	(-5347, 3067)	-3.44	0.180	1.00
[QS]*Vol. TPP:QS	-977	-488	331	(-4695, 3718)	-1.48	0.379	1.00
[QS]*Agitación	-1115	-557	331	(-4764, 3649)	-1.68	0.341	1.00
[Acético]*[TPP]	-649	-324	331	(-4531, 3883)	-0.98	0.507	1.00
[Acético]*Vol. TPP:QS	-1090	-545	331	(-4752, 3662)	-1.65	0.348	1.00
[Acético]*Agitación	-905	-452	331	(-4659, 3754)	-1.37	0.402	1.00
[TPP]*Vol. TPP:QS	976	488	331	(-3719, 4695)	1.47	0.379	1.00
[TPP]*Agitación	1098	549	331	(-3658, 4756)	1.66	0.345	1.00

#### Regression Equation in Uncoded Units

Tamaño = -5612 + 5518 [QS] + 11263 [Acético] + 23568 [TPP] + 4417 Vol. TPP:QS + 1196 Agitación  
 + 10583 [QS]\*[Acético] - 37994 [QS]\*[TPP] - 5426 [QS]\*Vol. TPP:QS  
 + 1858 [QS]\*Agitación + 32426 [Acético]\*[TPP] + 18167 [Acético]\*Vol. TPP:QS  
 - 4525 [Acético]\*Agitación + 16274 [TPP]\*Vol. TPP:QS + 5491 [TPP]\*Agitación

## Anexo 1. ANOVA de DoE factorial fraccionado 2<sup>3</sup>

### Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	7	0.89461	0.12780	10.58	0.002
Linear	3	0.60314	0.20105	16.64	0.001
[QS]	1	0.19068	0.19068	15.79	0.004
Molar TPP:QS	1	0.35244	0.35244	29.18	0.001
[NaCl]	1	0.06003	0.06003	4.97	0.056
2-Way Interactions	3	0.20267	0.06756	5.59	0.023
[QS]*Molar TPP:QS	1	0.03349	0.03349	2.77	0.134
[QS]*[NaCl]	1	0.10347	0.10347	8.57	0.019
Molar TPP:QS*[NaCl]	1	0.06571	0.06571	5.44	0.048
3-Way Interactions	1	0.08880	0.08880	7.35	0.027
[QS]*Molar TPP:QS*[NaCl]	1	0.08880	0.08880	7.35	0.027
Error	8	0.09664	0.01208		
Total	15	0.99125			

### Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.109907	90.25%	81.72%	61.00%

### Coded Coefficients

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant		0.6576	0.0275	23.93	0.000	
[QS]	0.2183	0.1092	0.0275	3.97	0.004	1.00
Molar TPP:QS	-0.2968	-0.1484	0.0275	-5.40	0.001	1.00
[NaCl]	-0.1225	-0.0612	0.0275	-2.23	0.056	1.00
[QS]*Molar TPP:QS	0.0915	0.0457	0.0275	1.67	0.134	1.00
[QS]*[NaCl]	0.1608	0.0804	0.0275	2.93	0.019	1.00
Molar TPP:QS*[NaCl]	0.1282	0.0641	0.0275	2.33	0.048	1.00
[QS]*Molar TPP:QS*[NaCl]	0.1490	0.0745	0.0275	2.71	0.027	1.00

### Regression Equation in Uncoded Units

$$\text{PDI} = 0.92 + 1.38 [\text{QS}] - 1.37 \text{ Molar TPP:QS} + 14.38 [\text{NaCl}] - 4.60 [\text{QS}] * \text{Molar TPP:QS} \\ - 31.2 [\text{QS}] * [\text{NaCl}] - 82.2 \text{ Molar TPP:QS} * [\text{NaCl}] + 158.9 [\text{QS}] * \text{Molar TPP:QS} * [\text{NaCl}]$$