

# IMPLANTE DE POLIPIRROL SINTETIZADO POR PLASMA EN LA MEDULA ESPINAL DE RATAS DE LABORATORIO

Alvarez L.<sup>1</sup>, Mondragón R.<sup>1</sup>, Morales A.<sup>1</sup>, Díaz A.<sup>2</sup>, Rios C.<sup>2</sup>,  
Salgado H.<sup>2</sup>, Cruz G. J.<sup>3</sup>, Olayo M.G.<sup>3</sup>, Morales J.<sup>4</sup>, Olayo R.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> UPIITA-Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional, Col. Ticomán, CP 07738, México, D.F.

<sup>2</sup> Departamento de Neuroquímica-Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

<sup>3</sup> Departamento de Síntesis y Caracterización, ININ, Apdo. Postal 18-1027, CP 11801, México, D.F.

<sup>4</sup> Departamento de Física, UAM-I, Av. Michoacán y Purísima, Col. Vicentina, CP 09340, México, D.F.

## 1- Introducción

La tecnología actual permite construir dispositivos artificiales biocompatibles capaces de imitar los movimientos naturales del cuerpo humano y convivir con él, pero, ninguno de estos puede ser controlado desde el cerebro, ni coordinado con otros órganos, entre otras cosas, por carecer de una interfase conductor-nervio. Algunos polímeros conductores o semiconductores pueden ser biocompatibles, como por ejemplo algunas variedades de polipirrol y polialilamina. La síntesis de estos polímeros juega un papel muy importante en la biocompatibilidad, ya que se requiere que adicionalmente el material tenga cierto grado de absorción o pasividad, según sea el caso, en el medio biológico. Por medio de descargas de resplandor es posible sintetizar polipirrol dopado *in situ* con yodo con conductividad eléctrica sensible a la concentración acuosa e iónica de medios biológicos.

Así, un electrodo polimérico hecho de esta forma puede responder ante la concentración iónica de un organismo viviente, que podría ser el cuerpo humano, con potenciales eléctricos y ser una interfaz biocompatible, capaz de recibir y/o enviar señales eléctricas y transformarlas en señales iónicas, o viceversa, entendibles por el sistema nervioso.

En este trabajo se presentan los resultados de la implantación de un polímero semiconductor en la médula espinal de ratas de laboratorio. Los animales fueron operados para cortar la médula espinal e inmovilizar las extremidades inferiores del cuerpo para después recibir implantes de materiales biocompatibles y reconectar la médula espinal.

## 2. Resultados y Discusiones

### 2.1 Caracterización del polímero

El polipirrol-yodo (PPy-I) se sintetizó en forma de película delgada por medio de una descarga de resplandor a una potencia de 18 W, frecuencia de 13.5 MHz y presión de  $1.5 \times 10^{-2}$  Torr. Una descripción detallada del método de síntesis se encuentra en la referencia [1]. El polímero se recuperó con acetona en forma de película delgada y posteriormente se molió para hacer una pastilla e implantarla en la médula espinal de las ratas.

#### 2.1.1 Análisis de FT-IR

En la Fig. 1 se muestra el espectro FT-IR del polipirrol. En el espectro se encuentran las bandas de absorción amplias y complejas características de los materiales sintetizados por plasma. Destacan los picos de  $3349 \text{ cm}^{-1}$  y de  $1630 \text{ cm}^{-1}$  que corresponden a las vibraciones de las aminas. En  $2932 \text{ cm}^{-1}$  se puede observar la vibración de los enlaces C-H alifáticos. La deformación de los grupos metilo (C-H) se encuentra en  $1452 \text{ cm}^{-1}$  y en  $747 \text{ cm}^{-1}$  se aprecian la vibración del enlace C-C. Finalmente, en  $2200 \text{ cm}^{-1}$  se presenta la vibración de los grupos nitrilos, los cuales indican fragmentación de anillos aromáticos.

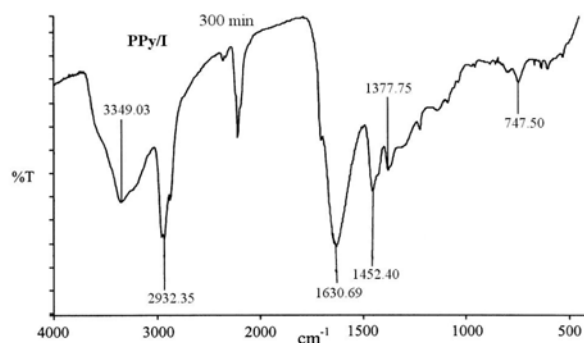


Fig. 1. Espectro FT-IR del PPy/I

### 2.1.2 Morfología

La morfología del PPy-I antes de formar las pastillas usadas como implantes se muestra en la Fig. 2. Se aprecia una superficie con pequeñas arrugas que forman líneas en todas direcciones. Los pliegues, por lo delgado del polímero, dan la impresión de estar compuesta por una serie de conductos por toda la superficie.

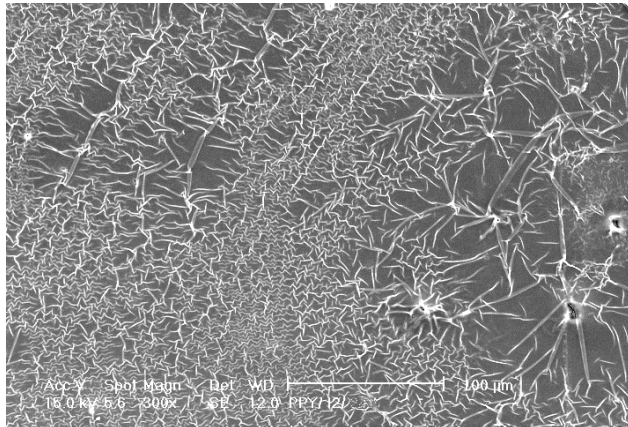


Fig. 2. Micrografía de PPy-I

### 2.1.2 Conductividad Eléctrica.

La resistencia eléctrica de la pastilla de polímero fue de  $1.3 \text{ M}\Omega$  y la conductividad calculada fue de  $21 \text{ nS/cm}$ . La conductividad de este tipo de materiales aumenta hasta en 8 órdenes de magnitud cuando se encuentran en una humedad relativa del 92% [2]. Es posible que la conductividad de este material, una vez implantado, llegue hasta  $1 \text{ S/cm}$ .

### 2.2 Protocolo de Implantación

Se siguieron los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Título Séptimo de la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación), publicada en 1990.

Se utilizaron 9 ratas de la cepa Long Evans, hembras adultas entre 12 y 14 semanas de edad con peso corporal entre 230 y 250 g, divididas en 3 grupos. También se prepararon pastillas similares de copolímeros polipirrol-poietilenglicol (PPy/PEG) para hacer comparaciones con el material estudiado:

**Grupo control:** Se formó con 3 ratas a las que se les practicó una sección completa de la médula espinal a nivel de la 9° vértebra torácica (T9).

**Grupo I. PPy/I:** Se formó por 3 ratas a las que se le aplicó el mismo procedimiento quirúrgico y se les implantó una pastilla de PPy/I.

**Grupo I. PPy/PEG:** Se formó por 3 ratas a las que se le aplicó el mismo procedimiento quirúrgico y se les implantó una pastilla de PPy/PEG. Los animales fueron evaluados al siguiente día de la lesión para comprobar que no existiera movimiento de las extremidades inferiores y así tener la seguridad de que la cirugía se realizó de manera adecuada. Las evaluaciones funcionales se realizaron una vez por semana por medio de la escala BBB (desarrollada por Basso-Beattie-Bresnahan), que evalúa la marcha a través de 22 grados de recuperación motora. En la Tabla 1 se presentan detalles de los grupos formados.

Grupo	Fecha	Procedimiento
I.PPy/PEG Rata 1	15 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/PEG
Control Rata 2	15 de Abril de 2004	control lesión por sección (LPS)
I.PPy/I Rata 3	15 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/I

Grupo	Fecha	Procedimiento
I.PPy/PEG Rata 1	22 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/PEG
Control Rata 2	22 de Abril de 2004	control lesión por sección (LPS)
I.PPy/I Rata 3	22 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/I

Grupo	Fecha	Procedimiento
I.PPy/PEG Rata 1	29 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/PEG
Control Rata 2	29 de Abril de 2004	control lesión por sección (LPS)
I.PPy/I Rata 3	29 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/I

Tabla 1. Diseño experimental (grupos y fecha de procedimiento).

#### 2.2.1 Lesión de sección de la médula espinal

Los animales se anestesiaron vía intramuscular con una mezcla de 77.5 mg de ketamina y 12.5 mg de hidrocloreuro de xilacina por Kg de peso corporal. Después de anestesiarse al animal y realizar la asepsia de la zona quirúrgica se practicó una incisión sagital en piel seguido de disección

de los músculos paravertebrales de las apófisis espinosas.

Se extirparon 3 apófisis espinosas de T9-T11 para observar los procesos laminares de esas vértebras. Finalmente, se realizó una laminectomía de 3 niveles, extendiéndola bilateralmente hasta los procesos facetarios. Las meninges se mantuvieron intactas. Una vez concluida la laminectomía se realizó una incisión longitudinal en meninges de aproximadamente 5 mm de largo, referenciando ambos lados de la incisión con un punto simple de sutura de 10-0 (Polipropileno deknatel), posteriormente se hizo un corte transversal completo de la médula espinal, y se corroboró mediante microscopio quirúrgico que ninguna vía nerviosa quedara conectada.

A los grupos I.PPy/I e I.PPy/PEG se les implantó una pastilla de polímero (según el caso) en posición transversal a la médula espinal.

### 2.2.2 Método de implantación del material

Inmediatamente después de terminar el proceso de lesión por sección de la médula espinal en las ratas, justo en el sitio de sección se introdujo en forma transversal un trozo de pastilla de polímero de aproximadamente 3 mm de diámetro. Después de la implantación se paso una sutura de 10-0 (poliamida 6 monofilamento) a través de las meninges con puntos simples de sutura. Finalmente, la incisión quirúrgica se suturó en 2 planos, la fascia muscular y la piel con puntos simples y continuos respectivamente de 5-0 (polipropileno monofilamento).

Después de la cirugía, los animales se mantuvieron en observación a temperatura ambiente en una misma jaula, con una dieta a base de alimento comercial y agua, a libre demanda, mezclada con tempra (10 ml en 2 l de agua durante 72 hrs). También se administro intramuscularmente penicilina benzatínica (1,200,000 u.i. como única dosis).

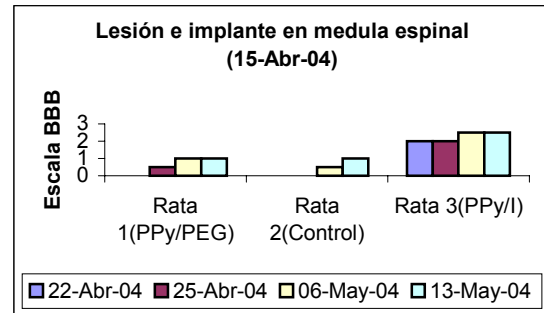


Fig. 3. Evolución motora del 1º conjunto intervenido.

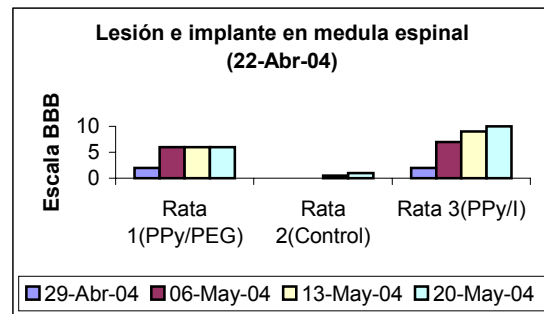


Fig. 4. Evolución motora del 2º conjunto intervenido.

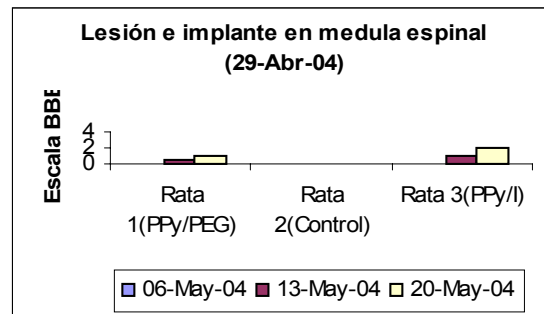
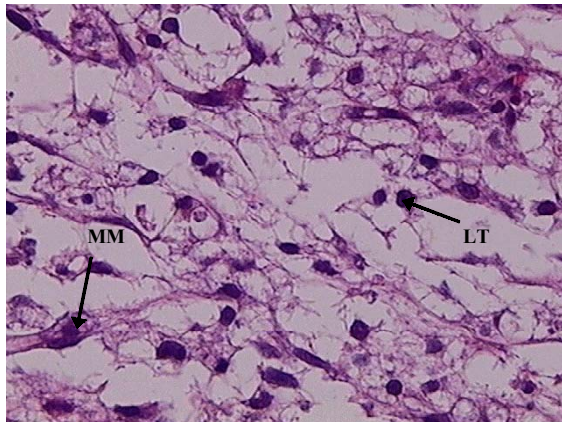


Fig. 5. Evolución motora del 3º conjunto intervenido.

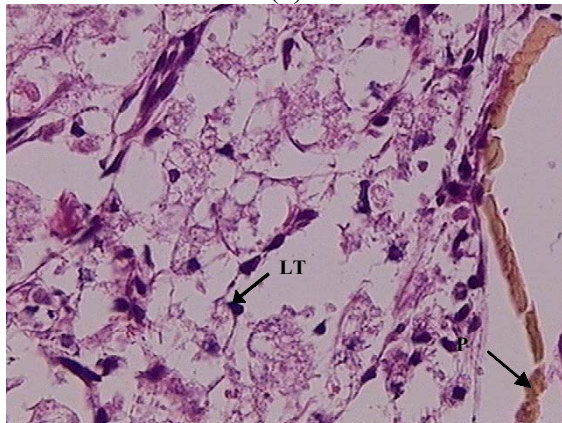
### 2.2.3 Sacrificio y análisis histológico

Para estudiar histológicamente la integración del material en la médula espinal, 1 mes después de la lesión, los animales se perfundieron vía intracardiaca. Al término de la perfusión se extrajo la médula espinal para obtener un segmento de 1.5 cm a partir de la región del epicentro de la lesión, hacia el segmento caudal y hacia el segmento cefálico de la médula. Se colocó el espécimen en fijador durante 5 días, al cabo del cual se siguió el procedimiento para ser embebido en parafina. Se realizaron cortes longitudinales secuenciales de 1 µm de espesor en un micrótom, seleccionándose los cortes en un intervalo

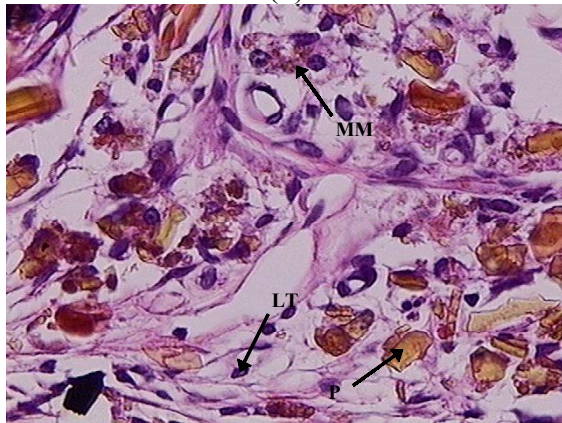
de 10 cortes obteniéndose 4 muestras. Los cortes seleccionados se pasaron a un baño de flotación con agua a 45°C (a cada litro de agua se le agregaron 0.5 g de gelatina bacteriológica) y luego se colocaron en laminillas de vidrio para ser teñidas con el procedimiento de hematoxilina y eosina de Harris. Los resultados se muestran en la Fig. 6.



(a)



(b)



(c)

Figura 6. Fotografías de cortes histológicos a 20X y 40X (procedimiento de hematoxilina y eosina de Harris). P → Polímero, LT → Linfocitos, MM → Macrófagos modificados.

En los animales implantados, ver Fig. 6, se observa que en el polímero transplantado de PPy/I se integro al tejido nervioso de la médula espinal (c). Al igual que, la presencia de células inflamatorias, linfocitos T y macrófagos modificados denominados células gigantes de cuerpo extraño. En los implantes con PPy/PEG (b) existe menos destrucción del tejido nervioso, no se presentan macrófagos de células gigantes de cuerpo extraño, sin embargo, hay presencia de macrófagos esponjosos, células inflamatorias y linfocitos T. En los animales control se muestra gran destrucción de tejido nervioso y mayor presencia de células inflamatorias (a).

### 3. Conclusiones

Las pruebas de BBB indican que los animales implantados con PPy-I tienen una buena respuesta a la conducción del impulso nervioso a través de la médula espinal como lo demuestra el movimiento de las extremidades inferiores de las ratas implantadas pese al corte de sección completa de la médula espinal.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Leticia Carapia del ININ por el análisis de microscopía electrónica de barrido y al CONACYT por el financiamiento al proyecto 33077.

### 4. Bibliografía

- 1 – J. Morales, M.G. Olayo, G.J. Cruz, R. Olayo, *Journal of Applied Polymer Science*, 85, 263-270, 2002.
- 2 – G.J. Cruz, J. Morales, R. Olayo, *Thin Solid Films*, 342, 119-126, 1999.
- 3 – J. Morales, M.G. Olayo, G.J. Cruz, M.M. Castillo, R. Olayo, *Journal of Polymer Science, Part B*, 38, 3247-3255, 2000.

## **HIDROGELES ANFOLÍTICOS PARCIALMENTE HIDROFÓBICOS: CANDIDATOS PARA NUEVOS SISTEMAS DE SUMINISTRO DE FÁRMACOS**

**Angel Licea-Claverie\*(a), Rosario Santos-Rosas (a), Lucía S. Palazuelos (a),**

**José M. Cornejo-Bravo (b) y Karl-Friedrich Arndt (c)**

a.-Centro de Graduados e Investigación, Instituto Tecnológico de Tijuana, A.P.1166

22500 Tijuana, B.C.; México

\*[aliceac@tectijuana.mx](mailto:aliceac@tectijuana.mx)

b.- Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Calzada

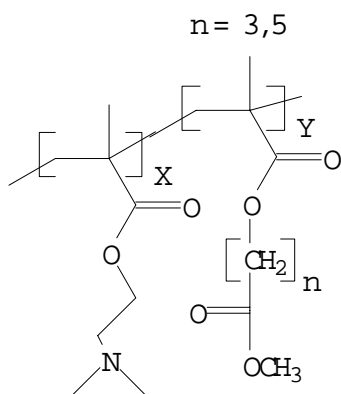
Tecnológico 14418, Mesa de Otay, 22300 Tijuana, B.C., México.

c.-Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie, Technische Universität Dresden,

D-01062 Dresden, B. R. Deutschland

Los hidrogeles polianfolíticos (anfotéricos) se forman a partir de monómeros ácidos y básicos y algunas veces adicionando monómeros neutros [1]. Estos son entrecruzados ya que en esta forma tienen una gran diversidad de aplicaciones tales como: membranas para aplicaciones biomédicas [2], materiales para procesos de separación [3], materiales superabsorbentes [4] y geles sensibles a la temperatura y al pH [5]. Las propiedades físicas de estos materiales dependen principalmente del balance de grupos iónicos presentes en el hidrogel generando interacciones atractivas o repulsivas entre sus cadenas. Pero también la fuerza iónica del medio donde se encuentren y la elasticidad de la red son factores importantes para su comportamiento. A diferencia de los polielectrolitos, los polianfolitos tienen la capacidad de hincharse a altas fuerzas iónicas, lo cuál es aprovechado para su gran variedad de aplicaciones tecnológicas [6]. Par un gran número de aplicaciones médicas potenciales en particular se requiere entender el comportamiento cuantitativo de éstos materiales a fuerzas iónicas fisiológicas [1]. Los polanfolitos existen como policationes a bajos valores de pH y como polianiones a altos valores de pH. A valores de pH intermedios muestran un punto donde la proporción de cargas positivas y negativas es la unidad llamado punto isoeléctrico (IP). En el IP las cadenas poliméricas muestran un mínimo de expansión en solución. Los geles polielectrolíticos e hidrofóbicos han mostrado hinchamiento dependiente del pH y liberación de fármacos con cinética cercana al orden-cero [7, 8]. Desafortunadamente el comportamiento de hinchamiento de los geles polielectrolíticos se ve fuertemente afectado por la fuerza iónica de la solución [9].

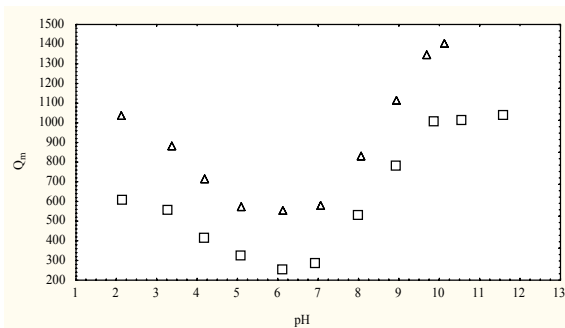
En este trabajo se reporta la síntesis y caracterización de geles anfotéricos basados en metacrilato de *N,N*-dimetilaminoetilo (DMAEM) y dos monómeros derivados del ácido metacrílico con espaciadores hidrofóbicos reportados por nosotros con anterioridad [10]. Dos series de hidrogeles fueron preparados para ello: una utilizando al ácido 4-(metacriloiloxi)butanoico (M4AMOB) y la otra utilizando al ácido 6-(metacriloiloxi)hexanóico (M6AMOH) como comonómeros (Figura 1). Ambas series fueron preparadas vía radicales libres en *p*-dioxano como disolvente a 60° C por 20 h utilizando 1% en mol de azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador y 2% en mol de dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) como agente entrecruzante. Los geles fueron preparados en forma de películas entre dos placas de vidrio silanizado. Después de purificarlos, los geles fueron cortados hinchados en forma de discos de 9 mm de diámetro. Los discos fueron introducidos en soluciones de NaCl con concentraciones molares desde 0 hasta 4.0 M y en soluciones buffers con pH's desde 2 hasta 12 y su grado de hinchamiento al equilibrio fue medido por la técnica gravimétrica. Además, algunos geles fueron seleccionados para hacer estudios de liberación del fármaco



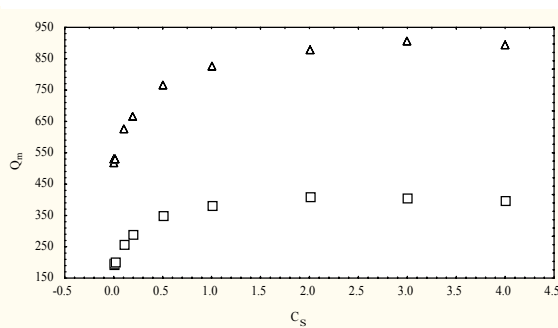
**Figura 1:** Estructuras químicas de los hidrogeles polianfolíticos.

modelo salicilamida. Para ello los geles fueron cargados en soluciones metanólicas de salicilamida (0.2 M) y después de secados y de lavar el exceso de fármaco de su superficie, fueron sometidos a los estudios de liberación en medio acuoso con amortiguadores de pH a fuerza iónica ajustada a. Para ello los geles fueron sumergidos en canastillas dentro de un recipiente con agitación magnética en un volumen total de 200 mL y con control de la temperatura a 37.5 °C. A tiempos seleccionados se tomaron alícuotas y se determinó por espectrometría UV-Vis a 299 nm el contenido de salicilamida liberada al medio.

Algunos de los resultados mas relevantes son que los hidrogeles que contienen alrededor del 50% de unidades básicas y 50% de unidades ácidas se muestran en las figuras 2 y 3 y se discuten a continuación: Estos geles muestran un punto isoeléctrico localizado a pH's de 6.1 y 6.07 respectivamente. A este pH el gel tiene la mínima capacidad de absorción de agua debido a las atracciones intraiónicas entre cargas opuestas que hacen que las cadenas del polímero se colapsen. Cuando el pH de la solución se aleja del punto isoeléctrico, el gel polianfolítico se comporta como un policación a pH's ácidos y como un polianión a pH's básicos. Por otro lado observamos que, conforme aumenta la concentración de sal, los hidrogeles muestran mayor hinchamiento.



**Figura 2.** Hinchamiento al equilibrio con respecto pH: (p)-Gel M4AMOB-DMAEM (50-50) y (p)-Gel M6AMOH-DMAEM (50-50).



**Figura 3.** Hinchamiento al equilibrio con respecto a la concentración de sal (NaCl): (p)-Gel M4AMOB-DMAEM (50-50) y (p)-Gel M6AMOH-DMAEM (50-50).

Esto era de esperarse por efecto de apantallamiento de cargas por las sales, disminuyendo las fuerzas de atracción entre cadenas y aumentando el hinchamiento.

En general se puede observar que el hinchamiento del hidrogel con comonomero M4AMOB es mayor que el del hidrogel con comonomero M6AMOH, por lo que el efecto principal de la cadena hidrofóbica en el monómero ácido es cambiar el grado de hinchamiento al equilibrio, mas no la posición del punto isoeléctrico.

Por otro lado la velocidad de liberación de la Salicilamida se ve afectada por la hidrofobicidad de las unidades ácidas, la fuerza iónica y en menor proporción, por el pH del medio.

**Agradecimientos:** Este trabajo se realizó con apoyo del CONACYT, Proyecto 28022-U; con apoyo del fondo SEP-CONACyT, Proyecto 2002-C01-40262 y de la Fundación Volkswagen, Proyecto I/76 065.

### Referencias

- 1.-English, A.E., Tanaka, T., Edelman, E.R., *Macromol.* **1998**, *31*, 1989.
- 2.-Baker, J.P., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M., *Polymer.* **1995**, *36*, 1961.
- 3.-Freitas, R.F.J., Cussler, E.J., *Chem. Eng. Sci.* **1987**, *42*, 97.
- 4.-Okazaki, Y., Ishizuki, K., Kawaguchi, S., Satoh, M., Komiyama J., *Macromol.* **1996**, *29*, 8391.
- 5.-Yu, H., Grainger, W., *J. Appl. Polym. Sci.* **1993**, *49*, 1553.
- 6.-English, A.E., Tanaka, T., Edelman, E.R., *Polymer.* **1998**, *39*, 5894.
- 7.-Siegel, R.A.; et al. *J. Contr. Rel.* **1988**, *8*, 179.
- 8.-Kim, Ch.-J.; et al. *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 195.
- 9.-English, A.E.; et al. *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 10606.
- 10.-Rogel-Hernández, E., Licea-Claverie, A., Cornejo-Bravo, J.M., Arndt, K.F., *Desig. Monom. Polym.* **2001**, *4*, 343.

# Síntesis de un copolímero de poli(etilenglicol) y poli( $\beta$ -bencil-L-aspartato) para su aplicación en el encapsulamiento de medicamentos hidrofóbicos

R. Hernández Sierra<sup>a,\*</sup>, B.J. Micheli<sup>a</sup>, L.A. García Cerda<sup>b</sup>, J. Romero García<sup>b</sup>, O.S. Rodríguez Fernández<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Química, ITESM Campus Monterrey, Eugenio Garza Sada 2501. Monterrey, N.L

<sup>b</sup>Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA). Blvd. Enrique Reyna Hermosillo 140. Saltillo, Coah.

\*E-mail: [rocio@itesm.mx](mailto:rocio@itesm.mx)

## Introducción

En los últimos años ha existido un creciente interés en el desarrollo de portadores coloidales de medicamentos, es decir, suficientemente pequeños para su administración intravenosa, sin la posibilidad de generación de problemas tromboticos. El objetivo de estos es asegurar la liberación de un medicamento de manera continua y controlada manteniendo una dosis eficiente del mismo, sin acercarse a la dosis tóxica. Se ha demostrado que las partículas de material polimérico biodegradable y biocompatible, de tamaño nanométrico ( $10^{-9}$  m), son excelentes portadoras de medicamentos y pueden ser utilizadas de forma segura.<sup>[1]</sup>

Con el fin de aumentar la persistencia en el sistema circulatorio, una de las mejores opciones es cubrir el medicamento con un polímero que no pueda ser reconocido por el sistema inmunológico y que además sea hidrofílico para asegurar su compatibilidad con la sangre. Entre los polímeros hidrofílicos, el Poli(etilenglicol) (PEG) es considerado no tóxico y ha sido aprobado por la FDA para su uso interno en humanos<sup>[2]</sup>. Además de su carácter hidrofílico, otra característica importante es la flexibilidad de la cadena. La estructura flexible y rápidamente cambiante del PEG hace que el sistema inmunológico tenga dificultades para modelar un anticuerpo alrededor de él y por lo tanto, formará una capa protectora que evitará dicha interacción.

El presente trabajo está enfocado al transporte de medicamentos insolubles en agua, por lo tanto, es necesario contar con una parte hidrofóbica capaz de disolver, atrapar o enlazar al medicamento. Se desea además utilizar un polímero que pueda ser degradado por los procesos normales del organismo. Esto lleva a considerar la utilización de un péptido, con el fin de evitar la formación de cualquier metabolito de alta toxicidad. El polímero elegido es el Poli( $\beta$ -bencil-L-aspartato) (PBLA). Este polímero es capaz de solubilizar medicamentos hidrofóbicos, tiene la facilidad de unirse químicamente al PEG y es fácilmente degradado en el organismo. El polímero estará formado por un bloque de péptido, el cual constituirá el centro de la nanopartícula y un bloque de PEG que formará la capa flexible, compatible con el agua. En este caso es necesario bloquear un grupo terminal del PEG bajo la forma de un éter metílico y activar el otro extremo como grupo amino. Este grupo iniciará la polimerización del N-Carboxianhídrido (NCA). Para este fin se utilizará  $\alpha$ -metoxi- $\omega$ -amino-PEG.

En el presente trabajo se describe la polimerización del PBLA sobre una cadena de PEG funcionalizada utilizando  $\beta$ -bencil-L-aspartato-N-carboxianhídrido (BCA-NCA) como monómero y la síntesis del BCA-NCA mediante la carboxilación del  $\beta$ -bencil-L-aspartato (BCA), así como la caracterización de los productos mencionados

## Parte experimental

### *Síntesis del $\beta$ -Bencil-L-Aspartato-N-Carboxianhídrido (BCA-NCA)*

El BCA-NCA fue sintetizado tal como se describe en la literatura<sup>[3]</sup>. Se disolvió el BCA (Sigma) en THF seco y destilado. Se calentó el sistema a 50 °C en atmósfera de nitrógeno. Se

añadió el trifosgeno (Fluka) hasta obtener una solución incolora. Después de 3 horas se agregó hexano a la solución hasta observar la formación de cristales. Esta solución se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Pasado este tiempo se recrystalizó el NCA con THF/hexano hasta punto de fusión constante. Finalmente se secó al vacío. La caracterización de este producto se llevó a cabo mediante espectroscopía IR y RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

#### *Síntesis del Poli( $\beta$ -Bencil-L-Aspartato) sobre Poli(etilen-glicol) (PEG-PBLA)*

Se añadió DMF (Aldrich) doblemente destilado al BCA-NCA. Posteriormente, se añadió cloroformo (Aldrich) destilado hasta la disolución completa del BCA-NCA. Se agitó a  $35^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de nitrógeno. Por otra parte, se disolvió el mPEG-NH<sub>2</sub> (M=5000, 114 unidades, Shearwater) en cloroformo destilado. La razón molar de PEG/BCA-NCA fue de 1:19 con el objetivo de obtener 19 unidades de PBLA. Se dejó reaccionar durante 21.5 h con agitación. Para la remoción del PEG residual se disolvió el PEG-PBLA en cloroformo y se puso en baño maría a  $40^{\circ}\text{C}$ . Se añadió metanol (Aldrich) hasta la formación de un precipitado blanco. Se centrifugó y se secó al vacío. Nuevamente se disolvió en cloroformo y se añadió éter etílico en exceso. Se centrifugó y se secó al vacío. La caracterización del PEG-PBLA se llevó a cabo medio de RMN de  $^1\text{H}$ .

## Resultados

#### *Síntesis del $\beta$ -Bencil-L-Aspartato-N-Carboxiahnídrido (BCA-NCA)*

El producto obtenido fue un polvo blanco. El rendimiento fue del 81% obtenido tomando como base el peso inicial de  $\beta$ -bencil-L-aspartato.

Fue posible comprobar que la reacción se efectuó analizando el producto por espectroscopía de Infrarojo (IR); la aparición de dos bandas, separadas por  $60\text{ cm}^{-1}$ , pertenecientes al grupo carboxílico de un anillo pentagonal saturado, entre  $1850\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente, es diagnóstico de la formación del producto esperado<sup>[4]</sup>. Mediante un análisis IR se obtuvieron dos picos a  $1861.37$  y  $1801\text{ cm}^{-1}$ , lo cual es una evidencia clara de la existencia de BCA-NCA como producto. (Figura 1).

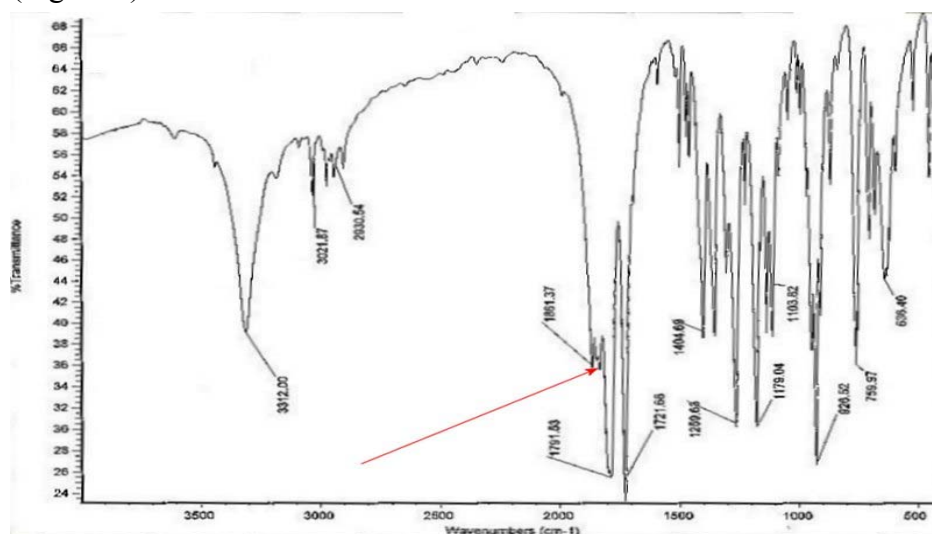


Figura 1. Espectro IR del BCA-NCA

Para la comprobación de la pureza del producto se utilizó el análisis de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . En un inicio se simularon los dos espectros utilizando el programa ACD Labs 5.0 HNMR Viewer y CNMR Viewer respectivamente. Posteriormente se comparó el desplazamiento de los picos obtenidos experimentalmente con los teóricos. La Tabla 1 muestra comparación de los desplazamientos químicos, la cual hace evidente que el producto obtenido corresponde al BCA-NCA esperado (los protones y carbonos a los cuales corresponden los desplazamientos se encuentran señalados por negritas).

Grupo Funcional	Protón		Carbón	
	Desplazamiento Teórico (ppm)	Desplazamiento Experimental (ppm)	Desplazamiento Teórico (ppm)	Desplazamiento Experimental (ppm)
R- <b>CH<sub>2</sub></b> -CO-O-	3.05, 3.10, 3.20	2.85-3.15	36.26	35
-NH- <b>CH</b> -CO-	4.81	4.7	53.19	54
-CO- <b>CH<sub>2</sub></b> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	5.16	5.15	66.1	66.5
- <b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub></b>	7.27-7.37	7.4	128.50 - 136.81	128.5 - 136
-NH-CO-O-CO-	9.17	9.05	153.71	152.5
- <b>CH</b> -CO-O-			169.39	169.5
- <b>CH<sub>2</sub></b> -CO-O-			170.51	171
THF	1.84 y 3.73	1.75 y 3.6		

Tabla 1. Desplazamientos teóricos y experimentales para la molécula de BCA-NCA.

#### *Síntesis del Poli( $\beta$ -Bencil-L-Aspartato) sobre Poli(etilen-glicol) (PEG-PBLA)*

La metodología para sintetizar esta estructura resultó ser acertada obteniéndose el PEG-PBLA en forma de polvo blanco. El rendimiento fue del 86.7%, calculado mediante la ecuación (1).

$$100\% \text{ de Rendimiento} = \text{Peso del PEG} + \text{Peso del BCA-NCA} * 0.823 \quad \text{Ecuación (1)}$$

Para verificar la composición del producto se utilizó un análisis de RMN. Específicamente, el análisis de RMN de protón permite comparar el área de los picos correspondientes a los protones metilénicos del PEG ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\delta = 3.6$ ) y los protones bencílicos del PBLA ( $\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $\delta = 5.0$ ; PBLA) <sup>[5]</sup>. Mediante esta comparación es posible conocer el número de unidades de PBLA, dado un número determinado de unidades de PEG.

En el espectro experimental (Figura 2) el pico a 3.574 ppm corresponde a los 4 protones metilénicos del PEG; el pico a 4.965 ppm corresponde a los 2 protones bencílicos de PBLA. Tomando en cuenta que el espectro muestra una unidad de integración de PBLA por cada 12.161 unidades de integración de PEG, se tiene la relación  $\text{PBLA/PEG} = 0.1645$ . Considerando que el PEG utilizado ( $M_w = 5000$ ) contiene 114 unidades, se obtiene que, bajo las condiciones de reacción indicadas anteriormente, se lograron añadir 18.75 unidades de PBLA, en promedio. Esto da una aproximación del 98.7% con respecto a las 19 unidades planeadas.

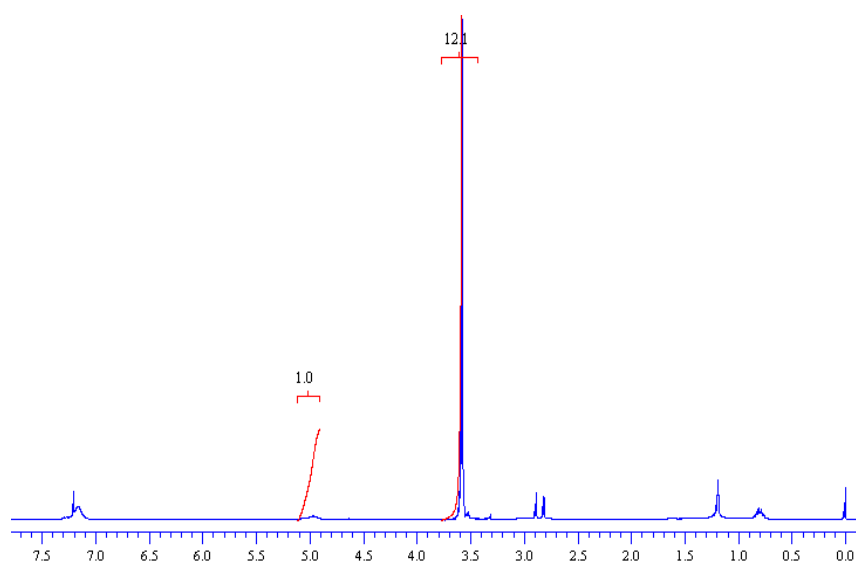


Figura 2. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del PEG-PBLA

## Conclusiones

Se obtuvo BCA-NCA a partir de la carboxilación del BCA, mediante el método tradicional, utilizando trifosgeno. Mediante los análisis IR y RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvo evidencia clara de la existencia de este producto. El rendimiento fue del 81%. También se obtuvo PEG-PBLA polimerizando el BCA-NCA sobre una cadena de mPEG-NH<sub>2</sub>. El rendimiento obtenido fue del 86.7%. Las evidencias experimentales presentadas en este trabajo sugieren que la síntesis se llevó a cabo adecuadamente, obteniéndose una aproximación del 98.7% con respecto a las unidades planeadas. De estos resultados podemos mencionar que el polímero sintetizado es una opción para su uso como portador de medicamentos.

## Referencias

- [1] Wolfgang Mehnert, Karsten Mäder. *Solid Lipid Nanoparticles Production, Characterization and Applications*. Advanced Drug Delivery Reviews 47 (2001) 165-196
- [2] R. Gref, et al. "The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres". Adv. Drug Del. Rev. 16 (1995) 215-233.
- [3] Daly, W., Poché D. "The Preparation of N-Carboxyanhydrides of  $\alpha$ -Amino Acids Using Bis(trichloromethyl)carbonate". Tetrahedron Letters (1988), Vol. 29, No. 46, pp 5859-5862.
- [4] R. Katakai, Y. Iizuka. "An Improved Method for the Synthesis of N-Carboxy- $\alpha$ -Amino Acid Anhydrides using Trichloromethyl Chloroformate". J. Org. Chem (1985), Vol. 50, pp 715-716.
- [5] G. Kwon, et. al. "Polimeric Micelles as New Drug Carriers". Adv. Drug Del. Rev. 21 (1996) 107-116.

# ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES MOLECULARES DEL SISTEMA QUITOSAN-CASEINATO DE SODIO

Rivas-Araiza R. N.<sup>1</sup>, Luna-Bárceñas J.G.<sup>1</sup>, Pérez-Pérez. C.<sup>2</sup>, Mauricio-Sánchez, R.A.<sup>1</sup>, Delgado-Cruz, M.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., Libramiento Norponiente No. 2000, Fracc. Real de Juriquilla, C.P. 76230, Santiago de Querétaro, Qro. México, Tel. (442)4414900

<sup>2</sup>Dpto. Ingeniería Bioquímica, Instituto tecnológico de Celaya, Ave. Tecnológico y A. García Cubas S/N, Col. FOVISSSTE, Celaya, 38010, México

## RESUMEN

Con el avance del conocimiento de las interacciones presentes en el sistema quitosan-caseinato de sodio (CTS-SC) se pretendió aprovechar las propiedades de ambos biopolímeros para fabricar una película biodegradable, insoluble en agua y de bajo costo. Se mejoró considerablemente la fuerza tensil de la película CTS-SC (93.1MPa) aunque ésta fue poco flexible (35.17%E). La película CTS-SC fue menos permeable al vapor de agua que sus componentes individuales ( $2.10 \times 10^{-11} \text{ mol.m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ ). Mediante el uso espectroscopia óptica se observó que las películas estaban constituidas por gránulos conglomerados de forma irregular. En la espectroscopia de IR se encontraron cambios en las longitudes de onda de las bandas amida I y amida II que se pueden atribuir a la formación de puentes de hidrógeno entre ambos componentes. A través de la espectroscopia de RMN se confirmó la presencia de puentes de hidrógeno entre el CTS y SC, puesto que se detectaron cambios en los desplazamientos químicos del C-2 de la unidad estructural del CTS.

**PALABRAS CLAVE:** *quitosan, caseinato de sodio, puentes de hidrógeno, fuerza tensil.*

## 1. INTRODUCCIÓN

Los biopolímeros son macromoléculas generadas a partir de recursos naturales renovables y en general son biodegradables y no tóxicos. Estos pueden ser producidos por sistemas biológicos (*Vg.* microorganismos, plantas y animales), o sintetizados químicamente a partir materiales biológicos (*Vg.* azúcar, almidón, grasas naturales, aceites, etc. [1].

La mezcla de biopolímeros es uno de los métodos más efectivos para obtener nuevos materiales poliméricos con propiedades biológicas y mecánicas deseables para la industria, que a su vez puedan representar una alternativa para sustituir los polímeros de origen sintético [2].

El quito san (CTS) es un polisacárido ampliamente distribuido en la naturaleza que se ha mezclado con varios polímeros naturales, específicamente con polisacáridos (*Vg.* la xantana, el ácido hialurónico, la celulosa, la agarosa y alginatos) y proteínas. Mucho del potencial del quitosan se basa en su naturaleza catiónica y alta densidad de carga en solución, esta densidad de carga le permite formar complejos polielectrolitos insolubles en agua con una gran cantidad de polímeros aniónicos solubles en agua [3].

El caseinato de sodio (SC) es un polímero aniónico soluble en agua, de bajo costo, tiene la capacidad de absorber agua y de gelificar.

El SC se ha empleado para elaborar películas a partir de soluciones acuosas debido a su capacidad de formar enlaces de hidrógeno y de tener interacciones electrostáticas e hidrófobas. En general el SC forma películas quebradizas y altamente solubles en agua lo que puede ser desventajoso en algunas aplicaciones [4].

Por lo anterior, el SC es un candidato adecuado para mezclarse con CTS con el propósito de obtener una película insoluble en agua que sea producto de la interacción química quitosan-caseinato de sodio (CTS-SC).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

Los materiales empleados fueron grado reactivo. Se utilizó caseinato de sodio (Sigma-Aldrich C-8654) y quitosan derivado del caparazón de cangrejo de peso molecular medio y con un grado de desacetilación mayor de 85% (Sigma-Aldrich);

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Elaboración películas.

Para la elaboración de las películas, se mezcló en una proporción de 1:1, una solución de CTS 1.5%(w/v) pH=6 con una solución de SC 1.5% (w/v) pH=8. Mediante agitación constante se adicionó gota a gota la solución de SC a la solución de CTS, la mezcla se vertió en cajas petri de plástico de 10cm de diámetro y se secaron las películas durante 36 h a 40°C. De esta forma se obtuvo una película que se separó fácilmente del soporte de la caja petri.

#### 2.2.2 Propiedades mecánicas.

Las pruebas mecánicas de las películas fueron determinadas con una máquina universal Texture Analyser (TA-XT2 Stable Micro Systems, UK). Mediante el procedimiento estandarizado ASTM D 882-88 [5] se determinó la fuerza tensil (MPa) y el porcentaje de elongación de las películas elaboradas. Un total de cuatro muestras de cada tipo de película fue evaluado.

#### 2.2.3 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La transferencia de vapor de agua a través de una película se calculó utilizando el método gravimétrico ASTM E96-80 [6]. La permeabilidad al vapor de agua se calculó con las siguientes formulas.

$$PVA = \frac{\Delta W \cdot x}{\Delta t \cdot A \cdot \Delta p} \quad (1)$$

Donde  $\Delta W$  es la pérdida de peso de la celda de permeabilidad (g),  $\Delta t$  es el tiempo transcurrido durante el análisis (días),  $A$  es la superficie expuesta de la película (g),  $x$  es el espesor de la película (m),  $\Delta p$  es la diferencia de presión en el vapor de agua (mmHg)

#### 2.2.4 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Se recubrieron con oro las películas y se realizaron observaciones con 500 y 5000 aumentos en un microscopio electrónico de barrido ambiental con microsonda de análisis químico elemental (Philips XL30 ESEM).

### 2.2.5 Espectroscopía de infrarrojo.

Las películas se analizaron con un equipo Perkin Elmer Modelo Spectrum One con una resolución de  $4\text{cm}^{-1}$  y con 60 barridos por cada espectro.

### 2.2.6 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Las mediciones se llevaron a cabo en un equipo de alta resolución en sólidos  $^{13}\text{C}$  RMN.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 3.1 Fuerza tensil

La fuerza tensil de la película de CTS-SC (93.1MPa) superó los valores reportados de sus componentes individuales (CTS 50.96MPa y SC 18.2MPa). Este incremento se atribuyó a la fuerte interacción química de ambos biopolímeros. Xiao *et al.*, (1999) [7]. observaron el mismo fenómeno en la preparación de películas de quitosan-konjac glucomanan donde la fuerza tensil se mejoró por la mezcla de ambos compuestos (72.5MPa), ya que se formaron de puentes de hidrógeno intermoleculares. Se encontró que las propiedades de fuerza tensil de las películas CTS-SC son muy similares a las encontradas para el policloruro de vinilo (93.2MPa) [4].

### 3.2 Porcentaje de elongación (%E)

El porcentaje de elongación de la película CTS-SC (35.17%) presentó un valor menor a la película de CTS (45.67%) pero mayor a la película de SC (3.06). La razón por la cual disminuyó el porcentaje de elongación de ésta película se puede atribuir a la baja continuidad de la red polimérica ya que como se observó en las micrografías la red polimérica es heterogénea Este mismo efecto fue observado en películas de caseinato de sodio-grasa [8].

### 3.3 Permeabilidad al vapor de agua.

La permeabilidad de las películas de CTS y SC fue de  $1.69 \times 10^{-11}$  y de  $2.36 \times 10^{-11} \text{ mol.m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ , respectivamente. Por su parte, la película CTS-SC resulto ser menos permeable puesto que tuvo un valor de  $2.10 \times 10^{-11} \text{ mol.m.m}^{-2}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ . Este comportamiento fue ocasionado por la red polimérica compacta que se formó entre ambos componentes, que no fue más que producto de las interacciones químicas entre el CTS-SC.

### 3.4 SEM

De las micrografías se encontró que la superficie de las películas es heterogénea debido a que esta conformada por pequeños gránulos de forma irregular, cuyo tamaño oscila en  $5\mu\text{m}$ .

### 3.5 Espectroscopia de IR

En la comparación del espectro IR de la película de CTS-SC con sus componentes individuales se observó que la banda de absorción correspondiente a las vibraciones de estiramiento de los grupos O-H y N-H cambió hacia bajos números de onda ( $3289\text{cm}^{-1}$ ), esto fue debido a la presencia de grupos O-H y N-H del caseinato de sodio y de los grupos O-H provenientes agua de absorbida que permitió la formación de enlaces de hidrógenos inter- e intramoleculares con los grupos C=O del quitosan y del caseinato de sodio. En el mismo espectro del CTS-SC se encontró un aumento en la frecuencia y una mayor resolución de las señales provenientes de las vibraciones de estiramiento simétrica ( $1569\text{cm}^{-1}$ ) y asimétrica ( $1411\text{cm}^{-1}$ ) de los grupos carboxilato del caseinato de sodio y por su parte la banda amida I se resuelve con mayor claridad.

Por lo tanto, es muy probable que se hayan desarrollado fuertes interacciones atractivas entre los grupos carboxilato del caseinato y los grupos amida del quitosan. Este mismo efecto fue observado en la mezcla de quitosan-gelatina donde disminuyó el número de onda de las bandas de carbonilo y amino, formándose un complejo polielectrolítico entre ambos compuestos [9].

### 3.6 RMN.

Los espectros de RMN de las películas preparadas mostraron un patrón muy similar al espectro del CTS puro, lo que indico que las películas preparadas no sufrieron modificaciones estructurales considerables. Se observó una diferencia notable en el desplazamiento químico del C-2 (desde 57.697 a 56.669ppm) de la unidad estructural del CTS, lo que indico un cambio en su entorno químico ocasionado probablemente por la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo amino pendiente de dicho carbono con un sustrato electronegativo.

## 4. CONCLUSIONES

Existió una fuerte interacción química entre el CTS y el SC, lo que permitió formación de películas con baja permeabilidad al vapor de agua así como con adecuadas propiedades mecánicas; cualidades que pueden ser aprovechadas para su aplicación como biomaterial o como material de empaque.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Biopolymers Volume 1 Ligning, humic substances and coal, edited by E.J Vandamme, S. De Baets, and A. Steinbuchel. Wiley-VCH, c2001
- [2] Cheng, M. *et al.*, Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials* 24 (2003) 2871-2880
- [3] Mao, J.S. *et al.*, The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterial* 24 (2003) 1621-1629
- [4] Pérez-Pérez. M.C. Structure et propriétés mécaniques et de transfert des films comestibles à base de caseinate de sodium. Tesis para obtener grado de doctor en ciencias. Institut national polytechnique de Lorraine. 2001
- [5] ASTM.1989. Tensile Properties of Thin plastic Sheeting, Annual Book of ASTM Standards; D 882-88, American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA.
- [6] ASTM. 1980. Standard test method for water vapor transmission of materials. ASTM B. of Standards, E96-80, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- [7] Xiao, C. *et al.*, Blend films from chitosan and konjac glucomannan solutions. *J. Appl. Polym Sci.* 76 (1999) 509-515
- [8].Khwaldia *et al.*, Mechanical and barrier properties of sodium caseinate-anhydrous milk fat edible films. *International Journal of Food Science and Technology* 39 (2004): 403-411
- [9] Yin, Y.J.; Yao, K.D., Cheng, G.X. y Ma, J.B.; Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin, *Polym int.* 48 (1999):429-433)

## Aplicación de quitosán como agente antimicrobiano en calzado

S. Barrientos<sup>1</sup>; G. Montes de Oca<sup>1</sup>; J. Revilla<sup>2</sup>; M.A. Juárez., & D. Guzmán<sup>3</sup>

<sup>1</sup> CIATEC A.C. Omega 201, Fracc. Ind. Delta, León, Gto. México

<sup>2</sup> CID-DESC Av. De los Sauces 87 mz. 6 Parque Ind. Lerma, Lerma, Edo. Mex. México

<sup>3</sup> CINVESTAV Unidad Irapuato, Km 9.6 lib. Norte carr. Irapuato-León, Irapuato, Gto.

El pie de atleta es una de las micosis superficiales clasificadas como dermatofitosis o tiñas. Estas son producidas por los hongos denominados dermatofitos, que incluyen las especies *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. En el caso del pie de atleta, el hongo que lo produce es el *Tinea pedis*, que se desarrolla principalmente en lugares calientes y húmedos. El sudor del pie produce el tipo de ambiente húmedo y caliente que necesita el hongo, *Tinea pedis*, para desarrollarse.

En vista de que la mayoría de personas utilizan zapatos cerrados y hechos de material sintético que mantienen la humedad y evitan que el pie respire, hay un mayor riesgo de contraer algún tipo de micosis en especial el pie de atleta. Por esta razón se plantea en este trabajo la incorporación de un biopolímero como el quitosán en la fabricación de plantillas, pues se conoce el efecto antimicrobiano de este biopolímero.

La quitosán es un polímero policationico que contiene unidades de glucosamina y se obtiene a partir de la quitina de cáscara de crustáceos por desacetilación alcalina (1).

El uso de la quitosán es limitado debido a su insolubilidad en agua, alta viscosidad y tendencia a coagular con proteínas a pH's altos (1). Por esta razón el trabajo describe un método para modificar el quitosán con anhídrido maléico. (Figura 1)

El quitosán modificado se hizo reaccionar con el doble enlace presente en el hule natural así como en SBR carboxilado, materiales con el que se pueden desarrollar plantillas para calzado.

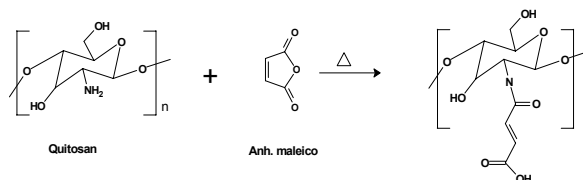


Figura 1. Modificación de quitosán con anhídrido maléico

La actividad antimicrobiana de la quitosana ha sido observada en una gran variedad de hongos, algas y bacterias (2). Sin embargo, dicha acción está influenciada por factores intrínsecos tales como el tipo de quitosán, el grado de polimerización, los grupos químicos ligados a la molécula, el hésped, los componentes de los nutrientes para el sustrato, las condiciones ambientales, entre otros. Aunque el quitosán nativo y sus derivados son efectivos como agentes antimicrobianos hay clara diferencia entre ellos, de hecho la quitosana oligomérica tiene un mejor efecto antifúngico que bactericida (3-4).

En este trabajo se realizaron pruebas con *Tinea pedis* encontrándose que el quitosán modificado tiene efecto fungicida.

## REFERENCIAS

- (1) S. Barrientos; & J. Revilla.. Quitosán. Aplicaciones y aspectos económicos. UNAM (2000)
- (2) E. Rabea, et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465, (2003)
- (3) Y. Shin, et al. Molecular Weight effect on antimicrobial activity of chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* 80, 2495-2501, (2001)
- (4) F. Xiao, et al. Antibacterial action of chitosan and carboxymethyl chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* 79, 1324-1335, (2001)