

## SÍNTESIS DE N-SUCCINIL-QUITOSANO Y FORMACIÓN DE NANOMICELAS PARA TRANSPORTE DE FÁRMACOS HIDRÓFOBOS

Pedro Mena-Giraldo<sup>1†</sup>, Sandra Pérez-Buitrago<sup>1,2</sup>, Rodolfo Pinal<sup>3</sup>, Lina Hoyos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Dinámica Cardiovascular, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Cir. 1 #70-01, of. 11-259, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>Grupo de Óptica y Espectroscopía, Escuela de Ingenierías, Universidad Pontificia Bolivariana. Circular 1 N° 70-01. Medellín, Colombia.

<sup>3</sup>Department of Industrial and Physical Pharmacy, Purdue University. 575 Stadium Mall Drive. West Lafayette, IN 47907, USA.

Recibido 17 Noviembre 2015; aceptado 15 Diciembre 2015  
Disponible en línea: 19 Diciembre 2016

**Resumen:** En este artículo se presenta la síntesis y caracterizaciones del copolímero anfifílico, parcialmente hidrosoluble N-succinil-QUITOSANO, el cual presenta una mayor solubilidad a un pH de 5, este se sintetiza a partir del polímero no soluble en agua QUITOSANO de medio peso molecular. Esto con el fin de implementar este derivado del QUITOSANO para la formación de nanomicelas transportadoras de fármacos hidrófobos, la cual se llevó a cabo a través del método de evaporación de solvente. Las caracterizaciones del polímero se realizaron empleando espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear, cuyo análisis de resultados indica que mediante el proceso de síntesis empleado se logró obtener el polímero N-succinil-QUITOSANO soluble en agua a partir del QUITOSANO de peso molecular medio. Las nanopartículas poliméricas formadas a partir de éste, se caracterizaron a través de microscopía electrónica de transmisión obteniendo imágenes de nanomicelas de un tamaño medio de 70 nm.

*Palabras clave:* N-succinil-QUITOSANO, síntesis de polímeros, nanomicelas.

## SYNTHESIS OF N-SUCCINYL-CHITOSAN AND FORMATION OF NANOMICELLES FOR HYDROPHOBIC DRUG DELIVERY

**Abstract:** This article describes the synthesis and characterization of amphiphilic, partially water soluble N-succinyl-chitosan, which has a higher solubility at pH 5, this is synthesized from polymer chitosan which is not soluble in water with medium-molecular weight, in order to implement this derivative of chitosan for the formation of nanomicelles as transporters of hydrophobic drugs. The micelles formation was conducted through solvent evaporation method. Polymer characterizations were performed using infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance, the analysis results indicate that by the process of synthesis used from medium molecular weight chitosan, was obtained N-succinyl-chitosan soluble in water. The polymer nanoparticles formed, were characterized by transmission electron microscopy. Images of nanomicelles show an average size of 70 nm.

*Keywords:* N-succinyl-chitosan, polymer synthesis, nanomicelles.

---

† Autor al que se le dirige la correspondencia:

Tel. (+574)4488388 ext 12400.

E-mail: [pedro.mena@upb.edu.co](mailto:pedro.mena@upb.edu.co) (Pedro Alejandro Mena Giraldo).

## 1. INTRODUCCIÓN

El quitosano se deriva de la desacetilación de la quitina y es uno de los polímeros de carbohidratos abundantes, renovables, no tóxicos, y biodegradables ([Luo et al., 2011](#)). El quitosano con altos grados de desacetilación no es soluble en agua debido a la fuerte unión de hidrógeno intermolecular, haciéndolo inapropiado para ser empleado en sistemas vivos. Por esta razón se realiza la modificación en los enlaces -OH y -NH<sub>2</sub> para mejorar su solubilidad en agua ([Aiping et al., 2006](#)).

El derivado N-succinil-quitosano (NSQ) es un copolímero anfifílico que posee los grupos hidrofílicos R-CO-R' y -COOH (provenientes del anhídrido butanodioico), y grupos (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), acetilo y anillos glucosídicos que se comportan hidrofóbicamente. Se ha encontrado que el NSQ exhibe propiedades biológicas tales como una buena solubilidad a diversos pH, no toxicidad, biocompatibilidad y larga circulación sistémica en ratones ([Y. Kato, 2004](#)). Por estas razones, el NSQ es atractivo para aplicaciones en transporte de fármacos ([Cao, et al., 2013](#); [Kato, 2004](#); [Woraphatphadung et al., 2015](#)), como vehículo de suministro de genes para mejorar la solubilidad del quitosano y transfección de genes ([E.K. Toh, 2011](#)), reconstitución inmunitaria ([Luo et al., 2011](#)), anticoagulantes ([Wang et al., 2012](#)), entre otras.

El presente trabajo se enfoca en la síntesis de éste polímero ya que su propiedad de anfifilicidad, le confiere la capacidad de formar estructuras micelares con un núcleo hidrófobo y corona hidrófila, lo que las hace solubles en un medio acuoso como la sangre y a su vez permite transportar fármacos con tendencia hidrófoba.

Estas micelas han capturado considerable atención debido a sus posibles aplicaciones en la biotecnología, los nanosensores, administración de fármacos y sistemas de transporte de genes. Además, estas pueden someterse a cambios reversibles en respuesta a determinados estímulos externos ([Yuan et al., 2014](#)). Las micelas poliméricas aumentan la estabilidad de agentes farmacéuticos volátiles, de una forma sencilla y económica ya que es posible fabricarlas en grandes cantidades por una multitud de métodos. También, ofrecen una mejora significativa sobre

los métodos orales e intravenosos tradicionales de administración, en términos de eficiencia y eficacia. Proporciona una mayor concentración de agente farmacéutico en una ubicación deseada ([Nagavarma et al., 2012](#)).

Debido a su estructura química, la mayoría de los fármacos tienden a agregarse en medios acuosos como resultado de la tendencia de su estructura hidrófoba para evitar el contacto con las moléculas de agua. Este estado es uno de los factores determinantes que pueden dificultar la eficacia del fármaco in vivo por la disminución de su biodisponibilidad ([Paszko et al., 2011](#)).

Para lograr la formación de estas micelas transportadoras de fármacos hidrófobos, inicialmente se realizó la síntesis del polímero anfifílico NSQ a partir de quitosano de peso molecular medio. Se realizó la caracterización por espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear, en las cuales a través del análisis de los picos obtenidos fue posible identificar si el producto obtenido corresponde al NSQ esperado. Para comprobar las propiedades de hidrosolubilidad se realizó una prueba gravimétrica con la cual se construyó la curva de solubilidad a diferentes valores de pH.

Luego se realizó un proceso de formación de las micelas por el método de evaporación de solvente, con el cual se obtuvieron nanopartículas de un tamaño aproximado de 70 nm, caracterizadas a través de microscopía electrónica de transmisión.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Reactivos

El de quitosano de peso molecular medio, con un grado de desacetilación de 85 %, el anhídrido butanodioico, la acetona y el hidróxido de sodio fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (EEUU).

### 2.2. Síntesis de N-Succinil-Quitosano

El NSQ se sintetizó mediante la reacción de Schotten-Baumann entre el quitosano y el anhídrido butanodioico, allí los grupos amino se

transformaron en grupos -NH-CO- para formar una amida.

La síntesis del copolímero anfifílico NSQ, se realizó mezclando 1g de quitosano con 3 g de anhídrido butanodioico, en 20 ml de acetona y se agitó por 72 horas a temperatura ambiente (Yan, 2006; Zhang et al., 2014). En la Fig. 1 se presenta el esquema de la síntesis. Al finalizar la reacción, se agregaron otros 20 ml de acetona y luego se precipita la mezcla con 5% (p/v) de hidróxido de sodio (NaOH). Después, se filtró el precipitado obtenido y se lava tres veces con etanol. Finalmente se seca bajo vacío a 60°C durante 12 h empleando un evaporador rotatorio (Cao et al., 2013; Aiping et al., 2006).

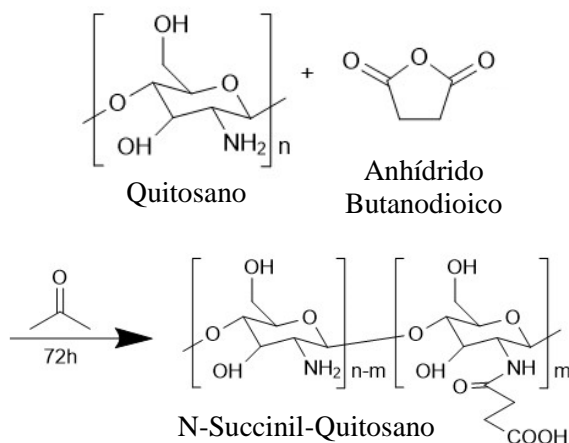


Fig. 1. Esquema de la síntesis de NSQ.

### 2.3. Caracterizaciones

Con el fin de verificar que el material obtenidos en la síntesis es NSQ, en la Universidad de Purdue, se realizaron caracterizaciones mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y resonancia magnética nuclear (RMN); empleando los espectrómetros Nicolet Magna 760 y Bruker Avance DRX500 respectivamente. Estas pruebas se realizaron tanto para el quitosano comercial empleado en la síntesis como para el compuesto obtenido al final de la misma.

Para adquirir el espectro FTIR, se ubicó la muestra en polvo, sin ninguna preparación previa, en el porta-muestras y éste en el compartimento del equipo, el cual se cerró herméticamente.

Desde el software se realizó la adquisición del fondo (*background*) y luego se adquirió la señal. Finalmente, se obtuvo un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual fue posible realizar, a través de software, una identificación de los materiales y a su vez comparar varias señales grabadas y marcar los picos de interés.

Las muestras para RMN se prepararon en tubos para de 5 mm, empleando 0.75 ml de solvente, en este caso se empleó agua pesada D<sub>2</sub>O, y una cantidad suficiente de muestra para obtener una concentración entre 10 y 50 milimolar. Luego el tubo fue ubicado en el equipo y asegurado. Finalmente, desde el software se realizó la adquisición y el procesamiento de los espectros.

Finalmente, se realizó una prueba de solubilidad usando en el método gravimétrico. En esta, se realizaron 12 soluciones a 0.02g/ml de NSQ en agua, ajustando el pH con NaOH (0.1 M) y HCl (0.1 M) a valores desde 1 hasta 12. Se agitaron durante 24 horas para obtener una solución homogénea. Luego se filtraron con papel filtro cuyo peso es conocido. Finalmente se pesaron los filtros con el remanente de NSQ que no se solubilizó y se resta el peso del filtro correspondiente, para determinar la cantidad de soluto solubilizado y de esta manera hallar el porcentaje de solubilidad a cada pH.

### 2.4. Formación de micelas poliméricas a partir de N-Succinil-Chitosano y caracterización

Primero se realizó una solución homogénea de NSQ en agua a pH 5, a la cual se le agregó tetrahidrofurano (THF) lentamente, en una proporción 1:1. Luego se agregó a la anterior, una mezcla de agua (50%) con THF (50%). Finalmente se dejó evaporar lentamente, durante 3 días a temperatura ambiente. Luego se caracterizó empleando un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 20 con un voltaje de 120 kV, además se se aplicó tinción negativa para aumentar el contraste de las nanoestructuras vistas al microscopio, para aumentar la definición; se emplearon 0.3 µl de 1% Ácido fosfotúngstico (PTA) con pH = 7.2.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

La [Fig. 2](#) presenta la comparación de los espectros FTIR del quitosano y el NSQ sintetizado. El espectro infrarrojo del quitosano (azul), presenta los siguientes picos que caracterizan a este polímero de origen biológico: 3367.0  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a los grupos  $-\text{OH}$ , la banda en 3289.2  $\text{cm}^{-1}$  es debida al grupo  $-\text{NH}$ , 2875.2  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al grupo  $-\text{CH}$ , 1658.2  $\text{cm}^{-1}$  es debido al grupo  $-\text{NH}_2$ , 1386.1  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al  $-\text{CH}$  y deformación del  $\text{C}-\text{CH}_3$ , 1114.0  $\text{cm}^{-1}$  es característico de la tensión antisimétrica del grupo  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  y 802.0  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la tensión  $-\text{CH}$  de los grupos anoméricos.

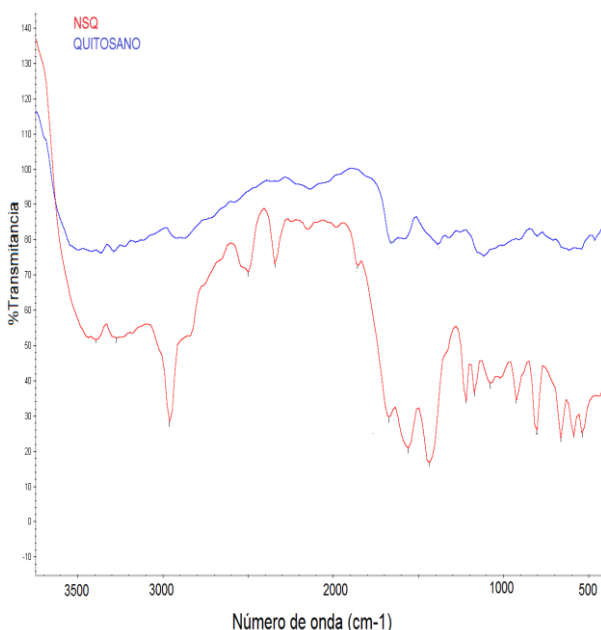


Fig. 2. Comparación entre los espectros FTIR del quitosano y el NSQ sintetizado

El espectro del NSQ (rojo), presenta los siguientes picos que definen la estructura del polímero: 3395.0  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al grupo  $-\text{OH}$ , 3272.0  $\text{cm}^{-1}$  al  $-\text{NH}$  que conforma la amida secundaria, el cual es un punto diferencial entre el quitosano y el NSQ, 2960.5  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al  $-\text{CH}$ , 1856.8  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al  $\text{C}=\text{O}$ ,

característico a la amida y al ácido carboxílico, también puntos cruciales en la diferenciación entre los dos polímeros; 1561.7  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al  $-\text{NH}_2$  conformando las aminas que no alcanzaron a reaccionar para formar la amida secundaria, 1437.3  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a  $-\text{CH}_2$ , a 11695  $\text{cm}^{-1}$  demuestra la presencia de  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ , y el 922.7  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los  $-\text{CH}$  de los grupos aromáticos (Ver [Fig. 2](#)).

#### 3.2. Resonancia magnética nuclear

El espectro de RMN del quitosano (Ver [Fig. 3a](#)) se caracteriza según los siguientes factores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) expresados en [ppm]: 4.71 que corresponde al grupo  $-\text{NH}_2$  y 1.82 que corresponde a  $\text{R}-\text{CH}-\text{R}'-\text{R}''$ . Se hace énfasis en estos dos ya que son los grupos por medio de los cuales reacciona el NSQ y se adiciona la cadena del anhídrido succínico.

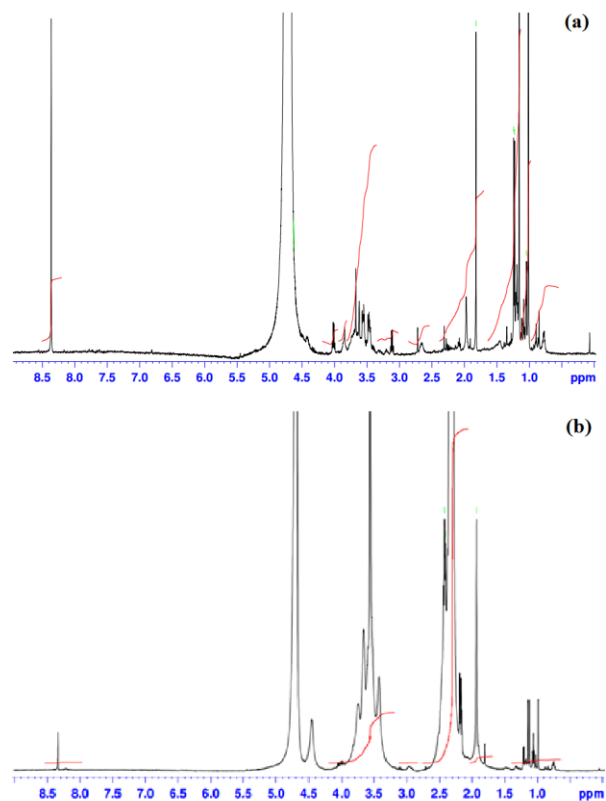


Fig. 3. Espectros de RMN. (a) Quitosano, (b) NSQ.

El espectro de RMN del NSQ, el cual se reporta en la [Fig. 3b](#), se caracteriza según los siguientes factores de desplazamiento químico: 4.71 ppm que corresponde a los grupos  $\text{-NH}_2$  que no reaccionaron, 3.57 ppm corresponde al grupo  $\text{-CH-OH}$  que son los OH que se desprenden del ciclo, 2.44 ppm corresponde al grupo  $\text{-OH}$ , 2.32 ppm identifica el grupo  $\text{-CH}_2\text{COOH}$  que es el ácido carboxílico característico del anhídrido succínico que se adicionó al quitosano, 1.96 ppm corresponde a  $\text{-R-CO-}$ , que es la cetona que se une al grupo  $\text{NH}_2$  para formar la amida.

### 3.3. Pruebas de solubilidad en medio acuoso

La curva de solubilidad obtenida se presenta en la [Fig. 4](#). En esta se evidencia una solubilidad máxima a pH 5 y mínima a pH 1.

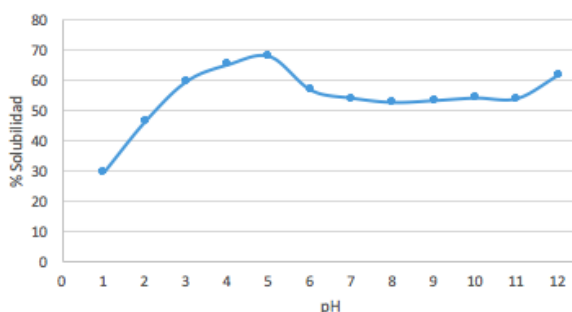


Fig. 4. Curva de solubilidad de NSQ con respecto al pH.

### 3.4. Formación de las nanomicelas

Como se describió en la sección de métodos, para la formación de las micelas de NSQ se diseñó un sistema de evaporación de solvente, empleando agua para solubilizar el NSQ y una dispersión con THF. De esta forma, la parte interna es atraída por las moléculas de THF (solvente hidrófobo) y la parte exterior por las moléculas de agua, haciendo que se cierren los conjugados poliméricos. Luego, por evaporación lenta y difusión a través de las paredes del polímero, se retiró el THF dejando el centro de estas libre. Así, se obtuvieron finalmente nanomicelas de NSQ con un núcleo hidrófobo y corona hidrófila. La [Fig. 5](#) presenta las imágenes TEM de las partículas, las cuales poseen una morfología esférica, donde los dominios hidrófobos están compuestos por restos hidrófobos, tales como  $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ , grupos acetilo y anillos glucosídicos

por lo cual las nanomicelas de NSQ pueden cargar moléculas hidrofóbicas. A partir de la observación a través de TEM se estimaron los tamaños de las esferas huecas entre 40 nm y 100 nm.

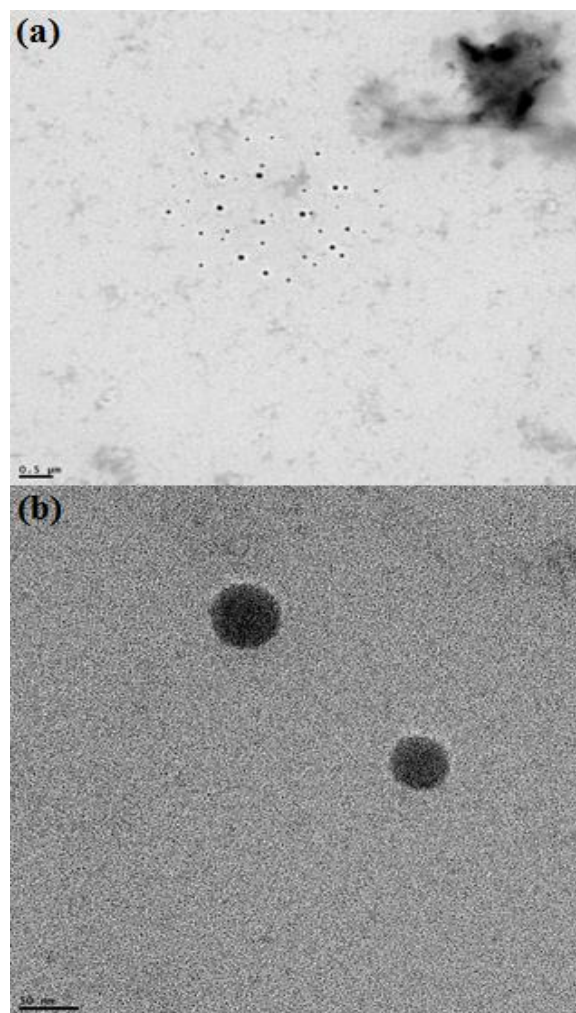


Fig. 5. Imágenes TEM de las nanomicelas de NSQ. A escalas de (a) 0.5  $\mu\text{m}$  y (b) 50 nm.

## 4. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar N-succinil-quitosano a partir de quitosano de peso molecular medio. El NSQ obtenido fue verificado a través de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier y de resonancia magnética nuclear, en las cuales se analizaron los principales enlaces y grupos que caracterizan al quitosano, adquirido en Sigma Aldrich, y al polímero anfifílico NSQ; a través de esto se comprobó que el polímero sintetizado

corresponde a lo esperado para NSQ de carácter anfifílico. Se comprobó además la solubilidad en medio acuoso del polímero en función del pH, lo cual favorece la distribución de fármacos en medios biológicos.

A partir del NSQ, empleando el valor de pH que permite mayor solubilidad, se formaron nanomicelas de tamaños entre 40 y 100 nm, con la capacidad de transportar fármacos hidrófobos.

Además, por su tamaño estas nanoparticulas poliméricas de estructura micelar, tienen la capacidad de interactuar con células de forma segura, para la inyección de fármacos por vía intravenosa (Decuzzi et al., 2010). Este trabajo abre la puerta a futuras investigaciones mediante las cuales se evalúe la biodistribución de medicamentos hidrófobos empleando las nanomicelas desarrolladas.

#### AGRADECIMIENTO

Se agradece a UPB Innova por la financiación del proyecto 282B-09/14-04. También, al profesor Rodolfo Pinal de la Universidad de Purdue por los servicios de caracterización y asesoría, especialmente al profesor Christopher J. Gilpin por el apoyo en la adquisición de las imágenes TEM.

#### REFERENCIAS

Aiping, Z. et al. (2006). Synthesis and characterization of N-succinyl-chitosan and its self-assembly of nanospheres. *Carbohydrate Polymers*, **66** (2): 274–279. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861706001287>.

Cao, J., Huang, S., Chen, Y., Li, S., Achilefu, S., et al. (2013). Near-infrared light-triggered dissociation of block copolymer micelles for controlled drug release. S. Achilefu & R. Raghavachari, eds., 8596, p.859606. Available at: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.2003247>.

Cao, J., Huang, S., Chen, Y., Li, S., Li, X., et al., (2013). Near-infrared light-triggered micelles for fast controlled drug release in deep tissue. *Biomaterials*, **34** (26): 6272–6283. Available

at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721796>.

Decuzzi, P. et al. (2010). Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *Journal of Controlled Release*, **141** (3): 320–327. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.011>.

Kato, Y. (2004). N-succinyl-chitosan as a drug carrier: water-insoluble and water-soluble conjugates. *Biomaterials*, **25** (5): 907–915. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961203005982>.

Luo, H., Li, J. & Chen, X. (2011). Potential role of N-Succinyl-Chitosan in immune reconstitution after umbilical cord blood transplantation in mice. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, **65** (8): 578–584. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2010.01.011>.

Nagavarma, B.V.N. et al. (2012). Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **5** (3): 16–23.

Paszko, E. et al., 2011. Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **8** (1): 14–29. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.12.001>.

Toh, E. K., Chen HY. (2011). Succinated chitosan as a gene carrier for improved chitosan solubility and gene transfection. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, **7**: 174–183.

Wang, T. et al. (2012). Preparation and anticoagulant activity of N-succinyl chitosan sulfates. *International Journal of Biological Macromolecules*, **51** (5): pp.808–814. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.07.029>.

Woraphatphadung, T., Sajomsang, W. & Gonil, P. (2015). Synthesis and characterization of pH-responsive N-naphthyl-N , O-succinyl chitosan micelles for oral meloxicam delivery. *Carbohydrate Polymers*, **121**: pp.99–106. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.039>.

Yan, C. et al. (2006). Preparation of N -Succinyl-chitosan and Their Physical-Chemical

Properties as a Novel Excipient. *Yakugaku zasshi*, **126** (9):789–793.

Yuan, W., Shen, J. & Guo, W. (2014). Thermoresponse and light-induced reversible self-assembly / disassembly of supra-amphiphiles from azobenzene- and  $\beta$ -cyclodextrin-containing copolymers. *Materials Letters*, **134**: 259–262. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2014.07.108>.

Zhang, C. et al. (2014). N-Succinyl-chitosan nanoparticles coupled with low-density lipoprotein for targeted osthole-loaded delivery to low-density lipoprotein receptor-rich tumors. *International Journal nanomedicine*, **9**: 2919–2932.

## **Lina Hoyos**

Profesora Asistente de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Pontificia Bolivariana. Ingeniera Química de la Universidad Nacional de Colombia y Doctora en Ingeniería y Termodinámica de la Universidad Pontificia Bolivariana. Áreas de interés investigativo: Síntesis y caracterización de nanoestructuras.

## SOBRE LOS AUTORES

### **Pedro Mena Giraldo**

Estudiante de Maestría en Ingeniería, área Ingeniería Biomédica, Línea en Nanotecnología y Biomateriales, de la facultad de Ingeniería de la Universidad Pontificia Bolivariana. Ingeniero Químico de la Universidad Pontificia Bolivariana, Áreas de interés investigativo: Síntesis química, nanomateriales y bioingeniería.

### **Sandra Pérez-Buitrago**

Estudiante de Doctorado en Ciencias Médicas, Línea en Bioingeniería de la facultad de Medicina de la Universidad Pontificia Bolivariana. Bioingeniera de la Universidad de Antioquia. Magister en Ingeniería de la Universidad Pontificia Bolivariana. Especialista del Instituto Tecnológico Metropolitano. Áreas de interés investigativo: Óptica, nanomateriales y bioingeniería.

### **Rodolfo Pinal**

Profesor asociado del Departamento de Farmacia Industrial y Física de la Universidad de Purdue-EUU. Director Dane O. Kildsig Center for Pharmaceutical Processing Research. Doctor en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Arizona. Áreas de interés investigativo: Formulación, liberación de fármacos.