



Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C
Posgrado en Materiales Poliméricos

Nanopartículas de quitosano cargadas con hidrobromuro de galantamina para posible tratamiento del Alzheimer

Tesis que presenta:

Alexis Bernardo Sabido Barahona

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(MATERIALES POLIMÉRICOS)

Mérida, Yucatán, México

2022

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a central vertical stroke, positioned above a horizontal line for the name.

Firma: _____

Nombre: Alexis Bernardo Sabido Barahona

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Alexis Bernardo Sabido Barahona** titulado “**Nanopartículas de quitosano cargadas con hidrobromuro de galantamina para posible tratamiento del Alzheimer**” fue realizado en la Unidad de Materiales dentro de la línea de Biomateriales y Nanomateriales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. José Manuel Cervantes Uc, perteneciente al Programa de Posgrado en Maestría en Ciencias en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 25 de abril del 2022.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C (CICY) por permitirme utilizar sus instalaciones y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (número de becario 1008398).

A mi director de tesis, el Dr. José Manuel Cervantes Uc, por toda la paciencia y confianza a lo largo de este proyecto, y por todo el apoyo profesional y personal brindado.

A mi tutor interno, el Dr. Fernando Hernández Sánchez y tutor externo, el Dr. Luis Villarreal Gómez por el tiempo para revisar y brindar sus comentarios del proyecto.

A mis revisores, el Dr. Carlos Rolando Ríos Soberanis, el Dr. Víctor Manuel Moo Huchin, el Dr. Fernando Hernández Sánchez y el Dr. Luis Villarreal Gómez por sus observaciones y el tiempo dedicado a este trabajo de tesis.

Al Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez por haberme permitido el uso del laboratorio de química macromolecular.

A la Q.I Rossana Faride Vargas Coronado por todo el apoyo técnico de laboratorio, la paciencia y las enseñanzas prácticas.

Al Q.I Santiago Duarte Aranda por haber obtenido las micrografías SEM de las muestras.

Al Dr. Alejandro May Pat por haber obtenido las micrografías AFM de las muestras.

A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por permitirme utilizar parte de su equipo de laboratorio.

Al Dr. Wilberth Herrera Kao por realizar el análisis de las muestras por FTIR y TGA.

A mi familia, por el seguimiento que le dan a mi crecimiento profesional y por brindarme la motivación y el apoyo para continuar.

A mis amigos, Gaby, Geovanny y Raúl, por su atención y asesoría, así como la oportunidad de compartir la vida académica, profesional y personal.

A todos mis compañeros de laboratorio, Silvia, Gualberto y Juan, por toda la ayuda técnica y teórica, al igual que la asesoría y consejos brindados.

Dedicatoria

Con amor, a la Mtra. Alejandra Barahona, mi mamá,
Quien siempre me alienta y motiva en cada proyecto y me recuerda que aproveche mis
conocimientos para ayudar a los demás.

A mi papá, Ángel Sabido, por hacerme sentir orgulloso del trabajo que realizo.

Con cariño, a la Mtra. Clara Gio, mi abuela.
Gracias, porque a pesar de que hace un tiempo ya no estás conmigo, me llenaste con ganas de
aprender e investigar

ÍNDICE

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	3
1.1 Sistemas de liberación de fármacos	3
1.2 Liberación de fármacos en el cerebro	5
1.3 Nanopartículas como sistemas de liberación controlada de fármacos	6
1.4 Nanopartículas poliméricas como sistemas de liberación de fármacos	7
1.5 Quitosano	10
1.6 Obtención de nanopartículas de quitosano cargadas con fármacos (Antecedentes).	11
1.7 Nanopartículas de quitosano para la liberación de fármacos en el cerebro	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
Hipótesis.....	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares.....	16
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.....	17
2.1 Materiales	17
2.2. Esquema general de trabajo.....	17
2.3 Caracterización del quitosano	18
2.3.1 Peso molecular.....	18
2.3.2 Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	19
2.3.3 Grado de desacetilación.....	19
2.3.4 Análisis termogravimétrico (TGA)	19

2.4 Caracterización del hidrobromuro de galantamina	20
2.5 Preparación de las partículas de quitosano.....	21
2.6 Caracterización fisicoquímica y morfológica de las partículas de quitosano	24
2.6.1 Caracterización fisicoquímica	24
2.6.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	24
2.6.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)	24
2.7 Preparación de las nanopartículas de quitosano cargadas con GH	25
2.8 Estudios de liberación de hidrobromuro de galantamina	25
2.8.1 Eficiencia de atrapamiento y capacidad de carga.....	26
2.8.2 Estudios de liberación del fármaco <i>in vitro</i>	26
2.8.3 Modelación de la cinética de liberación	27
CAPÍTULO 3. RESULTADOS	28
3.1 Caracterización fisicoquímica del quitosano.....	28
3.1.1 Peso molecular.....	28
3.1.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	32
3.1.3 Grado de desacetilación.....	33
3.1.4 Análisis termogravimétrico	34
3.2 Caracterización fisicoquímica del hidrobromuro de galantamina.....	35
3.3 Caracterización fisicoquímica de las partículas del quitosano.....	37
3.3.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	37
3.3.2 Análisis termogravimétrico (TGA)	40
3.3.3. Tamaño y morfología de las partículas.....	45
3.4 Nanopartículas de quitosano cargadas con GH.....	51
3.4.1 Encapsulación del fármaco	51
3.4.2 Caracterización fisicoquímica	52

3.4.3 Estudios de liberación <i>in vitro</i>	54
3.4.4 Modelación matemática de la cinética de liberación	55
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	59
REFERENCIAS	60

Índice de Tablas

Tabla 2. 1. Condiciones de síntesis de las nanopartículas de quitosano	23
Tabla 3. 1. Tiempos de elución para las disoluciones de CS-L.	28
Tabla 3. 2. Tiempos de elución para las disoluciones de CS-M.	28
Tabla 3. 3. Tiempos de elución para las disoluciones de CS-H.	29
Tabla 3. 4. Parámetros viscosimétricos del CS-L a 25 ° C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L.	29
Tabla 3. 5. Parámetros viscosimétricos del CS-M a 25 ° C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L.	29
Tabla 3. 6. Parámetros viscosimétricos del CS-H a 25 ° C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L.	30
Tabla 3. 7. Tamaño promedio de las partículas de quitosano.	45
Tabla 3. 8. Condiciones de preparación de las NPs-CS cargadas con GH.	51
Tabla 3. 9. Eficiencia de atrapamiento y capacidad de carga de las nanopartículas de quitosano.	52

Índice de Figuras

Figura 1. 1. Liberación de fármacos en el rango terapéutico.	3
Figura 1. 2. Tipos de liberación de fármacos. a) inmediata; y modificada: b) extendida y c) retardada	4
Figura 1. 3. Cruce de moléculas a través de la barrera hematoencefálica.....	5
Figura 1. 4. Clasificación de las nanopartículas utilizadas como sistemas de liberación controlada de fármacos.	7
Figura 1. 5. Nanopartículas poliméricas: a) nanoesfera, b) nanocápsula.....	9
Figura 1. 6. Estructura química del quitosano.....	10
Figura 1. 7. Entrecruzamiento iónico entre el a) quitosano protonado y el b) tripolifosfato de sodio.	12
Figura 1. 8. Carga del fármaco durante el proceso de gelación iónica. Imagen tomada y adaptada de [46].	13
Figura 1. 9. Estructura química del hidrobromuro de galantamina (GH).	14
Figura 1. 10. Formación de complejos entre el quitosano y el hidrobromuro de galantamina. Imagen tomada de Hanafy et al. [25].	15
Figura 2. 1. Etapas principales del trabajo.	17
Figura 2. 2. Espectro UV-vis de una solución de hidrobromuro de galantamina/agua destilada. .	20
Figura 2. 3. Curva de calibración para la cuantificación del hidrobromuro de galantamina en sobrenadantes.	21
Figura 2. 4. Representación esquemática de la preparación de las partículas de CS por gelación iónica.	22
Figura 2. 5. Representación esquemática de la liberación in vitro.....	27
Figura 3. 1. Gráfica de Huggins y Kraemer a 25 °C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L para CS-L.....	30
Figura 3. 2. Gráfica de Huggins y Kraemer, a 25 °C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L para CS-M.	31
Figura 3. 3. Gráfica de Huggins y Kraemer, a 25 °C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L para CS-H.	31
Figura 3. 4. Espectros FTIR del quitosano en polvo: CS-L (110 kDa), CS-M (194 kDa), CS-H (267 kDa).....	33

Figura 3. 5. Áreas bajo la curva de los grupos metilo y amida III de los espectros FTIR: CS-L, CS-M, CS-H.	33
Figura 3. 6. Curvas TGA (línea continua) y DTGA (línea punteada) de quitosanos con diferente peso molecular: CS-L, CS-M, CS-H.	35
Figura 3. 7. Espectro FTIR del hidrobromuro de galantamina puro.	36
Figura 3. 8. Curvas TGA (línea continua) y DTGA (línea punteada) del hidrobromuro de galantamina.	36
Figura 3. 9. Espectro FTIR de las partículas de quitosano de bajo peso molecular.	38
Figura 3. 10. Espectro FTIR de las partículas de quitosano de mediano peso molecular.	39
Figura 3. 11. Espectro FTIR de las partículas de quitosano de alto peso molecular.	39
Figura 3. 12. Curvas TGA y DTGA para las partículas preparadas con quitosano de bajo peso molecular.	42
Figura 3. 13. Curvas TGA y DTGA para las partículas preparadas con quitosano de mediano peso molecular.	43
Figura 3. 14. Curvas TGA y DTGA para las partículas preparadas con quitosano de alto peso molecular.	45
Figura 3. 15. Micrografías SEM de las partículas de quitosano de bajo peso molecular.	48
Figura 3. 16. Micrografías SEM de las partículas de quitosano de mediano molecular.	49
Figura 3. 17. Micrografías SEM de las partículas de quitosano de alto peso molecular.	50
Figura 3. 18. Micrografías AFM (izq. 10x10 μm ; der. 3 x 3 μm) de las partículas de quitosano de la muestra L7.	50
Figura 3. 19. Espectro FTIR de las NPs-CS con y sin galantamina.	53
Figura 3. 20. Curvas TGA y DTGA para las nanopartículas con y sin galantamina.	53
Figura 3. 21. Perfil de liberación del hidrobromuro de galantamina a partir de NPs-CS.	55
Figura 3. 22. Ajuste de la cinética de liberación a los modelos: a) orden cero, b) primer orden, c) Higuchi, d) Hixon-Crowell, e) Korsmeyer-Peppas.	56

RESUMEN

Los sistemas de liberación de fármacos para el tratamiento de enfermedades cerebrales es un tema de investigación altamente estudiado debido a la baja efectividad de los tratamientos convencionales. Es por ello que, en este trabajo, se sintetizaron nanopartículas de quitosano (NPs-CS) con el fin cargar y liberar hidrobromuro de galantamina (GH), el cual es un fármaco utilizado para controlar la progresión de la enfermedad del Alzheimer. Para obtener partículas con un tamaño menor a 200 nm (condición necesaria para depositarse en el cerebro), se utilizó el método de gelación iónica y se estudió el efecto de tres variables, en tres niveles: peso molecular del quitosano (bajo, mediano y alto: 110, 194, 267 kDa respectivamente), concentración del quitosano (CS) en solución acuosa (1, 1.5 y 2 mg/ml) y concentración del tripolifosfato de sodio (TPP). En los espectros de FTIR de las nanopartículas, se observó que las vibraciones del grupo amida I (1650 cm^{-1}) y amida II (1557 cm^{-1}) del quitosano puro, fueron desplazadas hasta 1636 cm^{-1} y 1546 cm^{-1} , lo que comprobó la existencia del entrecruzamiento iónico. Por otro lado, la temperatura de degradación máxima del quitosano se desplazó de 305°C a 500°C y se le atribuyó al incremento de estabilidad térmica del polímero provocado por el entrecruzamiento con el grupo fosfato. De forma general, se observaron los siguientes efectos: a) a menor peso molecular, menor diámetro de partícula, b) el aumento en la concentración de TPP, provoca que el tamaño de las partículas se incremente, o se empiecen a formar aglomerados y estructuras sin morfología específica, c) la concentración óptima de quitosano en la formación de NPs fue de 1.5 mg/ml, (concentraciones mayores o menores generan micropartículas o masas amorfas). Las nanopartículas con el tamaño óptimo para depositarse en el cerebro (170 nm) fueron las obtenidas con las siguientes condiciones: peso molecular CS: 110 kDa, y una concentración de CS y TPP de 2.0 y 0.5 mg/ml respectivamente. Posteriormente, se realizó la carga del GH a las NPs-CS, obteniendo una eficiencia de carga del 19.42%. Asimismo, se comprobó la incorporación del fármaco en las NPs-CS por medio de FTIR ya que se genera un ensanchamiento de la banda del grupo -NH (1540 cm^{-1}) y la presencia del grupo C-N (1070 cm^{-1}), así como por un aumento en la estabilidad térmica. Por último, se observó que la cinética de liberación de la galantamina a partir de NPs-CS se ajustó al modelo de Korsmeyer-Peppas, en la que el fármaco tiene una liberación tipo ráfaga y después sostenida.

ABSTRACT

Drug delivery systems for brain disorders is a research topic highly development due to low efficacy of the conventional treatments. The current work aimed to prepare chitosan nanoparticles (NPs-CS) to load and delivery galantamine hydrobromide (GH), a drug used to treat Alzheimer disease progression. To obtain particles with a diameter < 200 nm (mandatory condition for its deposition in brain), ionic gelation method was used and the effect of three parameters, at three levels were studied: chitosan molecular weight (110, 194, 267 kDa), concentration of chitosan solution (1, 1.5 and 2 mg/ml) and concentration of TPP (0.5, 0.75 and 1.0 mg/ml). FTIR spectra showed that vibrations of amide I group (1650 cm^{-1}) and amide II (1557 cm^{-1}) of pure chitosan were shifted to 1636 cm^{-1} and 1546 cm^{-1} in nanoparticles due to ionic cross-linking. On the other hand, maximum degradation temperature of chitosan was shifted to a higher temperature (305°C to 500°C) due to increase of thermal stability of polymer caused by cross-linking with phosphate group. In general, the following effects were observed: a) a lower molecular weight of chitosan led to a decrease of the particle diameter, b) an increase in TPP concentration causes an increase of particle size until it generates agglomerates and amorphous structures c) the optimum concentration of chitosan was 1.5 mg/ml, higher or lower concentrations generate microparticles or amorphous masses. Nanoparticle of 170 nm were synthesized using the following conditions: CS molecular weight: 110 kDa, CS and TPP concentrations: 2.0 y 0.5 mg/ml respectively. The loading of GH into NPs-CS was carried out, obtaining a loading efficiency of 19.42%. The incorporation of the drug in the NPs-CS was confirmed by FTIR, widening the band of the -NH group (1540 cm^{-1}) and the appearance of the CN group (1070 cm^{-1}), as well as an rease in thermal stability of nanoparticles. Finally, it was observed that the galantamine release kinetic from NPs-CS fits to Korsmeyer-Peppas model, in which the drug has a burst-type release followed of a sustained release.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de liberación de fármacos (DDS por sus siglas en inglés) pertenecen a una de las líneas de investigación más prometedoras dentro de la tecnología farmacéutica, debido a que en los tratamientos médicos convencionales el principio activo puede presentar una alta toxicidad o éste no logra estar disponible en una zona específica del cuerpo. El uso de nanopartículas como DDS podría ayudar a incrementar la efectividad de los tratamientos debido a que estas estructuras son capaces de proteger, transportar y liberar el fármaco en un sitio específico. En los últimos años, los biomateriales de base polimérica han despertado un gran interés en la preparación de nanopartículas para DDS, ya que éstos se han visto involucrados en la cura, diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Por otra parte, la dosificación de fármacos al sistema nervioso central (SNC), implica desafíos interesantes ya que la molécula del principio activo no logra atravesar la barrera hematoencefálica, lo que provoca una baja efectividad de los tratamientos; un ejemplo de esto es el hidrobromuro de galantamina (GH), el cual es un fármaco empleado para tratar la demencia por Alzheimer. Debido a lo anterior, nanopartículas poliméricas han sido estudiadas con el fin de transportar al GH y liberarlo en el SNC.

El quitosano (CS) es un polímero prometedor para preparar dichas nanopartículas ya que no solo protege el principio activo, sino que lo libera de forma controlada en el cerebro; todo esto es posible porque las nanoestructuras de quitosano son biocompatibles y biodegradables. El método más utilizado en la preparación de nanopartículas a partir del del quitosano (NPs-CS) es el de gelación iónica, en donde, a través del manejo de diversas variables del proceso, es posible obtener partículas con las características (tamaño, morfología, carga superficial, etc.) adecuadas para esta aplicación.

Las NPs-CS ya han sido utilizadas con el fin de liberar diversos fármacos en el SNC, por lo que existen numerosos reportes al respecto; sin embargo, no se ha estudiado de forma simultánea el efecto del peso molecular del CS y las concentraciones en solución de los reactivos involucrados (CS y tripolifosfato de sodio, TPP), sobre las propiedades fisicoquímicas y morfológicas de las NPs-CS. Por lo tanto, en este trabajo se propone estudiar el efecto de las variables mencionadas de manera simultánea, con la finalidad de obtener NPs-CS adecuadas para su potencial aplicación como sistema de liberación controlada del hidrobromuro de galantamina.

El presente trabajo está dividido de la siguiente manera; en el primer capítulo se presentan los antecedentes del trabajo en conjunto con el marco teórico, en el cual se define qué es un sistema de liberación de fármacos y se detallan sus características más importantes; luego se presentan las diferentes partículas utilizadas para cargar y transportar fármacos a través del cuerpo humano y, finalmente, se profundiza acerca de la preparación de nanopartículas de quitosano y su aplicación para cargar y liberar fármacos como el hidrobromuro de galantamina en el cerebro. En el mismo capítulo se formula la justificación del proyecto, la hipótesis y sus objetivos. En el capítulo 2 se enlistan los materiales utilizados y se describe la parte experimental, donde se documenta la preparación y caracterización de las nanopartículas de quitosano cargadas con hidrobromuro de galantamina; también se detalla el estudio de la liberación *in vitro* de la galantamina a partir de nanopartículas de quitosano. En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos de la caracterización y los estudios de liberación, así como la discusión correspondiente. Finalmente se presentan las conclusiones a las que se llegaron con los resultados obtenidos en este trabajo y las recomendaciones.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1 Sistemas de liberación de fármacos

La liberación de fármacos es el proceso por medio del cual se suministra un compuesto farmacéutico (droga), que proporciona un efecto terapéutico a humanos o animales [1]. A pesar del beneficio proporcionado por este proceso, existen algunos inconvenientes asociados al fármaco, que pueden ocasionar su incorrecta distribución en el organismo, haciendo que el principio activo quede fuera de su intervalo terapéutico (inactivo), o bien que éste sea superado, teniendo efectos tóxicos o secundarios para la salud. El rango terapéutico está definido como el intervalo en que la concentración de la droga presente en el plasma hace que el medicamento sea efectivo [2], y debe de encontrarse arriba de la concentración mínima efectiva (MEC por sus siglas en inglés) y por debajo de la concentración tóxica mínima (MTC por sus siglas en inglés) [3]. Cuando se alcanza la concentración adecuada, el efecto terapéutico tiene una duración " Δt ", tal y como se muestra en la Figura 1.1.

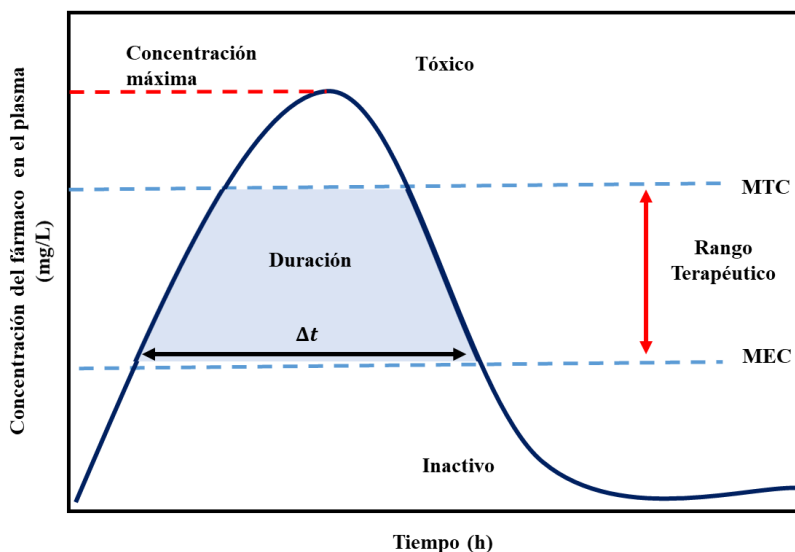


Figura 1. 1. Liberación de fármacos en el rango terapéutico.

La liberación de fármacos puede darse de dos formas: por liberación inmediata (Figura 1.2, curva a) o liberación modificada (curvas b ó c). En la primera de ellas, el medicamento es liberado inmediatamente después de la administración, iniciando de esta manera la acción terapéutica; su duración dependerá del tiempo en el que la concentración del fármaco en el plasma esté por encima de la MEC. La segunda forma de liberación se le conoce como liberación modificada y tiene como

objetivo modificar el perfil de liberación según los requerimientos de la zona y los objetivos terapéuticos. El sistema de liberación modificada se sub-divide en liberación extendida (ver Figura 1.2, curva b) y liberación retardada (ver Figura 1.2, curva c). En la primera, la liberación del fármaco se prolonga por más tiempo con el objetivo de reducir la frecuencia de dosificación y, por lo tanto, el medicamento se encuentra disponible en el plasma sanguíneo por un mayor período de tiempo después de la ingestión. En el segundo, el fármaco se libera en algún punto después de la administración inicial, haciendo que la concentración del mismo en el plasma se demore cierto tiempo en alcanzar el rango terapéutico [3].

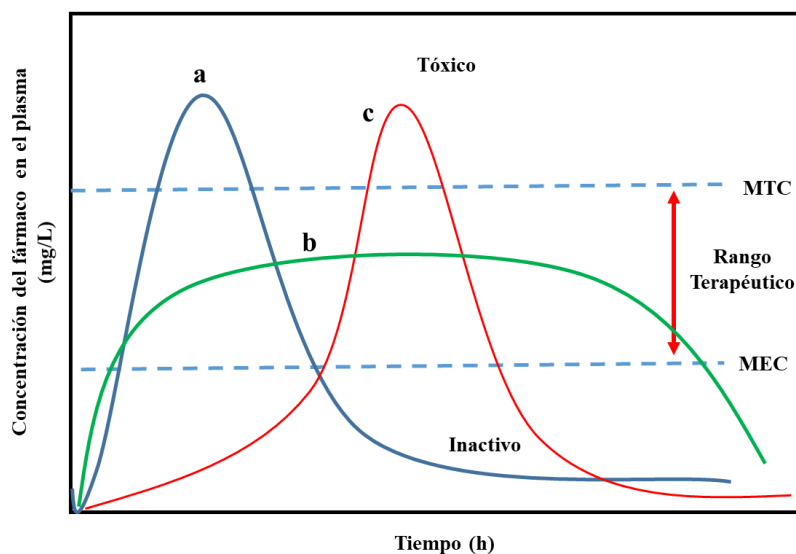


Figura 1. 2. Tipos de liberación de fármacos. a) inmediata; y modificada: b) extendida y c) retardada

Un sistema de liberación de fármacos tiene como objetivo final que el principio activo se encuentre en una concentración adecuada. Para evaluar la eficacia de los nuevos métodos de liberación de fármacos se necesita determinar tanto la vía de administración del medicamento, como estudiar la farmacocinética y la farmacodinámica del sistema de liberación. La farmacocinética describe el paso del fármaco a través del organismo, mientras que la farmacodinámica se refiere a la relación entre la concentración del fármaco en el sitio de acción y el efecto resultante [4, 2]. Además de lo anterior, es necesario conocer la cinética de liberación del sistema, la cual es determinada por modelos matemáticos obtenidos a partir de diseños experimentales de sistemas *in vivo* o *in vitro* para predecir su comportamiento [5]. En ocasiones es posible obtener una ecuación que describa la dependencia de la función de liberación con respecto del tiempo. La modelación matemática de

la cinética de liberación agrega valor al sistema de liberación del fármaco al asegurar que su diseño sea el óptimo [6]. Por lo tanto, al describir las características antes mencionadas, se puede realizar un correcto monitoreo terapéutico, lo cual determinará la eficacia y la seguridad del nuevo sistema de liberación del fármaco.

1.2 Liberación de fármacos en el cerebro

Un inconveniente al liberar fármacos en el sistema nervioso central (SNC), es que la mayoría de estos compuestos, por su estructura química, son incapaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB por sus siglas en inglés) *in vivo* [7]. La BBB está basada en uniones estrechas de células epiteliales que forman capilares (ver Figura 1.3), los cuales actúan como una barrera primaria; dicha conformación provoca que la BBB sea impermeable (98-100%) para la mayoría de las moléculas en condiciones normales, lo cual genera una baja eficiencia en los tratamientos para enfermedades cerebrales [8]. Es por esta razón que muy pocos de los fármacos utilizados para el tratamiento de desórdenes del SNC han llegado al mercado (3-5%) [7]. En consecuencia, el estudio de la liberación de fármacos, así como el desarrollo de nuevas estrategias para tratar desórdenes del SNC y enfermedades neurodegenerativas como el Párkinson y el Alzheimer, son dos de los nichos de estudio más desafiantes y costosos que existen en la actualidad [9].

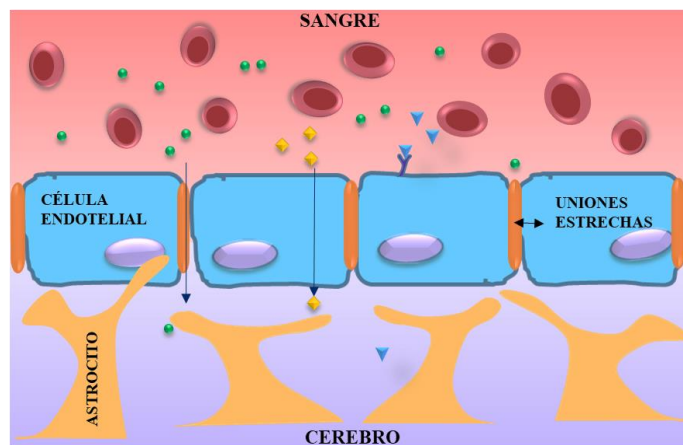


Figura 1. 3. Cruce de moléculas a través de la barrera hematoencefálica.

La enfermedad de Alzheimer (AD) es el trastorno neurodegenerativo más común y es, además, uno de los que requiere tratamientos de los más costosos que existen. En este padecimiento, ocurre la pérdida de la estructura sináptica y, por lo tanto, la disminución del número de sinapsis, lo cual

provoca la pérdida de memoria, desorientación espacial y una marcada disminución de la capacidad intelectual [10]. Existen diversas drogas aprobadas por la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (FDA), para controlar el progreso de esta enfermedad, como es el hidrobromuro de galantamina, la rivastigma, el donezepil y la memantina. Estos medicamentos se administran al paciente en dosis elevadas, ya que solo una fracción de ellos es capaz de llegar al cerebro. Esto último provoca diversos efectos secundarios en el paciente, como náuseas, vómito y diarrea [11]. Es por ello que, para mejorar la eficacia del tratamiento del AD y lograr la disminución de los efectos secundarios, resulta necesario la formulación de nuevos sistemas que conduzcan de forma dirigida la droga al cerebro y controlen su liberación.

Una de las formas más modernas para la dosificación de drogas en el SNC es el uso de sistemas de liberación controlada de fármacos, los cuales son capaces de dirigirse a un sitio específico del cuerpo. Entre éstos, se pueden mencionar diversas nanopartículas que actúan como nanoacarreadores del fármaco tales como los dendrímeros, liposomas, fullerenos, partículas magnéticas, micelas y nanopartículas poliméricas. Dichos sistemas han demostrado tener el potencial de liberar y aumentar la concentración de los fármacos en el cerebro, lo cual es sumamente importante en el desarrollo de nuevos tratamientos dirigidos al SNC [8,11].

1.3 Nanopartículas como sistemas de liberación controlada de fármacos

Las nanopartículas (NPs) generalmente varían de tamaño de 1 a 100 nm y se obtienen a partir de diversos materiales, ya sea de origen natural o sintético [12]. Se ha observado que las NPs tienen la capacidad de transportar diversos fármacos, incrementar la concentración local de éstos y controlar su perfil de liberación; de esta manera es posible proveer al organismo de medicamentos de manera controlada, incrementando su efecto terapéutico y minimizando los efectos secundarios [13]. Esto último puede traer beneficios inmediatos a la investigación y a la práctica de la medicina, así como una mejora en la calidad de vida de las personas, al incrementar la precisión y efectividad de los tratamientos.

Las nanopartículas usadas como sistemas de liberación de fármacos pueden clasificarse como nanopartículas lipídicas, inorgánicas y poliméricas; todas ellas se describen a continuación.

- Nanopartículas Lipídicas: partículas hechas de lípidos y agua, también conocidas como liposomas, las cuales tienen una estructura formada por una bicapa de fosfolípidos. Son

sistemas biocompatibles capaces de transportar fármacos y dirigirlos al sitio de acción, sin embargo, tienen una baja capacidad de encapsulación y fuga del fármaco, por lo que su desarrollo ha sido limitado [14].

- Nanopartículas Inorgánicas: son estructuras a las que se ha minimizado su uso en aplicaciones biomédicas debido a cuestiones de toxicidad, sin embargo, éstas poseen buenas propiedades ópticas, eléctricas y físicas. Ejemplos de este tipo de estructuras son los nanotubos de carbono, metales y óxidos metálicos [15].
- Nanopartículas Poliméricas: ofrecen una buena estabilidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad, así como la capacidad de proteger y transportar fármacos. Debido a las características anteriores, se han utilizado nanopartículas a base de polímeros para evaluar su posible aplicación como sistemas de liberación controlada de fármacos. Entre ellas se encuentran nanoestructuras como los dendrímeros, las nanoesferas y las nanocápsulas [12,16].

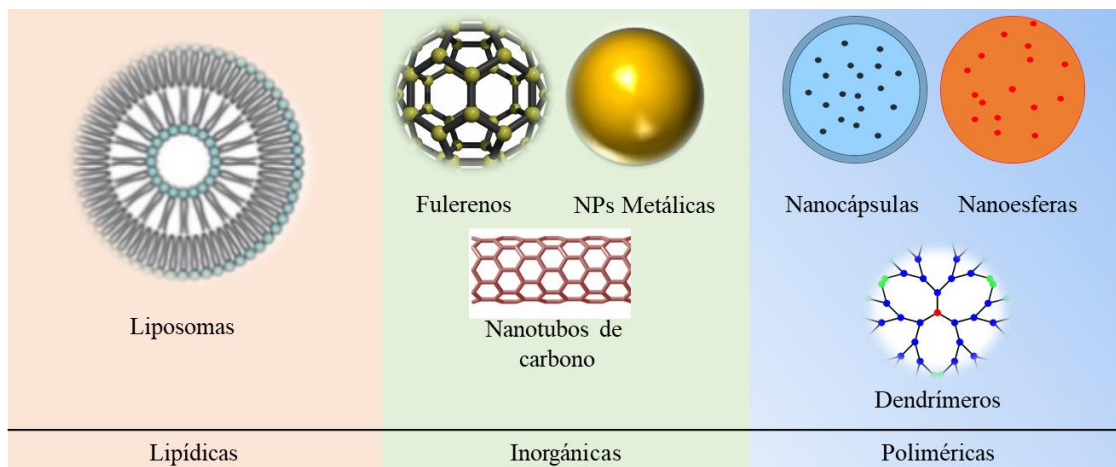


Figura 1. 4. Clasificación de las nanopartículas utilizadas como sistemas de liberación controlada de fármacos.

1.4 Nanopartículas poliméricas como sistemas de liberación de fármacos

Un polímero utilizado para liberar fármacos debe ser químicamente inerte, no tóxico y estar libre de impurezas; poseer una estructura física apropiada, con un envejecimiento mínimo no deseado y ser fácilmente detectable. Los polímeros utilizados para preparar nanopartículas pueden ser obtenidos a partir de métodos sintéticos, como el poli(ácido láctico) (PLA), o provenir de la naturaleza, como los polisacáridos (por ejemplo, el quitosano y el colágeno) [19,20]. Varios de estos polímeros han sido sometidos a mejoras en sus procesos de manufactura, o se les ha realizado

funcionalizaciones, para ser utilizados de forma efectiva como sistemas de liberación de fármacos [18].

Las nanopartículas poliméricas deben poseer ciertas características fisicoquímicas y morfológicas para desempeñarse correctamente como sistemas de liberación de fármacos; algunas de las propiedades de la partícula que deben de tomarse en cuenta son las siguientes:

- Interacción con fármacos: algunas de las propiedades de las partículas que influyen en la carga del fármaco son la composición, el tamaño y la carga superficial [23]. Además, el polímero con el que se sintetiza la nanopartícula puede ser modificado de forma química, para que su interacción con el compuesto activo sea más efectiva, y de esta manera sean aptos para ser utilizados como DDS [18].
- Peso molecular (PM) del polímero: es un parámetro que afecta de manera directa, tanto al tamaño de las NPs obtenidas, como a la eficiencia de encapsulación del fármaco. Por ejemplo, los polímeros con un PM alto generarán partículas con un mayor tamaño y, por lo tanto, un mayor espacio disponible para encapsular fármacos; en contraste, si las partículas se obtienen a partir de polímeros con PM medio o bajo, tanto el tamaño de la partícula como la eficiencia de encapsulación se reducirán. A pesar de lo anterior, se suelen utilizar en la mayoría de los casos polímeros con pesos moleculares bajos para obtener partículas con un tamaño aproximado de 100 nm, ya que estas nanopartículas logran depositarse eficazmente en un mayor número de tejidos, aunque la cantidad de fármaco encapsulado no sea muy grande [26].
- Tamaño promedio de partícula: al poseer dimensiones nanométricas, las partículas tienen la capacidad de ser capturadas por varios tipos de células y de penetrar microcapilares, epitelios, tumores o vasos sanguíneos. Además, el tamaño puede ser un factor importante para el tejido al que se dirige la liberación del medicamento; las más pequeñas (<20-30nm) se eliminan por excreción renal; las que tienen un tamaño de 30-150 nm se almacenan en la médula ósea, el cerebro, el corazón, el riñón y el estómago; las de 150-300 nm, en el hígado y vaso; mientras que las nanopartículas de más de 300 nanómetros (>300 nm) son absorbidas por los fagocitos [22]. Finalmente, el tamaño de partícula puede influir en la cantidad de fármaco cargado y en el perfil de liberación del mismo. Por lo antes mencionado, las NPs poliméricas con tamaños de 10 a 200 nm son altamente estudiadas

con el fin de liberar fármacos de manera controlada, ya que, si las partículas se encuentran cargadas con algún tipo de fármaco, éstas podrán entregarlo y acumularlo en el tejido que se pretenda [24,25].

- Carga en la superficie: es un parámetro que se mide a partir del potencial zeta (PZ) de la partícula, el cual está influenciado por la composición química de la misma, sus grupos funcionales y el medio en el que se encuentran dispersas. Este potencial eléctrico determina varias propiedades como la solubilidad de las nanopartículas y su estabilidad en suspensión. Además, el PZ puede ser utilizado para determinar si la molécula del fármaco se encuentra cargada en el centro de la nanopartícula, o en su superficie [27,28].

Como se mencionó anteriormente, las nanopartículas poliméricas pueden ser nanoesferas o nanocápsulas. Las nanoesferas (Figura 1.5a) son sistemas de tipo matricial, es decir, partículas cuya masa es sólida y el fármaco está uniformemente distribuido, ya sea en el interior de la matriz o en su superficie, mientras que una nanocápsula (Figura 1.5 b) es un sistema vesicular que actúa como un reservorio, en el que el fármaco se encuentra atrapado en una cavidad que consiste en un núcleo líquido interior, rodeado por una pared polimérica sólida [21].

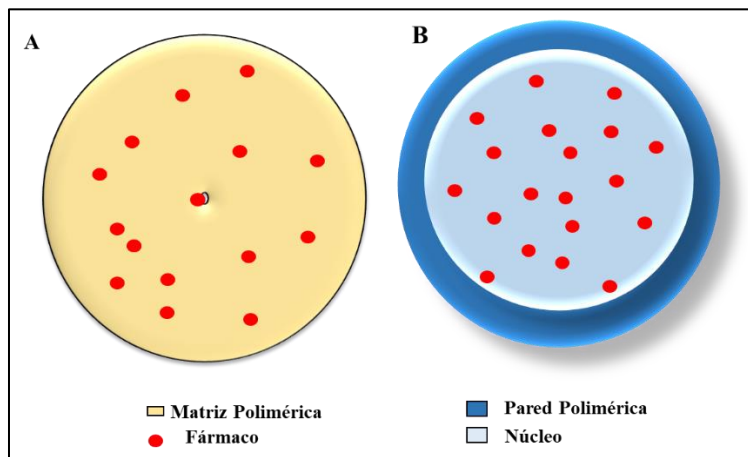


Figura 1. 5. Nanopartículas poliméricas: a) nanoesfera, b) nanocápsula.

Generalmente, el fármaco es disuelto, atrapado y cargado en la matriz o núcleo de la partícula y, el método con el que se realice la carga dependerá del tipo de partícula (nanoesfera o nanocápsula) a la que se le pretenda añadir el compuesto activo, el cual no requiere de modificaciones químicas para ser incorporado [21].

La carga del fármaco se realiza aplicando uno de los siguientes métodos: adsorción o absorción. En el primero de ellos, el compuesto activo se incorpora cuando se realiza la síntesis de la nanopartícula, mientras que, en el segundo, la carga se lleva a cabo después de la formación de ésta. La capacidad de carga del fármaco, así como la eficiencia de atrapamiento, dependerá de la solubilidad del fármaco en la matriz del material excipiente (polímero sólido o disperso en un líquido), el peso molecular del polímero, las interacciones fármaco-polímero y la presencia de grupos funcionales en el fármaco o matriz polimérica (i.e., éster o carboxilo) [24].

1.5 Quitosano

El quitosano (CS) es un polisacárido lineal, obtenido por la desacetilación alcalina de la quitina, la cual es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, solo después de la celulosa; generalmente se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos y en las paredes celulares de los hongos. Químicamente es un polisacárido compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, unidas por enlaces 1-4-β-glucosídicos. Es un biopolímero utilizado para preparar nanopartículas debido a su carácter catiónico, y en su estructura (ver Figura 1.6) tiene un grupo amino (NH_2) y dos hidroxilos (OH) libres, los cuales le da al quitosano la capacidad de formar puentes de hidrógeno y enlaces químicos o físicos [28,29].

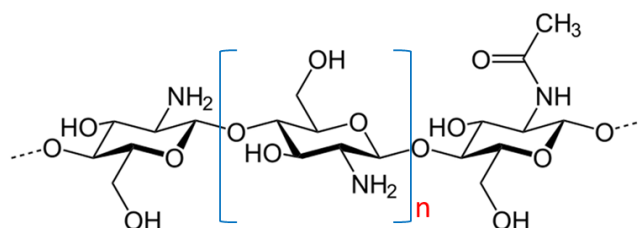


Figura 1. 6. Estructura química del quitosano.

De manera comercial, el quitosano posee un peso molecular promedio en el intervalo de 3.8×10^3 a 2×10^6 Daltons (Da) y un grado de desacetilación (GD) que es proporcional al número de los residuos de glucosamina del 66 al 100% [30,31]. Es altamente insoluble en agua por lo que debe ser solubilizado en soluciones ácidas diluidas, antes de usarlo [32].

El quitosano reacciona como un cuerpo extraño cuando es implantado en tejidos, aunque el grado de esta reacción está en función de la morfología de las partículas obtenidas a partir de este polímero (i.e. nanopartículas, fibras). Las propiedades morfológicas del quitosano están en función

de su método de obtención, pero también dependen del PM y el GD del polímero, ya que estos parámetros denotan la cantidad de grupos funcionales que están disponibles para interactuar con otros sistemas [33].

El quitosano puede ser degradado por agua (hidrolizado) o por medio de lisozimas, por lo que es considerado un material biodegradable, y sus residuos resultan ser no tóxicos. También posee propiedades antimicrobianas y efectos estimulantes en la cicatrización de heridas, aunque al ser implantado en algún tejido no se puede evitar inducir reacciones inflamatorias [34,35]. Además, tiene una fuerte adhesión a la mucosa, por lo que se administra al cuerpo de forma oral, pulmonar o nasal; esto ocurre por la interacción de los grupos aminos (cargas positivas) que lo conforman, con la mucosa que está cargada negativamente [36]. Sus fuerzas moleculares formadas por interacciones electroestáticas entre la carga positiva del quitosano y la carga negativa de las superficies mucosas son atribuidas a: i) los puentes de hidrógeno causados por los grupos $-OH$ y $-NH_2$; ii) el peso molecular y iii) la suficiente flexibilidad de cadena [37-39].

1.6 Obtención de nanopartículas de quitosano cargadas con fármacos (Antecedentes).

Las nanopartículas de quitosano (NPs-CS) pueden ser sintetizadas por medio de dos técnicas diferentes: “de abajo hacia arriba” (Bottom-up) o “de arriba hacia abajo” (Top-down). La primera consiste en el ensamblaje de átomos o moléculas, ya sea por enlaces físicos o químicos, que en conjunto formarán la nanoestructura. En la segunda se utiliza la descomposición de compuestos de mayor tamaño por medio de fuerzas químicas o físicas, hasta llegar a la nanoescala [40]. Existen diferentes métodos reportados en la literatura para la preparación de las NPs-CS por Bottom-up, tales como la co-precipitación, reticulación química, emulsificación y gelación iónica.

El método que se ha encontrado con más frecuencia en la literatura para la obtención de nanopartículas de quitosano ha sido el de gelación iónica, el cual fue propuesto por Calvo et al., 1997 [41]. En este método se utilizan polímeros hidrofílicos que se disuelven en una solución acuosa, y posteriormente se induce la gelación en la solución resultante. El proceso de gelación se logra con el uso de agentes de entrecruzamiento y se lleva a cabo mediante la reticulación iónica intermolecular, entre las cadenas cargadas positiva y negativamente [42]. En la síntesis de NPs-CS por gelación iónica, el quitosano se disuelve en una solución ácida para lograr la protonación de los grupos aminos (Figura 1.6 a), los cuáles interactuarán con el entrecruzante. El agente de

entrecruzamiento más utilizado para la obtención de NPs-CS es el tripolifosfato de pentasodio (TPP), el cual es una molécula cargada negativamente (Figura 1. 7 b) que se encuentra disuelto en agua. A diferencia de los otros métodos mencionados, el de gelación iónica resulta sencillo y económico [43-45].

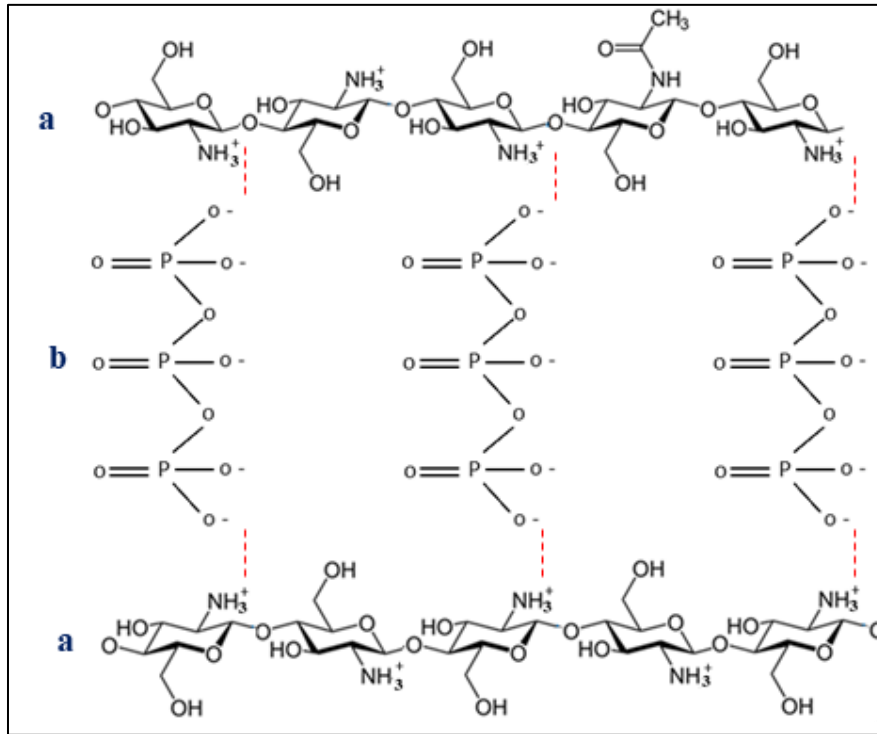


Figura 1. 7. Entrecruzamiento iónico entre el a) quitosano protonado y el b) tripolifosfato de sodio.

Una desventaja de usar polímeros naturales como el quitosano para preparar NPs, es la variabilidad en las propiedades de las partículas obtenidas (tamaño, forma, potencial zeta, entre otras), por lo que la determinación del efecto de las variables involucradas durante la gelación iónica resulta fundamental. Algunos de los factores que afectan las propiedades de las partículas son: las concentraciones del polímero y el entrecruzante, al igual que su razón de masas; el peso molecular del polímero, la forma de agitación y el pH del sistema [46].

Se ha observado que el tamaño de las nanopartículas depende en gran medida de la concentración de las soluciones acuosas del CS y del TPP. Fathalla et al. [47] detectó que el tamaño de las NP-CS se reducía si la concentración de CS disminuía. Asimismo, Hanafy et al. [48] determinó que la formación de NPs-CS ocurría en concentraciones de TPP por debajo de 1.5 mg/ml; mientras que

Fan et al. [27], sugiere que, para evitar la formación de micropartículas y agregados, la solución de CS utilizada debe estar por debajo de 2 mg/ml. Además, Pan et al [49], observó que existía la formación de NPs-CS cuando las concentraciones de CS y TPP estaban en un rango de 0.9-3 mg/ml y 0.3-0.8 mg/ml respectivamente.

Respecto al peso molecular (PM) del quitosano, en la investigación hecha por Jin et al. [43] se reportó que el tamaño de las NPs-CS disminuía cuando el PM del CS se reducía. Este mismo comportamiento fue descrito por Wu et al. [50] quienes además detectaron que no existía un cambio significativo de otras propiedades fisicoquímicas de las NPs-CS, como potencial zeta con respecto al PM del CS.

Los estudios presentados tienen como denominador común la obtención de NPs-CS con propiedades fisicoquímicas y morfológicas adecuadas, por medio de la variación de algún parámetro durante su obtención, ya sea las concentraciones de las soluciones de CS y TPP, o bien, el peso molecular del CS; sin embargo, no se han realizado trabajos que estudien estas variables de forma simultánea.

Particularmente, al utilizar el método de gelación iónica, la carga del fármaco se lleva a cabo durante la formación de las nanopartículas de quitosano [51]. Para ello se disuelve el compuesto activo en la solución acuosa del quitosano, para promover la complejación polímero-fármaco, y posteriormente se agrega el TPP para que ocurra el entrecruzamiento iónico entre las moléculas del CS y el TPP; de esta manera se generará la partícula cargada [48,52]. El proceso antes descrito se ilustra en la Figura 1.8.

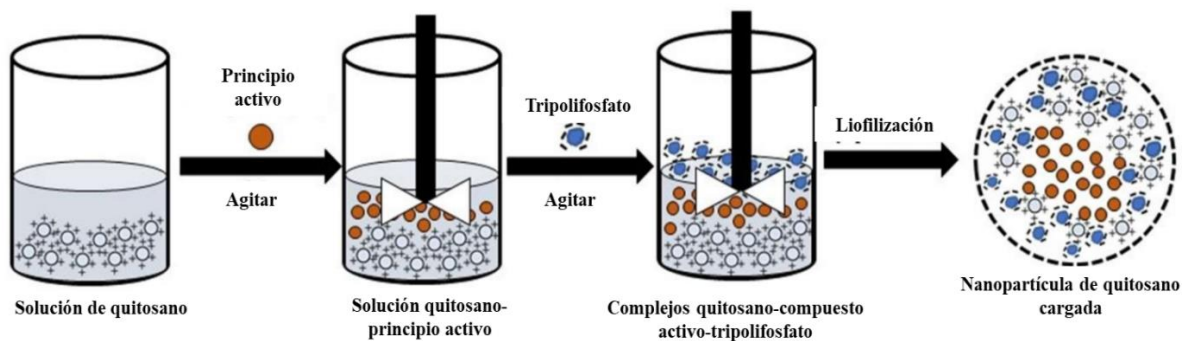


Figura 1. 8. Carga del fármaco durante el proceso de gelación iónica. Imagen tomada y adaptada de [46].

1.7 Nanopartículas de quitosano para la liberación de fármacos en el cerebro

Las nanopartículas de quitosano (NPs-CS) son consideradas como excelentes transportadoras de fármacos (drogas), debido a las propiedades intrínsecas que posee este biopolímero, tales como: biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioactividad y una baja toxicidad; además este tipo de partículas son de fácil preparación [53].

Por otro lado, las nanopartículas hechas a base de quitosano tienen la capacidad de proteger a la droga cargada, transportarla a través de la barrera hematoencefálica y aumentar la concentración de ésta en el cerebro durante prolongados periodos de tiempo [54]. Asimismo, se ha observado que al utilizar NPs-CS como transportadoras de drogas a través de la BBB, se obtienen efectos neuroprotectores y una mejoría en las funciones cognitivas, por lo que se cree que es un candidato ideal para tratar y prevenir algunos síntomas de la enfermedad del Alzheimer [55].

También se ha reportado que las NPs-CS han liberado de forma sostenida diversos tipos de fármacos en el cerebro; entre éstos se pueden mencionar a la piperina, la rivastigmina y el hidrobromuro de galantamina [48, 36-58]. De manera particular, el hidrobromuro de galantamina (GH) (ver Figura 1.9) es el fármaco que se utilizó en este trabajo, ya que es uno de los fármacos más utilizados para retardar la progresión de la enfermedad del Alzheimer y el Parkinson; además se ha comprobado que esta molécula logra una biodisponibilidad (capacidad de ser absorbida por el cuerpo) del 90 al 100%, aunque su efectividad decrece significativamente debido a que tiene una baja penetración en la barrera hematoencefálica y por lo tanto una baja concentración en el tejido cerebral [59].

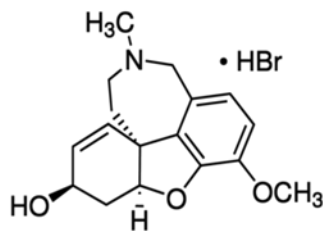


Figura 1. 9. Estructura química del hidrobromuro de galantamina (GH).

Como se ha mencionado anteriormente, el GH ya ha sido cargado en NPs-CS; sin embargo, han existido problemas durante su incorporación debido a que, tanto el CS como el fármaco poseen naturaleza catiónica cuando ambos se encuentran en un medio ácido. En consecuencia, se presenta una baja eficiencia de encapsulación de la molécula del fármaco en las NPs-CS y, para

incrementarla, se ha optado por la formación de complejos entre el quitosano y el hidrobromuro de galantamina (ver Figura 1.10) antes de la formación de las NPs, tal y como reportaron Hanafy et al [48]. Además, James et al [52] propusieron este mismo procedimiento al incorporar otra droga catiónica a las NPs-CS.

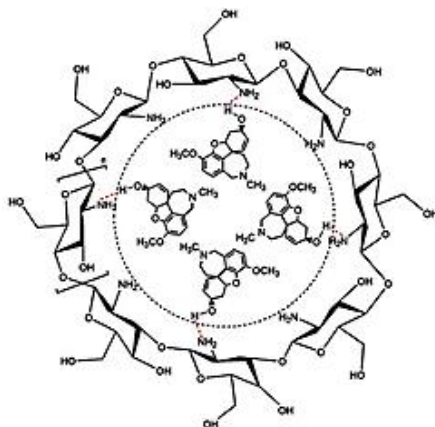


Figura 1. 10. Formación de complejos entre el quitosano y el hidrobromuro de galantamina. Imagen tomada de Hanafy et al. [25].

Como se puede observar de la literatura citada, son muy pocos los estudios en los cuales se describa la interacción del hidrobromuro de galantamina con las NPs-CS, por lo que aún no existe un comportamiento claro de la encapsulación del GH en las NPs-CS y una modelación de la cinética de liberación de la droga.

Con base en los antecedentes expuestos, este trabajo tuvo como objetivo sintetizar NPs-CS esféricas, con un diámetro en el intervalo de 50-200 nm. Para obtener las NPs-CS con las características antes mencionadas, se proponen condiciones experimentales de síntesis, derivadas del estudio de tres variables, en tres niveles: peso molecular del CS (bajo, mediano y alto); concentración del CS (1.0, 1.5, 2.0 mg/ml) y concentración del TPP (0.5, 0.75, 1.0 mg/ml). Posterior a esto, se eligió la condición óptima de síntesis y se sintetizaron NPs-CS cargadas con hidrobromuro de galantamina, para después determinar la eficiencia de carga del fármaco y realizar la modelación de la cinética de liberación *in vitro*.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El estudio de las tres variables involucradas en el proceso de síntesis de NP-CS (peso molecular del quitosano y concentraciones en solución acuosa del quitosano y tripolifosfato de pentasodio permitirá obtener nanopartículas de quitosano, cargadas con GH, con una morfología esférica y diámetros de 50-200 nm, con capacidad para cargar y liberar hidrobromuro de galantamina de manera controlada, en experimentos *in vitro*.

Objetivo general

Estudiar el efecto del peso molecular, la concentración del quitosano, así como la concentración del tripolifosfato de sodio, sobre la forma y tamaño de las nanopartículas obtenidas cargadas con hidrobromuro de galantamina.

Objetivos particulares

- Sintetizar nanopartículas de quitosano, mediante el método de gelación iónica, variando el peso molecular del quitosano y las concentraciones de quitosano y tripolifosfato de sodio.
- Caracterizar fisicoquímica y morfológicamente las nanopartículas de quitosano obtenidas, mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y análisis termogravimétrico (TGA).
- Preparar nanopartículas de quitosano cargadas con hidrobromuro de galantamina.
- Caracterizar las nanopartículas de quitosano cargadas con hidrobromuro de galantamina mediante FTIR, SEM, AFM y TGA.
- Estudiar la cinética de liberación del hidrobromuro de galantamina a partir de nanopartículas de quitosano, mediante espectrometría UV-Vis.
- Modelar la cinética de liberación del hidrobromuro de galantamina *in vitro* a partir de nanopartículas de quitosano.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales

En la preparación de las partículas se utilizaron tres tipos de quitosano (CS): de bajo (110 kDa), mediano (194 kDa) y alto (267 kDa) peso molecular. Para disolver el quitosano se empleó una solución de ácido acético glacial al 1% v/v con una pureza > 99%; el pH de la solución resultante se ajustó a 4.5 utilizando NaOH. Para la determinación del peso molecular del polímero se empleó una solución de acetato de sodio. Como agente entrecruzante se empleó el tripolifosfato de pentasodio (TPP). Por último, el fármaco que se cargó en las nanopartículas fue el hidrobromuro de galantamina (GH). Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma Aldrich Co. (USA).

2.2. Esquema general de trabajo

La metodología de este trabajo se puede dividir en tres etapas principales, las cuales se muestran en la Figura 2.1.

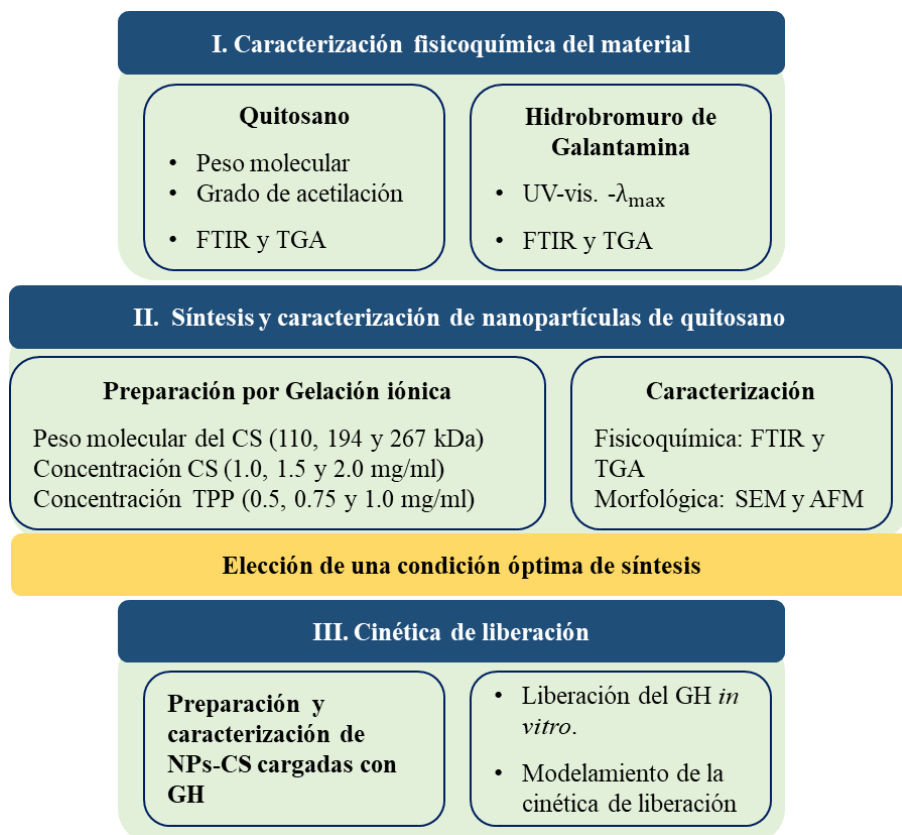


Figura 2. 1. Etapas principales del trabajo.

2.3 Caracterización del quitosano

2.3.1 Peso molecular

El peso molecular promedio viscoso (M_v) del quitosano se determinó por medio de la técnica de viscosimetría capilar. Para ello se utilizó un viscosímetro capilar tipo Ubbelohde No. 75, equipado con un baño termostático controlado por un recirculador de agua a 25.0 ± 0.1 °C. Las muestras de quitosano se prepararon utilizando un sistema de disolventes formado por ácido acético 0.3 M y acetato de sodio 0.2 M (pH 4.5). Las concentraciones del polímero fueron: 1.00 × 10⁻³, 8.69 × 10⁻⁴, 8.00 × 10⁻⁴, 7.40 × 10⁻⁴ y 6.66 × 10⁻⁴ g/ml. La viscosidad intrínseca [η] se determinó gráficamente utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Viscosidad relativa } [\eta_{\text{rel}}] = \frac{t}{t_0} \quad (2.1)$$

$$\text{Viscosidad intrínseca } [\eta_{\text{sp}}] = \eta_{\text{rel}} - 1 \quad (2.2)$$

$$\text{Viscosidad reducida } [\eta_{\text{red}}] = \frac{\eta_{\text{sp}}}{c} \quad (2.3)$$

$$\text{Viscosidad inherente } [\eta_{\text{inh}}] = \frac{\text{Ln}(\eta_{\text{red}})}{c} \quad (2.4)$$

Donde t es el tiempo en que fluye un volumen determinado de la disolución por el capilar del viscosímetro, t_0 es el tiempo de paso del disolvente y C es la concentración de la disolución.

Posteriormente, se aplicaron las ecuaciones de Huggins y Kraemer, las cuales generan dos líneas rectas que, extrapoladas a cero coinciden con el parámetro viscosimétrico [η] [60]. Este parámetro se conoce como viscosidad intrínseca y está directamente relacionado con el peso molecular del polímero en disolución.

$$\text{Ecuación de Huggins} \quad [\eta_{\text{red}}] = \frac{\eta_{\text{sp}}}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2c \quad (2.5)$$

$$\text{Ecuación de Kramer} \quad [\eta_{\text{inh}}] = \frac{\text{Ln}(\eta_{\text{sp}})}{c} = [\eta] - k_K[\eta]^2c \quad (2.6)$$

Donde k_H y k_K son constantes que dependen del tipo de polímero, disolvente y temperatura.

Una vez determinada [η], ésta se utilizó para calcular el peso molecular promedio viscoso, a partir de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada.

$$M_v = \left(\frac{[\eta]}{k} \right)^{\frac{1}{\alpha}} \quad (2.7)$$

Donde K y α son dos constantes que dependen del sistema tampón. Los valores para K y α utilizados en este trabajo se reportan en la sección 3.1.1.

2.3.2 Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de infrarrojo de los tres tipos de quitosano fueron obtenidos utilizando un equipo Thermo Scientific Nicolet 8700, mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés) usando un cristal de Ge. El estudio se realizó en un intervalo de número de onda de 4000-650 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y un promedio de 50 barridos.

2.3.3 Grado de desacetilación

Para determinar el grado de desacetilación (GD) del quitosano, se realizó un estudio cuantitativo a partir de los espectros infrarrojos obtenidos (en modo de absorbancia), siguiendo el método propuesto por Brugnerotto y colaboradores [61]. Como primer paso se calculó el grado de N-acetilación; para ello se determinaron las áreas bajo la curva de la banda característica del grupo amida III (1310 cm^{-1}) y como referencia se utilizó la banda de los grupos metilo (1380 cm^{-1}), posteriormente se aplicó la siguiente ecuación empírica:

$$\text{Grado de N-acetilación (\%)} = 31.92 \left(\frac{A_{1310}}{A_{1380}} \right) - 12.2 \quad (2.8)$$

Donde A_{1310} y A_{1380} son las áreas bajo la curva de las bandas en 1310 y 1380 cm^{-1} respectivamente; y 31.92 y 12.2 son los valores de la pendiente y ordenada al origen de una recta construida de forma experimental por [61].

Finalmente, el grado de desacetilación (GD) fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de desacetilación (\%)} = 100 - \text{Grado de N-acetilación} \quad (2.9)$$

2.3.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

El ensayo sirvió para determinar los eventos de degradación térmica del quitosano puro, y posteriormente compararlos con los del quitosano entrecruzado. Los experimentos se llevaron a cabo en un equipo Perkin Elmer TGA-7 en un intervalo de temperatura de 50 °C a 650 °C, con una

tasa de calentamiento de 10 °C/min, bajo una atmósfera de nitrógeno; para ello, se utilizaron muestras de 10 mg.

2.4 Caracterización del hidrobromuro de galantamina

El fármaco se caracterizó fisicoquímicamente por medio de las técnicas de FTIR y TGA. Los espectros de infrarrojo y los eventos de degradación térmica se obtuvieron utilizando los métodos mencionados anteriormente para caracterizar al quitosano, utilizando las mismas condiciones de análisis. Los ensayos tuvieron la finalidad de identificar la presencia del hidrobromuro en las partículas de quitosano por medio de las bandas características de su espectro IR y sus picos de degradación térmica.

Con la finalidad de obtener la longitud de onda de absorción máxima (λ_{\max}) del hidrobromuro de galantamina, se preparó una solución madre con 10 mg del fármaco diluidos en 10 ml agua destilada, es decir a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El barrido de λ se llevó a cabo en un intervalo de longitud de onda de 200 a 500 nm, en un espectrofotómetro UV-vis marca A&E Lab modelo AE-UV1608. Se obtuvieron dos diferentes longitudes de onda máximas a 272 y 238 nm (ver Figura 2.2). Para la cuantificación del GH, en este trabajo se utilizó el pico de absorción $\lambda_{\max} = 272$ nm, el cual es el valor cercano a los estudios de liberación de GH realizados por Hanafy col [25]. y Sidra col [62].

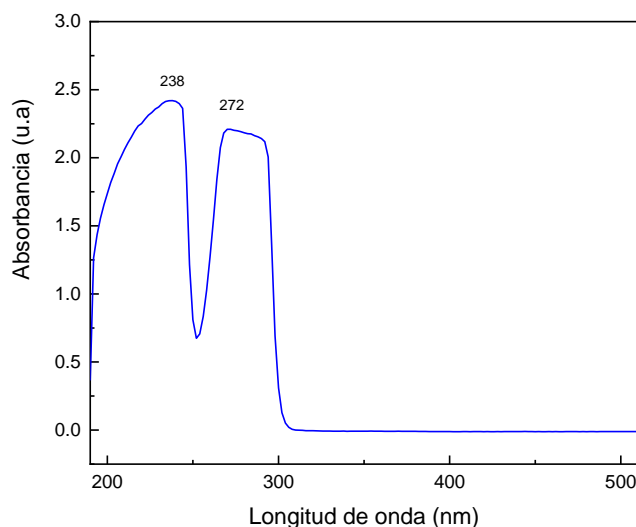


Figura 2. 2. Espectro UV-vis de una solución de hidrobromuro de galantamina/agua destilada.

Posterior a la obtención de la λ_{\max} del GH, se construyó una curva de calibración para cuantificar el fármaco presente en sobrenadantes. Para ello se utilizó como blanco (referencia) el agua destilada y se prepararon, a partir de la solución madre, disoluciones que contenían 10, 20, 30, 40, 50, 60, y 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de GH en agua destilada y se determinaron sus respectivas absorbancias. El coeficiente de correlación (r^2) tuvo un valor de 0.998 y fue calculado por el equipo de espectroscopia UV-vis utilizando la técnica de mínimos cuadrados.

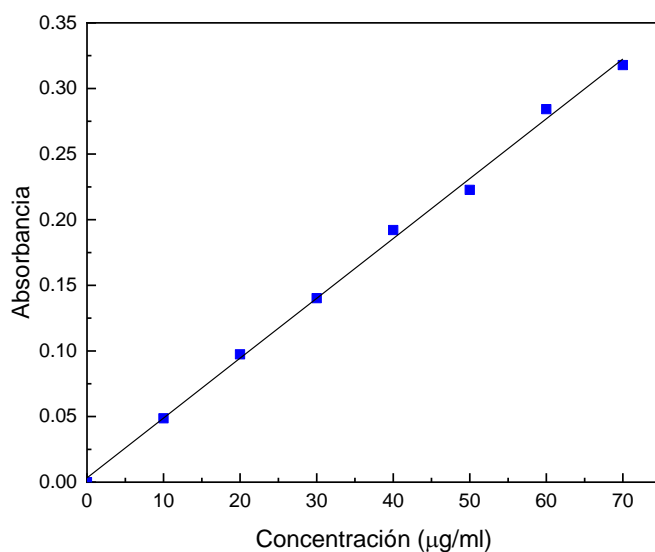


Figura 2. 3. Curva de calibración para la cuantificación del hidrobromuro de galantamina en sobrenadantes.

2.5 Preparación de las partículas de quitosano

La preparación de partículas de quitosano (NPs-CS) se realizó utilizando el método de gelación iónica, reportado por Calvo et al. [41]. Para protonar los grupos amino, se disolvió cierta cantidad de CS (10, 15, 20 mg) en 10 ml de una solución acuosa de ácido acético glacial al 1% v/v, empleando una parrilla de agitación magnética hasta obtener una solución homogénea. Después se le ajustó el pH a 4.5 agregando gota a gota una solución 5N de NaOH y se filtró con papel whatman. En un recipiente diferente, se disolvió tripolifosfato de pentasodio (0.5, 7.5 y 1.0 mg) en 10 ml agua destilada y, posteriormente, se añadió gota a gota 4 ml de la solución resultante a 10 ml de la disolución de quitosano preparada anteriormente, con la finalidad de inducir la reticulación iónica

y formar las nanopartículas. Este proceso se llevó a cabo bajo agitación magnética a 1200 rpm por 30 minutos. El proceso antes descrito, se representa en la Figura 2.4

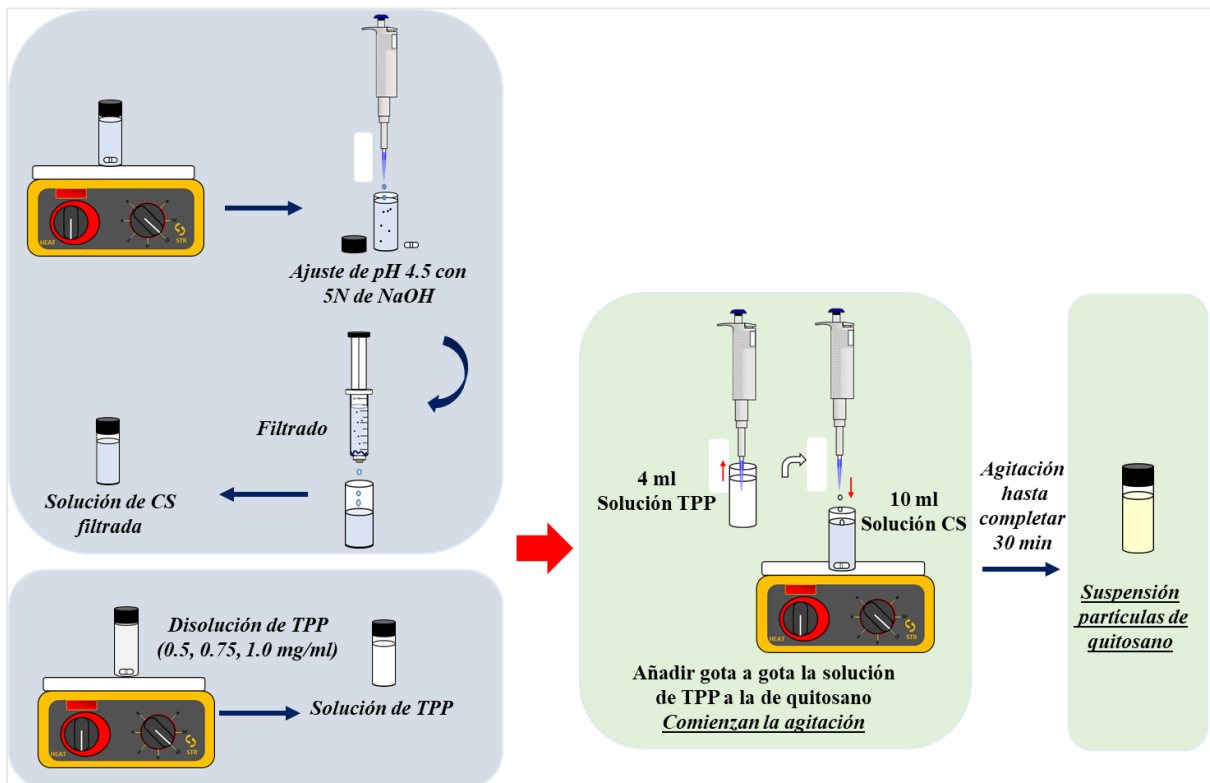


Figura 2. 4. Representación esquemática de la preparación de las partículas de CS por gelación iónica.

Para poder caracterizar las nanopartículas de quitosano obtenidas, las suspensiones resultantes se congelaron y posteriormente liofilizaron en un equipo LABCONCO modelo 4.5 FreeZone durante 96 horas (-53°C, los estudios de caracterización posteriores se llevaron a cabo con partículas en estado sólido.

Con respecto a las concentraciones de las soluciones de CS y TPP utilizadas, se eligieron tomando en cuenta los valores reportados como adecuados en la literatura para la formación de NPs-CS. Dichas concentraciones de CS y TPP se encontraban en un intervalo de 1 mg/ml - 2 mg/ml y 0.5 mg/ml - 1 mg/ml respectivamente [63-65]. Además, se utilizaron tres tipos de quitosano con diferente peso molecular: bajo, mediano y bajo (110, 194 y 267 kDa respectivamente).

Por lo tanto, en este trabajo se estudió el efecto de tres variables en tres niveles: peso molecular de quitosano: bajo, mediano y alto: 110, 194, 267 kDa respectivamente; concentración del quitosano

en solución acuosa (1, 1.5 y 2 mg/ml) y concentración del tripolifosfato (0.5, 0.75 y 1.0 mg/ml) sobre las propiedades fisicoquímicas y morfológicas de las partículas. Con base en los parámetros antes mencionados, se propusieron veintisiete condiciones experimentales de síntesis, las cuales se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2. 1. Condiciones de síntesis de las nanopartículas de quitosano

	Formulación	Concentración CS (mg/ml)	Concentración TPP (mg/ml)
Quitosano de bajo peso molecular (110 kDa)	L1	1.0	0.5
	L2		0.75
	L3		1.0
	L4	1.5	0.5
	L5		0.75
	L6		1.0
	L7	2.0	0.5
	L8		0.75
	L9		1.0
Quitosano de mediano peso molecular (194 kDa)	M1	1.0	0.5
	M2		0.75
	M3		1.0
	M4	1.5	0.5
	M5		0.75
	M6		1.0
	M7	2.0	0.5
	M8		0.75
	M9		1.0
Quitosano de alto peso molecular (267 kDa)	H1	1.0	0.5
	H2		0.75
	H3		1.0
	H4	1.5	0.5
	H5		0.75
	H6		1.0
	H7	2.0	0.5
	H8		0.75
	H9		1.0

2.6 Caracterización fisicoquímica y morfológica de las partículas de quitosano

2.6.1 Caracterización fisicoquímica

Las partículas de quitosano se caracterizaron fisicoquímicamente por medio de las técnicas de FTIR y TGA. Los espectros de infrarrojo y las curvas de degradación térmica se obtuvieron utilizando los métodos antes mencionados para caracterizar el quitosano, utilizando las condiciones descritas en las secciones 2.3.2 y 2.3.4. Los ensayos tuvieron la finalidad de determinar la existencia de interacciones entre el quitosano y el tripolifosfato de sodio y la posible formación de la nanopartícula.

2.6.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con el propósito de observar la morfología y el tamaño de las partículas obtenidas, se utilizó un microscopio JEOL JSM 6360 LV, con un voltaje de 20 kV. Para esto, el medio de reacción resultante fue diluido de la siguiente manera: se tomaron 0.5 ml de la solución de partículas de CS y se agregaron a 4.5 ml de agua destilada (la cual tenía un pH de 4.5 para que sea igual a la de la solución de las partículas de CS y éstas no precipiten). La suspensión obtenida se sonicó durante 5 min en un equipo Branson (110W, 40 kHz). Lo anterior sirvió para dispersar las nanopartículas y evitar la aglomeración de éstas. Posteriormente se colocó una gota de la suspensión diluida de las partículas de CS en un portamuestras cubierto con cinta de carbono y se dejó evaporar para después metalizarla con oro antes del análisis.

2.6.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Con el fin de observar las nanopartículas obtenidas, se realizó microscopía de fuerza atómica. Para esto, el medio de reacción se diluyó de la misma forma que la descrita en la prueba de SEM. Después se tomó una gota de la suspensión obtenida y se depositó sobre un sustrato de silicio adherido al porta-muestras y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se realizó el análisis topográfico de las muestras a temperatura ambiente, en atmósfera de aire, utilizando un microscopio Bruker INNOVA, en modo tapping, con una frecuencia de 300 kHz. Se utilizó una sonda con un tamaño de punta de 8 nm, aplicando un torque de 40 N/m y una frecuencia de escaneo de 0.5 Hz, en áreas de 10 x 10 micras cuadradas y de 3 x 3 micras cuadradas.

2.7 Preparación de las nanopartículas de quitosano cargadas con GH

Las condiciones utilizadas para la síntesis de nanopartículas de quitosano cargadas con GH fueron las de la muestra L7, es decir, quitosano de bajo peso molecular (110 kDa), y concentraciones de CS y TPP de 2.0 y 0.5 mg/ml respectivamente; estos parámetros fueron los óptimos para obtener nanopartículas con un tamaño de 170 nm.

La preparación de las NPs-CS cargadas con GH se llevó a cabo en dos etapas; en la primera, se formaron complejos entre el quitosano y el fármaco, y en la segunda, se realizó el entrecruzamiento iónico entre el polímero y el tripolifosfato de sodio para formar la nanopartícula [48,52]. Para esto, se disolvieron 20 mg de CS en 10 ml de una solución acuosa de ácido acético glacial al 1% v/v, empleando una parrilla de agitación magnética. Después se le ajustó el pH a 4.5 agregando gota a gota una solución 5N de NaOH y se filtró con papel whatman. Una vez hecho esto, se añadió el hidrobromuro de galantamina (5 o 7 mg) a la disolución de CS y se dejó en agitación magnética durante 24 horas para la formación del complejo fármaco-polímero. En un recipiente diferente, se disolvieron 10 mg de tripolifosfato de pentasodio en 20 ml agua destilada, y posteriormente se añadió gota a gota 4 ml de la solución resultante a 10 ml de la disolución de quitosano-GH para inducir la reticulación iónica. Este proceso se llevó cabo bajo agitación magnética a 1200 rpm por 30 minutos. Por último, la suspensión resultante fue congelada y liofilizada durante 96 horas (-53 °C, 0.185 bar).

Como ya se mencionó anteriormente, en la formación de complejos se utilizaron dos cantidades diferentes de fármaco, es decir, dos distintas formulaciones, las cuales se nombraron de la siguiente manera: L7-5GH y L7-7GH para cantidades de hidrobromuro de galantamina de 5 y 7 mg respectivamente.

2.8 Estudios de liberación de hidrobromuro de galantamina

Se eligió agua destilada como el medio para realizar los estudios de liberación del hidrobromuro de galantamina a partir de las NPs-CS, esto debido a que Qi Lu y colaboradores [65] reportaron que, si se utilizaba una solución buffer fosfato salino (PBS), los iones fosfato provocaban la agregación de las NPs-CS cargadas con el fármaco. La cantidad de fármaco liberado y cargado se cuantificó utilizando la longitud de onda máxima del GH y la curva de calibración que se encuentra en la sección 2.4.

2.8.1 Eficiencia de atrapamiento y capacidad de carga

La eficiencia o porcentaje de atrapamiento (EA) se define como la diferencia entre la cantidad de fármaco inicial y la que no fue cargada, con respecto a la cantidad total de fármaco que se utilizó durante la preparación de la nanopartícula. Dicho parámetro puede calcularse de forma indirecta, por medio de la centrifugación de la suspensión de nanopartículas y la cuantificación del fármaco que se encuentra en el sobrenadante (fármaco libre o no cargado) [67]. Por otro lado, la capacidad de carga (CC) se define como la cantidad de droga cargada por unidad de peso de nanopartícula.

La eficiencia de atrapamiento y la capacidad de carga se determinaron de la siguiente manera. Las NPs-CS cargadas con GH que fueron obtenidas del proceso de liofilización (ver apartado 2.7), se re-suspendieron en agua destilada con un pH= 7.1, y posteriormente esta suspensión fue centrifugada a 6000 rpm (4 °C, 1.5 hr). El sobrenadante se retiró y se midió su absorbancia a una $\lambda_{\text{max}}=272$ nm, esto con la finalidad de determinar la cantidad de fármaco no cargado. El pellet se congeló y liofilizó de nuevo durante 96 h (-53 °C, 0.185 bar) con la finalidad de determinar la masa total de las nanopartículas cargadas con GH en estado sólido y realizar posteriormente la liberación del fármaco *in vitro*.

Los porcentajes de la EA y la CC se determinaron utilizando las siguientes ecuaciones:

$$EA = \frac{TD-FD}{TD} \times 100 \quad (2.10)$$

$$CC = \frac{TD-FD}{NW} \times 100 \quad (2.11)$$

Donde:

TD: cantidad total del fármaco

FD: cantidad del fármaco no cargado (libre en el sobrenadante)

NW: masa total de las nanopartículas cargadas con el fármaco

2.8.2 Estudios de liberación del fármaco *in vitro*

Las NPs-CS cargadas con GH que fueron recuperadas del pellet y posteriormente liofilizadas se re-suspendieron en 25 ml de agua destilada filtrada (pH 7.1), el cual fue el medio utilizado para

realizar los estudios de liberación *in vitro*. La suspensión de las nanopartículas cargadas con GH se colocó en un vial y se incubó en un baño de agua (37 ± 0.5 °C) con agitación mecánica (50 rpm). En intervalos regulares de tiempo, la muestra que contenía las nanopartículas fue centrifugada (4300 rpm, 5 min) y se retiraron 3 ml del sobrenadante (ese mismo volumen fue reemplazado con un medio de disolución fresco para mantener la condición de perfecta solubilidad del hidrobromuro de galantamina denominada *sink condition*). Después de esto, la muestra fue puesta nuevamente en incubación. Posteriormente, el sobrenadante se analizó de forma espectrofotométrica para determinar la cantidad de fármaco liberado. El tiempo total de la liberación *in vitro* fue de 72 horas y se siguió la metodología propuesta por Wahba S. y colaboradores [73]. El ensayo se muestra de forma esquemática en la Figura 2.5.

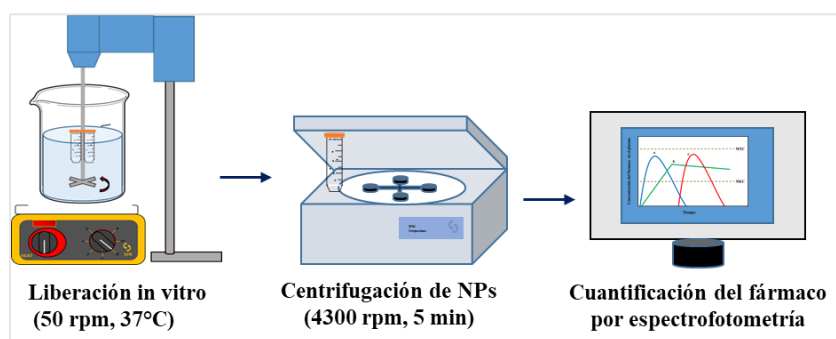


Figura 2. 5. Representación esquemática de la liberación *in vitro*.

2.8.3 Modelación de la cinética de liberación

Los datos obtenidos de la liberación de la galantamina se utilizaron para construir una gráfica donde se mostró la liberación acumulada (%) con respecto al tiempo (h). Posteriormente, la curva se ajustó a diferentes modelos matemáticos que describen el comportamiento de la cinética de liberación del fármaco (orden cero, primer orden, Higuchi, Hixon-Crowell y Korsmeyer-Peppas). El ajuste se realizó utilizando el Software de análisis de datos OriginPro2019. La descripción de los modelos y sus respectivas ecuaciones se encuentran en el apartado 3.4.4 del capítulo de resultados.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1 Caracterización fisicoquímica del quitosano

3.1.1 Peso molecular

En las Tablas 3.1, 3.2 y 3.3 se muestran los resultados obtenidos para la determinación del peso molecular de los tres tipos de quitosano: bajo (CS-L), mediano (CS-M) y alto (CS-H) respectivamente. En las mismas se resumen los tiempos de elución (t) medidos a 25 °C, durante la aplicación de la técnica de viscosimetría capilar, para las disoluciones del polímero en el sistema de disolventes seleccionado. Estos tiempos son el promedio de tres mediciones. Los parámetros viscosimétricos calculados, a partir de estos resultados, se pueden observar en las Tablas 3.4, 3.5 y 3.6 para CS-L, CS-M, CS-H, respectivamente.

Tabla 3. 1. Tiempos de elución para las disoluciones de CS-L.

Disolución	Concentración (g/ml)	Tiempo de elución (s)	Desviación estándar (SD)
1	1.00×10^{-3}	172.29	0.25
2	8.69×10^{-4}	163.32	0.67
3	8.00×10^{-4}	158.68	0.32
4	7.40×10^{-4}	154.68	0.32
5	6.66×10^{-4}	149.76	0.55
Disolvente	-	109.55	0.20

Tabla 3. 2. Tiempos de elución para las disoluciones de CS-M.

Disolución	Concentración (g/ml)	Tiempo de elución (s)	Desviación estándar (SD)
1	1.00×10^{-3}	214.71	0.18
2	8.69×10^{-4}	199.33	0.29
3	8.00×10^{-4}	191.06	0.36
4	7.40×10^{-4}	183.92	0.06
5	6.66×10^{-4}	175.12	0.12
Disolvente	-	109.55	0.20

Tabla 3. 3. Tiempos de elución para las disoluciones de CS-H.

Disolución	Concentración (g/ml)	Tiempo de elución (s)	Desviación estándar (SD)
1	1.00×10^{-3}	262.19	0.54
2	8.69×10^{-4}	238.34	0.37
3	8.00×10^{-4}	224.99	0.37
4	7.40×10^{-4}	214.62	0.27
5	6.66×10^{-4}	201.03	0.44
Disolvente	-	109.55	0.20

Tabla 3. 4. Parámetros viscosimétricos del CS-L a 25 ° C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L.

Disolución	Parámetros viscosimétricos					[η] (ml/g)
	η_{rel}	η_{sp}	Ln (η_{rel})	η_{sp}/c (ml/g)	Ln (η_{rel})/c (ml/g)	
1	1.57	0.57	0.45	572.78	452.84	504.41
2	1.49	0.49	0.39	564.83	459.54	
3	1.45	0.45	0.37	560.60	463.14	
4	1.41	0.41	0.34	556.67	466.19	
5	1.37	0.37	0.31	550.31	468.75	

Tabla 3. 5. Parámetros viscosimétricos del CS-M a 25 ° C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L.

Disolución	Parámetros viscosimétricos					[η] (ml/g)
	η_{rel}	η_{sp}	Ln (η_{rel})	η_{sp}/c (ml/g)	Ln (η_{rel})/c (ml/g)	
1	1.96	0.96	0.67	959.98	672.93	773.32
2	1.82	0.82	0.59	943.14	688.85	
3	1.74	0.74	0.55	930.12	695.29	
4	1.68	0.68	0.51	917.45	700.20	
5	1.60	0.60	0.46	897.43	703.32	

Tabla 3. 6. Parámetros viscosimétricos del CS-H a 25 ° C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L.

Disolución	Parámetros viscosimétricos					[η] (ml/g)
	η_{rel}	η_{sp}	Ln (η_{rel})	η_{sp}/c (ml/g)	Ln (η_{rel})/c (ml/g)	
1	2.39	1.39	0.87	1393.40	872.71	985.75
2	2.18	1.18	0.77	1352.92	894.53	
3	2.05	1.05	0.71	1317.24	899.61	
4	1.96	0.96	0.67	1296.21	908.82	
5	1.84	0.84	0.60	1252.08	910.22	

Los parámetros viscosimétricos calculados en este trabajo indican que existe una disminución de la viscosidad reducida η_{sp}/c para los tres tipos de quitosano, a medida que la concentración del polímero disminuye, siguiendo la expresión de Huggins. Mientras tanto, la viscosidad inherente exhibe un incremento para los tres tipos de CS a medida que la concentración del polímero disminuye, cumpliéndose la ecuación de Kraemer. La viscosidad intrínseca del polímero se calculó como el valor medio de las ordenadas al origen de las ecuaciones de Huggins y Kraemer extrapoladas a una concentración cero. Para ello, se graficaron las curvas de η_{sp}/c y Ln (η_{rel})/c en función de la concentración para CS-L, CS-M, CS-H y los resultados se muestran en las Figuras 3.1, 3.2 y 3.3, respectivamente.

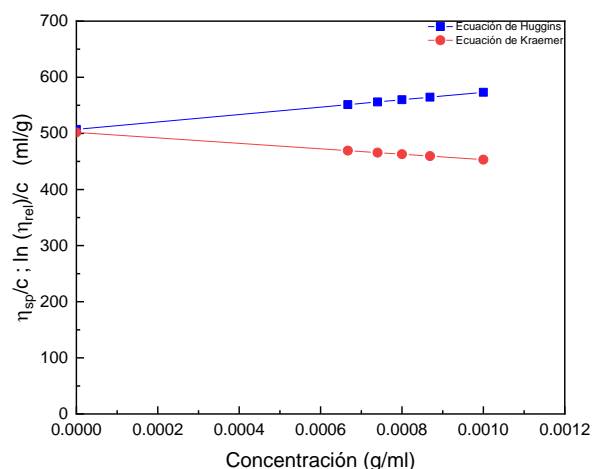


Figura 3. 1. Gráfica de Huggins y Kraemer a 25 °C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L para CS-L.

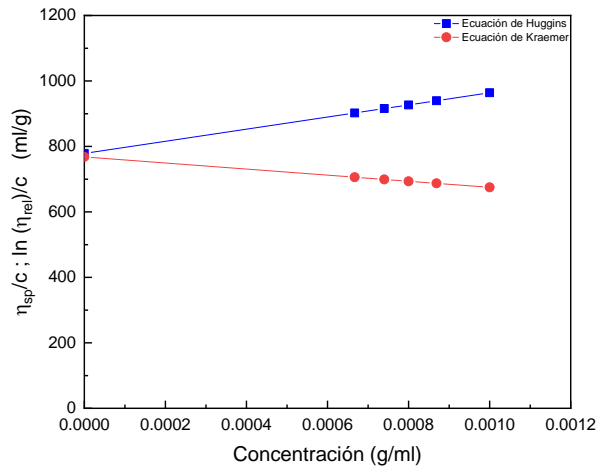


Figura 3. 2. Gráfica de Huggins y Kraemer, a 25 °C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L para CS-M.

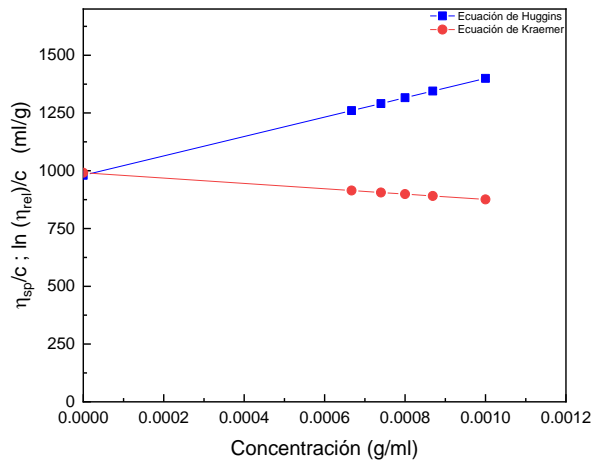


Figura 3. 3. Gráfica de Huggins y Kraemer, a 25 °C en ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L para CS-H.

A partir de los valores promedio obtenidos de las ordenadas al origen, se determinó la viscosidad intrínseca, $[\eta]$ obteniéndose los siguientes valores: 504.41, 773.32 y 985.75 ml/g para CS-L, CS-M, y CS-H respectivamente. Una vez conocida la viscosidad intrínseca del sistema polímero disolvente, pudo determinarse el peso molecular promedio viscoso del polímero mediante la ecuación 3.1.

Es importante mencionar que las constantes K y α reportadas en la literatura no tienen valores únicos para el quitosano como los tendría otro polímero, para un sistema polímero-disolvente-

temperatura dados, ya que se ha comprobado que la composición del CS, en términos de proporción de las unidades N-acetiladas en sus cadenas, afecta su comportamiento reológico en solución y, por lo tanto, las constantes antes mencionadas. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se utilizaron los valores para K (ml/g) y α reportados por Rinaudo M. y colaboradores [68]. Por lo tanto, para calcular el peso molecular promedio viscoso del quitosano con el disolvente y temperatura utilizados (ácido acético 0.3 mol/L y acetato de sodio 0.2 mol/L a 25 °C), se utilizó la Ecuación 3.1:

$$M = \left(\frac{[\eta]}{7.40 \times 10^{-2}} \right)^{\frac{1}{0.76}} \quad (3.1)$$

El peso molecular calculado para los quitosanos CS-L, CS-M y CS-H fue de 110,700; 194,234 y 267,312 g/mol respectivamente.

3.1.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos del quitosano en polvo con diferentes pesos moleculares CS-L (110 kDa), CS-M (194 kDa), CS-H (267 kDa) son presentados en la Figura 3.4. Como se puede observar, se aprecian señales ubicadas en 3350 cm^{-1} (relacionada al estiramiento por tensión del grupo -OH y al estiramiento asimétrico por tensión del del grupo -NH₂) y 3287 cm^{-1} (asociada al estiramiento del grupo N-H). Asimismo, existen picos en 2916 y 2870 cm^{-1} producidos por el estiramiento del enlace C-H, mientras que aquellas ubicadas en 1650, 1557 y 1310 cm^{-1} corresponden a los estiramientos del grupo amida I (tensión C=O), amida II (tensión N-H) y amida III respectivamente [69]. Además, se observan bandas en 1417 y 1375 cm^{-1} atribuidas a la deformación simétrica del grupo -CH₃. El pico localizado en 1147 cm^{-1} se debe a la tensión asimétrica del enlace C-O-C, mientras que la señal en 1064 cm^{-1} corresponde a las vibraciones del anillo piranosa [70]. Finalmente, en 1023 y 895 cm^{-1} , corresponden al estiramiento de los grupos amina libres y la tensión del grupo C-H [71]. Los picos anteriormente mencionados, coinciden por los reportados por Tan y colaboradores [72], quienes también obtuvieron este polímero con peso molecular bajo, medio y alto de la empresa comercial Sigma Aldrich.

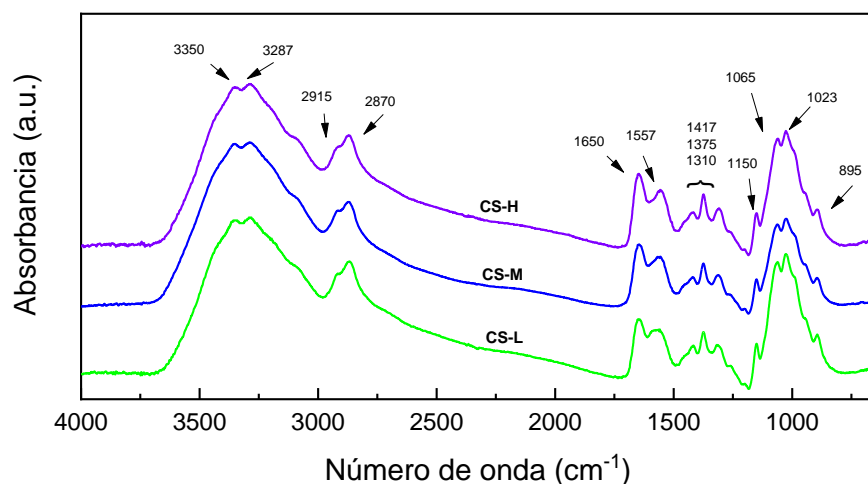


Figura 3. 4. Espectros FTIR del quitosano en polvo: CS-L (110 kDa), CS-M (194 kDa), CS-H (267 kDa).

3.1.3 Grado de desacetilación

Las áreas bajo la curva correspondientes a las señales de los espectros de infrarrojo de las bandas características de la amida III (1310 cm^{-1}) y la de los grupos funcionales metilo (1380 cm^{-1}) para las muestras de quitosano (CS-L, CS-M, CS-H) se presentan en la Figura 3.5.

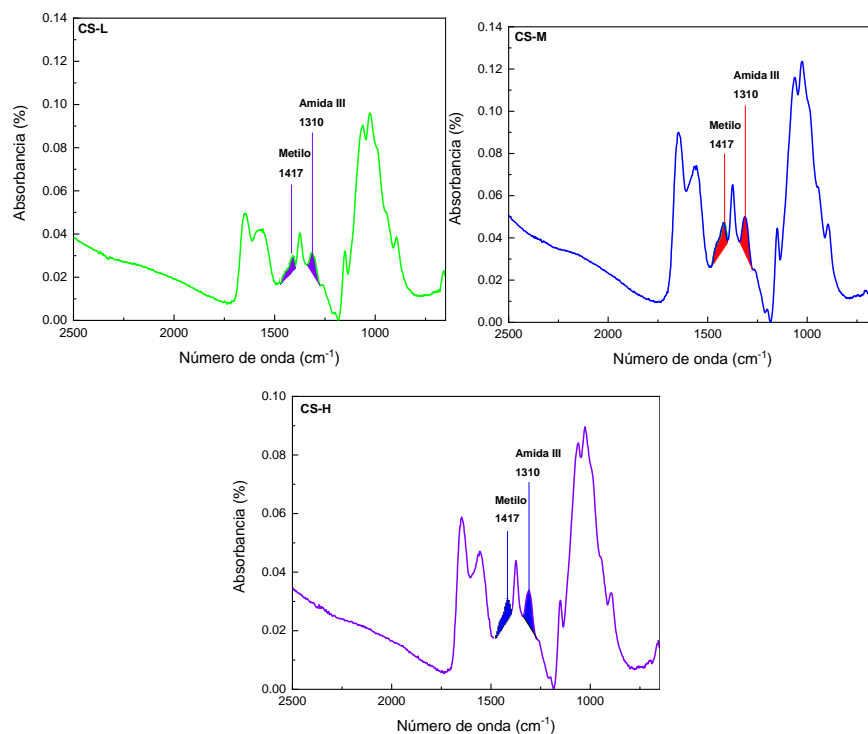


Figura 3. 5. Áreas bajo la curva de los grupos metilo y amida III de los espectros FTIR: CS-L, CS-M, CS-H.

Los porcentajes de N-acetilación y de desacetilación calculados para el CS-L son:

$$\text{Grado de N-acetilación (\%)} = 31.92 \left(\frac{.55}{.50} \right) - 12.2 = 22.27\%$$

$$\text{GD (\%)} = 77.08\%$$

Los porcentajes de N-acetilación y de desacetilación calculados para el CS-M son:

$$\text{Grado de N-acetilación (\%)} = 31.92 \left(\frac{.31}{.30} \right) - 12.2 = 20.78\%$$

$$\text{GD (\%)} = 79.02\%$$

Los porcentajes de N-acetilación y de desacetilación calculados para el CS-H son:

$$\text{Grado de N-acetilación (\%)} = 31.92 \left(\frac{.33}{.31} \right) - 12.2 = 21.82\%$$

$$\text{GD (\%)} = 77.19\%$$

3.1.4 Análisis termogravimétrico

La Figura 3.6 muestra las curvas de TGA (línea continua) y DTGA (línea punteada), para las muestras de quitosano en polvo, con diferentes pesos moleculares: CS-L (110 kDa), CS-M (194 kDa), CS-H (267 kDa). Las curvas de TGA exhibieron para los tres quitosanos una pérdida de masa del 7% en el intervalo de 50 a 150 °C, atribuida a la desorción del agua absorbida. Un segundo evento térmico ocurrió en el intervalo de 260 a 650 °C, atribuido a la descomposición de la cadena polimérica del quitosano. Los eventos térmicos se pueden notar claramente en las curvas DTGA, en las que se observa que la temperatura de degradación máxima para los tres tipos de quitosano fue de aproximadamente 305 °C. Al final de la prueba, se obtuvo que la masa residual era cercana al 30% y que no hubo un cambio significativo de la degradación térmica del quitosano con respecto a su peso molecular, esto se puede apreciar claramente en la curva de TGA.

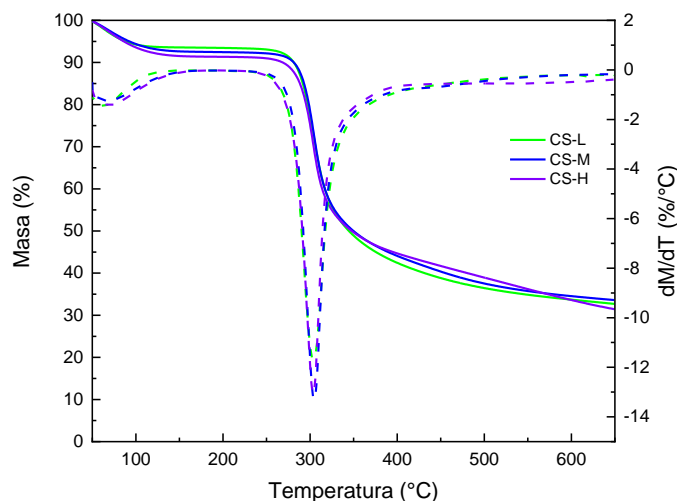


Figura 3. 6. Curvas TGA (línea continua) y DTGA (línea punteada) de quitosanos con diferente peso molecular: CS-L, CS-M, CS-H.

3.2 Caracterización fisicoquímica del hidrobromuro de galantamina

El espectro de infrarrojo del hidrobromuro de galantamina se muestra en la Figura 3.7. Como se puede observar, el fármaco exhibe una banda característica en 3359 cm^{-1} , provocada por el estiramiento del enlace O-H del grupo enol ($\text{C}=\text{C}-\text{O}-\text{H}$). Además, existen señales en 3429 y 2824 cm^{-1} correspondientes al estiramiento del enlace N-H ocasionado por el grupo catiónico del nitrógeno tetracoordinado ($\equiv\text{N}^+-\text{H}$) y al estiramiento de tensión del enlace C-H, respectivamente [73]. El pico localizado en 1623 cm^{-1} representa el estiramiento por flexión del enlace O-H. Por otro lado, se observaron vibraciones del anillo aromático: estiramiento del grupo C-H ($3000-3040\text{ cm}^{-1}$), y del enlace C=C ($1585, 1511, \text{ y } 1435\text{ cm}^{-1}$). Las bandas ubicadas en, $1070, 1020, 805\text{ cm}^{-1}$ corresponden al estiramiento por tensión del grupo C-N, C-O y C-H (en el plano) respectivamente. Finalmente, las señales que se encuentra en el intervalo de 650 a 700 cm^{-1} representan el estiramiento del enlace C-Br [74].

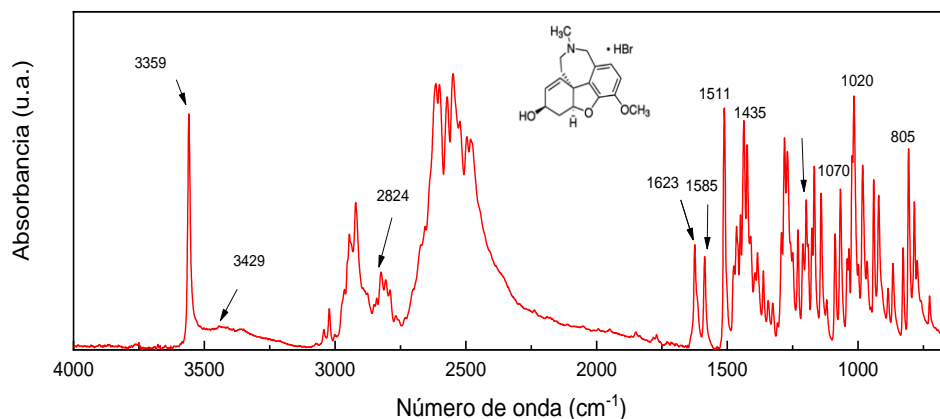


Figura 3. 7. Espectro FTIR del hidrobromuro de galantamina puro.

En la Figura 3.8 se muestra el termograma del hidrobromuro de galantamina pura. La curva de TGA muestra que el fármaco pierde 18% de su masa en el intervalo de 250 a 290 °C. Un segundo evento térmico ocurrió entre 290 y 370 °C, en el cual se tuvo la mayor pérdida de masa (~35%). Finalmente, el material se degradó un 19 % desde una temperatura de 370 °C hasta 650 °C. Los tres eventos térmicos anteriores se notan claramente en la curva DTG, donde se observa que las temperaturas en las que ocurrió mayor degradación del fármaco fueron aproximadamente 280, 310 y 347 °C. Al final de la prueba, la masa residual de hidrobromuro de galantamina fue del 28%. Estos resultados son consistentes por los reportados por Stavroula y col [75]. Estudios de TGA acoplado con FTIR y/o masas son necesarios para poder realizar una asignación de los eventos térmicos que se llevan a cabo en la degradación de este compuesto.

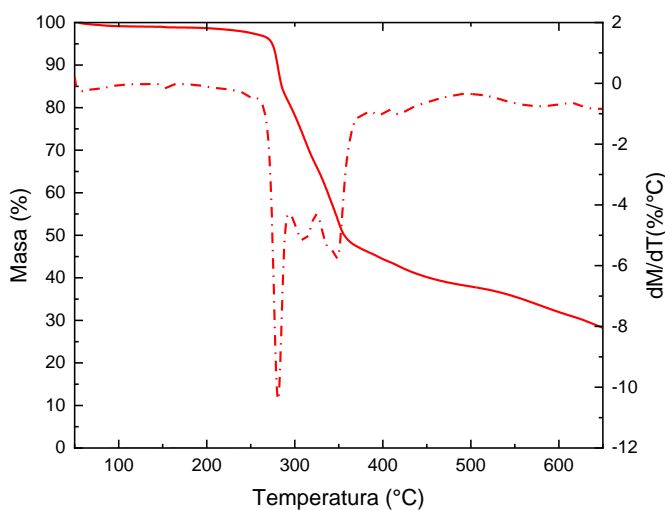


Figura 3. 8. Curvas TGA (línea continua) y DTG (línea punteada) del hidrobromuro de galantamina.

3.3 Caracterización fisicoquímica de las partículas del quitosano

3.3.1 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

En la Figura 3.9 se muestran los espectros de infrarrojo de las partículas de quitosano de bajo peso molecular entrecruzadas con tripolifosfato de sodio. Como se puede apreciar, las bandas ubicadas originalmente en 3350 y 3287 cm^{-1} (enlaces O-H y N-H del quitosano en polvo, ver figura 3.4) ahora absorben en a 3415 y 3278 cm^{-1} , e incluso aparece una nueva señal a 3160 cm^{-1} . El desplazamiento de las bandas originales del quitosano, así como la aparición de un nuevo pico, es atribuido a la reducción de puentes de hidrógeno existentes en el polímero y a la presencia de nuevos enlaces entre el agente entrecruzante y el grupo amino del quitosano [76]. Por otro lado, se observó que las bandas correspondientes a las vibraciones del grupo amida I (1650 cm^{-1}) y amida II (1557 cm^{-1}) del quitosano puro, ahora se ubican en aproximadamente 1636 cm^{-1} y 1546 cm^{-1} ; estos desplazamientos se atribuyen de nuevo a la interacción iónica entre el polímero y el tripolifosfato de sodio y son consistentes con los reportados por Hadidi et al. [77] y Anand et al. [78]. Particularmente, la banda ubicada aproximadamente en 1546 cm^{-1} , se ha reportado como una de las más importantes cuando se sintetizan nanopartículas de quitosano, ya que es un indicio de la interacción electroestática formada entre el grupo NH_3^+ del polímero y el PO_4^- del tripolifosfato, los cuales forman la partícula [79]. Finalmente, los espectros de las partículas presentan bandas en 1050 y 920 cm^{-1} que no estaban presentes en los espectros del quitosano y que corresponden al estiramiento por tensión del enlace P=O y a la vibración por tensión del grupo P-O-P respectivamente del tripolifosfato [80,81].

Es interesante observar que en los espectros de las muestras L2 (concentración de CS y TPP: 1.0 y 0.75 mg/ml) y L3 (concentración CS y TPP: 1.0 y 1.0 mg/ml), el desplazamiento del grupo amida II se encuentra hasta 1565 cm^{-1} y no en 1546 cm^{-1} como en las demás muestras. Dicho efecto se podría atribuir al grado de entrecruzamiento que se produce al utilizar concentraciones de CS y TPP cercanas. Este comportamiento fue reportado por Pan y colaboradores [82], quienes notaron cambios en los espectros IR de NPs de quitosano con diferente grado de entrecruzamiento.

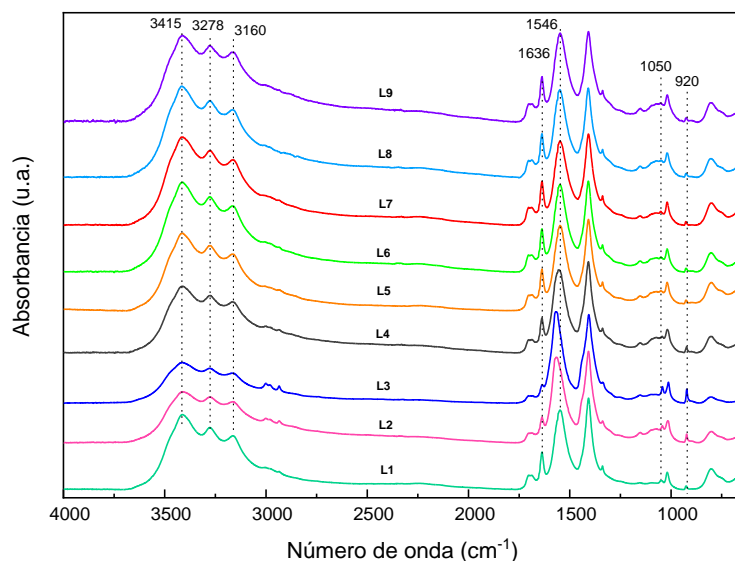


Figura 3. 9. Espectros FTIR de las partículas de quitosano de bajo peso molecular.

En la Figura 3.10 se presentan los espectros FTIR de las partículas de quitosano de mediano peso molecular, entrecruzadas con tripolifosfato de sodio. En ellos se observaron picos ubicados entre 3415, 3278, 3160, 1050 y 920 cm^{-1} , mismos que se obtuvieron en las muestras preparadas con quitosano de bajo peso molecular. La banda ubicada en 1636 cm^{-1} (desplazamiento de la vibración del grupo amida I) estuvo presente para todas las formulaciones, a excepción de M2 y M9.

Por otra parte, el corrimiento de la banda del grupo amida II del quitosano fue diferente para cada muestra, excepto el espectro de M3 el cual absorbió en el mismo número de onda del biopolímero en polvo (1557 cm^{-1}). Según lo reportado en la literatura [76-82], las nanopartículas presentan simultáneamente los dos desplazamientos de banda antes mencionados, razón por la cual es muy probable que en las muestras M2, M3 y M9 no se hayan obtenido nanopartículas de quitosano, debido, probablemente, a que éstas condiciones de síntesis no eran las más adecuadas.

Es interesante notar que el incremento en la concentración del agente entrecruzante y la cercanía de la misma con respecto a la concentración del quitosano, provocó que se dejaran de observar los desplazamientos de banda característicos de las nanopartículas. Esta tendencia se observó en las muestras preparadas con una concentración de quitosano de 1.0 mg/ml, es decir: M1, M2 y M3 (concentración TPP: 0.5, 0.75 y 1.0 mg/ml respectivamente).

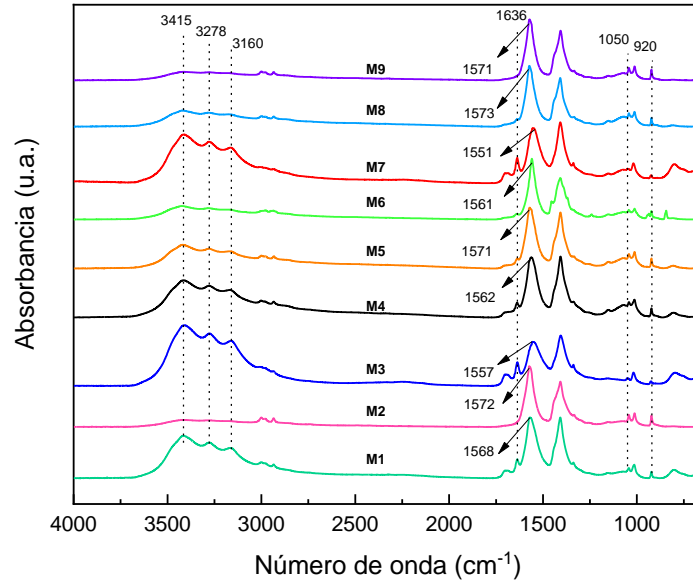


Figura 3. 10. Espectros FTIR de las partículas de quitosano de mediano peso molecular.

Los espectros infrarrojos de las partículas de quitosano de alto peso molecular se presentan en la Figura 3.11. En ellos se observaron los mismos picos que los obtenidos con los quitosanos de bajo y mediano peso molecular, razón por la cual, se infiere que también existen los enlaces entre el entrecruzante y el polímero, y la posible formación de partículas en casi todas las muestras, a excepción de las condiciones H2, H3, H4 y H8, las cuales absorbieron en la misma banda del grupo amida II (1557 cm^{-1}) del quitosano puro, lo cual sugiere que el entrecruzamiento iónico no fue el adecuado.

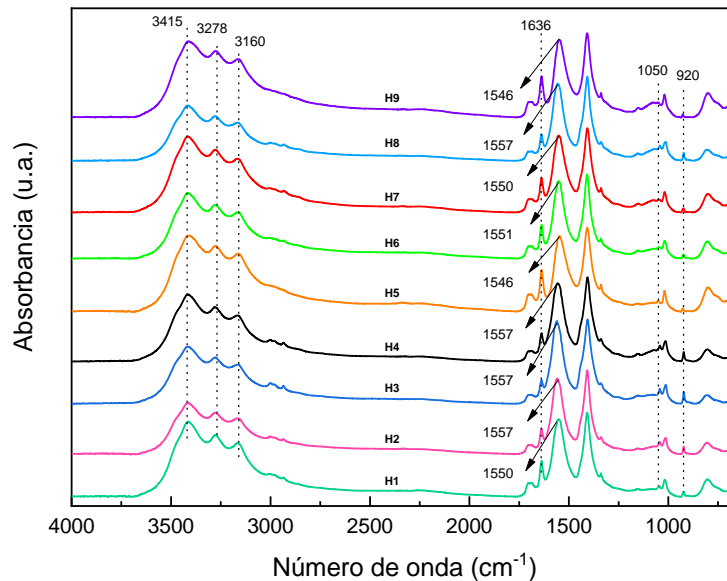


Figura 3. 11. Espectros FTIR de las partículas de quitosano de alto peso molecular.

3.3.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

En la Figura 3.12 se muestran los termogramas de las partículas de quitosano de bajo peso molecular entrecruzadas con tripolifosfato de sodio. A diferencia de lo obtenido en las muestras de quitosano en polvo, donde los TGAs mostraron solo dos etapas de degradación, las partículas exhibieron tres eventos de degradación térmica. De forma general, resulta posible identificar que el perfil de descomposición térmica de las partículas es completamente diferente al del polímero con el que fueron preparadas, ya que el quitosano se comienza a degradar a 260 °C, mientras que las partículas lo hacen a una temperatura de 210 °C.

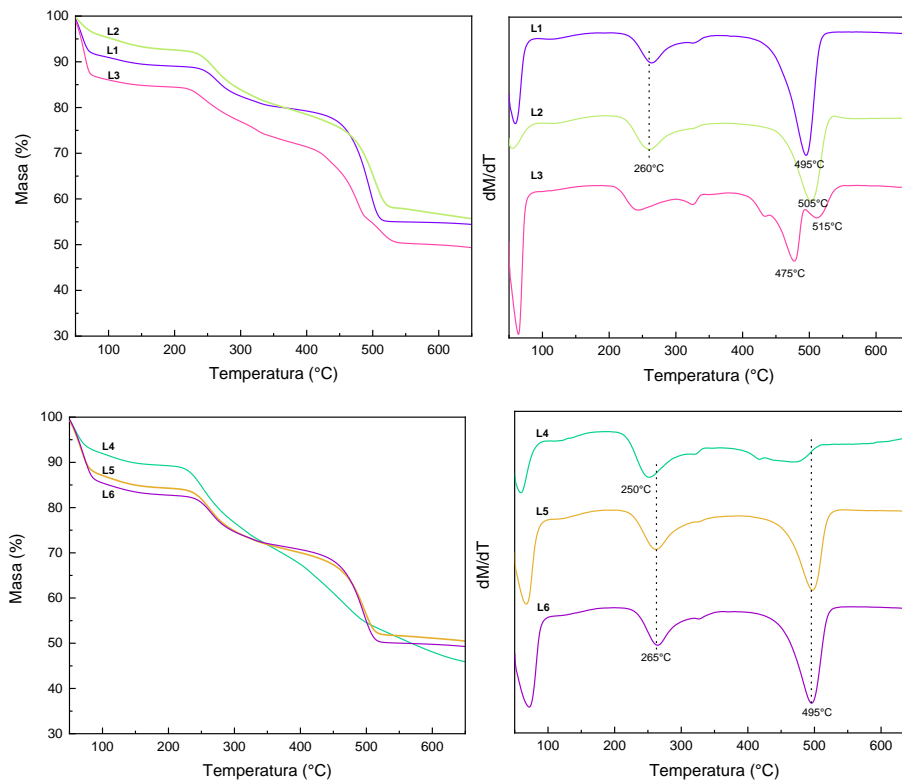
Todas las curvas TGA de las partículas mostraron el primer evento térmico en el intervalo de 50 a 100 °C, el cual está asociado a la pérdida de masa por evaporación de agua; este valor fue diferente para cada muestra, yendo desde un 7 hasta un 15%. Esta capacidad de absorción de agua fue mayor a la del quitosano puro, y esto es un hecho relacionado con la reducción de la cristalinidad del polímero [83]. A partir de 220 °C, el quitosano entrecruzado comienza a presentar degradación térmica, prolongándose ésta hasta los 650 °C. La masa residual obtenida fue alrededor del 50% para todas las muestras; dicho porcentaje es mayor al del quitosano el polvo y se debe a la presencia del fosfato inorgánico.

Las curvas DTGA de las partículas de quitosano de bajo peso molecular muestran, además del primer pico causado por la pérdida de humedad (ubicado a 80 °C), dos picos de degradación máxima adicionales, los cuales estuvieron ubicados cerca de 260 y 495 °C. El evento que ocurre a 260 °C, se le atribuyó a la degradación del quitosano sin entrecruzar, el cual es térmicamente menos estable, ya que el polímero disminuyó su cristalinidad al ser disuelto; dicho comportamiento coincide con lo reportado por Pati y colaboradores. [42], quienes sintetizaron fibras de CS-TPP por entrecruzamiento iónica. El segundo pico se ubicó aproximadamente a 495 °C, temperatura mayor a la del quitosano el polvo en donde se observó a 350 °C. Este incremento podría deberse a un aumento en la estabilidad térmica del material debido a la reacción de entrecruzamiento que experimenta el biopolímero [76, 84].

En las curvas DTGA, se pueden observar ligeros corrimientos en los valores de algunas transiciones térmicas; por ejemplo, en las muestras preparadas con una concentración de quitosano

de 1.0 mg/ml, es decir L1, L2 y L3 (concentración TPP: 0.5, 0.75, 1.0 mg/ml respectivamente) el último pico de degradación para el quitosano entrecruzado fue de 495, 505 y 515 °C respectivamente. Este comportamiento sugiere que el incremento en la concentración de agente entrecruzante aumenta de la estabilidad térmica del polímero, lo cual se debe a que existe una mayor cantidad de moléculas de TPP que se entrecruzan con los grupos NH_3^+ del quitosano [85].

Por otro lado, es interesante notar que en la curva DTGA de la muestra L3 (concentración CS y TPP: 1.0 y 1.0 mg/ml) se obtuvieron picos de degradación adicionales, entre ellos el ubicado a 475 °C, el cual exhibió una intensidad mayor que el observado a 515 °C. La presencia de estos picos sugiere que existen diferentes fases de entrecruzamiento del biopolímero, las cuales son producidas por las concentraciones de CS y TPP son iguales. Este efecto no ha sido reportado en estudios anteriores, ya que existe muy poca información acerca del comportamiento térmico del quitosano entrecruzado con el tripolifosfato.



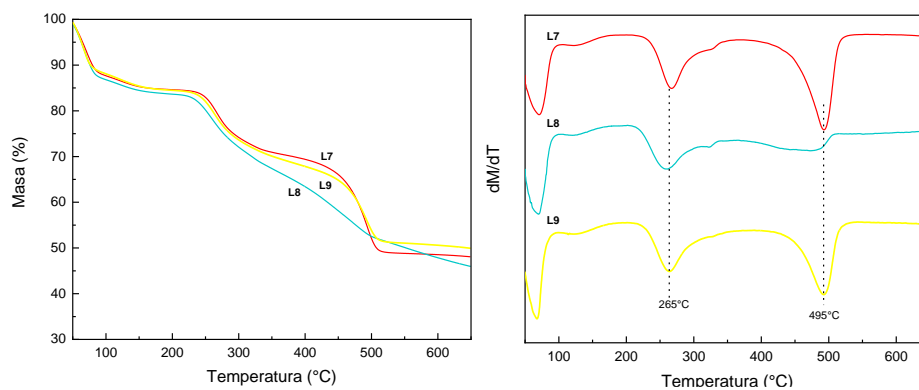


Figura 3. 12. Curvas TGA y DTGA para las partículas preparadas con quitosano de bajo peso molecular.

De manera análoga con lo obtenido con las partículas sintetizadas con CS de bajo peso molecular, las muestras preparadas con quitosano de mediano peso molecular exhibieron tres eventos de degradación térmica, los cuales se muestran en los termogramas de la Figura 3.13. Como se puede observar en las curvas TGA, las muestras tuvieron la primera pérdida de masa en el intervalo de 50 a 110 °C, la cual está asociada a la evaporación de agua. El porcentaje de humedad perdida fue variable para cada muestra (10-30%), y no se observó una relación directa con las concentraciones de CS y TPP utilizadas. De nuevo, la degradación del material estuvo en el intervalo de 220 a 650 °C, con un porcentaje de masa residual de aproximadamente del 50%. Únicamente la muestra M5 tuvo un perfil de degradación diferente al de las demás partículas, debido a que solo exhibió dos eventos térmicos: la pérdida de agua y la degradación del quitosano sin entrecruzar. Por otro lado, se observó que la muestra M7 (concentración CS y TPP: 2.0 y 0.5 mg/ml) fue la que absorbió una mayor cantidad de humedad, lo cual podría atribuirse al exceso de moléculas de quitosano en comparación a las de TPP, ya que algunos grupos amino en la cadena polimérica se entrecruzan con los iones fosfato, mientras otros interaccionan con las moléculas agua.

Las curvas DTGA muestran claramente la presencia del primer pico causado por la pérdida de agua, y los últimos dos eventos relacionados a la degradación térmica del polímero sin entrecruzar y la del CS entrecruzado con el TPP, las cuales se llevan a cabo a temperaturas cercanas a las reportadas previamente en este trabajo (260 y 495 °C). Por otro lado, las temperaturas de degradación máxima encontradas no mostraron relación con respecto a las variables estudiadas (concentración de CS y TPP, y peso molecular del polímero).

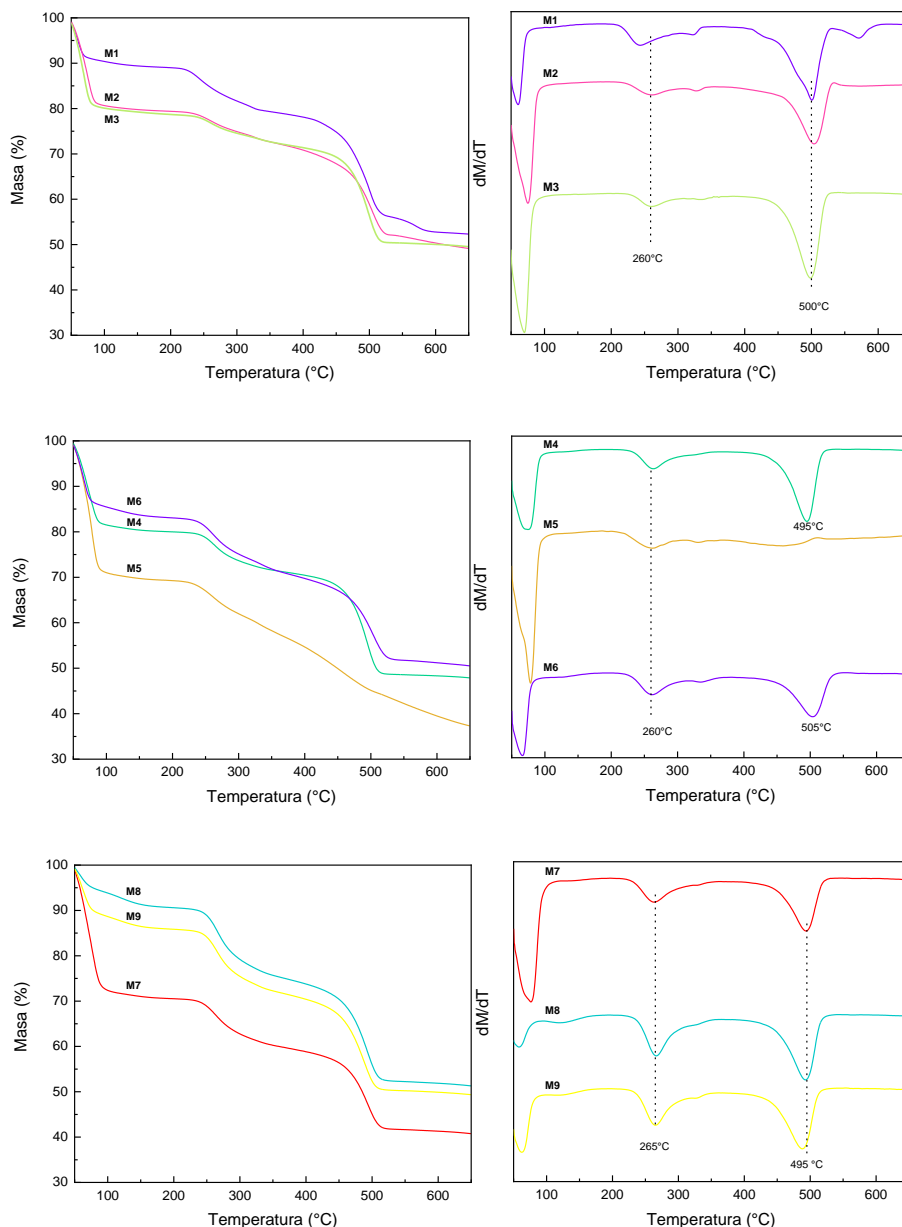
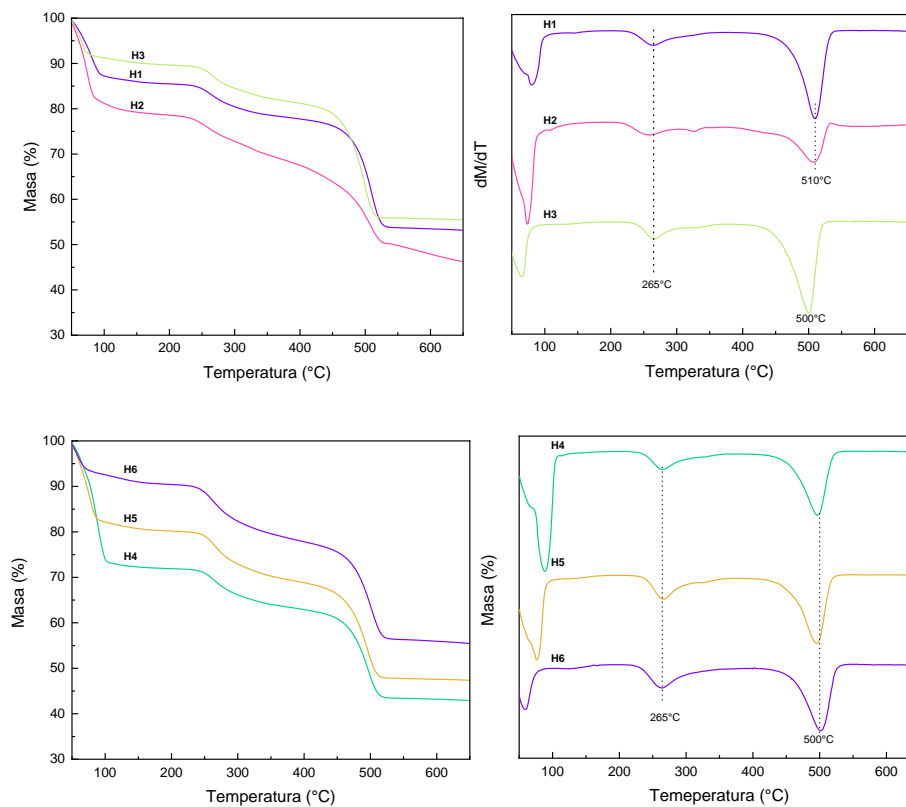


Figura 3. 13. Curvas TGA y DTGA para las partículas preparadas con quitosano de mediano peso molecular.

En la Figura 3.14 se presentan los termogramas de las partículas de quitosano de alto peso molecular. En las curvas TGA se observan perfiles de degradación térmica similares a los reportados para las muestras sintetizadas con quitosano de bajo y mediano peso molecular. De igual forma, se identificaron tres picos de degradación máxima, los cuales corresponden a la evaporación de agua (80 °C), la degradación del polímero sin entrecruzar (265 °C) y la del quitosano entrecruzado con TPP (~ 505 °C).

De forma general, resulta posible identificar que el incremento en el peso molecular del quitosano, aumentó la capacidad de absorción de agua de las partículas, ya que el intervalo de pérdida de humedad para las muestras de bajo, mediano y bajo fue de 7-10, 10-30 y 10-34 % respectivamente, concordando con lo reportado por Dhawade y colaboradores [86].

Por otro lado, también se observó un efecto del peso molecular del quitosano sobre la temperatura de degradación máxima de las partículas, ya que las muestras preparadas con quitosano de alto y mediano peso molecular, se degradan aproximadamente 505°C, mientras que las obtenidas con CS de bajo peso lo hacen a una temperatura menor (495 °C). Esto indica que las partículas obtenidas del quitosano con menor peso molecular se degradan a temperaturas ligeramente menores; dicho comportamiento es propio de los polímeros, los cuales se degradan con mayor facilidad cuando poseen un peso molecular bajo [87].



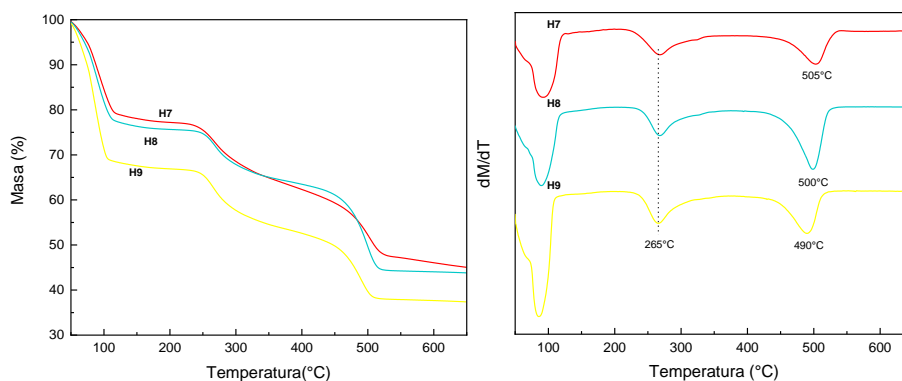


Figura 3. 14. Curvas TGA y DTGA para las partículas preparadas con quitosano de alto peso molecular.

3.3.3. Tamaño y morfología de las partículas

En la Tabla 3.7 se muestra el tamaño promedio de las partículas obtenidas, el cual se calculó midiendo el diámetro de 100 partículas observadas en las micrografías SEM. Para ello se utilizó el software de procesamiento de imágenes digital ImageJ y posteriormente se obtuvo el promedio.

Tabla 3. 7. Tamaño promedio de las partículas de quitosano.

Formulación	Concentración CS (mg/ml)	Concentración TPP (mg/ml)	Tipo de partícula	Tamaño de partícula (nm)
Quitosano de bajo peso molecular (110 kDa)				
L1	1.0	0.5	μ	935
L2		0.75	μ	1030
L3		1.0	μ	1070
L4	1.5	0.5	n	190
L5		0.75	μ	960
L6		1.0	μ	1170
L7	2.0	0.5	n	170
L8		0.75	×	-
L9		1.0	×	-
Quitosano de mediano peso molecular (194 kDa)				
M1	1.0	0.5	×	-
M2		0.75	×	-
M3		1.0	×	-
M4	1.5	0.5	n	230
M5		0.75	μ	1140
M6		1.0	n	675

M7	2.0	0.5	n	185
M8		0.75	×	-
M9		1.0	×	-
Qitosano de alto peso molecular (27 kDa)				
H1	1.0	0.5	×	-
H2		0.75	×	-
H3		1.0	×	-
H4	1.5	0.5	×	-
H5		0.75	×	-
H6		1.0	×	-
H7	2.0	0.5	×	-
H8		0.75	×	-
H9		1.0	×	-

Presencia de: nanopartículas (**n**), micropartículas (**μ**), masa amorfa (×), sin medir (-).

En la Figura 3.15 se presentan las micrografías SEM de las muestras preparadas con quitosano de bajo peso molecular (110 kDa). En las imágenes se observan principalmente micro y nanopartículas con morfología esférica, al igual que algunas masas amorfas. En las muestras preparadas con una concentración de CS de 1.0 mg/ml (L1, L2, L3), se identificaron micropartículas con morfología esférica, las cuales incrementaron su tamaño y se aglutinaron conforme aumentó la cantidad de tripolifosfato. Por otro lado, en las muestras preparadas con una concentración de CS de 1.5 mg/ml, se observa un comportamiento interesante cuando se compara el tamaño promedio de las partículas de la muestra L4 (190 nm), la cual fue sintetizada a partir de concentración de TPP de 0.5 mg/ml, con los valores reportados para las muestras L5 (960 nm) y L6 (1170 nm), generadas a partir de una concentración de TPP de 0.75 y 1.0 mg/ml; ahí es posible identificar que el tamaño de partícula aumentó al incrementar la concentración de entrecruzante. En el caso de las muestras preparadas a partir de una concentración de quitosano de 2.0 mg/ml, sólo se pudieron obtener nanopartículas en la condición L7 (170 nm) ya que las condiciones L8 y L9 produjeron masas amorfas. Con estos resultados es posible postular que el aumento en la concentración de TPP provoca que el tamaño de las partículas aumente, o se empiecen a formar aglomerados y estructuras sin morfología específica. Este comportamiento ya ha sido reportado con anterioridad por Fan y colaboradores [48].

Es interesante notar que en las muestras preparadas a partir de una concentración de quitosano de 1.0 mg/ml (L1, L2, L3), solo se identificaron partículas de tamaño micrométrico; esto podría deberse a que la concentración de entrecruzante es cercana a la del polímero, lo cual provoca un exceso en la cantidad de moléculas de TPP, las cuales entrecruzan una mayor cantidad de cadenas del quitosano y forman las micropartículas. Este comportamiento coincide con lo reportado Hanafy et al. [48], quienes observaron la formación de micropartículas cuando la cantidad de moléculas de TPP estaba en exceso.

Por otro lado, se observó que con una concentración de CS de 1.5 mg/ml se comenzaron a obtener nanopartículas; esto posiblemente se deba a un mayor equilibrio en la cantidad de moléculas del polímero y el entrecruzante. Además, si las partículas se generaban a partir de una concentración de quitosano de 2.0 mg/ml, comenzaban a identificarse masas amorfas, producto del exceso de moléculas de quitosano en comparación con las de TPP. Los comportamientos anteriormente descritos en este trabajo sugieren que al utilizar concentraciones de CS y TPP cercanas, se obtendrán micropartículas. Si la concentración del polímero va siendo cada vez mayor a la del entrecruzante, es posible llegar a un equilibrio entre las moléculas del quitosano y el entrecruzante que permita la formación nanopartículas, sin embargo, si dicha concentración de CS es mucho más grande que la del TPP, se generarán masas amorfas.

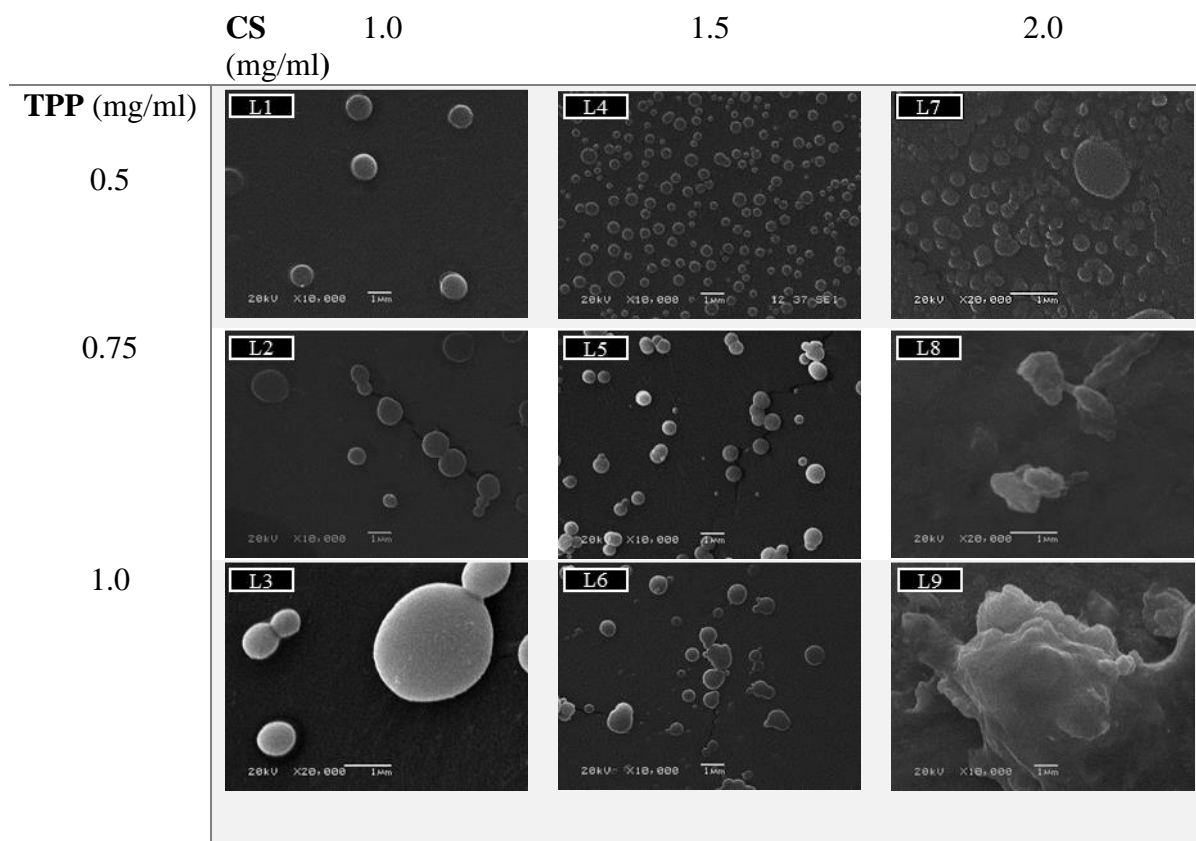


Figura 3. 15. Micrografías SEM de las partículas de quitosano de bajo peso molecular.

Las micrografías SEM de las partículas de quitosano de mediano peso molecular (194 kDa) se muestran en la Figura 3.16. Se pudo identificar un comportamiento similar al discutido en las micrografías de las partículas de bajo peso molecular, el cual indicó que el incremento en el agente entrecruzante aumenta el tamaño de las partículas y puede provocar que estas comiencen a aglomerarse.

Es interesante notar que el peso molecular del quitosano empleado tiene un efecto importante en el tamaño de las partículas obtenidas: a mayor peso molecular del CS, mayor será el tamaño de las NPs. Esta tendencia se exhibió en los pares L4-M4 (PM de 110 y 194 kDa; y tamaño promedio de partícula de 190 y 230 nm respectivamente), y L7- M7 (con PM de 110 y 194 kDa; y tamaño promedio de partícula de 170 y 185 nm respectivamente). Esto ha sido reportado por otros autores como Wu et al. [50] y Jin et al. [43], quienes señalaron que el quitosano con mayor peso molecular es menos soluble, lo que provoca el incremento en el diámetro de las partículas.

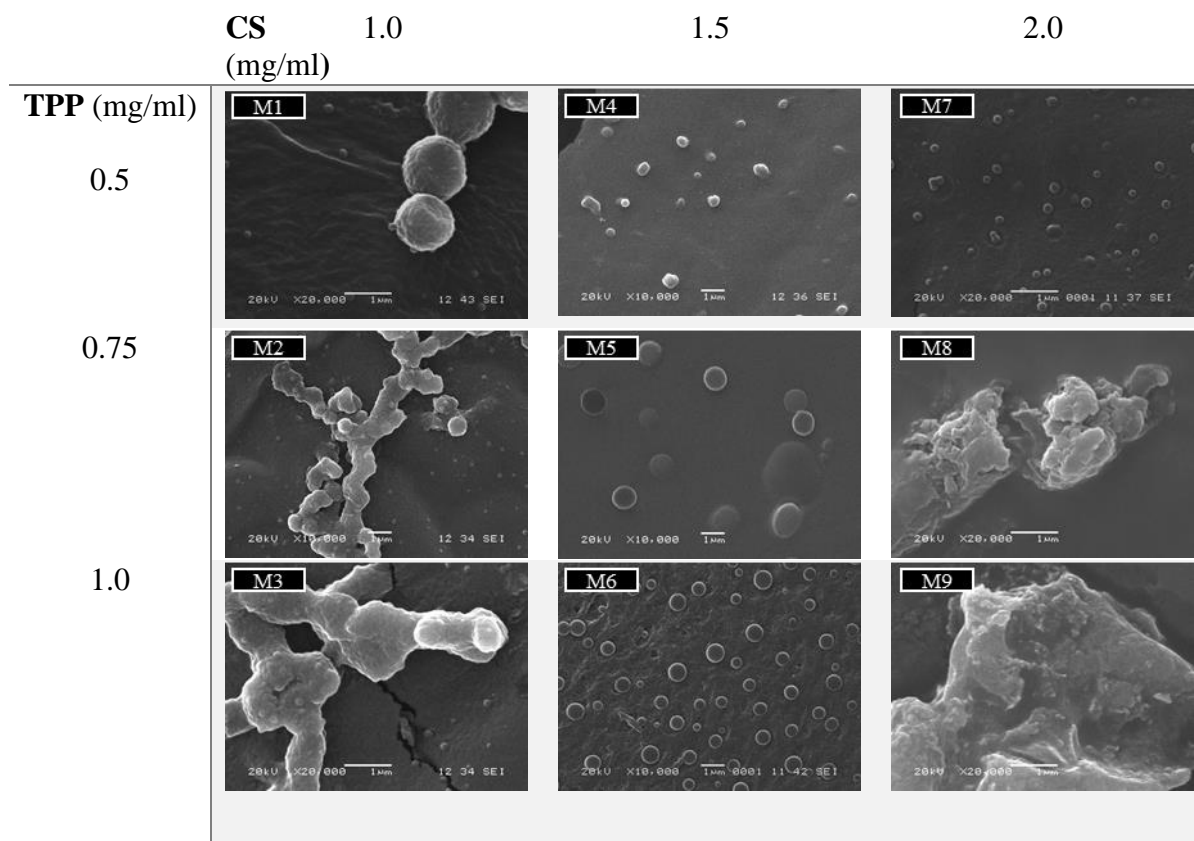


Figura 3. 16. Micrografías SEM de las partículas de quitosano de mediano molecular.

En la Figura 3.15 se presentan las micrografías SEM de las muestras preparadas con quitosano de alto peso molecular (267 kDa). Como se puede notar, no fue posible identificar un efecto directo de las concentraciones de CS y TPP debido a que no se observaron partículas esféricas. Sin embargo, se notó que el aumento de en el peso molecular del polímero incrementó el tamaño de las partículas o agregados obtenidos, hasta el punto de generar masas amorfas. Un ejemplo de esta tendencia se observó en las micrografías L1, M1 y H1 (peso molecular del CS: 110, 194 y 267 kDa respectivamente), ya que en L1 se obtuvieron partículas con un tamaño aproximado de 935 nm, mientras que en M1 son micropartículas semiesféricas y finalmente en H1 sólo se observa una masa amorfa. Este mismo comportamiento se identificó en L2, M2 y H2; L3, M3, H3.

Con base a la tendencia antes descrita, se confirma que no ocurre la formación de micro o nanopartículas esféricas si se utiliza quitosano de alto peso molecular (297 kDa).

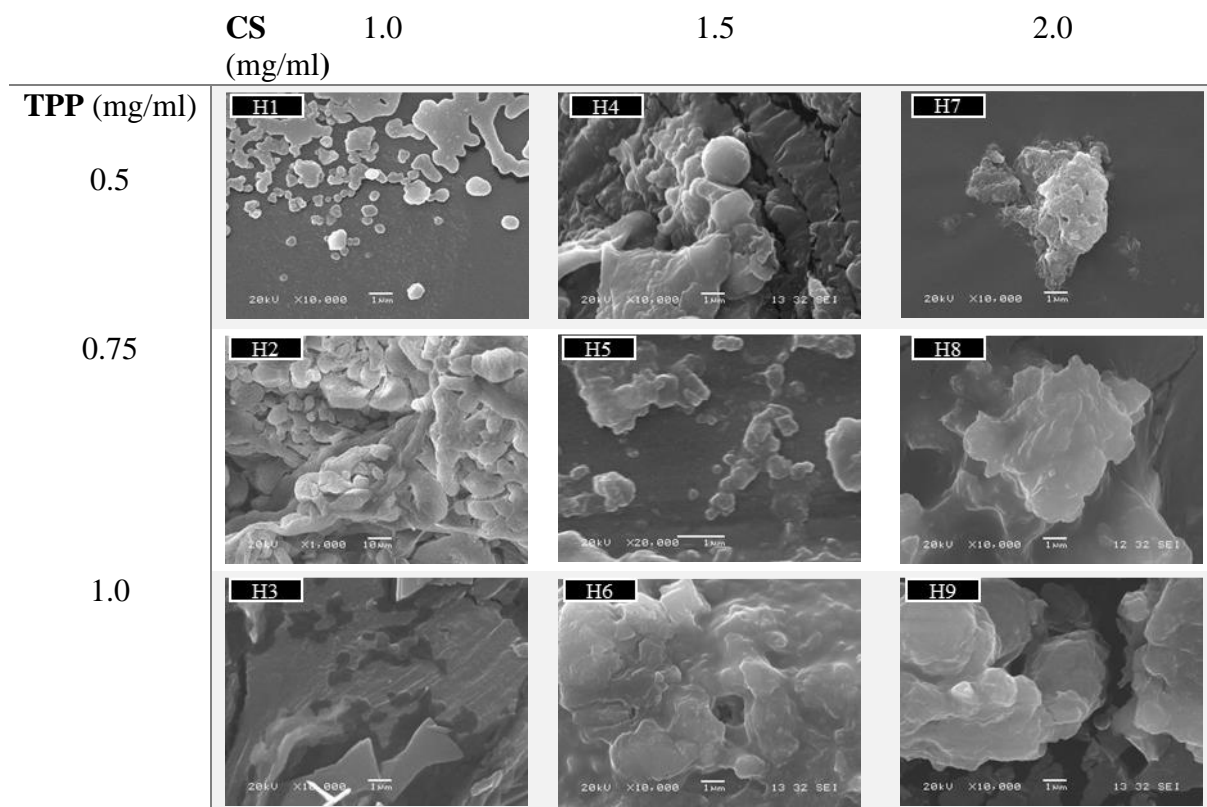


Figura 3. 17. Micrografías SEM de las partículas de quitosano de alto peso molecular.

Con la finalidad de corroborar el tamaño promedio de las partículas de la muestra L7, se realizó un ensayo de microscopía de fuerza atómica. En la micrografía de L7 (Figura 3.17) se pueden ver nanopartículas con morfología esférica y homogéneas, con un diámetro de 150 nm. Este tamaño promedio es cercano al valor calculado en las micrografías SEM (170 nm), y la pequeña diferencia podría deberse al grado de hinchamiento de las partículas al momento de realizar los estudios.

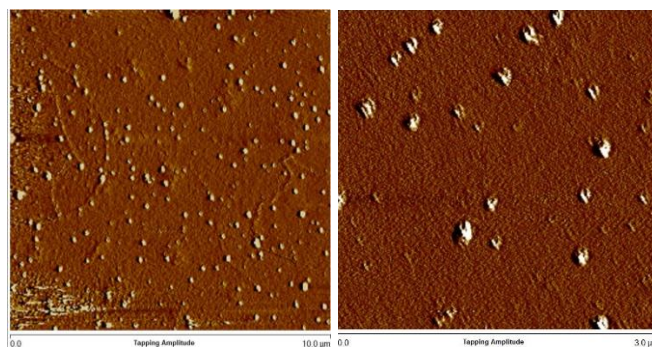


Figura 3. 18. Micrografías AFM de las partículas de quitosano de la muestra L7 (izq. 10x10 μm; der. 3 x 3 μm).

Con base a los resultados de las caracterizaciones antes presentadas, se eligió a la formulación L7 para realizar la carga del hidrobromuro de galantamina y los estudios de liberación *in vitro*. Dicha muestra fue sintetizada usando las siguientes condiciones: peso molecular de quitosano de 110 kDa y concentraciones de CS y TPP de 2.0 y 0.5 mg/ml respectivamente.

3.4 Nanopartículas de quitosano cargadas con GH

Las condiciones que fueron elegidas para realizar la preparación de nanopartículas de quitosano cargadas con hidrobromuro de galantamina se muestran en la Tabla 3.8. Como se puede apreciar, se realizaron dos variaciones con respecto a la cantidad de fármaco utilizado: 5 y 7 mg, esto con el fin de obtener mayores eficiencias de encapsulamiento y observar si existe algún efecto de la razón de masas quitosano-galantamina (CS:GH) sobre la cantidad de fármaco cargado.

Tabla 3. 8. Condiciones de preparación de las NPs-CS cargadas con GH.

Formulación	GH (mg)	Razón de masas CS:GH	Peso molecular CS (kDa)	Concentración CS (mg/ml)	Concentración TPP (mg/ml)
L7-5GH	5.0	4:1	110	2.0	0.5
L7-7GH	7.0	2.8:1			

3.4.1 Encapsulación del fármaco

Los datos que se presentan a continuación son los valores promedio de dos lotes de NPs-CS cargadas con GH. La cantidad total de fármaco cargado se calculó mediante la diferencia entre la cantidad de GH utilizado y la cantidad de GH en el sobrenadante. Los porcentajes de la eficiencia de atrapamiento (EA) y la capacidad de carga (CC) de las partículas de la muestra L7-5GH se calcularon en 5.80 y 1.30 % respectivamente, mientras que para la muestra L7-7GH se tuvieron valores de EA y CC de 19.42 y 5.83% respectivamente. Es interesante notar que, al disminuir la razón de masas CS:GH la eficiencia de atrapamiento aumentó considerablemente. La disminución de la razón CS:GH posiblemente provocó que la complejación entre el polímero y el fármaco supere a las fuerzas repulsivas entre las moléculas de CS y GH. En la Tabla 3.8 se presentan los datos correspondientes al encapsulamiento del hidrobromuro de galantamina en las NPs-CS.

Tabla 3. 9. Eficiencia de atrapamiento y capacidad de carga de las nanopartículas de quitosano.

Muestra	GH utilizado (mg)	CS:GH	GH en el sobrenadante (mg)	GH cargado (mg)	NPs-CS con GH (mg)	EA (%)	CC (%)
L7-5MG	5.0	4:1	4.71	0.29	22.21	5.80	1.30
L7-7MG	7.0	2.85:1	5.64	1.36	23.31	19.42	5.83

Para las caracterizaciones fisicoquímicas posteriores, así como la liberación del fármaco *in vitro* se eligió la muestra L7-7GH, con la cual se obtuvo la mayor eficiencia de carga.

3.4.2 Caracterización fisicoquímica

En la Figura 3.19 se presentan los espectros FTIR de las nanopartículas de quitosano cargadas con galantamina (L7-7GH) y sin el fármaco (L7). Como se puede notar, los espectros fueron similares en la forma, tamaño y posición de las bandas, aunque se observaron diferencias sutiles. Esta similitud en los espectros es debido a que la cantidad de fármaco cargado es muy poca, lo cual dificulta observar cambios en las bandas de las nanopartículas. Algunos autores también han reportado que casi no se aprecian diferencias entre los espectros de nanopartículas de quitosano con y sin fármaco [88,89].

Por otro lado, se apreció un pico ubicado en 1070 cm^{-1} , el cual pertenece al estiramiento por tensión del grupo C-N de la galantamina, lo cual confirma la presencia del fármaco en las nanopartículas.

En el estudio realizado por Hanafy et al. [48] postularon que el complejo quitosano-GH produce señales en 3428 cm^{-1} (tensión del enlace -OH) y 1569 cm^{-1} (tensión del grupo N-H), sin embargo, no compararon estas bandas con las de las nanopartículas sin el fármaco. Por lo tanto, resulta difícil comparar los picos que dichos autores reportaron, con los que se obtuvieron en este trabajo, además de que la cantidad de fármaco cargado es pequeña.

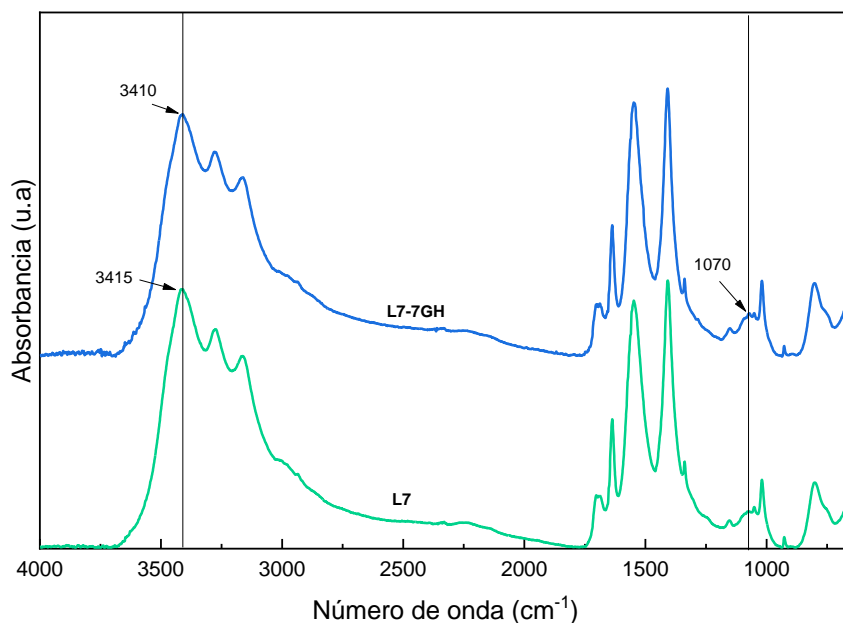


Figura 3. 19. Espectro FTIR de las NPs-CS con y sin galantamina.

En la Figura 3.20 se presentan los termogramas correspondientes a las NPs-CS cargadas con GH, así como para las nanopartículas sin el fármaco. Como se puede observar en las curvas DTGA, las NPs-CS con GH no exhibieron cambios relevantes en la temperatura de descomposición con respecto a las nanopartículas sin fármaco. Únicamente se notó que el pico ubicado en 493 °C se desplazó hasta 498 °C, lo cual sugiere que la incorporación del fármaco incremento levemente la estabilidad térmica las nanopartículas.

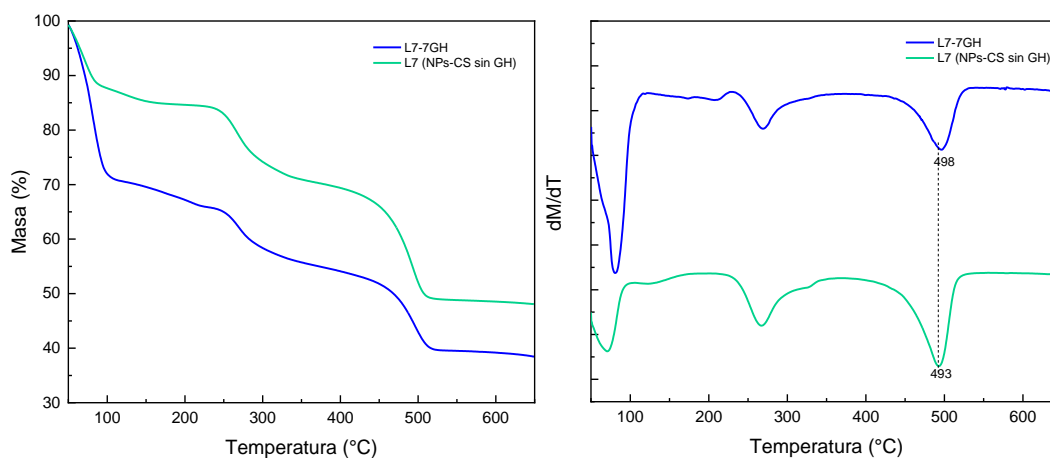


Figura 3. 20. Curvas TGA y DTGA para las nanopartículas con y sin galantamina.

3.4.3 Estudios de liberación *in vitro*

Los datos obtenidos en la prueba de liberación *in vitro* son el promedio de dos lotes de la muestra L7-7GH. En la Figura 3.21 se muestra el perfil de liberación del hidrobromuro de galantamina a partir de las nanopartículas de quitosano.

La liberación del fármaco a partir de nanopartículas puede ocurrir por diversos mecanismos: desintegración, erosión de la superficie, desorción y difusión. La forma más común en que las matrices poliméricas liberan los fármacos es por medio de la difusión de la molécula del fármaco desde la matriz hacia el medio [90]. En este trabajo se identificaron tres etapas de liberación con diversos mecanismos, los cuales se detallan a continuación.

En la primera etapa la liberación fue de tipo “ráfaga”, y ocurrió aproximadamente en las primeras 2 horas, durante las cuales se liberó un 11.6% del fármaco. En este tiempo se liberaron las moléculas del GH que se encontraban adheridas a la superficie de la matriz del polímero y encapsuladas cerca de la misma (desorción) [91].

En la segunda etapa (2-48 horas), la velocidad de liberación fue decreciendo en función del tiempo, y se liberó el 44.2% de la galantamina. Durante este intervalo de tiempo se llevó a cabo la ruptura de los puentes de hidrógeno, lo cual provocó que ya no exista la interacción entre las moléculas del quitosano y el fármaco, y este último se liberara al medio por difusión [52].

Finalmente, en la tercera etapa se tiene una liberación mucho más lenta y casi constante, en la cual solo se libera un 4% de galantamina durante las 24 horas restantes. La liberación del fármaco ocurre por medio de la difusión del medio hacia el interior de las nanopartículas, lo cual provoca la desintegración de la matriz polimérica [91]. El porcentaje de fármaco acumulado durante las 72 horas del experimento fue del 48.6 %.

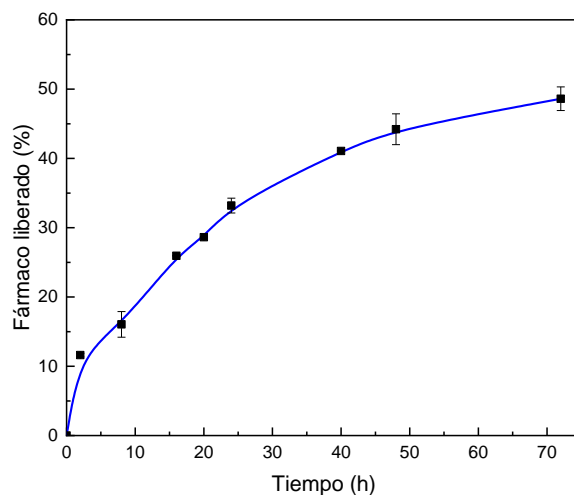


Figura 3. 21. Perfil de liberación del hidrobromuro de galantamina a partir de NPs-CS.

3.4.4 Modelación matemática de la cinética de liberación

La curva del perfil de liberación del GH se ajustó a cinco modelos matemáticos, los cuales se presentan a continuación.

Orden cero	
$C = k_0 t$	3.2
Primer Orden	
$\ln(Q) = k t$	3.3
Higuchi	
$C = k_H \sqrt{t}$	3.4
Hixon-Crowell	
$Q_0^{1/3} - Q^{1/3} = k_{1/3} t$	3.5
Korsmeyer -Peppas	
$C = k_p t^n$	3.6

Donde:

C: porcentaje de fármaco liberado $k_0, k, k_H, k_{1/3}, k_p$: constantes de liberación

Q: porcentaje de fármaco restante t: tiempo

Q_0 : porcentaje de fármaco inicial n: exponente de liberación

En la Figura 3.22 se muestran los ajustes de cada modelo a los datos experimentales obtenidos. El coeficiente de correlación (r^2), así como la constante de rapidez (k) se presentan en la Tabla 3. 10.

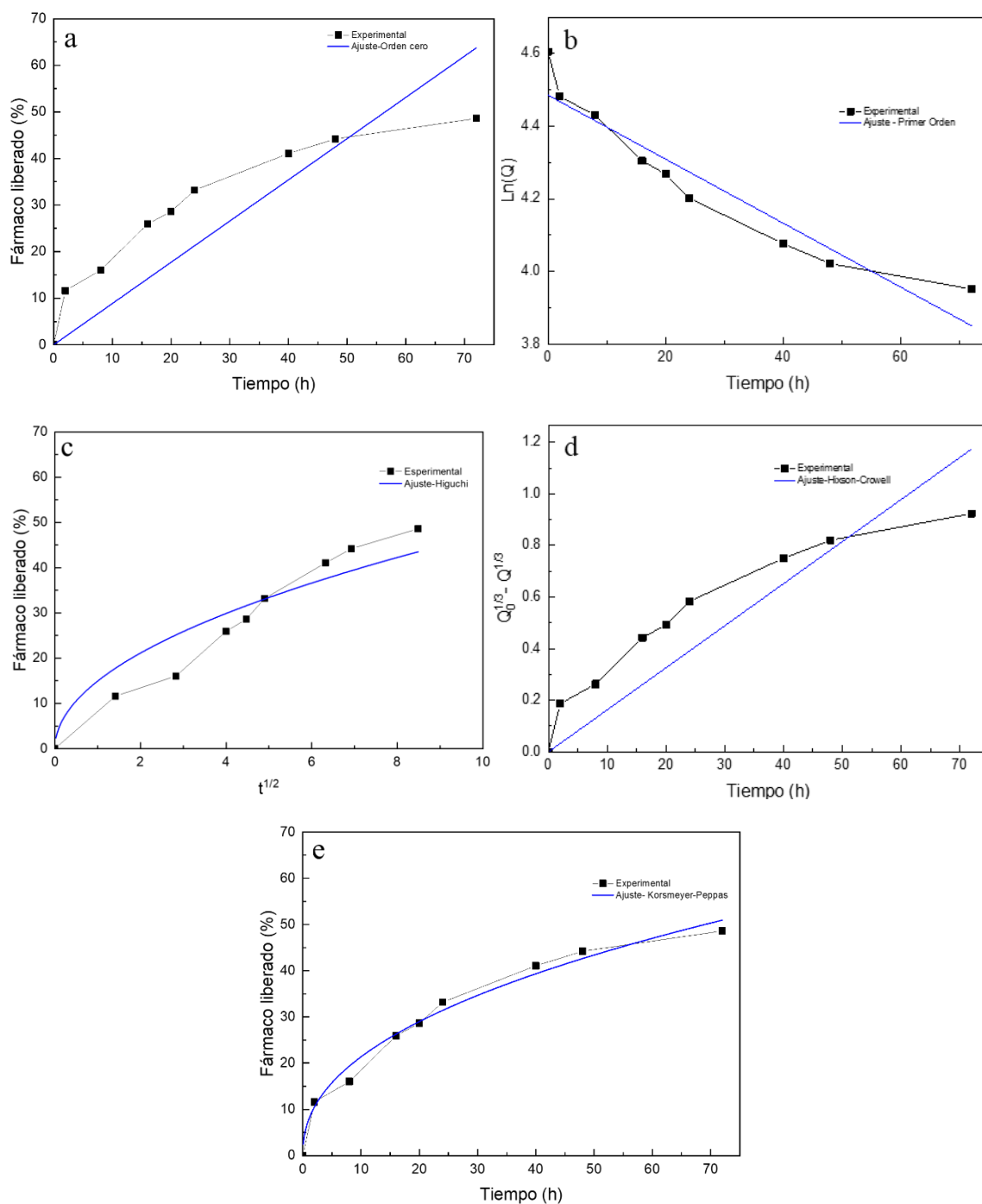


Figura 3. 22. Ajuste de la cinética de liberación a los modelos: a) orden cero, b) primer orden, c) Higuchi, d) Hixon-Crowell, e) Korsmeyer-Peppas.

Tabla 3. 10. Coeficientes de correlación (r^2) y constantes de rapidez (k) de los modelos matemáticos.

Modelo	(r^2)	k
Orden Cero	0.90637	0.8857 (% * h ⁻¹)
Primer Orden	0.90177	-0.0088 (h ⁻¹)
Higuchi	0.83074	14.9405 (%*h ^{-1/2})
Hixon-Crowell	0.92835	0.0163 (h ⁻¹)
Korsmeyer-Peppas	0.97816	7.7657 (% * h ⁻¹)
n=0.4398		

El modelo matemático de Korsmeyer-Peppas (ver Figura 3.22e) fue el que mejor se ajustó al perfil de liberación del fármaco al tener un coeficiente de correlación de 0.978, lo cual es lo esperado, debido a que este modelo fue desarrollado para sistemas de liberación de origen polimérico [92]. El valor del exponente de liberación n determina el mecanismo de liberación. En este trabajo n tuvo un valor de 0.438 lo cual indica que el mecanismo de liberación es la combinación de dos fenómenos; la difusión de Fick y la erosión de la matriz polimérica [93,94]. Por lo tanto, se puede postular que las moléculas del hidrobromuro de galantamina se liberan por difusión desde la nanopartícula de quitosano hacia el medio, siguiendo un gradiente de concentración. Además, el fármaco puede liberarse por medio de la erosión de la superficie de la nanopartícula de quitosano; debido a lo anterior, las nanopartículas de quitosano serían posibles candidatas para liberar de forma sostenida GH en el cerebro, y de esta manera ser una alternativa para los nuevos tratamientos de la enfermedad de Alzheimer.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se puede postular que las nanopartículas de quitosano, serían posibles sistemas de liberación de GH en el cerebro, debido a que puede cargar y liberar el fármaco de forma controlada.

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo, se presentan las siguientes conclusiones:

- ⊕ Los estudios de FTIR y TGA evidenciaron el proceso de reticulación iónica se lleva a cabo por la reacción de los grupos aminos protonados del quitosano y los aniones del TPP.
- ⊕ La concentración del tripolifosfato tiene un efecto directamente proporcional al tamaño de las partículas obtenidas
- ⊕ Cuando la concentración de CS es cercana a la de TPP se forman micropartículas que se van aglomerando.
- ⊕ La concentración de CS de 1.5 mg/ml es la más efectiva para generar nanopartículas, mientras que concentraciones mayores o menores producen micropartículas o masas amorfas.
- ⊕ Al incrementar el peso molecular del quitosano, aumenta el tamaño de las partículas, hasta producir masas amorfas. Por lo que existe un peso molecular óptimo (CS de bajo peso molecular: 110 kDa).
- ⊕ El tamaño promedio de las NPs-CS de la muestra L7 (170 nm) y M7(185nm) resultaron ser los más adecuados para una potencial aplicación en sistemas de liberación controlada de fármacos en el cerebro.
- ⊕ Es posible cargar GH en nanopartículas de quitosano por medio de la complejación entre el fármaco y el polímero.
- ⊕ La liberación in vitro del GH a partir las nanopartículas se ajusta al modelo de Korsmeyer-Peppas, en la que el fármaco se libera por difusión y erosión de la matriz polimérica.

RECOMENDACIONES

Con base a los resultados obtenidos, y con el fin de una mejora continua del proyecto se recomienda lo siguiente:

- ⊕ Optimizar la eficiencia de carga por medio de la variación de la cantidad de fármaco utilizado durante la complejación del quitosano-GH.
- ⊕ Realizar estudios complementarios que permitan corroborar la cantidad de fármaco cargado en las nanopartículas, usando técnicas como XPS ó EDX.
- ⊕ Realizar estudios *in vivo* con células endoteliales, para determinar la deposición y citotoxicidad de las nanopartículas cargadas con GH.

REFERENCIAS

- [1]. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhatti L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee S. Drug delivery systems: An updated review. *Int. J. Pharm. Investig.* 2 (1), 2012.
- [2]. M. del Amo E, Rimpela A, Heikkinen E, Kari O, Ramsay E, Lajunen T, Schmitt M, Pelkonen L, Bhattacharya M, Richardson D, Subrizi A, Turunen T, Reinisalo M, Itkonen J, Toropainen E, Casteleijn M, Kidron H, Antopolsky M, Vellonen K, Ruponen M, Urtti A. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. *Prog. Retin. Eye Res.* 57: 134-185, 2017.
- [3]. American Society of Health-System Pharmacists. Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics (Mayo, 2019). Disponible en: <https://www.ashp.org/-/media/store%20files/p2418-sample-chapter-1.pdf>.
- [4]. Perrie Yvonee, Rades Thomas. *Pharmaceutics- Drug Delivery and Targeting*. Pharmaceutical Press. Segunda edición. Nueva Zelanda: Fastrack; 4-6, 2012.
- [5]. Peppas N, Narasimhan B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *J. Control. Release.* 190,75-81, 2014.
- [6]. Dash S, Murthy P, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled. *Drug Research;* 67, 217-223, 2010.
- [7]. Pardridge WM. Drug targeting to the brain. *Pharm Res.* 24 (9),1733-1744, 2007.
- [8]. Skorobogatova A, Terenteva O, Vainshtein V, Okovityi S, Flisyuk E, Narkevich I. Targeted transport as a promising method of drug delivery to the central nervous system (review). *Pharm. Chem. J.* 53 (9): 845-851, 2019.
- [9]. Ayman K, Islam H, Hatim A, Yasser B, Mohammad M, Rabab T, Khaled A. Modified-chitosan nanoparticles: Novel drug delivery systems improve oral bioavailability of doxorubicin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 93, 38–44, 2016.
- [10]. Misra S, Chopra K, Sinha V. R, Medhi B. Galantamine-loaded solid–lipid nanoparticles for enhanced brain delivery: preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Drug Delivery.* 23(4), 1434–1443, 2016.

- [11]. Wen M, El-Salamouni N, El-Refaie W, Hazzah H, Ali M, Tosi G, Farid R, Blanco-Prieto M, Billa N, Hanafy A. Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial and clinical challenges. *J. Control. Release.* 245, 95-107, 2017.
- [12]. Kumar A, Mansour H, Friedman A, Blough E. Nanoparticles in Drug delivery Systems. En: CRC Press . *Nanomedicine in Drug delivery.*6-10, 2013.
- [13]. Cetin M, Gumru S, Aricioglu F. Nanotechnology Applications in Neuroscience: Advances, Opportunities and Challenges. 22 (2), 2012.
- [14]. Soppimath K. S, Aminabhavi T. M, Kulkarni A. R, Rudzinski W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release.* 70, 1–20, 2001.
- [15]. Son Sang J, Bai Xia. Lee Sang B. Inorganic hollow nanoparticles and nanotubes in nanomedicine Part 1. Drug/gene delivery application. *Drug Discov.* 12 (15/16), 2007.
- [16]. Rampino A, Borgogna M, Blasi P, Bellich B, Cesaro A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics* 2013; 455: 219– 228.
- [17]. Rampino A, Borgogna M, Blasi P, Bellich B, Cesaro A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *Int. J. Pharm* 455, 219– 228, 2013.
- [18]. Dudhani Anitha R, Kosaraju Shanta L. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization. *Carbohydr. Polym.*81,243–251, 2010.
- [19]. Sabu Thomas, Preetha Balakrishnan, Sreekala M.S. *Fundamental Biomaterials: Polymers.* India: Elsevier, Woodhead Publishing Series in Biomaterials; 2018. 3-23.
- [20]. Xiao K, Li Y, Luo J, Lee J, Xiao W, Gonik A, Agarwal R, Lam K. The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials.* 32, 3435–3446, 2011.
- [21]. Hans M.L, Lowman A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 6, 319–327,2002.
- [22]. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm.*69, 1–9,2008.

- [23]. Sinhg R, Lillar Jr J. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol* 86,215–223,2009.
- [24]. Aguilar Zoraida P. *Nanomaterials for Medical Applications*. Amsterdam: Elsevier; 2013. 3-10.
- [25]. Verma Ayush, Stellacci Francesco. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small*. 1, 12–21,2010.
- [26]. He Chunbai, Hu Yiping, Yin Lichen, Tang Cui, Yin Chunhua. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 31: 3657–3666, 2010.
- [27]. Rao J. Prasad, Geckeler Kurt E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.* 36: 887–913, 2011.
- [28]. Fathala Z, Khaled K, Hussein A, Alany R, Vangala A. Formulation and corneal permeation of ketorolac tromethamine-loaded chitosan nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 42(4), 514-524,2016.
- [29]. Sijumon K, Sajan J, Twan L. Understanding the mechanism of ionic gelation for synthesis of chitosan nanoparticles using qualitative techniques. *Asian J. Pharm.* 4 (2), 2010.
- [30]. H. Suheyla Kas. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J. Microencapsulation*. 14 (6), 689-711, 1997.
- [31]. Rayane Santa Cruz A, Lia Fook B, De Olivera Lima V, Farias Rached R, Nascimento Lima E, Da Silva Lima R, Peniche Covas C, Lia Fook M. Preparation and Characterization of Chitosan Obtained from Shells of Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Marine Drugs*, 15:141, 2017.
- [32]. Kamaly K, Yameen B, Wu J, Farokhzad O. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling. *Drug Release*.116: 2602-2663. 2016
- [33]. Bruno Sarmiento, José das Neves. *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics*. Portugal: John Wiley & Sons; 2012. 46-50.

- [34]. Vergaro V, Papadia P, Petrini P, Fanizzi F, De Pascali S, Baldassarre F, Pastorino L, Ciccarella G. Nanostructured polysaccharidic microcapsules for intracellular release of cisplatin. *Int. J. Biol. Macromol.* 99, 187–195, 2017.
- [35]. Chandy T, P. Sharma C. Chitosan - as a biomaterial. *Biomater., Art. Cells.* 18(1): 1-24, 1990.
- [36]. Rayane Santa Cruz A, Lia Fook B, De Olivera Lima V, Farias Rached R, Nascimento Lima E, Da Silva Lima R, Peniche Covas C, Lia Fook M. Preparation and Characterization of Chitosan Obtained from Shells of Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Marine Drugs.* 15, 141, 2017.
- [37]. H. Suheyla Kas. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *J. Microencapsulation.* 14 (6): 689-711, 1997.
- [38]. Sinha V.R, Singla A.K, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansai K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. Pharm.* 274, 1–33, 2004.
- [39]. Ways T, Lau W, Khutoryansky V. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers,* 10:267, 2018.
- [40]. Sanguansri, P., & Augustin, M. A. Nanoscale materials development in a Food industry perspective. *Trends Food Sci. Technol.* 17(10), 547-556, 2006.
- [41]. Calvo P, López C, Villa-Jato J, Alonso M. Novel Hydrophilic Chitosan–Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63, 125-132, 1997.
- [42]. Pati F, Adhikari B, Dhara S. Development of chitosan–tripolyphosphate fibers through pH dependent ionotropic gelation. *Carbohydrate Research.* 346, 2582–2588, 2011.
- [43]. Jin X, Zhang Sb, Li Sm, Liang K, Jia Zy. Influence of chitosan nanoparticles as the absorption enhancers on salvianolic acid B In vitro and In vivo evaluation. *Phcog Mag.* 12, 57-63, 2016.
- [44]. Hsieh F, Huang C, Lin T, Chen. Lin J. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. *Process Biochemistry,* 43, 83–92, 2008.
- [45]. Prabakaran M, Mano J.F. Chitosan-Based Particles as Controlled Drug Delivery Systems. *Drug Delivery.* 12, 41–57, 2005.

- [46]. Avtar S., Ajay M., Soottawat B. Chitosan nanoparticles: Preparation, food applications and health benefits. *Scienceasia*. 1513-1874, 2021.
- [47]. Fathala Z, Khaled K, Hussein A, Alany R, Vangala A. Formulation and corneal permeation of ketorolac tromethamine-loaded chitosan nanoparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 42(4), 514-524, 2016.
- [48]. Hanafy A, Farid R, ElGamal S. Complexation as an approach to entrap cationic drugs into cationic nanoparticles administered intranasally for Alzheimer's disease management: preparation and detection in rat brain. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41(12), 2055–2068, 2015.
- [49]. Pan Y, Li Y-J, Zhao H-Y, Zheng J, Xu H, Wei G, Hao J, Cui F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.* 249, 139-147, 2002.
- [50]. Wu Yan, Yang Wuli, Wang C, Hu Jianhua, Fu Shoukuan. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 295: 235–245.
- [51]. Rao J. Prasad, Geckeler Kurt E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36, 887–913, 2011.
- [52]. Janes K, Fresneau M, Marazuela A, Fabra A, Alonso M. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *J. Control. Release*; 73: 255–267, 2010.
- [53]. Veronika M., Peter M. Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 9652, 2021.
- [54]. Farshid A, C.S.R, Rama B, Malviya N, Shachindra L. Pharmacokinetic study and brain tissue analysis of Zolmitriptan loaded chitosan nanoparticles in rats by LC MS method. *Int. J. Biol. Macromol.* 142, 52-62, 2020.
- [55]. Ouyang Q, Zhao S, Li S, Song, C. Application of chitosan, chitooligosaccharide, and their derivatives in the treatment of Alzheimer's disease. *Marine Drugs*. 15(11), 1–15, 2017.

- [56]. Elnaggar V, Etman S, Abdelmonsif D, Abdallah O. Intranasal Piperine-Loaded Chitosan Nanoparticles as Brain-Targeted Therapy in Alzheimer's Disease: Optimization, Biological Efficacy, and Potential Toxicity. *J. Pharm. Sci.* 104, 3544–3556, 2015.
- [57]. Fazil M, Md S, Haque S, Kumar M, Baboota S, Sanhi J, Ali J. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 6–15, 2012.
- [58]. Nagpal K, Singh S.K, Mishra D.N. Optimization of brain targeted chitosan nanoparticles of Rivastigmine for improved efficacy and safety. *International Int. J. Biol. Macromol. al Journal of Biological Macromolecules.* 59, 72– 83, 2013.
- [59]. Bajic V, Milovanovic E, Spremo-potparevic B, Zivkovic L, Stanimirovic J, Bogdanovic N, Isenovic E. R. Treatment of Alzheimer ' s Disease : Classical Therapeutic Approach. *Current Pharmaceutical Analysis.* 12, 82–90, 2016.
- [60]. Santos G. Propiedades Funcionales Básicas de Materiales Porosos Nanoestructurados de Quitosano. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., P 52, 2013.
- [61]. Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Arguelles-Monal W-. Desbrieres, J. Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer (Guidf).* 42(8), 3569-3580, 2001.
- [62]. Sidra B., Nadian Z., Nouredine L., Asid M., Abdelmamid E. Hydroxypropyl Methylcellulose-Based Hydrogel Copolymeric for Controlled Delivery of Galantamine Hydrobromide in Dementia. *Processes.* 8,1350, 2020.
- [63]. Yang H. y Hon M. The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery. *Microchemical journal.* 92, 87-91, 2009.
- [64]. Fan Wen, Yan Wei, Xu Zushun, Ni Hong. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 90, 21– 27, 2012.
- [65]. Cunli P., Junqing Q., Changyan Z., Haiyang Y., Xiahua Z., Hui G. Study on the relationship between crosslinking degree and properties of TPP crosslinked chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers.* 241: 116349, 2020.

- [66]. Qi L, Xu Z, Jiang X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydr Res*, 339, 2693–700, 2004.
- [67]. Kaimin K., Xi H., Ziyuan S., Qian Y., Yanfeng Z., Faiith M., Chen J., Jianjun C. Dimeric Drug Polymeric Nanoparticles with Exceptionally High Drug Loading and Quantitative Loading Efficiency. *J. Am. Chem. Soc.*137(10), 3458-2461, 2015.
- [68]. Rinaudo M., Pavlov G., Desbriebes J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer (Guildf)*. 40(25), 7029-7032, 1999.
- [699]. Pérez A., Rojas J., Rodríguez J., Arrieta I., Arrieta Y., Rodríguez A. Antibacterial activity of chitosan acid solutions obtained from shrimp exoskeleton. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 21(1), 104-110, 2014.
- [70]. Skaroszczuk H., Sztuka K., Wolska J., Wojtasz-Pajak A., Kolodziejska I. Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 117, 707–712, 2014.
- [71]. Varma R., Vasedun S. Extraction, Characterization, and Antimicrobial Activity of Chitosan from Horse Mussel *Modiolus modiolus*. *American Chemical Society*. 5, 20224–20230. 2020.
- [72]. Tan G., Kaya M., Tevlek A., Sargin I., Baran T. Antitumor activity of chitosan from mayfly with comparison to commercially available low, medium and high molecular weight chitosans. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 54, 366–374, 2018.
- [73]. Wahba S., Darwish A., Kamal S. Ceria-containing uncoated and coated hydroxyapatite-based galantamine nanocomposites for formidable treatment of Alzheimer's disease in ovariectomized albino-rat model. *Materials Science and Engineering C*. 65, 151-163, 2016.
- [74]. Bashir S., Zafar N., Lebaz N., Mahmood A., Abdelhamid E. Hydroxypropyl Methylcellulose-Based Hydrogel Copolymeric for Controlled Delivery of Galantamine Hydrobromide in Dementia. *Processes* , 8, 1350, 2020.
- [75]. Nanaki S., Spyrou K., Bekiari C., Veneti P., Baroud T., Karouta N., Grivas I., Papadopoulos G., Gournis D., Bikiaris D. Hierarchical Porous Carbon—PLLA and PLGA Hybrid Nanoparticles for Intranasal Delivery of Galantamine for Alzheimer's Disease Therapy. *Pharmaceutics*.12, 227, 2020.

- [76]. Wazed A., Rajendran S., Mangala J. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers*. 83, 438–446, 2011.
- [77]. Hadidi M., Pouramin S., Adinepour F., Haghani S., Jafari S. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. *Carbohydrate Polymers*. 236, 116075, 2020.
- [78]. Anand M., Sathyapriya P., Maruthupaandy M., Hameedha A. Synthesis of chitosan nanoparticles by TPP and their potential mosquito larvicidal application. *Frontiers in Laboratory Medicine*. 2018.
- [79]. Ta Q., Ting J., Harwood S., Browning N., Simm A., Ross K., Olier I., Al-Kassas R. Chitosan nanoparticles for enhancing drugs and cosmetic components penetration through the skin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 160, 105765, 2021.
- [80]. Rodrigues, A., Costa A. Chitosan/carrageenan nanoparticles: effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydrate Polymers*. 89, 282–289, 2012.
- [81]. Po C., Ming T., Chun H., Chien L., Chitsan L., Chwen S., Chia K. Chitosan-Based Anti-Oxidation Delivery Nano-Platform: Applications in the Encapsulation of DHA-Enriched Fish Oil. *Marine Drugs*, 19, 470, 2021.
- [82]. Pan C., Qian J., Zhao C., Yang H., Zhao X., Guo H. Study on the relationship between crosslinking degree and properties of TPP crosslinked chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 241: 116349, 2020.
- [83]. Bhumkar D., Pokharkar V. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS PharmSciTech*. 7, E138–E143, 2006.
- [84]. Hosseini S, Zandi M, Rezaei M, Farahmandghavi F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*. 95, 50– 56, 2013.
- [85]. Villegas Y., Madera T., Sánchez R., Sánchez D., Martínez M., Correa M. Impact of the molecular weight on the size of chitosan nanoparticles: characterization and its solid-state application. *Polymer Bulletin*. 2020.

- [86]. Dhawade P., Jagtap R. Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. *Adv Appl Sci Res.* 3(3),1372–1382, 2012.
- [87]. Kamaly K., Yameen B., Wu J., Farokhzad O. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling. *Drug Release.* 116: 2602-2663, 2016.
- [88]. Cui, F., Shi, K., Zhang, L., Tao, A., Kawashima, Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *Journal of Control Release.* 114 (2), 242-250, 2006.
- [89]. Wahba S., Darwish A., Kamal S. Ceria-containing uncoated and coated hydroxyapatite-based galantamine nanocomposites for formidable treatment of Alzheimer's disease in ovariectomized albino-rat model. *Materials Science and Engineering C.* 65, 151-163, 2016.
- [90]. Akbar E., Azadeh A. In vitro release and biological activities of *Carum copticum* essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. *Biological Macromolecules*, 2015.
- [91]. Kabo I. Matshetshe, Sundararajan Parani, Sarah M. Manki, Oluwatobi S. Oluwafemi, Preparation, characterization and in vitro release study of β -cyclodextrin/chitosan nanoparticles loaded *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Biological macromolecules*. 2018.
- [92]. Elmas A, Akyuz G, Bergal A, Andac M, Andac O. Mathematical Modelling of Drug Release. *Res. Eng. Struct. Mater.* 6(4), 327-350, 2020.
- [93]. Sahar G., Seyed M., Reza N. A Novel and Inexpensive Method Based on Modified Ionic Gelation for pH-responsive Controlled Drug Release of Homogeneously Distributed Chitosan Nanoparticles with a High Encapsulation Efficiency. *Fibers and Polymers.* 21 (9), 1917-1926, 2020.
- [94]. Rangron Y., Jatesuda J., Kridsada A. Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. *Colloids and Surface B: Biointerfaces.* 292-297, 2020.