

## ENSAMBLADO DE MATRICES DE QUITOSANO CON NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON ÁCIDO GÁLICO

Lamarra, J.<sup>1</sup>; Lecot, J.<sup>1</sup>; Rivero, S.<sup>1</sup>; Pinotti, A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET-CIC, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

<sup>2</sup>Facultad de Ingeniería, UNLP, La Plata (1900), Argentina  
e-mail: [jlamarra11@gmail.com](mailto:jlamarra11@gmail.com)

### INTRODUCCION

El quitosano (Q) es un poliaminosácarido lineal compuesto por unidades monoméricas, N-acetil glucosamina y D-glucosamina, unidas a través de enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1-4). Este polímero tiene grupos amino sumamente reactivos en su estructura que permite modificar su funcionalidad mediante la incorporación de compuestos activos como el ácido gálico (AG) o la síntesis de nano-y micropartículas (Liu et al. 2015).

El ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) puede ser extraído de la nuez moscada, hojas de té, corteza de robles y otras plantas (Alkan et al. 2011). Posee diferentes propiedades biológicas como agente antiinflamatorio, antimutagénico y antioxidante (Giftson et al. 2010). Además, usado como entrecruzante, es capaz de modificar las propiedades mecánicas de materiales basados en polímeros naturales, permitiendo su uso en envases para alimentos (Sun et al. 2014).

El desarrollo de estrategias de preservación de los compuestos fenólicos que aseguren una viabilidad adecuada en el producto final es objeto de estudio en las industrias de alimentos y farmacéutica. La encapsulación de extractos y compuestos fenólicos constituye una estrategia de preservación de compuestos activos y un modo eficiente de incorporarlos es una matriz soporte (Stoll et al. 2015), facilitando su manejo y mejorando su estabilidad (Yousuf et al. 2015). Específicamente, por medio del empleo de la nanotecnología, nuevas formas de soportes poliméricos incorporando nanopartículas cargadas pueden ser desarrolladas para adaptar sus propiedades y modular la liberación de compuestos activos (de Moura et al. 2010). Según Merino et al. (2015) la combinación de una matriz polimérica con nanopartículas podría superar las limitaciones y desventajas asociadas con el empleo de nanopartículas aisladas como sistemas de liberación. Como fue descripto por Sugita et al. (2013), las ventajas principales de usar nanoestructuras como sistemas de liberación están relacionados con la posibilidad de incluir aditivos en las nanopartículas sin reacciones químicas, controlar y modular la liberación de compuestos activos, así como ajustar el diseño de las nanopartículas de acuerdo a su potencial uso.

Los objetivos de trabajo fueron: a) sintetizar nanopartículas a base de quitosano, funcionalizadas con ácido gálico; b) incluir las nanopartículas previamente sintetizadas en una matriz soporte de quitosano variando la relación nanopartícula:quitosano (N:Q); c) evaluar distintas propiedades de las películas formadas.

### Parte experimental

#### Materiales

Se usó quitosano (Q) proveniente de caparazones de cangrejos con un grado de desacetilación de 85% y un peso molecular de  $4,8 \times 10^4$  Da suministrado por Polymar Ciência e Nutrição (Fortaleza, Brasil). Tripolifosfato sódico de grado analítico (TPP), ácido gálico (AG) y ácido acético fueron adquiridos a Anedra (Buenos Aires, Argentina).

### *Síntesis de nanopartículas de quitosano*

Las suspensiones de nanopartículas se prepararon por el método de gelificación ionotrópica propuesto por *Calvo et al. (1997)* con algunas modificaciones. Las nanopartículas se formaron espontáneamente por adición gota a gota del TPP a una solución de Q funcionalizada con AG. Una vez finalizado este proceso, las suspensiones obtenidas fueron homogeneizadas a 13.500 rpm durante 10 min mediante un Ultraturax T-25 (Janke y Kunkel, IKA-Labortechnik, Alemania). Las formulaciones se prepararon con concentraciones de Q 0,75% (p/v) y AG 50 mg AG/g Q, difiriendo únicamente en la relación de concentraciones de Q:TPP. Estas relaciones fueron 5 y 3, las cuales se denominaron  $N_A$  y  $N_B$  respectivamente. Las formulaciones fueron seleccionadas en base a un diseño central compuesto, a partir del cual se obtuvieron los valores óptimos (*Lamarra et al. 2016*).

### *Preparación de soluciones filmogénicas*

Se preparó una solución de Q al 1,5% (p/v) por solubilización en ácido acético bajo agitación continua durante 24 h, seguida por una centrifugación a 7.000 rpm para eliminar el material insoluble presente. Para la formulación de las matrices nanocompuestas, diferentes proporciones de la suspensión de nanopartículas ( $N_A$  y  $N_B$ ) se incorporaron y dispersaron en la solución de quitosano obteniendo las relaciones N:Q: 1:2, 1:1 y 2:1 (v/v). Las películas nanocompuestas de quitosano fueron obtenidas por moldeo en placas de acrílico y secado a 37°C durante aproximadamente 18 h.

### *Análisis mecánico*

Para estudiar las propiedades mecánicas de las películas nanocompuestas se utilizó un texturómetro TA.XT2i-Stable Micro Systems (Inglaterra). Sobre muestras de 6 cm de longitud y 0,7 cm de ancho se determinaron el esfuerzo (MPa) y el porcentaje de elongación (%). Los ensayos se llevaron a cabo utilizando un sistema de tensión A/TG a una velocidad constante de 1 cm s<sup>-1</sup>. Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) fueron graficadas por medio del software Texture Expert Exceed.

### *Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier*

Para estudiar las interacciones establecidas entre los grupos funcionales de las nanopartículas y la matriz soporte se utilizó un equipo de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (Nicolet, iS10 Thermo Scientific, Madison, USA) en el modo de reflectancia total atenuada (ATR). Los datos registrados en el rango de 400-4000 cm<sup>-1</sup> por acumulación de 64 scans con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup> fueron analizados usando el software Omnic 8 (Thermo Scientific). La deconvolución espectral de la datos se realizó utilizando algoritmos de ajuste de la curva en la región 1700-1500 cm<sup>-1</sup>. Se realizó la segunda derivada de los espectros para estimar el número, la posición y la contribución relativa de los elementos individuales de la amida I y amida II.

### *Difracción de rayos X*

Las películas formadas a base de quitosano fueron analizadas por difracción de rayos X usando un equipo Philips PW 3710, X'Pert Pro P Analytical ModelPW3040/60 (Almelo, Países Bajos). Se operó con radiación CuK (1.542 Å) a temperatura ambiente a 40 kV y 30 mA. La intensidad relativa fue registrada en el rango de (2θ) 3-60°. La relación del área del pico cristalino ( $A_p$ ) respecto del área total del difractograma ( $A_t$ ) se usó para determinar el grado de cristalinidad como se describe en la siguiente ecuación:

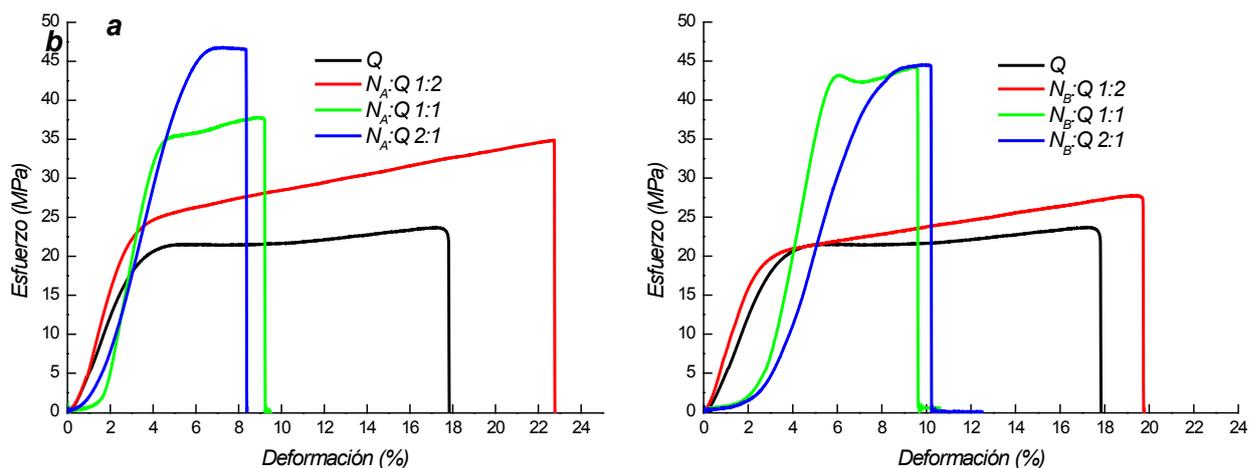
$$GC(\%) = \frac{Ap}{At} \times 100$$

### Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos se empleó el test de comparación de medias de Fisher (LSD) y análisis de varianza (ANOVA), utilizando el paquete estadístico Systat (versión 10, USA), con un nivel de significación de 0,05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la Figuras 1a y b, el agregado de la menor proporción de nanopartículas (relación 1:2) no generó cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en las propiedades mecánicas de las películas. Sin embargo, con la incorporación de proporciones crecientes a la matriz de quitosano se obtuvo un aumento en el esfuerzo y una disminución en la elongación (Tabla 1). Este hecho podría atribuirse a la reducción del volumen libre existente entre las cadenas del polímero provocado por el aumento de las fuerzas de interacción entre las mismas generando así una red polimérica interconectada y más compacta (Hosseini et al. 2015). Resultados similares fueron informados por Sanuja et al. (2015) quienes encontraron que al aumentar la concentración de nanopartículas de ZnO incluidas, las películas de quitosano experimentaron un incremento en el valor de esfuerzo.



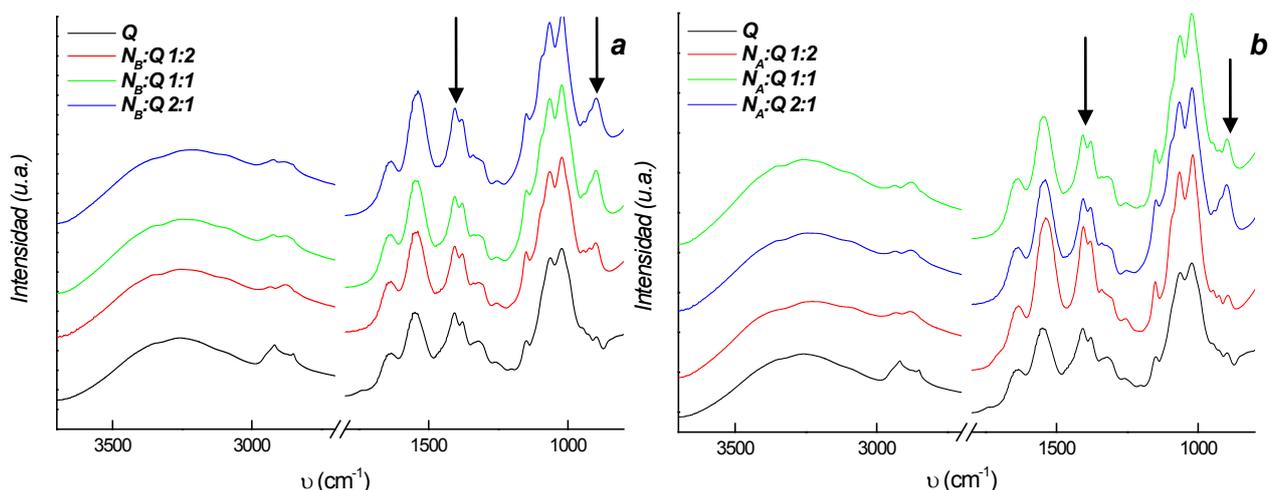
**Figura 1:** Perfiles mecánicos de películas a base de quitosano con diferentes proporciones de suspensión de nanopartículas: a)  $N_A$ , b)  $N_B$ .

**Tabla 1:** Esfuerzo máximo y elongación en la ruptura de las matrices de Q y las distintas formulaciones nanocompuestas\* con sus respectivas desviaciones estándar

Muestra	Esfuerzo (MPa)	Elongación en la ruptura (%)
Q	24,2 (0,8) <sup>a</sup>	18,3 (2,9) <sup>a</sup>
N <sub>A</sub> :Q 1:2	32,9 (3,2) <sup>b</sup>	26,0 (5,5) <sup>b</sup>
N <sub>A</sub> :Q 1:1	34,3 (2,7) <sup>b</sup>	14,9 (0,8) <sup>c</sup>
N <sub>A</sub> :Q 2:1	45,3 (3,1) <sup>c</sup>	8,3 (1,0) <sup>d</sup>
N <sub>B</sub> :Q 1:2	26,2 (2,9) <sup>a</sup>	18,7 (1,7) <sup>a</sup>
N <sub>B</sub> :Q 1:1	51,4 (4,2) <sup>d</sup>	8,4 (1,2) <sup>d</sup>
N <sub>B</sub> :Q 2:1	45,3 (3,1) <sup>c</sup>	9,8 (0,6) <sup>d</sup>

\*Subíndices diferentes en una misma columna representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras.

Para estudiar las interacciones entre los distintos componentes de las películas nanocompuestas se utilizó la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier en el modo ATR. En la Figura 2 se visualiza la presencia de un pico ubicado a  $900\text{ cm}^{-1}$  atribuido al estiramiento P=O del polianión tripolifosfato, indicando su presencia en la matriz. En ambas formulaciones se pudo observar que al aumentar la proporción de suspensión de nanopartículas, la intensidad del pico se incrementó significativamente. No obstante, esta tendencia resultó más acentuada para las matrices nanocompuestas con nanopartículas N<sub>B</sub>. Para mejorar la resolución espectral se recurrieron a técnicas matemáticas como la deconvolución de los picos pertenecientes a la amida I (estiramiento C=O) y a la amida II (bending N-H). Del análisis se evidenció, la conformación de un pico en la banda de la amida I y dos picos en la amida II. En este último caso se observó un corrimiento hacia menores números de onda de uno de los picos con respecto al quitosano, lo que indicaría la existencia de interacciones entre los grupos amino del quitosano y los fosfatos del tripolifosfato.

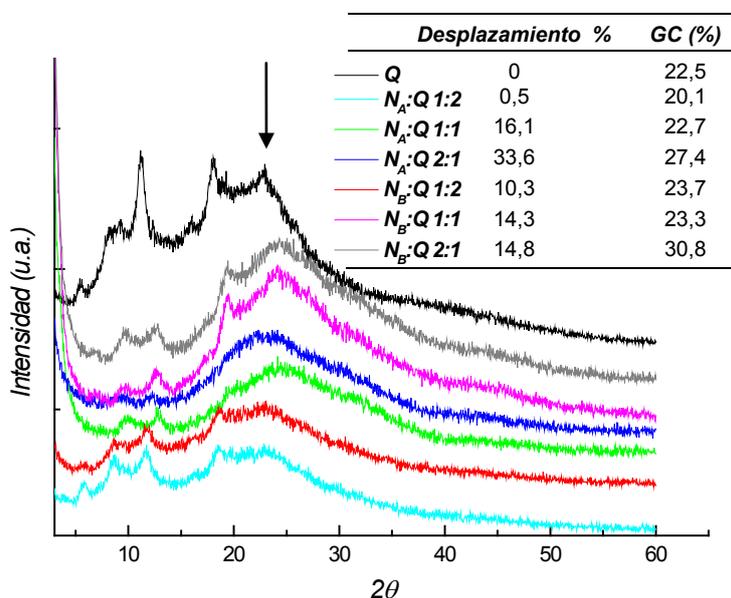
**Figura 2:** Espectros FTIR-ATR de películas a base de quitosano con diferentes proporciones de suspensión de nanopartículas: a) N<sub>A</sub>, b) N<sub>B</sub>.

Con el objetivo de analizar el cambio en la cristalinidad de las distintas películas nanocompuestas se realizaron los espectros de difracción de rayos X, cuyos resultados se

resumen en la Figura 3. Se observa que al aumentar la proporción de nanopartículas incorporadas a la matriz de quitosano se incrementó el área del pico centrado a  $22^\circ$  asignado a las cadenas de quitosano alineadas a través de interacciones intermoleculares (Yu *et al.* 2013) (Tabla inserta Figura 3). Estos cambios podrían atribuirse al aumento en el contenido de nanopartículas, con el consiguiente incremento en la concentración de compuestos con características cristalinas como el AG y TPP.

Resultados similares fueron observados por Yu *et al.* (2013) quienes registraron un aumento en la cristalinidad al aumentar el contenido de TPP en muestras a base de quitosano. El grado de cristalinidad se muestra en la Tabla inserta en la Figura 3, siendo las muestras con mayor proporción de suspensión de nanopartículas ( $N_A$  y  $N_B:Q$  2:1) las que evidenciaron mayores cambios en el GC (%). Asimismo, se observan mayores desplazamientos del pico centrado a  $2\theta = 22^\circ$  presente en la muestra control, confirmando el cambio en la estructura de la matriz.

La modificación en el grado de cristalinidad se correlacionó con los valores de esfuerzo obtenidos a partir de los patrones mecánicos.



**Figura 3:** Espectros de difracción de rayos X de las películas a base de quitosano con diferentes proporciones de suspensión de nanopartículas

## CONCLUSIONES

La inclusión de nanopartículas generó matrices con mejores propiedades mecánicas manifestadas por la obtención de un mayor valor de esfuerzo a medida que se incrementó la proporción incorporada a la matriz de quitosano, en correspondencia con el aumento de la cristalinidad de los nanocompuestos. Las interacciones establecidas debido a la presencia de nanopartículas incluidas en la matriz soporte también pudo evidenciarse por ATR, observándose modificaciones en los espectros respecto del control de quitosano. Así, los materiales formulados tienen un potencial aplicación en el campo de conservación de productos alimenticios en virtud de la presencia de ácido gálico, compuesto con reconocidas propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

## Referencias

Alkan, D., Aydemir, L.Y., Arcan, I., Yavuzdurmaz, H., Atabay, H.I., Ceylan, C., Yemenicioglu, A. (2011). Development of flexible antimicrobial packaging materials against *Campylobacter jejuni* by incorporation of gallic acid into zein-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11003-11010.

Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125-132.

de Moura, M.R., Aouada, F.A., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Krochta, J.M., Mattoso, L. H. (2009). Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 92, 448-453.

Giftson, J.S., Jayanthi, S., Nalini, N. (2010). Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Investigational New Drugs*, 28, 251-259.

Hosseini S.F., Rezaei M., Zandi M., Farahmandghavi F. (2015). Fabrication of bio nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 44, 172-182.

Lamarra, J., Rivero, S., Pinotti, A. (2016). Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. *Materials Science and Engineering C*, 67, 717-726.

Liu, F., Antoniou, J., Li, Y., Yi, J., Yokoyama, W., Ma, J., Zhong, F. (2015). Preparation of gelatin films Incorporated with tea polyphenol nanoparticles for enhancing controlled-release antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3987-3995.

Merino, S., Martín, C., Kostarelos, K., Prato, M., Vázquez, E. (2015). Nanocomposite hydrogels: 3D polymer-nanoparticle synergies for on-demand drug delivery. *ACS nano*, 9, 4686-4697.

Sanuja S, Agalya A., Umapathy M.J. (2015). Synthesis and characterization of zinc oxide-neem oil-chitosan bionanocomposite for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 76-84.

Stoll, L., Costa, T. M., Jablonski, A., Flôres, S. H., de Oliveira Rios, A. (2016). Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films. *Food and Bioprocess Technology*, 9(1), 172-181.

Sugita, P., Ambarsari, L., Sari, Y.A., Nugraha, Y. (2013). Ketoprofen encapsulation optimization with chitosan-alginate cross-linked with sodium tripolyphosphate and its release mechanism determination using in vitro dissolution. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*, 14(1), 141-149.

Sun, Y., Liu, Y., Li, Y., Lv, M., Li, P., Xu, H., Wang, L. (2011). Preparation and characterization of novel curdlan/chitosan blending membranes for antibacterial applications. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 952-959.

Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., Singh, P. (2015). Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. DOI: 10.1080/10408398.2013.805316.

Yu S-H., Wu S-J., Wu J-Y., Peng C-K., Mi F-L. (2013). Tripolyphosphate cross-linked macromolecular composites for the growth of shape- and size-controlled apatites. *Molecules*, 18, 27-40.