

Entrecruzamiento de un almidón comercial cubano para su uso como matriz de liberación controlada de fármacos

Juan Sabatier, Roberta C.R.S. Rosa* y Cristina T. Andrade.*

Laboratorio de Polisacáridos, Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana, Apartado Postal 6130, Código Postal 10600, La Habana, Cuba. Correo electrónico: jsabac@biomat.uh.cu. *Laboratorio de Polímeros Hidrosolubles, Instituto de Macromoléculas, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil.

Recibido: 14 de mayo de 2003. Aceptado: 24 de marzo de 2004.

Palabras clave: almidón, entrecruzamiento, epíclorhidrina, liberación controlada, medicamentos.
Key words: starch, crosslinking, epichlorhydrin, controlled release, drugs.

RESUMEN. Se estudió el entrecruzamiento de un almidón comercial cubano con epíclorhidrina (ECH) y los productos se evaluaron con vistas a la liberación controlada de fármacos. Inicialmente, se determinó el tiempo de gelatinización y posteriormente, se investigó el entrecruzamiento, estudiando la dosis de ECH (porcentaje sobre almidón), adición de amoníaco (moles de NH_3 /moles de ECH) y tiempo de adición de la ECH (min), entrecruzando almidón total o parcialmente gelatinizado. La reacción fue seguida midiendo la viscosidad del sistema reaccionante. Las muestras se caracterizaron por espectroscopia IR y RMN ^{13}C , microscopia electrónica de barrido y determinando el hinchamiento en varios fluidos, tales como fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS). El tiempo del entrecruzamiento y la viscosidad máxima obtenida solo fueron influidos significativamente por la dosis de ECH. El tiempo fluctuó entre 60 y 150 min, mientras que la viscosidad varió de 110 a 170 $\text{mPa} \cdot \text{s}$. Se encontró una elevada correlación entre la absorbancia IR a 2 930 cm^{-1} (grupos CH_2) y la viscosidad, indicando la posibilidad de cuantificar el grado de entrecruzamiento por esta vía. La microscopia electrónica permitió observar las muestras de almidón entrecruzado como materiales relativamente homogéneos, mientras para el almidón natural se apreciaron gránulos de 10 μm de diámetro. Los mejores resultados se lograron aplicando 10 % ECH y 1 mol NH_3 /mol ECH, evidenciado esto por elevados valores del hinchamiento máximo, gran velocidad (bajos tiempos) para alcanzarlo en FIS y tiempos mayores en FGS. Dosis de ECH mayores al 10 % limitaron el hinchamiento.

ABSTRACT. Crosslinking of a Cuban commercial starch with epichlorohydrin (ECH), for obtaining a polymeric matrix to be used in controlled release of drugs, was studied. Gelatinization time was previously determined at the experimental conditions lately used for ECH crosslinking of starch. The independent variables for the crosslinking study were ECH dose (percentage on starch), ammonia dose (moles of NH_3 /moles of ECH) and time for ECH addition (min) in order to crosslink full or partial gelatinized starches. Crosslinking was followed by dynamic viscosity measurements. Crosslinked starches were characterized by IR and ^{13}C NMR spectroscopies, scanning electron microscopy (SEM) and determining the swelling on several fluids, as simulated intestinal fluid (SIF) and simulated gastric fluid (SGF). Maximum viscosity and crosslinking time were only significantly influenced by ECH dose. Crosslinking time ranged between 60 to 150 min, meanwhile maximum viscosity changed from 110 to 170 $\text{mPa} \cdot \text{s}$. A significant high correlation between IR absorbance at 2 930 cm^{-1} (corresponding to CH_2 groups) and maximum viscosity was found, indicating the possibility of measuring the crosslinking degree of starch by this technique. SEM showed crosslinked starches as relative homogeneous materials, meanwhile granules of 10 mm diameter were found in the initial starch. Best results were obtained at 10 % ECH and 1 mol NH_3 /mol ECH, as can be seen by the high values of the maximum swelling (MS), high speed (short times) for reaching MS in SIF and higher times in SGF. ECH doses higher than 10 % affected the maximum swelling and were not adequate.

INTRODUCCION

El desarrollo de los sistemas de liberación controlada ha ido aparejado con las aplicaciones médicas y farmacéuticas de los polímeros.^{1,2} Un sistema polimérico ampliamente utilizado ha sido el de los llamados "hidrogeles", retículos poliméricos que absorben y retienen grandes cantidades de agua al hidratarse sus grupos funcionales hidrofílicos,³ por lo que requieren de un cierto nivel de entrecruzamiento para evitar la disolución de las cadenas poliméricas hidrofílicas.

Los polímeros biodegradables son preferidos para estos sistemas,^{1,4} ya que disminuyen los riesgos de acumulación del polímero en el entorno biológico. Los polímeros naturales son una alternativa muy atractiva no sólo porque usualmente son biodegradables, sino también, por su disponibilidad, bajos costos y capacidad de experimentar modificaciones químicas.^{1,4} Los polisacáridos representan opciones ventajosas por ser usualmente no tóxicos y farmacológicamente inertes.¹ El almidón es uno de los polisacáridos más utilizado para estos fines,⁵⁻⁶ siendo el más producido a nivel industrial⁷⁻⁸ y aplicándose en la industria alimentaria, de cosméticos, del papel, farmacéutica y muchas otras debido a su elevada pureza y bajo costo.⁸

Distintos reactivos han sido utilizados para el entrecruzamiento del almidón, tales como el trimetafosfato de sodio,⁸⁻¹⁰ la epíclorhidrina¹¹⁻¹³

y otros.⁷ Incrementos del grado de entrecruzamiento por encima de cierto valor provocan una disminución del hinchamiento y afectan la liberación controlada,¹³ por lo que el entrecruzamiento debe ser controlado para lograr resistencia a la disolución y adecuadas propiedades mecánicas del gel sin afectar sus propiedades.

En el Instituto de Macromoléculas de la Universidad Federal de Río de Janeiro se han realizado estudios sobre el entrecruzamiento del almidón con epíclorhidrina para la obtención de materiales termoplásticos,¹⁴⁻¹⁵ mientras que en el Centro de Biomateriales de la Universidad de la Habana se investiga la aplicación de los polisacáridos para la formulación de sistemas de liberación controlada de fármacos. El objetivo de este trabajo consistió en el estudio del entrecruzamiento con epíclorhidrina de un almidón comercial cubano con vistas a la obtención de una matriz polimérica adecuada para la formulación de sistemas de liberación controlada de fármacos.

PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo fue realizado con almidón de maíz producido nacionalmente en la única fábrica que existe en Cuba con ese propósito. Las propiedades del almidón de partida fueron 13 % de humedad, 0,15 % de cenizas, 0,55 % de proteínas y 0,50 % de ceras. El tiempo de gelatinización se determinó de 25 a 27 °C y agitación constante en una disolución 1 mol/L de NaOH, para una relación NaOH/almidón de 1 : 1 (p/p). Se entrecruzó adicionando epíclorhidrina (ECH) a dicho sistema, según el diseño experimental (Tabla 1). La adición de amoníaco (NH₃), cuando se realizó, fue justo antes de la ECH. La gelatinización y el entrecruzamiento fueron seguidos midiendo la viscosidad del sistema cada 15 min. Se consideró finalizado el entrecruzamiento cuando se determinó una viscosidad constante durante cuatro a cinco lecturas. Posteriormente, se neutralizó a pH 7 y se precipitó el almidón entrecruzado sobre etanol. El producto fue filtrado y lavado con mezcla etanol-agua 1 : 1 y posteriormente con etanol. Finalmente, fue secado a 50 °C durante 16 h. Los reactivos empleados en el trabajo fueron todos de calidad analítica de diversos fabricantes.

La dosis de ECH fue variada según la literatura,¹⁶⁻¹⁷ al igual que la de NH₃,^{12,14-15} aunque en este último caso, también se contempló su no

utilización. El momento de adición de la ECH se varió para entrecruzar almidones total y parcialmente gelatinizados. Las muestras se caracterizaron por espectroscopia IR y RMN ¹³C, microscopia electrónica de barrido y determinando el hinchamiento en diversos fluidos. La viscosidad se determinó a (25,0 ± 0,1) °C y diferentes velocidades de cizallamiento en un viscosímetro Brookfield Synchro-lectric Modelo LVT. Un potenciómetro digital (Modelo Q400A, Quimis Aparelho, Brasil), previamente normalizado, fue usado para medir el pH. Se intentó evaluar el entrecruzamiento por la intensidad relativa de la señal IR de 2 930 cm⁻¹ (grupos CH₂) referida a la banda de 850 a 865 cm⁻¹ de la vibración 2a de las α-D-glucopiranosas. Los espectros IR fueron obtenidos en un espectrómetro FTIR Perkin Elmer 1720X con resolución de 2 cm⁻¹, aplicando 20 acumulaciones a tabletas de KBr con una concentración de 10 % (p/p) de muestra. También se intentó evaluar los grupos CH₂ mediante RMN ¹³C. Los espectros se determinaron a disoluciones al 10 % (p/p) de muestra en DMSO-d₆, utilizando un espectrómetro Varian Modelo Mercury 300, a 75,4 MHz. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente en modo de transformada de Fourier,

con 12 000 acumulaciones a un pulso de 90°, tiempo de relajación de 0,5 s y tiempo de adquisición de 1,591 s. Se garantizó el desacoplamiento de banda ancha con el hidrógeno y se utilizó como referencia el pico central del DMSO-d₆ (δ = 39,5 ppm). También se determinaron los espectros APT (Attached Proton Test). Las microfotografías se obtuvieron en un microscopio Jeol JSM-5610 LV, a 2 a 10 kV. Las muestras fueron previamente sometidas a deposición de Au/Pd en un equipo Denton II. El hinchamiento en el tiempo se determinó mediante el equipo descrito para evaluar la absorción de superabsorbentes¹⁸ utilizando fluidos intestinal simulado (FIS) y gástrico simulado (FGS).¹⁹

RESULTADOS Y DISCUSION

Bajo las condiciones empleadas, la gelatinización del almidón ocurre a los 90 min (Fig. 1). La adición de ECH a 90 min de comenzada la gelatinización se corresponde con el entrecruzamiento de un almidón totalmente gelatinizado, mientras que la adición a menor tiempo, implica entrecruzar almidón parcialmente gelatinizado.

Durante el entrecruzamiento, la viscosidad aumenta hasta un valor constante (Fig. 2). Se pudo apreciar

Tabla 1. Variables independientes y sus niveles para el estudio del entrecruzamiento.

Variable	Nivel		
	Bajo	Medio	Alto
Dosis de ECH, porcentaje sobre almidón (p/p).	10	15	20
Relación molar NH ₃ /ECH.	0	0,5	1
Tiempo para la adición de la ECH (min).	30	60	90

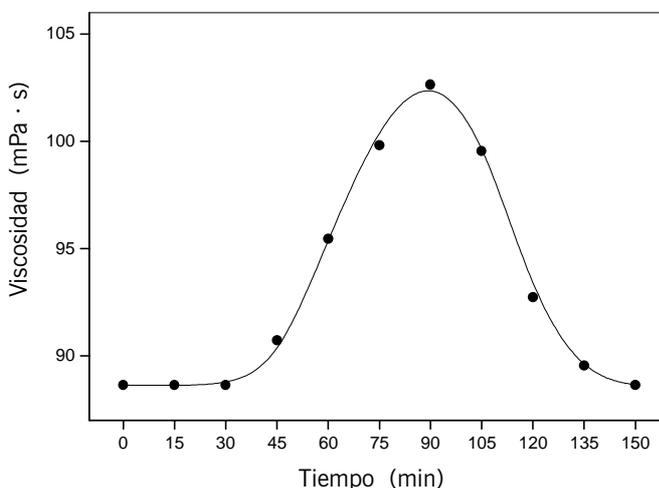


Fig. 1. Variación de la viscosidad durante la gelatinización del almidón.

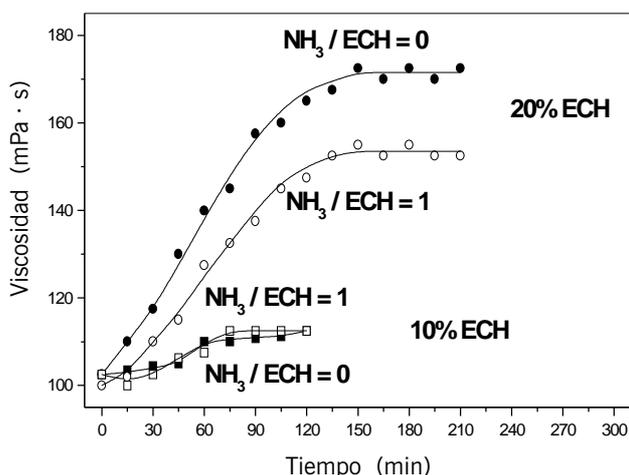


Fig. 2. Influencia de la dosis de ECH y NH_3 a un tiempo de adición de 90 min .

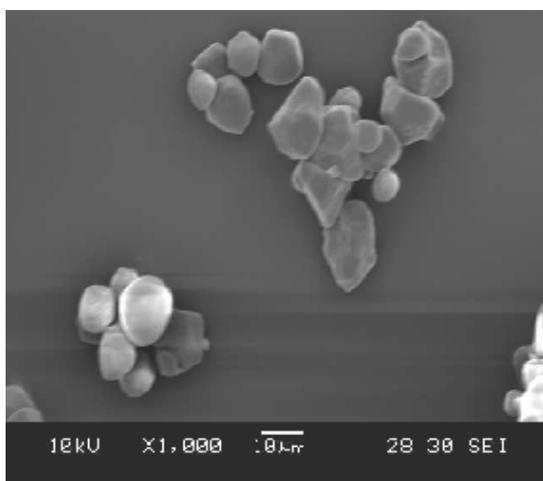


Fig. 3. Microfotografía (Magnificación $\times 1\,000$) de los gránulos del almidón comercial de partida.

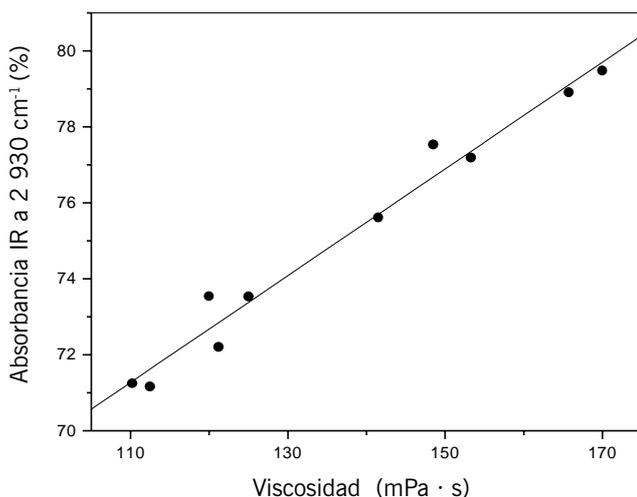


Fig. 4. Relación entre la viscosidad máxima y la absorbancia IR a $2\,930\text{ cm}^{-1}$.

cómo la viscosidad máxima depende fundamentalmente de la dosis de ECH al igual que el tiempo del entrecruzamiento. Para 10 % de ECH la reacción concluye entre los 60 y

90 min bajo las condiciones empleadas, mientras que para 20 % de ECH, se prolonga hasta 150 min . Un análisis estadístico, con un nivel de significación de 0,99 o superior, demos-

tró que ambas respuestas dependen significativamente solo de la dosis de ECH.

La microscopía electrónica permitió observar en el almidón de partida gránulos de diámetro aproximado de $10\ \mu\text{m}$ (Fig. 3). Todos los almidones entrecruzados se apreciaron como materiales relativamente homogéneos al mismo nivel de magnificación; indicando que la gelatinización continúa, aún cuando se haya adicionado la ECH.

Los espectros IR para el almidón de partida, así como para los almidones entrecruzados, no presentaron variación con lo reportado en la literatura en cuanto a cantidad y posición de señales. El cálculo de intensidades relativas no permitió determinar el grado de entrecruzamiento. No obstante, se encontró la tendencia significativa ($r = 0,987\ 1$; $r_c = 0,872$ para $\alpha = 0,999$) de que al aumentar la viscosidad máxima se incrementa la absorbancia en $2\,930\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 4). Esto indica una posible relación entre la absorbancia de esta señal IR y el grado de entrecruzamiento, lo que señala la necesidad de trabajos futuros.

Se pudo apreciar que el espectro RMN ^{13}C para una muestra de almidón entrecruzado (Fig. 5, Tabla 2) es prácticamente idéntico al obtenido para el almidón de partida, con la diferencia de las señales en 63,2 y 70,0 ppm . La asignación de estas señales de baja intensidad corresponde a grupos CH_2 y CH , respectivamente, planteando la posibilidad de que fueran señales producidas por el entrecruzamiento. Su baja intensidad estaría en consonancia con los niveles de entrecruzamiento esperados en este trabajo. No obstante, una profundización en estos resultados no sustentó esta posibilidad. De hecho, la evidencia obtenida no ha posibilitado evaluar el grado de entrecruzamiento, coincidiendo con las dificultades planteadas en este sentido en la literatura.^{7-10,17}

Finalmente, se aportan algunos resultados de la evaluación del hincharse en el tiempo para diferentes muestras de almidón entrecruzado (Fig. 6), así como los principales aspectos de interés (Tabla 3).

Los mejores resultados se lograron aplicando 10 % ECH y 1 mol NH_3 /mol ECH (experimentos J3 y J7), evidenciados por elevados valores del hincharse máximo (HM), gran velocidad (bajos PZ) en FIS y tiempos (PZ) mucho mayores en FGS. Dosis de ECH mayores al 10 %, limitaron el

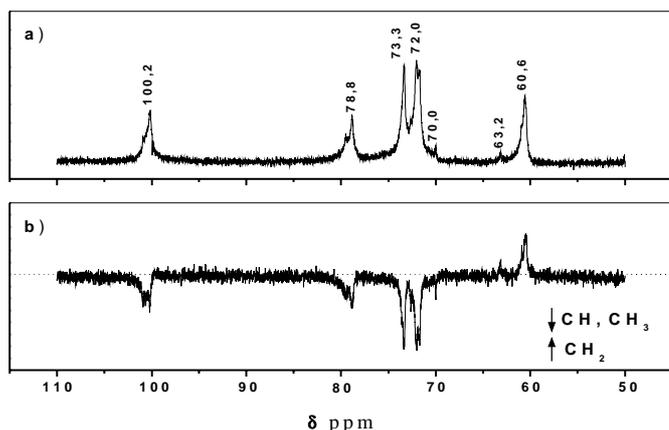


Fig. 5. Espectros RMN ¹³C cualitativo (a) y APT (b) del almidón entrecruzado.

Tabla 2. Asignaciones de las señales del espectro RMN ¹³C para el almidón entrecruzado.

Corrimiento químico (δ) (ppm)	Grupo funcional	Átomo de carbono
100,2	CH	C ₁ , carbono anomérico
78,8	CH	C ₄ , enlace α 1-4
72,0 a 73,3	CH	Carbonos 2, 3 y 5
70,0	CH	?
63,2	CH ₂	?
60,6	CH ₂ OH	C ₆ , hidroxilo primario

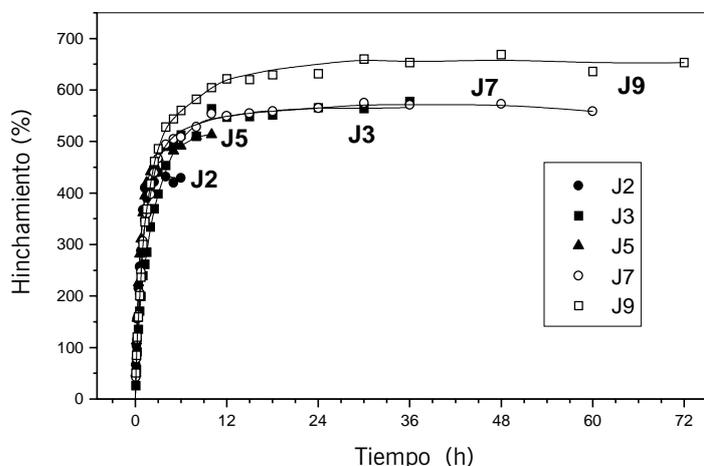


Fig. 6. Hinchamiento de diferentes muestras de almidón entrecruzado en FGS.

Tabla 3. Principales resultados de la evaluación del hinchamiento.

Exp.	Condiciones			Resultados (FIS/FGS)		
	ECH	NH ₃	t _{ECH}	HM	PZ	HPZ
J2	20	0	30	300/440	90/300	*/88
J3	10	1	30	520/600	90/360	85/85
J5	10	0	90	500/510	90/120	88/86
J7	10	1	90	560/570	180/480	87/93
J9	15	0,5	60	420/660	120/480	*/88

HM Hinchamiento máximo alcanzado (%). PZ Primera zona de mayor aumento del hinchamiento (min). HPZ Porcentaje de hinchamiento en la primera zona respecto al HM (%). * Hinchamiento limitado por afectación del hidrogel.

hinchamiento presumiblemente por producir mayor grado de entrecruzamiento.

CONCLUSIONES

El tiempo de gelatinización del almidón utilizado en este trabajo, bajo las condiciones empleadas en él, es de 90 min. La dosis de ECH fue la única variable con peso significativo sobre la viscosidad máxima y el tiempo del entrecruzamiento. Mayores dosis de ECH conducen a mayores viscosidad y tiempo de entrecruzamiento. Se obtienen materiales entrecruzados relativamente homogéneos aún al adicionar la ECH antes de finalizada la gelatinización. No se logró cuantificar el grado de entrecruzamiento por IR y RMN ¹³C. No obstante, existen indicios de que la intensidad de la banda IR correspondiente a los grupos CH₂, ubicada en 2 925 a 2,932 cm⁻¹, varía debido al entrecruzamiento. La evaluación del hinchamiento indicó que los mejores resultados se lograron en los experimentos a 10 % ECH y 1 mol NH₃/mol ECH (J3 y J7) evidenciados por elevados valores del hinchamiento máximo (HM), gran velocidad (bajos PZ) en FIS y tiempos (PZ) mucho mayores en FGS.

AGRADECIMIENTOS

A la Academia de Ciencias del Tercer Mundo (TWAS) y el Consejo Nacional de Pesquisas (CNPq) de Brasil por el apoyo financiero a este trabajo. A Nadir Sánchez, Marcia R. Benzi y Eduardo Miguez por su cooperación en el trabajo de microscopía electrónica, espectroscopias IR y RMN ¹³C, respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

- Dumitriu S. (Ed.). Polymeric Biomaterials, Marcel Dekker, New York, 1994.
- Peppas N.A., Bures P, Leobandung W. and Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 27, 2000.
- Hennink W.E. and Van Nostrum C.F. Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Reviews*, 54, 13, 2002.
- Bogdanský S. Natural polymers as drug delivery systems, in *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (M. Chasin and R. Langer, Eds.), Marcel Dekker, New York, 231-259, 1990.
- Chebli C., Moussa I., Buczkowski S. and Cartilier L. Substituted amylose as a matrix for sustained drug release, *Pharm. Res.*, 16, 1436, 1999.
- Dumoulin Y., Cartilier L.H. and Mateescu M.A. Cross-linked amylose tablets containing alpha-amylase: an enzymatically-controlled drug release system, *J. Control. Release*, 60, 161, 1999.

7. Wurzburg O.B. (Ed.). *Modified starches: Properties and uses*, CRC Press, Boca Ratón, 1986.
8. Le Bail P., Morin F.G. and Marchessault R.H. Characterization of a crosslinked high amylose starch excipient, **Int. J. Biolog. Macrom.**, **26**, 193, 1999.
9. Ravenelle R., Marchessault R.H., Légaré A. and Buschmann M.D. Mechanical properties and structure of swollen crosslinked high amylose starch tablets, **Carbohydrate Polymers**, **47**, 259, 2002.
10. Woo K. and Sieb P.A. Cross-linking of wheat starch and hydroxy propylated wheat starch in alkaline slurry with sodium trimetaphosphate, **Carbohydrate Polymers**, **33**, 263, 1997.
11. Kuniak L. and Marchessault R.H. Study of the crosslinking reaction between epichlorohydrin and starch, **Die Stärke**, **24**, 110, 1972.
12. Šimkovic I. One-step quaternization/crosslinking of starch with 3-chloro-2-hydroxypropylammonium chloride/epichlorohydrin in the presence of NH_4OH , **Carbohydrate Polymers**, **31**, 47, 1996.
13. Lenaerts V. *et al.* Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances, **J. Control. Release**, **53**, 225, 1998.
14. Andrade C.T., Rosa R.C.R.S. and Barbosa L.C. Compósitos biodegradáveis amido/amido reticulado, Paper presented at III Encontro Regional de Polímeros, Rio de Janeiro, 2000 (**Firjan**, **1**, 43, 2000).
15. Rosa R.C.R.S. and Andrade C.T. Obtenção e caracterização de compósitos biodegradáveis amido-amido reticulado. Anais do 60 Congresso Brasileiro de Polímeros, **1**, 1282, 2001.
16. Kulicke W.-M., Aggour Y.A., Nottelmann H. and Elsabee M.Z. Swelling and Rheological studies of some starch hydrogels, **Starch/Stärke**, **41**, 140, 1989.
17. Lenaerts V., Dumoulin Y. and Mateescu M.A. Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets, **J. Control. Release**, **15**, 39, 1991.
18. Departamento de Aseguramiento de la Calidad de Proveedores. Laboratorios Autex S.A. Método de ensayo para determinar Capacidad de Absorción bajo presión No. 10-002 (01), 1995.
19. Amiji M.M. Drug delivery using pH-sensitive semi-interpenetrating network hydrogels. U.S. Pat. 5 904 927, 1999.