

AMIDACION DEL QUITOSANO CON CLORURO DE OLEOILO

Cristóbal Lárez Velásquez*, Alfonso Rivas, William Velásquez y Alí Bahsas

Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Mérida 5101, Venezuela. Correo electrónico: clarez@ula.ve

Recibido: 11 Enero de 2007; Aceptado: Julio de 2007

RESUMEN

Se realizó la modificación química del biopolímero quitosano mediante una reacción de amidación de los grupos amino presentes en las unidades glucosamina del biopolímero y el cloruro de oleoilo. Se obtuvieron materiales modificados en diversas proporciones los cuales fueron caracterizados desde el punto de vista del porcentaje de amidación a través de una metodología que combinó estudios de $^1\text{H-RMN}$ de las muestras que resultaron solubles y FTIR cuantitativo para las muestras insolubles. Los estudios de cuantificación mostraron que en las condiciones estudiadas es posible obtener un porcentaje máximo de modificación de alrededor del 60% de las unidades repetitivas en la cadena del biopolímero. Igualmente, estos estudios muestran que la reacción de modificación ocurre prácticamente solo en los grupos amino, descartándose reacciones laterales de formación de ésteres en los grupos hidroxílicos.

Palabras claves: *quitosano, oleoilo, amidación, modificación química*

ABSTRACT

Biopolymer chitosan was chemically modified through of an amidation reaction involving the amine groups, from the glucosamine units in the biopolymer, and oleoyl chloride. Materials were synthesized at diverse ratios of oleoyl/amine groups and amidation degree (%) were obtained when soluble samples NMR- ^1H results and quantitative FTIR results from insoluble samples were combined. These studies showed that under the studied conditions it is possible to obtain a maximum percentage of modification of around 60% of the repetitive units in the biopolymer. Spectroscopic results show high selectivity for the amidation reaction and no side reactions, like esterification of the hydroxyl groups in the chitosan, were observed.

Key words: *chitosan, oleoyl, amidation, chemical modification*

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de polímeros biocompatibles para cumplir diversas tareas en el cuerpo humano es una de las áreas de investigación más activas en el campo de los materiales. En ese sentido, el biopolímero quitosano ha venido encontrando una amplia gama de aplicaciones en biomedicina debido a sus múltiples ventajas como, por ejemplo, por su baja toxicidad, su excelente biocompatibilidad y su relativamente bajo costo.

Entre las aplicaciones más conocidas, y algunas veces aprovechadas de manera comercial o militar, de este biomaterial se pueden mencionar: la fabricación de vendajes para control de hemorragias (HemCom) [1], lentes de contacto [2], piel artificial [3], su uso como vehículo para la liberación controlada de fármacos [4], material de soporte en el crecimiento de tejido [5]; en la separación de proteínas [6], vector no viral en terapia genética [7], etc.

Muchas de las aplicaciones que se han desarrollado para este biomaterial, y que continúan desarrollándose en la actualidad, han sido exitosas sólo después de su modificación química. En muchos casos un tratamiento adecuado ha hecho posible aumentar su solubilidad [8], su poder bactericida [9], su capacidad de transporte de fármacos macromoleculares a través de membranas [10], etc.

La modificación de quitosano con miras a la liberación controlada de sustancias hidrófobas ha sido ensayada exitosamente usando hidrogeles físicamente entrecruzados mediante la formación de las respectivas sales entre los grupos amino libre en el biopolímero y los grupos carboxílicos de los ácidos alifáticos de cadena larga:



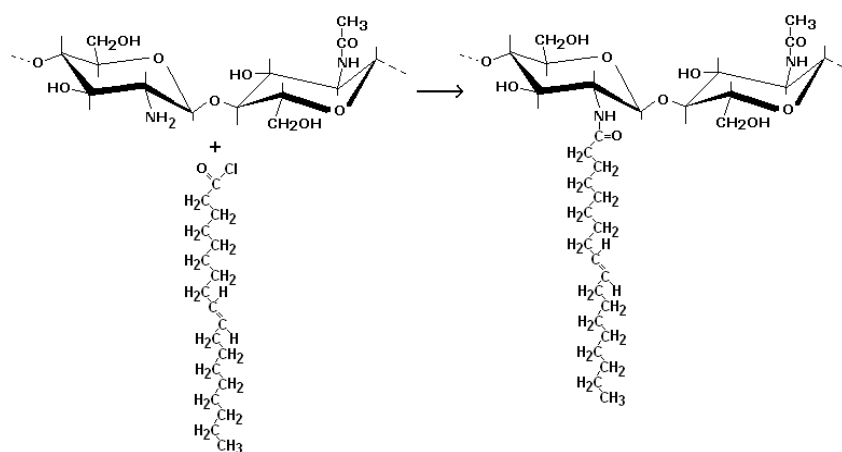
Las interacciones hidrófobas de estas largas cadenas alifáticas generan un entrecruzamiento físico del sistema y, en las zonas hidrófobas así generadas, es posible disolver fármacos hidrófobos que pueden ser liberados controladamente [11].

En una variación del sistema anterior se ha logrado la amidación del grupo amina libre en el glicol quitosano (GQuitosano), un derivado del quitosano soluble en agua formado por una reacción de eterificación entre una molécula de etilenglicol y el grupo CH₂OH del quitosano, usando cloruros de alquiloilo de cadena larga:



Los materiales obtenidos por esta vía también forman hidrogeles mediante el entrecruzamiento físico debido a las interacciones hidrófobas de las cadenas alifáticas y han sido ensayados, por ejemplo, en la liberación de denbufilina, un fármaco hidrófobo [12].

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos para la reacción de amidación del quitosano con cloruro de oleoilo (esquema I), con miras a posibles aplicaciones de los materiales obtenidos en la liberación controlada de sustancias hidrófobas, tomando en cuenta que tanto el quitosano como el ácido oleico son biodegradables y biocompatibles.



Esquema I

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos. El quitosano (MMW, Fluka BioChemika) se lleva al menor tamaño posible de partícula mediante un molino, para después agitarse repetidamente en agua desionizada (Millipore Milli Q™ (18 Ω)), lavado sobre un embudo Buchner y secado a 50°C; el ácido oleico (BDH, 92%) y el cloruro de tionilo (Laboratorio Reagents, 99%) se destilan, a presión reducida y por destilación simple, respectivamente, antes de usar. Los demás reactivos y disolventes se usan como vienen del proveedor.

El cloruro de oleoilo fue preparado de la siguiente manera: se añaden 10 mL de ácido oleico (0,0314 moles) en un balón de fondo redondo equipado para agitación magnética, luego se incorporan, gota a gota, 3,5 mL de SOCl₂ (~ 0,0471 moles) [13,14]. La reacción se finaliza después de unos 20 minutos, cuando deja de observarse el desprendimiento de HCl. El producto obtenido se purifica por destilación al vacío (4 mm Hg, 170-172°C).

Reacciones de modificación. El procedimiento seguido para la modificación del quitosano fue el siguiente: se tomaron 60 mL de una solución matriz de quitosano en HCl acuoso, preparada a partir de 0,833 g de quitosano (~3,0 meq de grupos $-NH_2$) colocados en 100 mL de agua junto a 3,6 meq de HCl. Se ajusta el pH entre 6 y 7 con una solución de NaOH 0,1 M, con fuerte agitación de la mezcla, hasta observar la formación de una especie de gel blanquecino de apariencia homogénea. A continuación se agrega la cantidad del cloruro de oleoilo necesaria para lograr el porcentaje de sustitución predeterminado y se deja la muestra con agitación por un lapso de 4-6 horas. De nuevo se lleva la solución a pH entre 6 y 7 y se precipita con cantidades mínimas de acetona, para posteriormente colectar el sólido obtenido por filtración. El material resultante es lavado con un exceso de metanol caliente (50-60°C); este lavado se repite por tres veces para eliminar el ácido libre. Finalmente, se decanta el precipitado y se lleva a la estufa por un tiempo de 24 horas, a una temperatura de 50-55°C. Todos los precipitados obtenidos son de color blanco-amarillento, más intenso para los materiales con un grado de sustitución mayor.

Equipos. Los espectros infrarrojos se obtuvieron empleado un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo Sistema 2000, usando muestras preparadas en pastillas de KBr (6 mg del polímero en 60 mg de KBr). Los espectros de 1H -RMN se realizaron en un espectrofotómetro Bruker, modelo DRX400 MHz. Las muestras se prepararon utilizando como disolventes agua deuterada y ácido trifluoroacético. Las medidas de pH se realizaron en un pH-metro marca Metrohm modelo 691.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

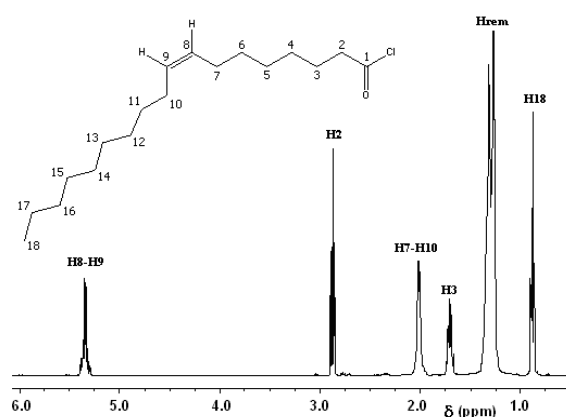
La Figura 1a muestra el espectro de 1H -RMN del cloruro de oleoilo en $CDCl_3$, pudiéndose observar en éste todas las señales esperadas para este compuesto, como se desprende de las correlaciones mostradas en su espectro de 1H -COSY (Figura 1b). Las señales marcadas como H_{rem} corresponden a todos los demás protones que no aparecen marcados específicamente en el espectro (remanentes). Este análisis asegura el uso de una muestra del cloruro de oleoilo de alta pureza.

En la Tabla 1 se muestra un resumen de las condiciones experimentales en las que se estudió la reacción de modificación del quitosano. Los números en el código indican el porcentaje de cloruro de oleoilo añadido con relación a los grupos amino presentes. También se realizó una prueba con el quitosano sólo (QAO-000) para tener el valor del porcentaje de

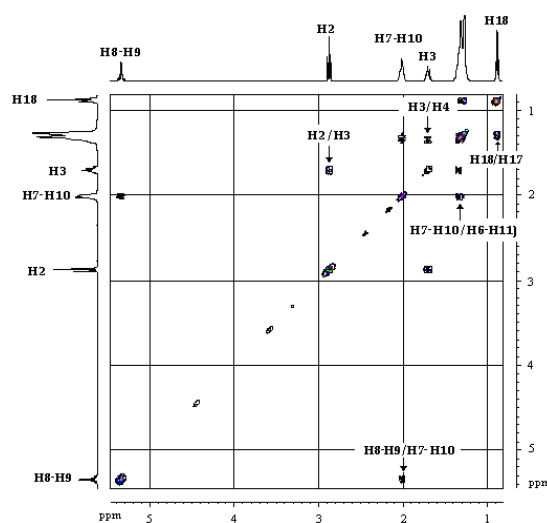
recuperación cuando el material inicial es tratado en las mismas condiciones de modificación pero sin usar el agente modificante.

Se puede apreciar que el rendimiento de la reacción muestra tendencia a disminuir hasta que se añade una cantidad estequiométrica de cloruro de oleoilo (100% de modificación). Para cantidades por encima de la relación 1:1 hay un aumento del rendimiento y, finalmente, se observa una nueva disminución de éste.

Por otro lado, es notorio que en todas las reacciones de modificación el rendimiento es siempre sustancialmente menor que el porcentaje de recuperación cuando se prueba el quitosano solo, lo que pudiera ser explicado por la posible solubilización parcial del quitosano (modificado y sin modificar) en las micelas que es capaz de formar el ácido oleico una vez neutralizado al final de la reacción.



(a)



(b)

Figura 1. Espectros de (a) ^1H -RMN y (b) ^1H -COSY para el cloruro de oleoilo. Disolvente utilizado: CDCl_3 .

Tabla 1. Condiciones experimentales para la obtención de los quitosanos modificados con el cloruro de oleoilo.

Código	m _{quitosano} g	meq _{NH2}	m _{Cl-oleoilo} g	meq _{Cl-oleoilo}	eq _{Cl-oleoilo}		m _{final} g	% rend.
					eq _{NH2}			
QAO-000	0,500	2,994	-	-	-	-	0,405	81,0
QAO-015	0,500	2,994	0,135	0,449	0,150		0,332	52,3
QAO-038	0,500	2,994	0,338	1,123	0,375		0,350	41,8
QAO-075	0,500	2,994	0,676	2,246	0,750		0,324	27,6
QAO-113	0,500	2,994	1,014	3,369	1,125		0,491	35,0
QAO-150	0,500	2,994	1,351	4,489	1,499		0,743	53,0
QAO-225	0,500	2,994	2,027	6,735	2,249		0,454	32,4

El porcentaje de modificación (% mod.) en el quitosano de partida sometido a modificación con cloruro de oleoilo fue obtenido de la siguiente manera:

a) Se realizaron experimentos cuantitativos de FTIR con cada una de las muestras modificadas a fin de encontrar las señales que permitan la cuantificación de la sustitución. Los espectros son registrados después de la acumulación de por lo menos de 64 barridos, una resolución de 2 cm⁻¹ y barridos para el blanco entre cada muestra. Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 2; las asignaciones de las principales señales en estos espectros se muestran en la Tabla 2.

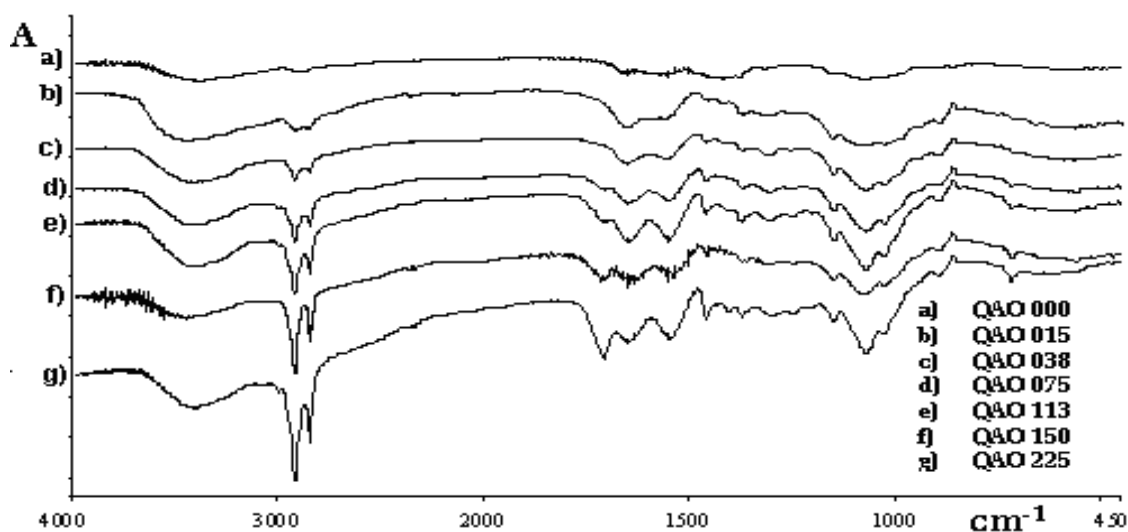


Figura 2. Espectro infrarrojo en pastilla de KBr para los diferentes quitosanos modificados con cloruro de oleoilo.

b) Los valores reales del porcentaje de modificación se obtienen a partir de estudios de ^1H -RMN con las muestras que resultaron solubles. La Figura 3 muestra algunos de estos espectros y en la Tabla 3 se presenta la asignación de las señales observadas

Tabla 2. Asignación de las principales señales en los quitosanos modificados con cloruro de oleilo.

Señal (cm^{-1})	Asignación
2.924-2.854	Estiramiento -C-H alifáticos.
1.712	Estiramiento C=O para la amida de cadena oleica
1.636	Vibración tensión C=O de la acetamida en el quitosano
1.544	Estiramiento N-H
1.464	Vibración de deformación $> \text{CH}_2$ alifáticos
1.154	Estiramiento C-N
1.084	Estiramiento C-O
898	Vibración de deformación N-H fuera del plano
722	Vibración esquelética $> \text{CH}_2$ de cadenas largas
616	Vibración deformación fuera del plano HC=CH sustitución <i>cis</i>

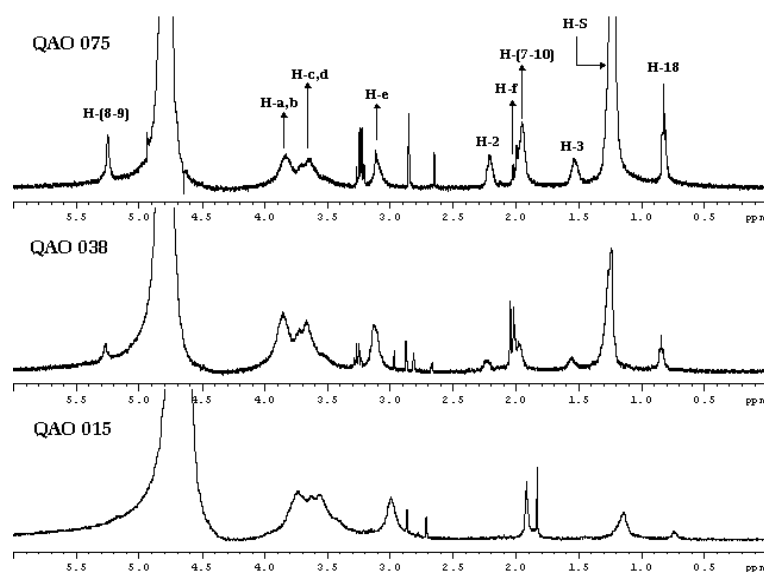


Figura 3. Espectros de ^1H -RMN para las muestras solubles de los quitosanos modificados con diferentes proporciones de cloruro de oleilo (D_2O , 400 MHz).

Tabla 3. Desplazamientos químicos (δ , ppm) en el ^1H -RMN de los quitosanos modificados con cloruro de oleilo.

QAO-015	H	H-a,b	H-c,d	H-e	H-f	H-2	H-3	H(7-10)	H(8-9)	H-S	H-18
	δ (ppm)	3,863	3,683	3,120	2,038	-	-	1,954	5,317	1,264	0,844
QAO-038	H	H-a,b	H-c,d	H-e	H-f	H-2	H-3	H(7-10)	H(8-9)	H-S	H-18
	δ (ppm)	3,833	3,669	3,128	2,046	2,125	1,681	1,990	5,272	1,262	0,843
QAO-075	H	H-a,b	H-c,d	H-e	H-f	H-2	H-3	H(7-10)	H(8-9)	H-S	H-18
	δ (ppm)	3,837	3,654	3,117	1,966	2,238	1,680	1,961	5,251	1,224	0,833

Utilizando la integral del área de la señal en alrededor de 0,84 ppm ($I_{0,8\text{ppm}}$), asignada a los grupos metílicos terminales de la cadena sustituyente ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, protones H18) y la integral del área de la señal en 2,016 ppm ($I_{2,0\text{ppm}}$), la cual se atribuye a la suma de las contribuciones de:

- los protones del metilo acetamida ($-\text{CO}-\text{CH}_3$) en el quitosano sustituido
- los protones alílicos en la cadena sustituyente ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, protones H7 y H10),

se puede separar el valor de la integral ($I_{\text{H acetamida}}$) para los protones del grupo metilo acetamida ($-\text{CO}-\text{CH}_3$, protón H_f), de acuerdo con la siguiente relación:

$$I_{\text{H acetamida}} = I_{2,0\text{ppm}} - \frac{4 \times I_{0,8\text{ppm}}}{3} \quad (2)$$

En el caso de la muestra QAO-075, donde la integral $I_{0,8\text{ppm}}$ no se puede establecer con mucha exactitud, debido a que la línea base no es completamente horizontal, ésta se puede sustituir en la ecuación (2) por la integral del área de los protones H3 ($I_{1,68\text{ppm}}$) de la cadena sustituyente ($-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), haciendo los cambios correspondientes en los coeficientes que normalizan su número, con lo cual se tendría:

$$I_{\text{H acetamida}} = I_{2,0\text{ppm}} - \frac{2 \times I_{1,68\text{ppm}}}{3} \quad (2a)$$

La relación entre los valores de $I_{\text{H acetamida}}$ e $I_{0,8\text{ppm}}$ permite establecer el porcentaje de modificación de los quitosanos modificados, de acuerdo con:

$$\% \text{ mod.} = \frac{16,72\% \times I_{0,8\text{ppm}}}{I_{\text{H}_{\text{acetamida}}}} \quad (3)$$

donde el valor 16,72% representa el porcentaje inicial de grupos amino acetilados en el quitosano de partida. Los resultados obtenidos con este procedimiento se muestran resumidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de modificación para los materiales solubles en medio acuoso, obtenidos por ¹H-RMN.

Muestra	I _{2,0}	I _{0,8 (I_{1,68})}	I _{H_{acetamida}}	% Mod.
QAO-015	6,223	1,000	4,89*	3,42
QAO-038	2,666	1,000	1,33*	12,54
QAO-075	4,572	(2,000)	2,57**	21,50

* Usando la ecuación 2. ** Usando la ecuación 2a.

c) Con los valores del porcentaje de modificación obtenidos de los estudios de ¹H-RMN se construye un gráfico en función de la absorbancia a 2.956 cm⁻¹ de los grupos CH₂ en los quitosanos modificados (Figura 4, A_{QAO2956}), a la cual se le resta el valor de la absorbancia a dicha frecuencia del quitosano solo (A₂₉₅₆, Tabla 5). Los resultados pueden apreciarse en la Figura 5 (círculos llenos).

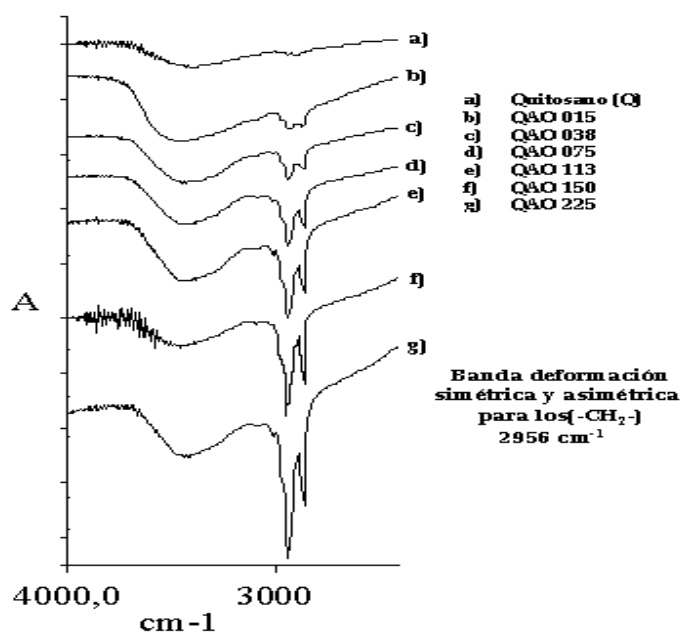


Figura 4. Ampliación de la zona entre 2.500-4.000 cm⁻¹ de los espectros de FTIR para los quitosanos modificados con cloruro de oleoilo. Pastilla de KBr.

Tabla 5. Valores experimentales de la absorbancia a 2.596 cm^{-1} para los quitosanos modificados después de restar el valor de la muestra de quitosano solo.

Muestra	eqCl-oleoilo/eqNH ₂	A _{QAO2.956}	A _{2.956}
QAO-000	-	0,0110	0
QAO-015	0,150	0,0669	0,0559
QAO-038	0,375	0,1089	0,0979
QAO-075	0,750	0,2041	0,1931
QAO-113	1,125	0,2997	0,2887
QAO-150	1,499	0,3810	0,3700
QAO-225	2,249	0,5379	0,5269

d) Los valores de modificación de las muestras que no resultaron solubles se obtienen por extrapolación de la recta generada en el paso anterior (Figura 5, círculos vacíos).

Los valores para los porcentajes de modificación obtenidos mediante esta metodología aparecen reportados en la Tabla 6.

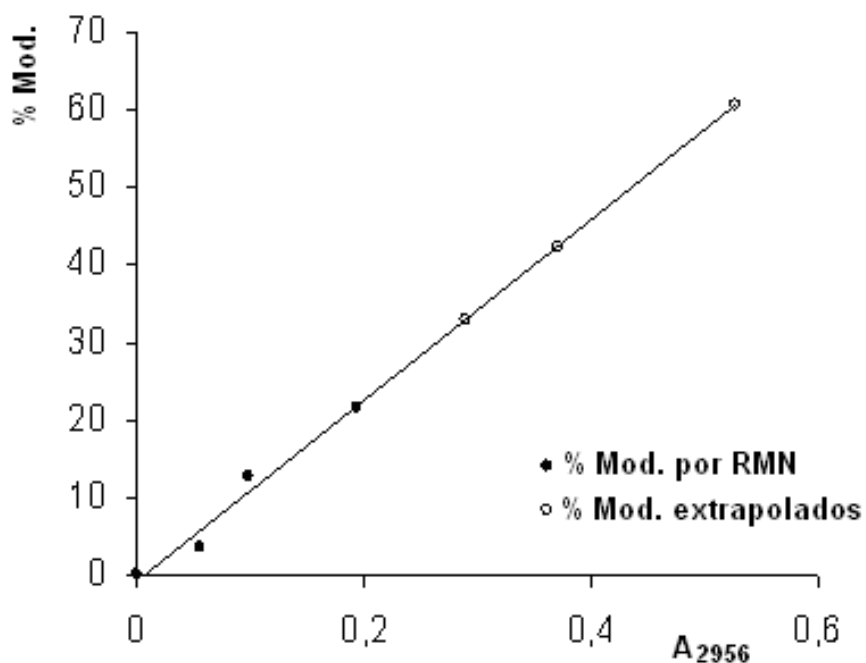


Figura 5. Porcentaje Modificación real en función de la absorbancia a 2.956 cm^{-1} para los diferentes quitosanos modificados.

Tabla 6. Valores experimentales obtenidos durante la cuantificación del porcentaje de modificación del quitosano con cloruro de oleoilo.

Muestra	¹ H-RMN	Extrapolados FTIR
QAO-000	0	-
QAO-015	3,42	-
QAO-038	12,54	-
QAO-075	21,50	-
QAO-113	-	32,91
QAO-150	-	42,40
QAO-225	-	60,69

CONCLUSIONES

La modificación química del biopolímero quitosano ha sido realizada exitosamente a través de la reacción de amidación de sus grupos amino con cloruro de oleoilo. Ha sido posible realizar la modificación de dichos grupos amino hasta un 60% en las condiciones ensayadas y se ha comprobado que la solubilidad en medio acuoso del material modificado disminuye en la medida que el porcentaje de modificación aumenta, aunque se ha logrado la disolución de muestras con alrededor de 20% de modificación.

El uso combinado de las técnicas de ¹H-RMN y FTIR ha permitido la cuantificación del porcentaje de amidación de los materiales obtenidos y, además, permitió descartar la ocurrencia de reacciones de condensación en otras posiciones de los anillos glucosamina y/o acetilglucosamina.

BIBLIOGRAFÍA

1. S. Basu "Army Develops New Combat Care Items", *U.S. Medicine*, December 2004
2. S. Xin-Yuan, T. Tian-Wei "New Contact Lens Based on Chitosan/Gelatin Composites", *J. Bioactive and Compatible Polymers*, **19(6)**, 467 (2004)
3. J. Mao, L. Zhao, K. De Yao, Q. Shang, G. Yang, Y. Cao "Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro", *J. Biomedical Materials Research*, **64A(2)**, 301 (2002)
4. V. Sinha, A. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan "Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs", *Int. J. Pharm.*, **274**, 1 (2004)
5. A. Ghanem, M. Katalinich "Characterization of chitosan films for tissue engineering applications", *Applied Bionics & Biomechanics*, **2(1)**, 9 (2005)

6. E. Casal, A. Montilla, F. J. Moreno, A. Olano, N. Corzo “Use of Chitosan for Selective Removal of β -Lactoglobulin from Whey”, *J. Dairy Sci.*, **89**, 1384 (2006)
7. W. Weecharangsan, P. Opanasopit, T. Ngawhirunpat, T. Rojanarata, A. Apirakaramwong “Chitosan Lactate as a Nonviral Gene Delivery Vector in COS-1 Cells”, *Pharm. Sci.Tech.*, **7(3)**, E1 (2006)
8. S. Mao, X. Shuai, F. Unger F, M. Simon, D. Bi, T. Kissel “The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties”, *Int. J. Pharm.*, **281**, 45 (2004)
9. A. Vishu, M. Varadaraj, L. Gowda, R. Tharanathan “Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolytic with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*”, *Biochem. J.*, **391**, 167 (2005)
10. A. Kotze, M. Thanou, H. Lueben, A. De Boer, J. Verhoef, H. Junginger “Effect of the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2)”, *Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **47**, 269 (1999)
11. T. Cerchiara, B. Luppi, F. Bigucci, I. Orienti, V. Zecchi “Physically cross-linked chitosan hydrogels as topical vehicles for hydrophilic drugs”, *J. Pharmacy & Pharmacology*, **54(11)**, 1453 (2002)
12. L. Martin, C. Wilson, F. Koosha, I. Uchegbu “Sustained buccal delivery of the hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels”, *Eur. J. Pharmaceutics & Biopharmaceutics*, **55**, 35 (2003)
13. M. Yahya, A. Arof “Effect of oleic acid plasticizer on chitosan–lithium acetate solid polymer electrolytes”, *Eur. Polym. J.*, **39 (5)**, 897 (2003)
14. H. Sommer, H. Lipp, L. Jackson “Alkylation of amines. General exhaustive alkylation method for the synthesis of quaternary ammonium compounds”, *J. Organ. Chem.*, **36 (6)**, 824 (1971)