

Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas



A. Cuadros-Moreno¹, R. Casañas Pimentel¹, E. San Martín-Martínez¹,
J. Yañes Fernandez²

¹Centro de Investigación Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, Legaria 694. Colonia Irrigación 11500 México D.F.

²Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, Acueducto de Guadalupe S/N Barrio la Laguna Ticomán 073040, México D.F.

E-mail: sanmartinedu@hotmail.com

(Recibido el 28 de Septiembre de 2014, aceptado el 13 de Diciembre de 2014)

Resumen

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) es una herramienta muy útil para la determinación de tamaños de partícula y observar las interacciones de los polímeros a través del incremento del tamaño de los polímeros formados. En esta investigación fue posible evaluar la incorporación de extractos de plantas que tienen propiedades hipoglucemiantes en nanoesferas de quitosano, para conservar y estabilizar los extractos dentro de las nanoesferas poliméricas. Por DLS se han obtenido distribuciones de tamaño de nanoesferas de quitosano ($616.3 \pm 26.9\text{nm}$) mayores que las obtenidas por SEM (572nm) debido a la diferencia de técnicas empleadas. También se ha observado que, las nanoesferas que contienen los extractos de plantas tienen un menor tamaño cuando se evalúan por SEM que por DLS. Esto se debe a que SEM se realiza en seco, mientras que DLS es evaluado en la forma hidratada; además es debido a que el quitosano interactúa con los compuestos de los extractos de plantas con propiedad hipoglucemiante.

Palabras clave: DLS, SEM, quitosano, guarumbo, lágrima de San Pedro.

Abstract

The Dynamic light Scattering (DLS) technique is a useful tool for determining particle size and for observe the interactions of polymers by increasing the size of the polymers formed. In this research was possible to evaluate the incorporation of plant extracts that have hypoglycemic properties in chitosan nanospheres, for preserve and stabilize the extracts within the polymeric nanospheres. By DLS were obtained size distributions chitosan nanospheres ($616.3 \pm 26.9\text{nm}$), higher than those obtained by SEM (572nm) due to the difference of techniques employed. It has also been observed that the nanospheres containing plant extracts are smaller when evaluated by SEM that DLS, due to SEM is done in dry, while DLS is evaluated in the hydrated form; also because the chitosan interacts with compounds extracts of plants with hypoglycemic property.

Keywords: DLS, SEM, quitosano, guarumbo, lágrima de San Pedro.

PACS: 01.30.Rr, 01.40.E-

ISSN 1870-9095

I. INTRODUCCIÓN

A diferencia de la dispersión de luz estática, para determinar el tamaño de las partículas la dispersión de luz dinámica no tiene en cuenta la dependencia del ángulo, sino la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo. La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering"), espectroscopía de correlación de fotones PCS (Photon Correlation Spectroscopy) o dispersión QELS (Quasi Elastic Light scattering) es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión (Foord *et al.*, 1970), o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros [1]. La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una

suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada.

Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas. Por norma general, en la dispersión de luz dinámica la suspensión de la muestra permanece en reposo. El término "dinámica" no se

refiere al movimiento de la muestra como un conjunto, sino a la "vibración" de las partículas que la componen.

En los últimos años, dispersión de luz dinámica (DLS) se ha convertido en un método popular para abordar y comprender mejor el crecimiento de cristales, el inicio de la agregación o la nucleación de macromoléculas [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]. Debido a que es una técnica sensible para evaluar las interacciones macromoleculares y para detectar la formación de agregados en solución [11, 12]. Siguiendo esta tendencia, DLS ha sido utilizado, como una herramienta de diagnóstico de las condiciones en que el solvente podría cristalizar [5, 10], o para el seguimiento de la cristalización en soluciones macromoleculares sobresaturadas [4].

Por otro lado, el diseño de materiales altamente ordenados y nanoestructurados es una de las tareas más difíciles en la química de materiales. En este contexto, copolímeros de bloques anfífilicos con dos bloques covalentemente incompatibles unidos son de especial interés debido a su capacidad de auto-ensamblar a nanoescala [11, 12, 13]. Cuando un bloque copolímero se disuelve en un disolvente selectivo, que es termodinámicamente buen disolvente para un bloque, pero es un pobre disolvente para el otro bloque, se asocia para formar micelas [14, 15]. La formación de micelas es útil para varias posibles aplicaciones en pinturas, cosméticos, [16] de liberación de fármacos [17, 18, 19] materiales eléctricos y electro-ópticos, [20, 21, 22] nanoclusters metálicos, [23] biosensores, [24] y terapia génica [25]. En esta investigación se estudia la formación de nanoesferas de quitosano y su interacción con extractos de plantas con propiedades hipoglucemiantes, de forma que ambos sean compatibles en el mismo solvente durante la formación de las nanoesferas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Preparación de nanoesferas de quitosano

Nanoesferas poliméricas se prepararon con quitosano (Sigma Aldrich, México) directamente por el método de secado por pulverización en un nano secador [18]. Una solución de quitosano 0.125% p/v en 25ml de agua acidificada con ácido acético (1% p/v) y se adicionó 1.25 ml del extracto de guarumbo (0.5 mg/ml) disuelto en agua. La solución de 0,5% se agitó constantemente en un agitador magnético a 300 rpm y se alimentó el equipo secador por pulverización Buchi Nano (Modelo B-90, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza), y se secó a 120° C y 35 mbar de presión.

B. Distribución de tamaño y potencial ζ

El tamaño (diámetro hidrodinámico) y distribución de tamaño de las nanoesferas de quitosano, fue determinado por dispersión de luz dinámica (DLS) con el equipo Nano Zetasizer Malvern, modelo ZEN 3600 y el potencial ζ fue

determinado en el mismo equipo. La muestra de quitosano tenía una concentración de 0.1mg/ml disueltos en 2ml de agua desionizada. Las muestras antes de ser evaluadas fueron filtradas en disco millipore de 0.22 μ m.

C. Tamaño de partículas y morfología

El tamaño y la morfología de las nanopartículas se determinaron por microscopía electrónica de barrido (SEM, JSM-6390LV, JEOL, Japón), las muestras se colocaron en muestras titulares conectados al grafito cinta, y luego fueron cubiertas con una fina capa de plata por un proceso de pulverización catódica de vacío (Desk IV, Denton vacuum, USA). Las micrografías se realizaron en 5000 y 10.000 aumentos.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presentan las determinaciones de tamaño promedio de los polímeros de quitosano (583.0 ± 64.8 nm) e quitosano nanoencapsulado (bimodal pico 1, 616.3 ± 26.9 nm; pico 2 4812 ± 94.1 nm), las diferencias se deben a que el primero es un polímero sin tratamiento y el segundo fue secado por atomización nanospray, probablemente este proceso promueve algunas interacciones entre los polímeros formando mayores tamaños y algunos se mantienen sin interactuar, esa es la razón de tener una distribución bimodal de tamaños.

Al extracto acuoso de la planta lágrima de San Pedro se le evaluó el tamaño del polímero o compuesto extraído (Figura 2a), resultando estar compuesto de dos fracciones, es decir, tiene una distribución bimodal de tamaños probablemente la primera fracción de 80.1 ± 21.2 nm corresponda también a la segunda fracción que esta polimerizada, por eso el tamaño es mayor. Esta afirmación se debe a que, los compuestos al ser extraídos por solventes solubilizan solamente aquellos compuestos que tienen la misma estructura química y no otras. También es probable que los compuestos sean similares en solubilidad pero con algunos grupos funcionales diferentes que no le permiten la polimerización e incremento de tamaño.

Cuando el extracto de la planta de lágrima de San Pedro es nanoencapsulado en quitosano, este presenta tres distribuciones de tamaño (trimodal, Figura 2b). Lo cual indica que, una pequeña fracción del extracto no se encapsula y se mantiene en solución (80.1 ± 21.2 nm), y una mayor parte del extracto si fue incorporado en las nanoesferas (pico 2, 638.7 ± 22.6 nm; pico 3, 5461 ± 63.5 nm), porque tiene la misma distribución de tamaño que las nanoesferas de quitosano. El área bajo la curva nos indica la proporción de cada fracción de nanoesferas en la solución acuosa determinada por DLS, por lo que la fracción 2 correspondiente a 638.7 ± 22.6 nm es la que presenta una mayor proporción del extracto de lágrima de San Pedro incorporada en la nanoesfera.

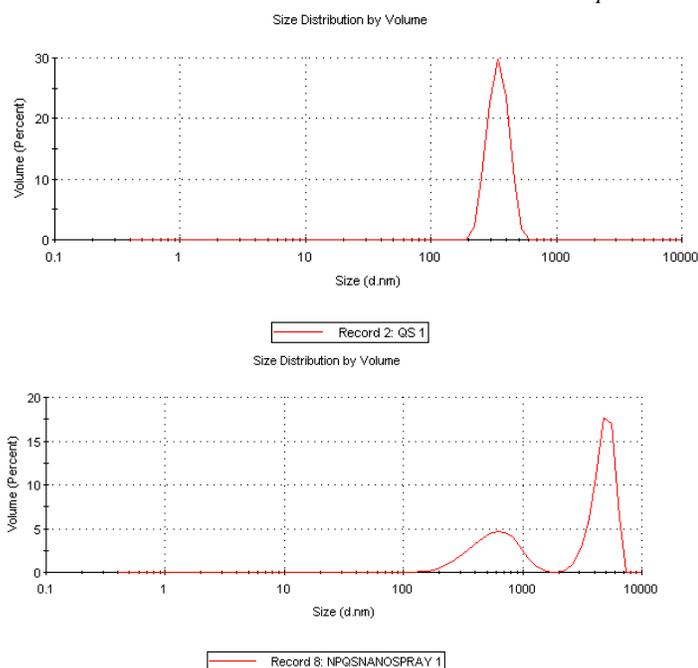


FIGURA 1. Tamaño de a) polímeros de quitosano QS (diámetro promedio 583.0 ± 64.8 nm); b) Nanopartículas de QS obtenidos por nanospray (bimodal pico 1, 616.3 ± 26.9 nm; pico 2 4812 ± 94.1 nm).

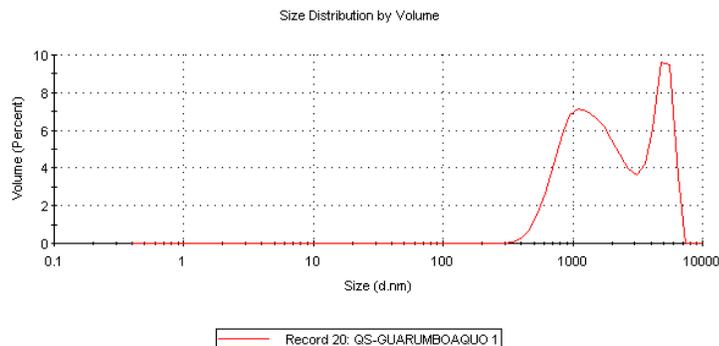


FIGURA 3. Distribución de tamaño de nanoesferas de quitosano conteniendo extracto de guarumbo (bimodal pico 1, 1471 ± 69.8 nm; pico 2, 4736 ± 97.0 nm).

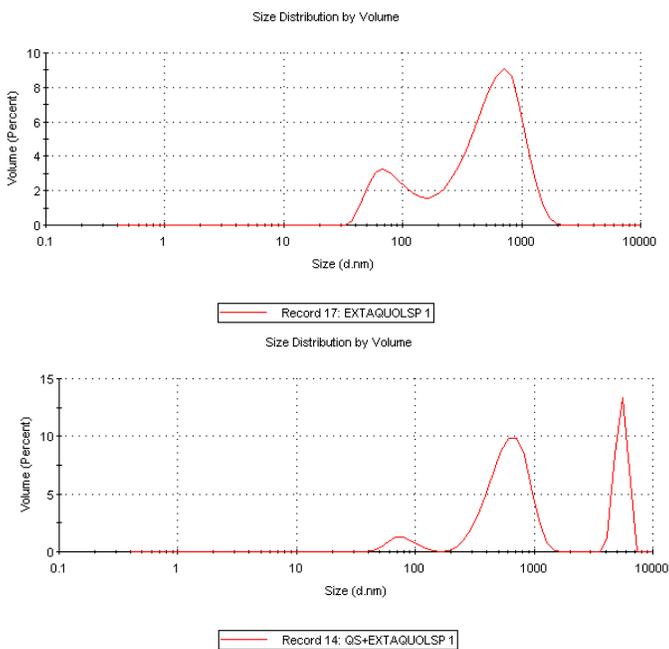


FIGURA 2. Distribución de tamaño de a) extracto acuoso de lágrima San Pedro sin polímeros (Bimodal pico 1, 87.36 ± 34.3 nm, pico 2, 647.3 ± 31.2 nm); y b) nanopartículas de quitosano conteniendo extracto de lágrima de San Pedro (trimodal pico 1, 80.1 ± 21.2 nm; pico 2, 638.7 ± 22.6 nm; pico 3, 5461 ± 63.5 nm).

En la Figura 3 se presenta la nanoencapsulación del extracto de una planta de guarumbo en polímero de quitosano. Por la distribución de tamaño de nanopartículas se tiene una distribución bimodal (pico 1, 1471 ± 69.8 nm;

Los resultados obtenidos por DLS para las nanoesferas de quitosano (616.3 ± 26.9 nm) fueron corroborados por microscopia electrónica de barrido (SEM), como se observa en la Figura 4, donde la distribución de tamaños por esta técnica fue muy similar, aunque un poco menor (diámetro promedio 572 nm). Esta diferencia se debe a que, por esta técnica de SEM las muestras son evaluadas en seco y no están hidratadas, como lo están por la técnica de DLS; pero las esferas son estables y de forma esférica regular.

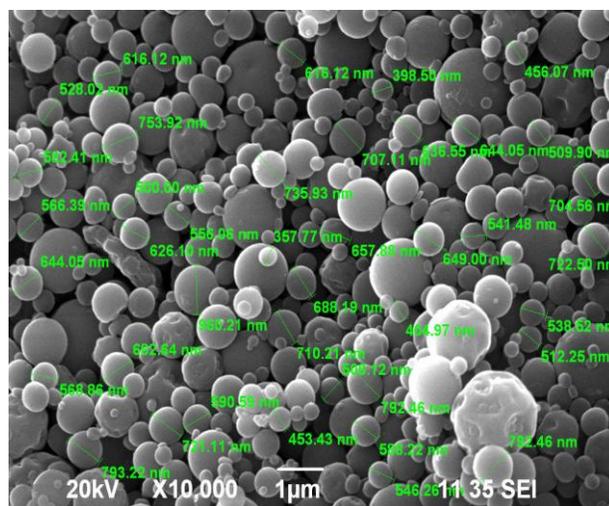


FIGURA 4. Micrografías de nanoesferas de quitosano (diámetro promedio de 572 nm).

En la suspensión de quitosano cuando se incorpora el extrato de planta de lágrima de San Pedro (Figura 5) se

tienen nanoesferas de menor tamaño (diámetro promedio 343.86nm) que las nanoesferas de quitosano (616.3±26.9nm) y la morfología es de esferas irregulares. Estos resultados se deben a la interacción que tienen los compuestos del extracto de lágrima de San Pedro con el quitosano reduciendo los tamaños de partícula (lo cual puede ser benéfico para su aplicación en la administración en modelos in vivo por el menor tamaño), y también porque en la técnica de DLS se evalúa la forma hidratada, por lo que el tamaño es mayor. Cuando sea administrada en el organismo probablemente puedan alcanzar los valores de DLS, y cuando se almacenen en seco las nanoesferas de quitosano con el extracto, se mantendrán dentro de los tamaños obtenidos por SEM.

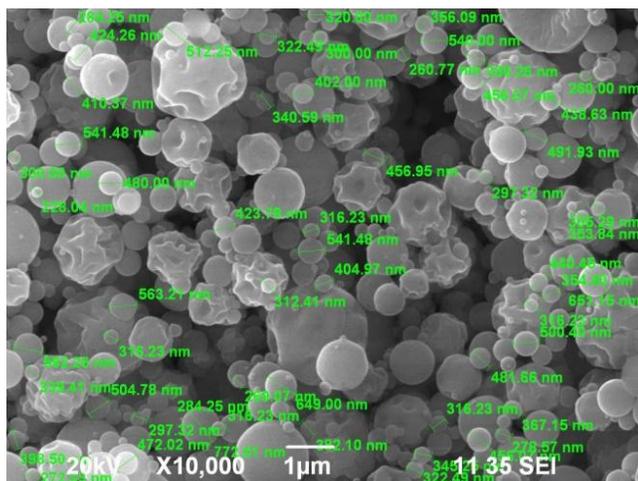


FIGURA 5. Micrografías de nanoesferas de quitosano conteniendo extracto de lágrima de San Pedro (diámetro promedio 343.86nm).

En la Figura 6 se tiene las micrografías de nanoesferas de quitosano a las que se incorporó extracto de guarumbo. Su tamaño promedio fue de 293.42nm; valor similar al obtenido con el extracto de lágrima de San Pedro. Lo que indica que, el quitosano interacciona con los compuestos del extracto reduciendo el tamaño de sus nanoesferas. Esto es favorable para las aplicaciones médicas para el tratamiento de diabetes tipo 2. La morfología es esférica y regular, aunque con pequeñas deformaciones de las nanoesferas de quitosano con guarumbo.

IV. CONCLUSIONES

Por la técnica de DLS se ha podido determinar la distribución de tamaños de polímeros y compuestos extraídos de las plantas, y también poder incidir cuales fracciones pequeñas no fueron incorporadas en las nanoesferas poliméricas. Los valores de distribución de tamaño de nanoesferas obtenidos por DLS son mayores a los obtenidas por SEM, debido a que esta técnica realiza la medición en la forma hidratada, no seca como se realiza

con SEM. La morfología que es posible observar con SEM y DLS permite observar la interacción de los compuestos de los extractos de las plantas con el quitosano.

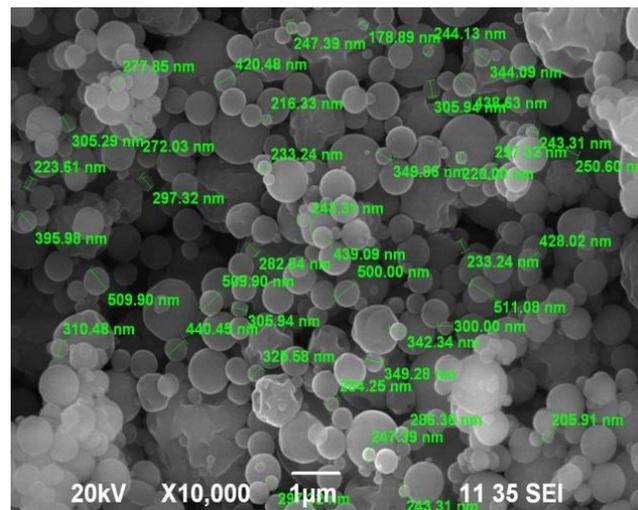


FIGURA 6. Micrografías de nanoesferas de quitosano conteniendo extracto de guarumbo (diámetro promedio 293.42nm).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a SIP-IPN y COFFA-IPN, México, y también gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la concesión de una beca.

REFERENCIAS

- [1] Estelrich, J. & Pons, M., *La espectroscopía de correlación fotónica y sus aplicaciones*, Industria farmacéutica: Equipos, procesos y tecnología **4**, 81-86 (1991). ISSN 0213-5574.
- [2] Foord, R., Jakeman, E., Oliver, C. J., Pike, E. R., Blagrove, R. J., Wood, E. & Peacocke, A. R., *Determination of diffusion coefficients of haemocyanin at low concentration by intensity fluctuation spectroscopy of scattered laser light*, Nature **227**, 242 - 245 (1970).
- [3] Kam. Z., Shore, H. B. & Feher G., *On the crystallization of proteins*, J., Mol. Biol. **123**, 539-555 (1978).
- [4] Baldwin, E. T., Crumley, K. W. & Carter, C. W., *Practical, Rapid screening of protein crystallization conditions by dynamic light scattering*, Biophys. J. **49**, 47-48 (1986).
- [5] Carter. J. W., Baldwin. E. T. & Frick. L. J., *Statistical design of experiments for protein crystal growth and the use of precrystallisation assay*, J. Crystal Growth **90**, 60-73 (1988).
- [6] Mikol. V., Hirsch, E. & Giegé B. R., *Monitoring protein crystallization by dynamic light scattering*, FEBS Letters **258**, 63-66 (1989).

- [7] Mikol, V., Hirsch, E. & Giegé B. R., *Diagnostic of precipitant for biomacromolecule crystallization by quasi-elastic light-scattering*, J. Mol. Biol. **213**, 187-195 (1990).
- [8] Kadima, W., McPherson, A., Dunn, M. F. & Journak, F. A., *Characterization of precrystallization aggregation of canavalin by dynamic light scattering*, Biophys J. **57**, 125-132 (1990).
- [9] Auersch, A., Littke, W., Lang, P. & Burchard, W., *Static and dynamic light scattering on solutions of precrystalline beta-galactosidase*, J. Crystal Growth **110**, 201-207 (1991).
- [10] Bishop, J. B., Martin, J. C. & Rosenblum, W. M., *A light scattering method for qualitatively monitoring aggregation rates in macromolecular systems*, J. Crystal Growth **110**, 164-170 (1991).
- [11] Kadima, W., McPherson, A., Dunn, M. F. & Journak, F., *Precrystallization aggregation of insulin by dynamic light scattering and comparison with canavalin*, J. Crystal Growth **110**, 188-194 (1990).
- [12] Mikol, V., Vincendon, P. & Eriani, G., *Diagnostic of protein crystallization by dynamic light scattering; an application to an aminoacyl-tRNA synthetase*, J. Crystal Growth **110**, 195-200 (1991).
- [13] Candau, S., *Chapter 3*, In: Light scattering in surfactant solutions. Vol. 22, (J. Zana & M. Dekker, N. Y., 1982).
- [14] Pecora, R., *Dynamic light scattering*, (Plenum Press, N. Y., 1985).
- [15] Lodge, T. P., *Block copolymers: past successes and future challenges*, Macromol. Chem. Phys. **204**, 265-273, (2003).
- [16] Forster, S. & Plantenberg, T., *From self-organizing polymers to nanohybrid and biomaterials*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **41**, 689-714 (2002).
- [17] Hamley, I. W. & Castelletto, V., *Small-angle scattering of block copolymers in the melt, solution and crystal states*, Prog. Polym. Sci. **29**, 909-948 (2004).
- [18] Gohy, J. F., *Block copolymer micelles*, Adv. Polym. Sci. **190**, 65-136 (2005).
- [19] Rodríguez-Hernández, J., Checot, F., Gnanou, Y. & Lecommandoux, S., *Toward 'smart' nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution*, Prog. Polym. Sci. **30**, 691-724 (2005).
- [20] Baradie, B. & Shoichet, M. S., *Synthesis of fluorocarbon-vinyl acetate copolymers in supercritical carbon dioxide: insight into bulk properties*, Macromolecules **35**, 3569-3575 (2002).
- [21] Lele, B. S. & Leroux, J. C., *Synthesis and micellar characterization of novel amphiphilic A-B-A triblock copolymers of n-(2-hydroxypropyl) methacrylamide or n-vinyl-2-pyrrolidone with poly(ϵ -caprolactone)*, Macromolecules **35**, 6714-6723 (2002).
- [22] Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetsky, V., Torchilin, V. & Langer, R., *Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres*, Science **263**, 1600-1603 (1994).
- [23] Kataoka, K., Harada, A. & Nagasaki, Y., *Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance*, Adv. Drug Delivery Rev. **47**, 113-131 (2001).
- [24] Kane, R. S., Cohen, R. E. & Silbey, R., *Synthesis of PbS nanoclusters within block copolymer nanoreactors*, Chem. Mater. **8**, 1919-1924 (1996).
- [25] Liaw, D. J., Huang, C. C. & Wu, P. L., *Living Ring Opening Metathesis Polymerization (ROMP) for the preparation of novel diblock copolymers of 5-(N-carbazoylmethyl)bicyclo[2.2.1]hept-2-ene and 5-(Phthalimide methyl) bicyclo[2.2.1]hept-2-ene*, Polymer **42**, 9371-9377 (2001).
- [26] Liaw, D. J. & Wu, P. L., *Synthesis and characterization of new diblock copolymers of 5-(N-carbazoylmethyl)-2-norbornene and 1,5-cyclooctadiene using Ring Opening metathesis Polymerization (ROMP)*, J. Mol. Catal. A: Chem. **160**, 35-43 (2000).
- [27] Clay, R. T. & Cohen, R. E., *Synthesis of metal nanoclusters within microphase-separated diblock copolymers: ICP-AES analysis of metal ion uptake*, Supramol. Sci. **4**, 113-119 (1997).
- [29] Emoto, K., Nagasaki, Y. & Kataoka, K., *Coating of surfaces with stabilized reactive micelles from poly(ethylene glycol)-poly(l-lactic acid) block copolymer*, Langmuir **15**, 5212-5218 (1999).
- [30] Liu, J. Q., Zhang, Q., Remsen, E. E. & Wooley, K. L., *Nanostructured materials designed for cell binding and transduction*, Biomacromolecules **2**, 362-368 (2001).