

Formación de partículas de polietilenglicol en presencia de calcitonina como nuevos biomateriales

Formation of poly(ethylene glycol) particles in the presence of calcitonin as new biomaterials

HUMBERTO ALEJANDRO MONREAL-ROMERO^{1,3}, JULIO VILLEGAS-HAM², REBECA GUZMÁN-MEDRANO², RAQUEL DUARTE-RICO², MARTA LOYA-LOYA², RAMÓN PÁJARO-HERNADEZ², JANETH SARAHÍ PINEDO-HERNANDEZ², EVELYN GARCÍA-TORRES²

Recibido: Enero 02, 2007

Aceptado: Diciembre 14, 2007

Resumen

En este estudio, la formación de partículas de polietilenglicol en presencia de calcitonina de varios tamaños, es presentado. El presente trabajo tiene como objetivo mostrar una fácil ruta para la formación de nuevos biomateriales usando sistemas biológicos. La muestra de polietilenglicol fue preparada con Calcitonina; subsecuentemente, las muestras fueron sujetas a tratamiento térmico a 28° C. Las características estructurales y morfológicas fueron determinadas usando Difracción de Rayos-X, Microscopía Electrónica de Barrido, Análisis de Energía Dispersiva de Rayos-X y Microscopía Electrónica de Transmisión. Los resultados mostraron la formación de partículas con tamaños de 1 a 3 µm de diámetro. La presencia de fase cristalina no pudo ser detectada mediante difracción de rayos-X. Se observaron además, partículas de 5 nm en la estructura del compuesto. Este resultado, es importante en medicina, porque partículas de Polietilenglicol/Calcitonina pueden ser aplicadas como vehículos farmacéuticos.

Palabras clave: polietilenglicol, calcitonina, biomateriales.

Abstract

In this study, the formation of poly (ethylene glycol) particles in the presence of calcitonin of various sizes is presented. The present work had as objective to show an easy route for the formation of news biomaterials by using biological systems. The samples of poly(ethylene glycol) were prepared with calcitonine; subsequently the samples were subjected to a treatment at 28°C. The structural and morphological characteristics were determined using X-Ray Diffraction, Scanning Electron Microscopy, Energy Dispersive Spectroscopy, and Transmission Electron Microscopy. Results showed the formation of particles with size of 1 to 3 µm in diameter. The presence of crystalline phase was not detected by X-Ray Diffraction. Also particles of 5 nm were observed in composite structure; this result is important in medicine, since poly(ethylene glycol)/Calcitonin particles could be applied as pharmaceutical vehicles.

Keywords: Poly(ethylene glycol), calcitonin, biomaterials.

¹Profesor investigador, Escuela de Odontología, Universidad Autónoma de Chihuahua. Av. Universidad s/n Campus Universitario I. C.P 31170, Chihuahua, Chihuahua. Tel. (614) 439-18-34, Fax.(614) 439-18-34

³Dirección electrónica del autor de correspondencia: hmonreal@uach.mx

Introducción

La ciencia de los biomateriales puede ser entendida como la interacción entre diversas áreas médicas y ciencia de materiales para la fabricación de nuevos dispositivos e implantes que son compatibles con tejidos y células. Esto, ha dado paso a que se comience a explorar con una gran variedad de elementos para su diseño, tal es el caso en el cual se han utilizado diferentes polímeros biocompatibles y biodegradables como el ácido poliláctico (PLA), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), polietilenglicol (PEG), entre otros, para formar micelas, hidrogeles y sistemas inyectables para el desarrollo de drogas (Liggins, *et al.*, 2002; Hoffman, 2002; Jeong, *et al.*, 1997).

Estos polímeros, han sido ampliamente investigados para ser usados para diversas aplicaciones, como materiales farmacéuticos, ingeniería de tejidos así como sistemas de encapsulamiento de partículas (Morlock, *et al.*, 1998). Una estrategia usada para modificar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los diferentes polímeros como PLA y PLGA, ha sido el poder incorporar segmentos hidrofílicos de PEG, y además, es conocido que su bajo peso molecular es fácilmente excretado por humanos (Beletsi, *et al.*, 1999; Morlock, *et al.*, 1998; Kissel y Unger, 2002; Jeong, *et al.*, 2000; Huh y Bae, 1999; Bae, *et al.*, 2000; Hrkach, *et al.*, 1997). Algunas estrategias usadas en la síntesis para la fabricación de medicamentos, ha sido el formar hidrogeles y copolímeros utilizando péptidos y proteínas. (Li, *et al.*, 2000; Gref, *et al.*, 2000; Choi, *et al.*, 2001).

Una gran variedad de dendrímeros de uso odontológico, como los derivados de etilendiamina (PAMAM), los cuales son capaces de atraer iones de calcio, han sido modificados; asimismo, se han desarrollado sistemas para construir cristales de fluorapatita en combinación con geles polipeptídicos (Peytcheva y Antonietti, 2001). Las moléculas biológicas presentan gran habilidad para reconocer y procesar diversos complejos de información entre

moléculas orgánicas-inorgánicas (Dupont y Rouxhet, 2001). Una amplia gama de superficies como oro, grafito, y sílice, han sido estudiados para explicar fenómenos como la interacción electrostática entre oligonucleótidos y aminoácidos para producir substratos inorgánicos con capacidad de

reconocimiento de substratos naturales que pueden estar relacionados con biomoléculas (Kim y Abbott, 2001). Tal es el caso en donde se unieron albúmina sérica de bovino (BSA), en substratos de vidrio para formar capas de líquido cristalino de 4-ciano 4-M'-pentilbifenil (Loidl, *et al.*, 2001).

En el presente trabajo, se presenta una estrategia para sintetizar un compuesto mediante el uso de PEG adicionándole calcitonina. Estos compuestos parecen promisorios para ser usados como materiales de uso médico.

Materiales y métodos

En el presente estudio se utilizaron los materiales: Polietilenglicol (PEG) con peso molecular 8000 (grado Biología Molecular marca Sigma Aldrich); calcitonina de salmón (cat. 05-23-2401 CALBIOCHEM) y agua bidestilada. En un primer paso, se preparó una solución, con 200 mg de PEG y 2 ml de agua bidestilada; posteriormente, la solución (conteniendo PEG) se agitó con un agitador magnético por 24 h para disolver el polietilenglicol. Luego se añadieron a la solución, 10 µl de calcitonina de salmón a una concentración de 10,000 µg/ml, se agitó durante un minuto para homogeneizar ambos compuestos y permitir la interacción de las moléculas de calcitonina y el polietilenglicol. Después se retiró la solución del agitador magnético y se mantuvo a una temperatura de 28°C por un período de siete días. Posteriormente, se caracterizó sin ningún tratamiento previo por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB mod. JSM5800 USA, equipado con Energía Dispersiva de

Rayos-X (EDS); asimismo, se recurrió al uso de Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM Philips mod. CM-200 a 200 kV USA). En la Figura 1 se presenta un modelo sencillo para la formación del gel.

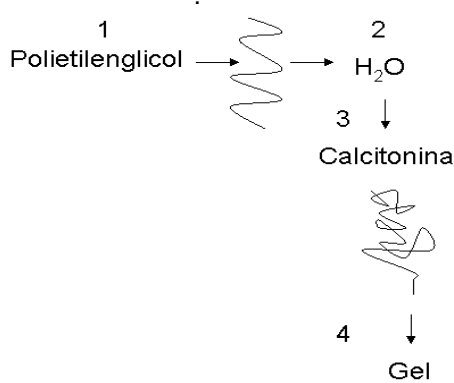


Figura 1. Modelo para la formación del gel basado en polietilenglicol y calcitonina

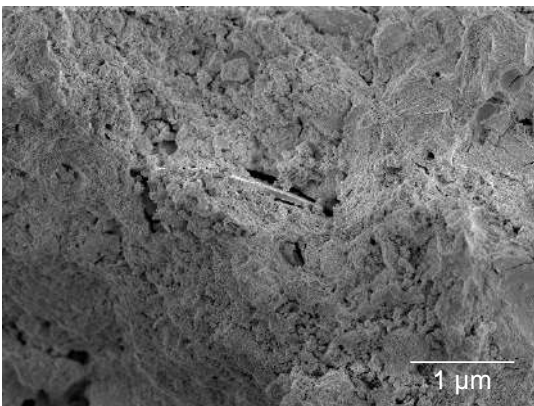
1 y 2 = moléculas de polietilenglicol en agua para producir una solución; **3** = incorporación de la solución conteniendo polietilenglicol a moléculas de calcitonina; **4** = Formación del gel conteniendo PEG/Calcitonina.

Resultados y discusión

El gel fue preparado siguiendo un método similar al descrito por Sugimoto (Sugimoto, *et al.*, 1997). La Figura 2-A muestra una imagen del polietilenglicol en ausencia de calcitonina, se observa una consistencia compacta, homogénea y cuya superficie es irregular.

En la Figura 2-B, por otro lado, se observa la muestra del compuesto en presencia de calcitonina, cuya apariencia es compacta con bordes irregulares y la mayor parte de la superficie porosa. Dicha morfología puede esperarse debido a las redes que forman la estructura del PEG. Derivado de las observaciones en MEB.

A)



B)

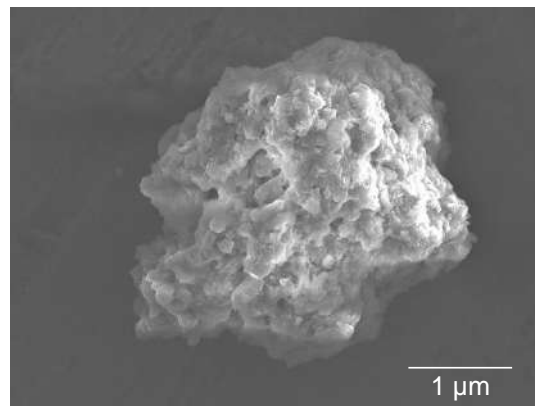
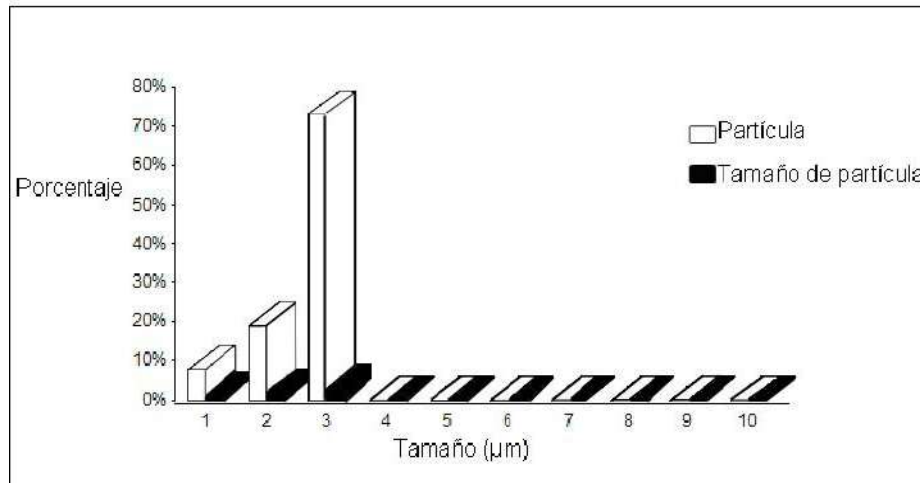


Figura 2. A) Polietilenglicol en ausencia de calcitonina. B) Compósito de Polietilenglicol/Calcitonina.

La Figura 3, muestra la distribución para el tamaño de partículas encontradas y cuyo intervalo oscila entre 1 y 3 μm de diámetro, siendo las partículas de 3 μm las que se encuentran en mayor porcentaje. Algunos procesos para desarrollar compósitos mediante la técnica de precipitación supercrítica antisolvente, con polímeros orgánicos para la liberación de drogas, han sido discutidos en la literatura (Chattopadhyay, *et al.*, 2002). Dichos

procesos no sólo ofrecen la ventaja de usar alcóxidos metálicos, sino también otro tipo de moléculas, y se basan en el control de la reacción por hidrólisis y condensación a través de medios químicos, y no por química coloidal donde los grupos alcoxi OR (R= grupo orgánico saturado o insaturado) son un fuerte donador de enlaces π que estabilizan el alto estado de oxidación del precursor (Kubo, *et al.*, 1998).

Figura 3. Distribución de tamaño de partículas (µm) del compuesto PEG/Calcitonina.



En esta vía y por adición de la calcitonina, la solución puede ser convertida a gel cuando éste puede soportar las fuerzas elásticas de las cadenas, esto es definido como punto de gelación o tiempo de gelación, t_{gel} . Desde este punto, la conversión es gradual y más y más partículas comienzan a ser interconectadas en la red formada entre la calcitonina y PEG, proceso conocido como redes poliméricas interpenetradas, en donde los grupos aminos de la cadena de 32 aminoácidos que componen la calcitonina (Figura 4-A) interactúan con las moléculas de PEG (Figura 4-B).

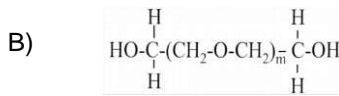
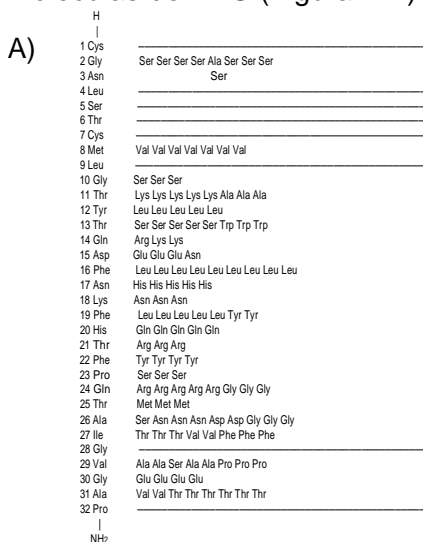


Figura 4. A) Secuencia de 32 aminoácidos de la cadena polipeptídica que conforma la calcitonina, B) Estructura del polietilenglicol.

En este caso la relación calcitonina:polietilenglicol fue mantenida en 1:20, para activar una buena dispersión de la primera en la matriz polimérica de polietilenglicol, esto permite que la unión de la calcitonina se lleve a cabo. Los parámetros de optimización están actualmente bajo investigación así como estudios de biodisponibilidad en modelos animales y tejidos dentales y podrán ser presentadas en una futura publicación.

En la Figura 5 se presenta un análisis semicuantitativo, obtenido mediante EDS, de los compuestos químicos que contiene la muestra del compuesto PEG/Calcitonina; se puede identificar un pico superior que corresponde al carbono con un porcentaje en peso de 64.89 %, un pico menor correspondiente al oxígeno con un porcentaje en peso de 30.28 %, y dos picos inferiores que corresponden a azufre con porcentaje en peso de 0.39 %, y al calcio con 0.31 %, respectivamente.

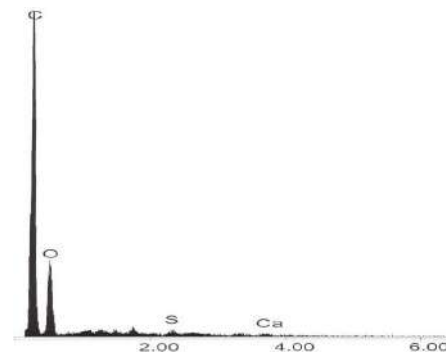


Figura 5. Espectro de análisis de energía dispersiva de rayos-X de los compósitos PEG/Calcitonina.

La estructura de los compósitos se estudió mediante difracción de rayos-X. Como se observa en el difractograma de la Figura 6, no existen picos de difracción que permitan la identificación del compuesto; se cree que esto es debido a la rápida evaporación del agua durante el secado del gel. Trabajos relacionados con el desarrollo de compuestos poliméricos reportan la formación de fases cristalinas al emplear técnicas hidrotermales, dependiendo de los compuestos poliméricos y el tratamiento térmico usado (Mogyrosi, *et al.*, 2003).

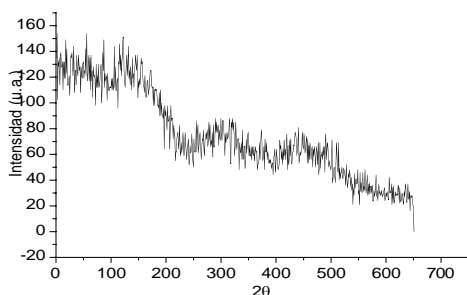


Figura 6. Difractograma de rayos- X de los compósitos PEG/Calcitonina.

Por otro lado, en la Figura 7, se observa una imagen de los compósitos PEG/Calcitonina mediante TEM en modo de campo claro; en esta imagen se aprecia la porosidad de la estructura conformada por gránulos con tamaños de aproximadamente 5 nm.

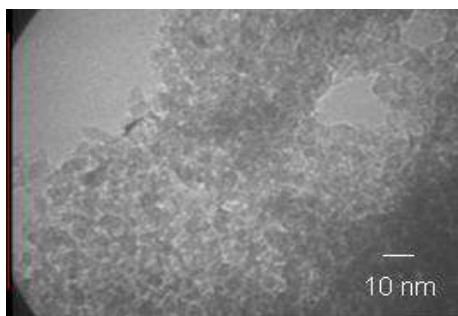


Figura 7. Imagen de TEM de los compósitos PEG/Calcitonina.

Para analizar la interacción entre la calcitonina y el polietilenglicol se realizó una espectroscopia infrarrojo Figura 8, durante el proceso de entrecruzamiento aparecen en el espectro bandas a 2100, 820 y 3000 cm^{-1} que

corresponden a la formación de puentes de hidrogeno (H), ya que los grupos O_2 libres que se encuentran en el PEGP, pueden atraer H que se encuentran formando parte de la cadena lateral de algunos aminoácidos como tirosina, treonina y serina que se encuentran en la molécula de calcitonina.

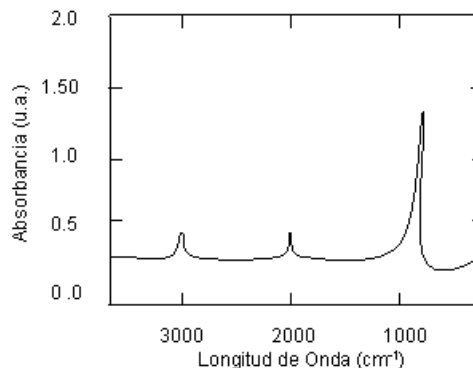


Figura 8. Espectro de análisis infrarrojo del compuesto PEG/Calcitonina

Además, el grupo carboxilo de la calcitonina, también puede formar puentes de hidrogeno con el hidrogeno de los grupos OH del PEG. Aunque en este espectro no se detectó la presencia de enlaces covalentes, cabe especular que se pueden formar dichos enlaces por la atracción de cargas residuales entre el oxígeno y el hidrógeno, la cual formaría una atracción electrostática entre ambos compuestos, Figura 9.

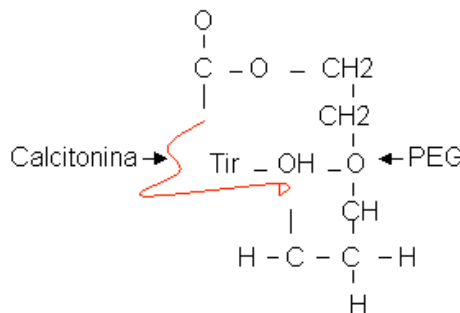



Figura 9. Mecanismo de interacción entre la calcitonina y polietilenglicol.

Conclusiones

Se ha desarrollado un modelo para la formación de nuevos biomateriales usando polietilenglicol y calcitonina. Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido y de Transmisión, revelaron que las partículas obtenidas presentaron diámetros entre 1 y 3 μm . La operación de este método de síntesis es simple y todos los procesos de reacción son llevados en solución.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Centro de investigación en Materiales Avanzados S. C. (CIMAV) y a Wilber A. Paraguay F., por el soporte técnico para la realización de este estudio. 

Literatura citada

- BAE, Y., H. K. M. Huh, Y. Kim, and K. H. Park. 2000. Biodegradable amphiphilic multiblock copolymers and their implant for biomedical applications. *J. Control Rel.* 64:3-13.
- BELETSI, A., L. Leontiadis, P. Klepetsianis, D. S. Ithakissios and K. Avgoustakis. 1999. Effect of preparative variable properties of poly(dl-lactide-co-glycolide)-methoxypoly(ethyleneglycol) copolymers related to theirs in controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.* 182:187-197.
- CHATTOPADHYAY, P., and R. B. Gupta. 2002. Protein nanoparticles formation by supercritical antisolvent with enhanced mass transfer. *J. Am. Inst. Chem. E.* 48(2):235-44.
- CHOI, Y., S. Y. Kim, S. H. Kim, K. S. Lee, C. Kim and Y. Byun. 2001. Long-term delivery of all-trans-retinoic acid using biodegradable PLLA/PEG/PLLA blended microspheres. *Int. J. Pharm.* 215: 67-81.
- DUPONT, C., C. and P.G. Rouxhet. 2001. Modulable Nanometer-Scale Surface Architecture Using Spin-Coating on an Adsorbed Collagen Layer. *Nano Lett.* 1:245.
- KIM, S., R. and N. L. Abbott. 2001. Rubbed Films of Functionalized Bovine Serum Albumin as Substrates for the Imaging of Protein-Receptor Interactions Using Liquid Crystals. *Adv. Mater.* 13(19):1445-1449.
- GRAF, R., M. Luck, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T.
- Blunk, and R.H. Miller. 2000. Stealth copolymer nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG) :Influences of the corona (PEG chain surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption and surface B. *Biointerfaces* 18:301-313.
- HOFFMAN, A., S. 2002. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* 43:1-12.
- HRKACH, J., S. M.T. Peracchia, A. Domb, N. Lotan and L. Robert. 1997. Nanotechnology for biomaterials engineering structural characterization of amphiphilic polymeric nanoparticles by ^1H NMR spectroscopy. *Biomaterials* 18:27-30.
- HUH, K., M. and Y. H. Bae. 1999. Synthesis and characterization of Poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) alternative multiblock copolymers. *Polymer.* 40:6147-6155.
- JEONG, B., Y. H. Bae, and S. W. Kim. 2000. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PLGA-PEG triblock copolymers. *J. Control Rel.* 63:155-163.
- KISSEL, T., Y. Li, and F. Unger. 2002. ABA- triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydro(ethylene oxide) B- block as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins. *Delivery Rev.* 54(1):99-134.
- KUBO, M., T. Kawakatsu and T. Yonemoto. 1998. Modeling of continuous synthesis process of TiO_2 particles using slugflow tubular reactor. *Trans I ChemE* 76: 669-676.
- LI, Y., P. Y. Y. Pei, X. Y. Zhang, Z. H. Gu, Z. H. Zhou, Y. F. Yuan, J. J. Zhou, J.
- H. Zhu and X. J. Gao. 2001. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Control Rel* 71(2): 203-211.
- LIGGINS, R., T. and H. M. Burt. 2002. Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loader polymeric micelle formations. *Adv. Drug Delivery Rev.* 54:191-202.
- LOIDL, S., A. J. Schmitt, J. Noller, T. Hartmann, H. Brodowski, W. Schmitt and J. Keldenich. 2001. Solid-Supported Biomolecules on Modified Silica Surfaces – A Tool for Fast Physicochemical Characterization and High-Throughput Screening. *Adv. Mater.* 13(23):1829-34.
- MOGYROSI, K., I. Dekani and J. H. Fendler. 2003. Preparation and characterization of clay mineral Intercalated titanium dioxide nanoparticles. *Langmuir* 19:2938-2946.
- MORLOCK, M., T. Kissel, Y. X. Li, H. Koll, and G. Winter. 1998. Erythropoietinloaded microspheres prepared from biodegradable LPGL-PEO-LPLG triblock copolymers: protein stabilization and in -vitro release. *Control Rel.* 56:105-115.
- PEYTCHEVA, A., and M. Antonietti. 2001. Carving on the Nanoscale³: Polymers for the Site-Specific Dissolution of Calcium. *Angew. Chem. Int.* 40(18):3380-3383.
- SUGIMOTO, T., K. Okada and H. Itoh. 1997. Synthetic of Uniform Spindle-Type Titania particles by the Gel-Sol. *J. Colloid Int. Sci.* 193(1):140-143.

Este artículo es citado así:

MONREAL-ROMERO H. A., J. Villegas Ham, R. Guzmán-Medrano, R. Duarte-Rico, M. Loya-Loya, R. Pájaro-Hernández, J. S., Pinedo-Hernández E. García-Torres. 2007. Formación de partículas de polietilenglicol en presencia de calcitonina como nuevos biomateriales. *TECNOCENCIA Chihuahua* 1(3):13-20.

Resúmenes curriculares de autor y coautores

HUMBERTO ALEJANDRO MONREAL ROMERO. Cursó la Licenciatura en Enfermería en la Facultad de Enfermería y Nutriología (1994-2000). En el año (2000-2002) realiza sus estudios de Maestría en Ciencias en Biotecnología en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Es Doctor en Ciencia de Materiales por el Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C. (CIMAV), de la Ciudad de Chihuahua (2003-2006). Su especialidad es en las áreas de Nanotecnología y Bionanotecnología, parte de su trabajo esta relacionado con la síntesis de Nuevos Biomateriales usando biomoléculas como DNA, aminoácidos y proteínas, del 2005 a la fecha funge como árbitro del Instituto de Publicaciones de Física RU en el área de Nanotecnología, tiene alrededor de 7 publicaciones en revistas internacionales indexadas y 2 en revistas arbitradas, ha sido distinguido como miembro del Sistema Nacional de Investigadores (SNI, CONACYT).

JULIO VILLEGAS HAM. Realizó sus estudios de Licenciatura de Cirujano Dentista, por la ENEP Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México (1978-1983.) Cursó la especialidad en Odontología Pediátrica (UNAM, 1986-1987)). Es Candidato a Doctor en Odontología por la Universidad de Navarra España (2002-2007). Su área de trabajo versa sobre el comportamiento y desarrollo in vivo e in vitro de Nuevos Biomateriales, ha sido Evaluador Nacional de CONAEDO de Programas Académicos del Área Odontológica (2002).

REBECA GUZMÁN MEDRANO. Cursó la Licenciatura de Cirujano Dentista en la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), (1989 – 1992). Realizó estudios de Especialidad en Patología Bucal y Diagnóstico Integral por la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)) (1998 – 2000). Obtuvo la Maestría en Ciencias en Patología Experimental por el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), (2004). Es Candidato al Grado de Doctor en Educación con Especialidad en Investigación por la Universidad Autónoma de Chihuahua (2006). Ha trabajado en las áreas de Patología Bucal, Diagnostico Molecular de enfermedades infecciosas y cáncer así como síntesis de Biomateriales, ha sido miembro de la sociedad médica científica del Instituto Nac. De Cancerología de 1999-2001, cuenta con 2 publicaciones en revistas internacionales indexadas,

RAQUEL DUARTE RICO. Cursó la Licenciatura de Químico Biólogo Parasitólogo en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (2000). Obtuvo su grado de Maestría en Salud en el Trabajo por la Facultad de Enfermería y Nutriología UACH (2007). Su área es sobre Salud en el Trabajo y Microbiología Clínica.

MARTHA LOYA LOYA. Realizó sus estudios de Licenciatura de Químico Biólogo Parasitólogo por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (1982), y la carrera de Contador Público por la misma Universidad (1987). Cursó estudios de Maestría en Salud en el Trabajo en la Facultad de Enfermería y Nutriología UACH (2006). Ha trabajado en las áreas de Microbiología Clínica y Experimental así como Seguridad e Higiene, tiene diversas publicaciones en las áreas de Trabajo, Salud y Ambiente.

RAMÓN PÁJARO HERNÁNDEZ. Cursó la Carrera de Químico Farmacobiólogo por la Universidad de Cartagena Colombia (1972). Es Candidato a Maestro en Biología de la Reproducción Animal por la Universidad Autónoma Metropolitana (2008). Su trabajo esta relacionado con el área de la Biología de la Reproducción y Efectos Toxicológicos de diversos metales pesados en tejidos in vivo e in Vitro.

JANETH SARAHÍ PINEDO HERNÁNDEZ. Cursa actualmente la Carrera de Cirujano Dentista (pasante 2008) en la Escuela de Odontología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Su participación ha sido la síntesis de biomateriales para aplicaciones dentales.

EVELYN GARCIA TORRES. Cursa la Carrera de Cirujano Dentista (pasante 2008) en la Escuela de Odontología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Ha participado en la elaboración de nuevos biomateriales para usos odontológicos

DOI: <https://doi.org/10.54167/tecnociencia.v1i3.59>