

## Trabajos de revisión medicamentos

# Quitosanos: usos y aplicaciones en tecnología farmacéutica

Zornoza-Sabina T\*, Cano-Cebrián MJ\*\*, Granero L\*\*\*, Polache A\*\*\*

### Resumen

*Se presenta una revisión de la gran diversidad de aplicaciones farmacéuticas del quitosano. Tras un breve repaso de la estructura y características fisicoquímicas de los quitosanos, se destaca el uso de este polímero en la elaboración de formas de liberación controlada, ámbito en el cual se está desarrollando una intensa investigación actualmente. Además se analiza la aplicación del quitosano para la mejora de la biodisponibilidad de diversos fármacos mediante su inclusión en formas farmacéuticas administradas a través de distintas vías, así como su capacidad promotora de la absorción intestinal y nasal, discutiendo los posibles mecanismos de acción. También se revisan las aplicaciones más novedosas de los quitosanos como son en la terapia antitumoral, en las vacunas, o incluso en la terapia génica y el trasplante de células. Por último, se pone de manifiesto la baja toxicidad y la buena biocompatibilidad de este polímero, que hacen de él un excelente excipiente para la industria farmacéutica y excepcional candidato para futuras formulaciones.*

**Palabras clave:** Quitosano. Excipiente farmacéutico. Formas de liberación controlada. Absorción intestinal. Terapia génica. Terapia antitumoral. Vacunas. Toxicidad.

### Summary

*The multiple pharmaceutical applications of chitosans have been reviewed in this paper. After describing its structure and physico-chemical properties, an overview of the use of this polymer in controlled release dosage forms as well as in other dosage forms to improve bioavailability and safety has been made. Furthermore, the capacity of chitosan to promote the intestinal and nasal absorption is analyzed including the discussion of the mechanisms of action. The authors also outline the newer applications of chitosans such as in antitumor therapy, vaccines delivery, gene therapy and cellular transplant. Finally, the safety of this polymer is reviewed putting in evidence its low toxicity and biocompatibility which make chitosan an exciting and promising excipient for the pharmaceutical industry for present and future applications.*

**Key words:** Chitosans. Pharmaceutical excipient. Controlled release dosage forms. Intestinal absorption. Gene Therapy. Antitumoral Therapy. Vaccines. Toxicity.

### Introducción

El quitosano es un polisacárido compuesto por subunidades de glucosamina (GlcN) y N-acetilglucosamina (GlcNac), unidas entre sí

\* Becario para la Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

\*\* Becaria Plan Nacional sobre Drogas. Ministerio del Interior.

\*\*\* Profesor titular. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universitat de València.

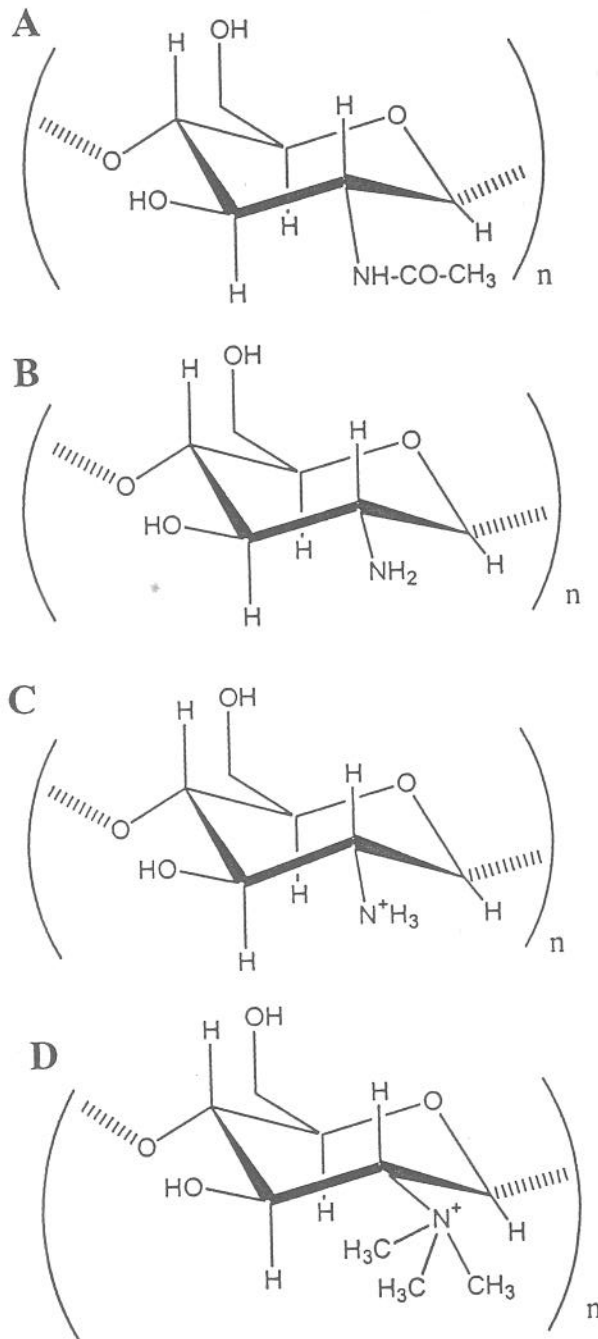


Fig. 1. Estructuras químicas de la quitina (A), quitosano (B), quitosano catiónico (C) y N-trimetilquitosano (TMC) (D).

por un enlace  $\beta(1:4)$ . Se obtiene a partir de una fuente natural, concretamente, a partir de la desacetilación parcial de la quitina, principal componente del exoesqueleto de invertebrados como crustáceos e insectos, también presente en algunos microorganismos y hongos, como las levaduras (1) (Fig. 1). Visto que la quitina es un polímero de N-acetilglucosamina,

#### Quitina

- Componente estructural de exoesqueleto de crustáceos
- Polímero natural más común aparte de la celulosa
- Biodegradable. No tóxico

#### Quitosano

- Alto peso molecular
- Soluble a  $\text{pH} < 6.5$
- Poliamina
- Biodegradable. No tóxico

#### Quitosano catiónico

- Elevada densidad de carga
- Propiedades como agente formador de películas
- Forma complejos con aniones. Compatible con cationes
- Biodegradable. No tóxico

#### Trimetilquitosano

- Elevada densidad de carga
- Soluble a  $\text{pH} < 9$
- Propiedades como promotor de la absorción intestinal
- Biodegradable. No tóxico

y el quitosano es un producto de su desacetilación parcial, es difícil determinar su composición química exacta. Por ello, el término quitosano se emplea de modo genérico para designar a toda la serie de polímeros obtenidos con distintos pesos moleculares (50 kDa-2000 kDa) y grado de desacetilación (40%-98%). Se ha demostrado que tanto el número de unidades

de GlcNac (grado de desacetilación) como el peso molecular del polímero influyen en sus propiedades físicas y biológicas (2-5).

El quitosano nativo es un plicación a valores de pH ácido, con un  $pK_a$  intrínseco de 6.5 (1). Es un compuesto insoluble a pH neutro y alcalino, pero forma sales con ácidos orgánicos e inorgánicos como los ácidos láctico, acético, glutámico y clorhídrico. Estas sales son más o menos solubles en agua, dependiendo de su grado de desacetilación (y por tanto del  $pK_a$  del polímero) y el pH del medio. Quitosanos con un grado bajo de desacetilación (40%) son solubles hasta pH 9, mientras que quitosanos con un grado de desacetilación aproximado del 85 % sólo son solubles hasta pH 6.5. Es decir, cuanto menor es el grado de desacetilación del polímero, mayor es el ámbito de valores de pH a los que es soluble.

Por otro lado, la viscosidad de una solución de quitosano aumenta a medida que se incrementa su grado de desacetilación. Esta característica parece ser debida a las diferentes conformaciones que puede adoptar la molécula en función del mayor o menor grado de desacetilación. Cuando el grado de desacetilación es alto, la molécula se encuentra altamente cargada y adopta una conformación extendida, mientras que si el grado de desacetilación es bajo, adopta una conformación más arrollada debido a su menor carga (6).

### Usos generales del quitosano

Actualmente sus usos y propiedades son numerosos lo que conlleva a aplicaciones de índole diversa. Sus propiedades como floculante se han empleado para la clarificación de las aguas de desecho en Japón (7), o de bebidas como cervezas y zumos de frutas (8). Sin embargo, también destaca su uso como agente quelante de metales, hecho que se ha aprovechado para la detoxificación de residuos peligrosos (9). Por sus propiedades como gelificante y agente formador de películas ha sido empleado por la industria cosmética (10), de fijador de colorantes en la industria textil, aditivo reforzante en la industria papelera (11), o incluso cabe destacar sus aplicaciones oftálmicas como recubrimiento o material propio de las lentes de contacto (12).

En el campo de la agricultura, se ha adicionado a fertilizantes líquidos por sus propiedades antifúngicas. La posible interacción entre la carga positiva del quitosano y los ácidos grasos libres y sales biliares (13), ha potenciado su empleo, a nivel dietético, en dietas adelgazantes y reductoras del colesterol.

Por último, también cabe resaltar su uso como componente de materiales biomédicos, especialmente de materiales empleados a nivel de cirugía, debido a sus características anticoagulantes (14), antifúngicas (15) y su acción estimuladora de la cicatrización (16). Sus aplicaciones a nivel farmacéutico se comentarán más ampliamente a continuación.

### Usos en la industria farmacéutica

Diversos grupos de investigación han centrado, en los últimos años, sus esfuerzos en el íntimo conocimiento de las características físico-químicas de este polímero. Fruto de estos trabajos se le han ido atribuyendo al quitosano multitud de propiedades de gran interés para la industria farmacéutica y que se exponen seguidamente.

#### Formas de liberación controlada

El quitosano ha sido ampliamente estudiado por la industria farmacéutica por su potencial uso en el desarrollo de sistemas de transporte y liberación controlada. Ello se debe a su comportamiento como polímero catiónico, así como a sus características como agente formador de películas y geles. Ambos sistemas pueden permitir el control de la tasa de fármaco liberado y la prolongación de la duración del efecto terapéutico, así como tal vez el transporte y liberación a lugares específicos. A continuación, se detallan los estudios más relevantes en este campo.

Lehr y col. (17) demostraron, *in vitro*, las propiedades mucoadhesivas del quitosano, el cual presentaba un mejor comportamiento que otros agentes mucoadhesivos como la hidroxipropilmetilcelulosa o la carboximetilcelulosa. El empleo de formas de dosificación mucoadhesivas puede mejorar la biodisponibilidad de muchos fármacos ya que pueden prolongar el tiempo de residencia frente a sus transportadores específicos y/o conseguir una liberación sostenida (18).

En 1984, Nagai y col. (19) pusieron de manifiesto que distintos quitosanos en combinación con otros excipientes, podían utilizarse para la elaboración de comprimidos con propiedades de liberación controlada. El estudio concluía que los comprimidos formulados presentaban una cinética de liberación del fármaco de orden cero, cuya tasa de liberación dependía directamente del tipo y cantidad de quitosano empleado. Estudios posteriores abordaron la elaboración de comprimidos de liberación sostenida de diclofenaco sódico, utilizando el qui-

tosano como excipiente, mediante compresión directa y granulación húmeda. De acuerdo con estos estudios (20, 21), el grado de acetilación del quitosano afecta significativamente a la liberación de diclofenaco a pH 1.2 y 6.8.

Nigalaye y col (22) elaboraron comprimidos de liberación sostenida que contenían teofilina incluida en una matriz hidrocoloidal de quitosano, carbómero-934P y ácido cítrico. Según sus resultados, cuando el quitosano era empleado en concentraciones superiores al 50% del peso total del comprimido, se formaba una matriz insoluble no erosionable, mientras que al utilizar una concentración inferior al 33 % se obtenía un sistema matricial de liberación rápida. Cuando se empleaba en concentraciones inferiores al 10% únicamente actuaba como disgregante. Estos resultados se vieron apoyados por los obtenidos por Miyazaki y col. (23) quienes demostraron que la adición de alginato sódico al quitosano proporcionaba al comprimido unas mejores propiedades de liberación. Similares resultados obtuvieron Yomota y col (24) quienes pusieron en evidencia que los comprimidos obtenidos por compresión directa de teofilina, alginato sódico y quitosano presentaban una liberación sostenida de fármaco independiente del pH, hecho atribuido a la presencia del alginato sódico.

Akbuga y col. (25) abordaron el estudio de la influencia de las características físico-químicas de los fármacos en su comportamiento de liberación desde comprimidos elaborados con una matriz compuesta por maleato de quitosano. Estos autores identificaron que la solubilidad del fármaco, su grado de ionización y su peso molecular eran factores de gran importancia en este proceso.

#### Liberación colónica

Una de las nuevas aplicaciones que se ha descubierto en los últimos años para este polímero es el transporte específico de sustancias a determinadas regiones del organismo. En esta vía, distintos grupos de investigación han postulado que el quitosano, en forma de cápsulas, permite la liberación selectiva de fármacos en la región colónica. Se ha conseguido el transporte selectivo a dicha región tanto del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) (26) como de insulina (27). Este último grupo investigador ensayó unas cápsulas de quitosano con un recubrimiento entérico de ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. De acuerdo con sus resultados dichas cápsulas liberaban selectivamente la insulina en el colon, sugiriendo que esta liberación selectiva podría ser debida al bajo pH presente en el colon ascendente, o a la presen-

sencia de enzimas bacterianos que podrían degradar el quitosano.

#### Administración parenteral

La susceptibilidad del quitosano a la lisozi- ma, permite que sea un polímero biodegradable y un transportador ideal de fármacos (28). Moléculas como albúmina de suero bovino, el toxoide de la difteria (29), bifosfonatos (30), esteroides como la progesterona (31) o antitumorales como la mitoxantrona (32) han sido incorporadas en microesferas de quitosano de modo satisfactorio. Jameela y col. han demostrado la viabilidad de estas microesferas de quitosano para la obtención de una liberación controlada de moléculas tras la administración intramuscular de preparados de distinta naturaleza. Este grupo investigador incluso realizó estudios histológicos donde se inyectaron microesferas de quitosano y placebo, demostrando una biocompatibilidad total con los tejidos. La biodegradación no fue completa hasta los seis meses, demostrando su potencial uso como vehículo para la liberación prolongada de moléculas (32).

El empleo de los quitosanos a nivel de formulaciones intravenosas ha abierto una nueva vía de investigación (33). Kamiyama y col. realizaron estudios farmacocinéticos y de distribución a nivel de tejidos utilizando glicolquitosano y N-succinilquitosano. Los dos polímeros ensayados, mostraron un alto grado de retención a nivel de circulación sanguínea y una pequeña acumulación en tejidos, lo que sugiere que el quitosano puede ser un excelente excipiente para fármacos con una elevada velocidad de eliminación (33).

#### Administración ocular

La baja biodisponibilidad que presentan los fármacos cuando se administran de forma tópica a nivel ocular, hace necesaria una instilación frecuente para conseguir el efecto terapéutico. Este inconveniente puede ser solventado empleando formas de liberación prolongada a nivel del área de la córnea (34). Genta y col. (35) demostraron que microesferas de quitosano cargadas con aciclovir presentaban una velocidad de disolución in vitro menor que la del compuesto puro. Sin embargo, tras su administración ocular in vivo presentaban una liberación sostenida de modo que el valor del área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) era significativamente mayor que cuando se administraba el fármaco puro. Los autores sugirieron que las propiedades mucoadhesivas del quitosano adicionado eran las res-

l  
é  
c  
ir  
a,  
jo  
cc  
tic  
as  
cíc  
me  
ap.  
cor  
cur  
pla,  
fies  
bilic  
exc,  
céu,  
form

\* Be  
ric  
\*\* Be  
ter  
\*\*\* Pr  
gía  
de

Recibid  
ceptac



ponsables de su liberación sostenida y su mayor biodisponibilidad.

Sin embargo, existe cierta controversia respecto a los mecanismos implicados en esta mejora de la biodisponibilidad en preparados oftálmicos. Así, Calvo y colaboradores (36) prepararon varios sistemas de transporte de la indometacina para administración ocular. Los preparados ensayados fueron suspensiones de nanopartículas, nanocápsulas y micropartículas elaboradas con poli-epsilon-caprolactona, y una emulsión submicroscópica. Los resultados evidenciaron un aumento de la biodisponibilidad de alrededor del 300% para la indometacina con respecto al preparado comercial para las tres formas submicroscópicas (nanopartículas, nanocápsulas y emulsión). El mecanismo de interacción de estos sistemas con el epitelio córneo se estudió mediante microscopía de barrido confocal laser. Dicho análisis mostró que las partículas submicroscópicas atraviesan el epitelio córneo por endocitosis. Por tanto, los autores sugirieron que la naturaleza coloidal de los transportadores es la principal causa de este incremento de la biodisponibilidad del fármaco, y no la presencia de ningún promotor específico.

### Otras vías de administración

El interés comercial de péptidos y proteínas y sus ventajas como agentes terapéuticos, han sido la base de tremendos esfuerzos para el diseño y desarrollo de sistemas de transporte adecuados para ellos (37). Sin embargo, la susceptibilidad de estas sustancias a efectos de primer paso hepático o degradación en el medio gastrointestinal (medio excesivamente ácido, presencia de proteasas, etc), han imposibilitado su administración por vía oral y han obligado a la búsqueda y mejora de vías alternativas, como la vía intranasal, sublingual o pulmonar. Con el fin de incrementar la absorción intranasal de estos compuestos, se han investigado diversos promotores, tales como tensioactivos (38), sales biliares (39), mezclas de sales biliares con ácidos grasos (39) o ciclodextrinas (40). Sin embargo, la mayor parte de estos promotores producen alteraciones importantes de la mucosa. Illum y col. (41) fueron pioneros en poner de manifiesto que el quitosano es capaz de promocionar la absorción vía trans-mucosa de pequeñas moléculas polares, péptidos y proteínas. Utilizando como modelo animal la oveja, ensayaron una fórmula farmacéutica de insulina para su administración nasal en presencia y ausencia del quitosano. Sus resultados mostraron que la concentración máxima de insulina en plasma ( $C_{max}$ ) se elevó de

34 mIU/l a 191 mIU/l y el AUC se incrementó 7 veces gracias a la adición del promotor. Se han obtenido resultados similares con otras moléculas de pequeño tamaño que habitualmente se encuentran polarizadas, como la morfina o fármacos antimigrañosos, y péptidos como la hormona paratiroidea, la goreselina, la desmopresina o la calcitonina. Los estudios desarrollados en voluntarios sanos, han confirmado los resultados anteriores (42). La eficacia del quitosano como promotor de la absorción nasal de medicamentos, fue confirmada utilizando la [D-Arg (2)]-kitorfina, dipéptido opioide enzimáticamente estable, en un modelo experimental con rata (43). Se ensayaron tres formas nativas del quitosano y dos en forma de sal (glutamato e hidrocloreto). Todos se mostraron efectivos como promotores de la absorción nasal, sin embargo, la efectividad de las formas amínicas libres aumentaba a medida que el pH disminuía de 6 a 4 ( $p < 0.01$ ). Por tanto, es el quitosano formulado como sal (0.02% p/v) su forma más efectiva, presentando un factor de promoción similar al de la hidroxipropil-beta-ciclodextrina al 5%. El estudio histológico realizado tras dos semanas de tratamiento diario con ambos quitosanos al 1% sólo mostró una ligera irritación de la mucosa.

La mucosa bucal, parece otra candidata seria para la administración de este tipo de sustancias. De este modo, Senel y col. (44) administraron un péptido, como es el factor de crecimiento  $\beta$ , en forma de gel de quitosano al 2% preparado en una dilución de ácido láctico. Los resultados obtenidos *in vitro* en mucosa bucal de cerdo, fueron plenamente satisfactorios, y pusieron de manifiesto el efecto promotor y protector del quitosano para este tipo de sustancias. Recientemente, Takeuchi y col. (45) han administrado distintos péptidos en forma de liposomas y nanopartículas recubiertos con polímeros mucoadhesivos como quitosanos y Carbopol por vía oral y pulmonar. Estas formas farmacéuticas recubiertas, permitieron una mayor efectividad y un efecto más prolongado del péptido administrado que las preparadas sin ningún tipo de recubrimiento.

### Absorción intestinal

En relación con los estudios de absorción intestinal Rentel y col (46) detectaron la capacidad del quitosano para promocionar la absorción de la 9-desglicina-8-arginina vasopresina tras su administración en forma de solución en las asas intestinales de la rata. Según los primeros estudios realizados por Artursson y colaboradores (47), el quitosano, incrementó el transporte de un marcador hidrofílico a través

de una monocapa de células intestinales (Caco-2). El incremento observado era dependiente del pH. Esto sugiere que la densidad de carga podría ser un factor importante en el fenómeno estudiado. Pero, además de por el pH, la densidad de carga del quitosano puede ser controlada variando el grado de desacetilación de la molécula, puesto que sólo es la unidad GlcN, la que se encuentra cargada positivamente. Por ello, en los siguientes trabajos, estos autores estudiaron y confirmaron que la composición química (grado de desacetilación) y el peso molecular de los distintos quitosanos es crucial en su efecto sobre la permeabilidad epitelial y toxicidad, usando como modelo epitelial *in vitro*, una monocapa de células intestinales de carcinoma humano (Caco-2) (5, 48). Algunos de los quitosanos ensayados incrementaron la cantidad de manitol absorbida hasta en 15 veces con respecto al grupo control (5). También los citados autores comprobaron que el efecto promotor de este polímero es concentración y tiempo-dependiente. Sin embargo, a partir de aquí, existe una gran controversia en torno a cual es el idóneo. Investigaciones posteriores han ido identificando nuevos derivados del quitosano como el glutamato de quitosano (49), clorhidrato de quitosano (49) o el clorato de N-trimetil quitosano (50), siendo éstos iguales o más efectivos que los primeros derivados acetilados, pero mucho más solubles, lo que hace más fácil su incorporación a formas farmacéuticas en forma de polvo (49, 50).

El mecanismo de acción del quitosano en el incremento del transporte de moléculas a través de membranas mucosas está siendo estudiado por distintos grupos de investigación, y todos ellos parecen coincidir en que es una combinación de su efecto mucoadhesivo y de la capacidad de dilatar las uniones intercelulares o uniones estrechas (*tight junction* en terminología anglosajona) (48). En el estudio realizado por Dodane y col. (51) se confirmó que el incremento de la permeabilidad celular a nivel intestinal provocado por el quitosano venía acompañado de una afectación de las uniones estrechas. La disminución de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de la línea celular se relacionó con el aumento del flujo por vía paracelular. Mediante microscopía confocal laser se visualizó que el quitosano interacciona con la F-actina, ocludina y ZO-1, proteínas implicadas en la regulación del flujo por vía paracelular (52, 53). En conclusión, se ha comprobado que el quitosano, posiblemente debido a su carga positiva, es capaz de interactuar con el mecanismo de apertura de las uniones estrechas por inhibición de las proteínas ZO-1

y el cambio en el citoesqueleto de la F-actina, que pasa de forma filamentosa a forma globular (47, 48, 51).

### Terapia antitumoral

Las distintas propiedades que se han ido conociendo a nivel de la tecnología farmacéutica de los distintos polímeros de quitosano, han conducido a su estudio y aplicación en la mejora de las terapias antitumorales. Ouchi y col. (54) conjugaron el quitosano y el quitosaminoligosacárido (COS) con el 5-fluorouracilo (5FU), con el fin de obtener un profármaco de gran actividad antitumoral pero con efectos adversos reducidos. Los estudios *in vivo* demostraron que el complejo quitosan-5FU presentaba un excepcional comportamiento frente a la leucemia linfocítica en ratones. Además, quitosan-5FU y COS-5FU mostraron un remarcado efecto inhibitor del crecimiento fibrosarcoma tipo Met-A y hepatoma tipo MH-134Y.

La formulación de microesferas de quitosano y otros polímeros, también ha alcanzado al campo de la terapia del cáncer. Así, Jameela y col (32) prepararon unas microesferas de quitosano y glutaraldehído que contenían un conocido fármaco antitumoral, la mitoxantrona. Su actividad farmacológica, fue evaluada frente al carcinoma ascítico de Ehrlich tras administración intraperitoneal. Los animales que recibieron 2 mg de mitoxantrona libre tras inyección intraperitoneal sobrevivieron una media de 21 días, mientras que los que recibieron 2 mg del fármaco en forma de microesferas vivieron una media de 50 días. Cinco de los ocho animales tratados, llegaron a los 60 días de supervivencia. Estos resultados, muestran el potencial uso de este complejo para la liberación sostenida de este tipo de moléculas, con el fin de minimizar su toxicidad y mejorar su eficacia terapéutica. Recientemente, Kamiyama y col. (55) estudiaron la viabilidad del N-succinilquitosano y el glicol-quitosano como vehículos para la administración de preparados antitumorales. Tras la administración intravenosa de ambos preparados en ratón sano y enfermo, comprobaron que el N-succinilquitosano puede ser un excepcional candidato para futuras formulaciones debido a la elevada retención sistémica y acumulación en la región tumoral mostrada.

### Terapia génica

Para el correcto transporte y transferencia de genes *in vivo*, se requiere una correcta condensación del plásmido, protección frente a las nucleasas, interacción celular, internalización del plásmido, protección frente a endosomas y

C  
S  
C  
N  
E  
D  
I  
A  
J  
C  
T  
A  
S  
I  
C  
I  
O  
R  
M  
E  
C  
A  
P  
L  
I  
C  
O  
M  
C  
U  
N  
P  
L  
A  
N  
F  
I  
E  
S  
T  
B  
I  
L  
I  
D  
A  
E  
X  
C  
E  
L  
E  
N  
T  
E  
F  
O  
R  
M  
U

\* Bec  
rio c  
\*\* Bec,  
terio  
\*\* Profe  
gía f  
de V

cebido:  
eptado:

entrada en el núcleo (56). Por todo esto, una de las limitaciones de este tipo de terapia es la elección del vehículo adecuado. Actualmente, los sistemas de transporte y liberación no virales están siendo los más propuestos, por su seguridad, estabilidad y capacidad para ser producidos en grandes cantidades (57). Entre estos sistemas, destacan los compuestos por proteínas, lípidos y liposomas catiónicos, polipéptidos de elevado peso molecular o nuevos polímeros sintéticos (58). Se han obtenido resultados prometedores en la formación de complejos de quitosano y DNA (58-61). Por ejemplo, Richardson y col. (61) estudiaron la efectividad de diversos quitosanos de diferente peso molecular. Aunque todos ellos presentaron escasa toxicidad, y capacidad de complementar el DNA y protegerlo de la degradación de las nucleasas, fueron los polímeros de bajo peso molecular los que presentaron una nula acumulación en el hígado tras su administración intravenosa. Por tanto, el quitosano de bajo peso molecular parece un candidato ideal como vehículo para la administración génica. Todos los resultados obtenidos sugieren que los quitosanos presentan una eficacia comparable a la de otros vectores sintéticos, pero claramente muestran una toxicidad inferior.

### Quitosano y vacunas

Las distintas propiedades de los polímeros de quitosano han conducido a diferentes grupos de investigadores a ensayar su aplicabilidad como vehículo en la administración de vacunas. Jameela y col. (29) prepararon unas microesferas de quitosano en las que se incluyó el toxoide de la difteria. Estudios preliminares de inmunogenicidad en ratas utilizando dichas microesferas, demostraron la presencia relativamente constante del anticuerpo durante un período de unos cinco meses. Tras un efecto intenso al comienzo, posteriormente se observó una relación lineal entre la cantidad liberada y el tiempo. Protegiendo las microesferas con parafina líquida o un polímero de ácido láctico, ese efecto inicial más pronunciado fue controlado y amortiguado. Estudios histológicos del tejido muscular donde se administraron las microesferas de quitosano, mostraron una biocompatibilidad total. La biodegradación aún no se había completado a los seis meses, demostrando el potencial uso de las microesferas de quitosano como vehículo para este tipo de sustancias. Estudios posteriores realizados por Calvo y col (63) han confirmado los resultados anteriores. Este último grupo investigador preparó nanopartículas de quitosano nativo y de quitosano con un copolímero de óxido de etile-

no y óxido de propileno, en el que se incluyeron el toxoide del tétanos y el de la difteria. En todos los casos se demostró la idoneidad de este polímero para la liberación controlada de vacunas.

También se ha demostrado que el quitosano es capaz de mejorar la respuesta inmunológica de vacunas administradas a través de mucosas como la vía nasal. Jabbal-Gill y col. (64) demostraron que la vacuna para la Bordetella Pertussis, compuesta por filamentos de hemaglutinina de la bacteria y el toxoide recombinante PT-9K/129G, administrada por vía nasal en combinación con el quitosano, provee unos niveles de IgG en plasma similares a los obtenidos tras administración intraperitoneal. Resultados similares se han obtenido tras la administración nasal de la vacuna de la gripe (H. Influenzae) con quitosano, comparada con su administración por vía subcutánea (65). Los últimos éxitos en formulación de vacunas con quitosano para su administración nasal, han sido los logrados por McNeela y col. (66) para la vacuna de la difteria.

### Quitosanos en terapias de transplante celular

Una alternativa terapéutica para la diabetes mellitus tipo I es el transplante de islotes de Langerhans. Para ello, es necesario el empleo de membranas semipermeables y biocompatibles para su encapsulamiento (67-69). Sin embargo, los estudios al respecto no fueron del todo exitosos por el rechazo sufrido debido a la excesiva permeabilidad de la membrana, que permitió la infiltración de fibroblastos (67) (69). Descartado el empleo de inmunosupresores debido a sus reacciones adversas, se procedió a la búsqueda de una membrana que reuniera las características apropiadas. Además de ser biocompatibles, las cápsulas deben presentar una elevada área superficial, ser estables desde el punto de vista mecánico, ser inmunoprotectoras, permitir la correcta oxigenación de la célula y el flujo adecuado de insulina (70). En 1999 Soon-Shiong sintetizó microcápsulas de alginato y polilisina cargadas con los islotes pancreáticos. Tras su administración intraperitoneal en la rata, se detectaron niveles de insulina secretada por las células transplantadas 24 horas después de la administración y continuaron liberando durante más de 58 meses. Estudios posteriores, como el realizado por Sakai y col. (71) o Chandy y col. (72) han utilizado membranas de quitosano-alginato o con diversas modificaciones como la adición de polietilenglicol (PEG), carbodimida (EDC) o glutaraldehído (GA), obteniendo resultados



muy satisfactorios y esperanzadores para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I, o incluso para el de las insuficiencias hepáticas mediante el transplante de hepatocitos.

### Seguridad y toxicidad del quitosano

Durante el año 1998 el quitosano fue aprobado como aditivo alimentario en países como Japón, Finlandia e Italia. Además en ese mismo año, se comenzó a tramitar su inclusión en la Farmacopea Europea. En muchos estudios realizados con el quitosano, además de evaluar alguna propiedad del polímero se ha evaluado su biocompatibilidad con los distintos tejidos así como la integridad de las membranas que han estado en contacto con él, tal y como se ha ido reseñando a lo largo de la revisión. Además, se han realizado una gran variedad de ensayos para determinar su toxicidad y perfil de seguridad que incluyen estudios de su efecto sobre la frecuencia de batido de la mucosa ciliar tras 28 días de aplicación (73), sobre la tasa de aclaramiento mucociliar en el paladar de rana (74) y tejido nasal humano (75), así como el efecto sobre la membrana nasal de la rata (76). En todos los casos la toxicidad fue insignificante. Aspden y col. (75) evaluaron la tasa de aclaramiento mucociliar en humanos valorando el aclaramiento de una molécula modelo. Tras una aplicación nasal diaria durante 7 días de quitosano, el valor del aclaramiento de sacarina permaneció inalterado.

La viabilidad de la célula se ha estudiado en múltiples trabajos. La liberación de lactatodeshidrogenasa (LDH) (enzima intracelular) desde el tejido perfundido al perfusato no aumentó en ningún estudio (5, 77), señal inequívoca de ausencia de sufrimiento celular importante en presencia de quitosano.

Según otros autores la adición de quitosano al 0.5% durante 60 minutos no afectó a la viabilidad celular tal y como mostró la prueba de exclusión del azul de tripano (51).

Mediante estudios morfológicos realizados con microscopía confocal laser de barrido y microscopía de transmisión electrónica se detectaron ligeras variaciones estructurales de escasa importancia a nivel de la mucosa intestinal. Aunque se observaron discontinuidades en un escaso número de microvellosidades intestinales y pequeñas estructuras vesiculosas, las uniones intercelulares aparecían totalmente normales y no se observaron discontinuidades en la membrana celular (5).

Según Arai y col. (78), la DL50 del quitosano tras administración por vía oral en ratones, se sitúa en torno a 16 g/kg.

### Conclusiones

A lo largo de esta revisión, se ha tratado de plasmar de forma somera la gran diversidad de aplicaciones que puede presentar un polímero como el quitosano para la industria farmacéutica. Como excipiente farmacéutico, puede ser empleado para la compresión directa de fármacos, como aglutinante, como disgregante, para la producción de formas sólidas de liberación controlada, o incrementar la biodisponibilidad de muchas moléculas administradas por vías muy diversas. Por tanto, el quitosano parece ser que presenta muchas de las propiedades de los excipientes clásicos, sin embargo, en muchas ocasiones su nivel de toxicidad es menor. La posibilidad de emplear el quitosano en la fabricación de microesferas y microcápsulas ha abierto un campo de innumerables posibilidades en la investigación de formas de liberación sostenida. Posibilidad que ha repercutido en formas tan innovadoras como implantes, capaces de liberar hormonas durante largos períodos de tiempo, o transplantes de hepatocitos o islotes pancreáticos. Entre las últimas propiedades descubiertas atribuidas al quitosano, destaca su capacidad para promover la absorción de pequeñas moléculas polares como péptidos y proteínas a través de determinadas membranas mucosas, especialmente mucosa nasal e intestinal. Todas estas propiedades, junto a su baja toxicidad y buena biocompatibilidad hacen del quitosano un excelente excipiente para la industria farmacéutica y excepcional candidato para futuras formulaciones.

---

#### Correspondencia:

A. Polache Vengut  
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica  
Facultad de Farmacia  
Universitat de València  
Avd. Vicente Andrés Estellés, s/n  
E-46100 Burjassot (Valencia)  
E-mail: ana.polache@uv.es



## Bibliografía

- 1 Dodane V, Vilivalam VD: Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Tech Today* 1998; 1 (6): 246-253.
- 2 Thanou M, Nihot MT, Jansen M y cols: Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo. *J Pharm Sci* 2001; 90 (1): 38-46.
- 3 Thanou M, Verhoef JC, Marbach P y cols: Intestinal absorption of octreotide: N-trimethyl chitosan chloride (TMC) ameliorates the permeability and absorption properties of the somatostatin analogue in vitro and in vivo. *J Pharm Sci* 2000; 89 (7): 951-7.
- 4 Thanou M, Kotze AF, Scharringhausen T y cols: Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal caco-2 cell monolayers. *J Control Release* 2000; 64 (1-3): 15-25.
- 5 Schipper NG, Varum KM, Artursson P: Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (caco-2) cells. *Pharm Res* 1996; 13 (11): 1686-92.
- 6 Errington N, Harding SE, Varum KM y cols: Hydrodynamic characterisation of chitosan varying in molecular weight and degree of acetylation. *Int J Biol Macromol* 1993; 15: 1117-23.
- 7 Sandford PA, Hutchings GP: Chitosan, a natural cationic biopolymer. In *Industrial polysaccharides: Genetics engineering, structure/properties relations and applications*. Yalpani M (Ed). Elsevier Science BV, Amsterdam 1987; 363-376.
- 8 Imeri AG, Knorr D: Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. *J Food Sci* 1988; 53: 1707-1710.
- 9 Mitani T, Nakalima C, Sungkano E y cols: Effects of ionic strength on the adsorption of heavy metals by swollen chitosan beads. *J Environ Sci* 1995; 30: 669-674.
- 10 Lang G, Clausen T. In *Chitin and Chitosan sources. Chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. Skjak-Braek G, Anthonsen T and Sandford P (Eds). Elsevier Science, London 1989: 139-147.
- 11 Ashford NA, Hattis DB, Murray AE. *MIT sea Grant Program*. Massachusetts Institute of Technology, 1977.
- 12 Illum L: Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res* 1998; 15: 1326-31.
- 13 Sugano M, Fujikawa T, Hiratsuji Y y cols: A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 787-793.
- 14 Dutkiewicz J, Kucharska M. *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier Sciences, 1992: 54-60.
- 15 Seo H, Mitsuhashi K, Tanibe H. *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier Sciences, 1992: 34-40.
- 16 Muzzarelli R, Biagini G, Pugnali A y cols: Reconstruction of parodontal tissue with chitosan. *Biomaterials* 1989; 10: 598-603.
- 17 Lehr CM, Bouwstra JA, Schacht EH y cols: In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm* 1992; 78: 43-48.
- 18 Guputa PK, Leung S, Robinson JR. In *Bioadhesive drug delivery systems*. Lenaerts V and Gummy R (Eds). CRC Press 1990: 65-92.
- 19 Nagai T, Sawayanagi Y, Nambu N. Application of chitin and chitosan to pharmaceutical preparations. In *Chitin, chitosan and related enzymes*. Zikakis JP (Ed), Academic Press Inc, 1984: 21-40.
- 20 Acarturk F: Preparation of a prolonged-release tablet formulation of diclofenac sodium. Part 1: Using chitosan. *Pharmazie* 1989; 44 (8): 547-9.
- 21 Sabnis S, Rege P, Block LH: Use of chitosan in compressed tablets of diclofenac sodium: inhibition of drug release in an acidic environment. *Pharm Dev Technol* 1997; 2(3): 243-255.
- 22 Nigalaye AG, Adusumilli P, Bolton S: Investigation of prolonged drug release from matrix formulations of chitosan. *Drug Devel Ind Pharm* 1990; 16: 449-467.
- 23 Miyazaki T, Komuro T, Yomota C y cols: Usage of chitosan as a pharmaceutical material: effectiveness as an additional additives of sodium alginate. *Eisei Shikenjo Hokoku* 1990; 108: 95-97.
- 24 Yomota C, Miyazaki T, Okada S: Sustained-release effect of the direct compressed tablet based on chitosan and sodium alginate. *Yakugaku Zasshi* 1994; 114 (4): 257-63.
- 25 Akbuga J: The effect of physicochemical properties of a drug on its release from chitosan maleate tablets. *Int J Pharm* 1993; 100: 257-261.
- 26 Tozaki H, Fujita T, Odoriba T y cols: Validation of a pharmacokinetic model of a colon-specific drug delivery and the therapeutic effects of chitosan capsules containing 5-aminosalicylic acid on 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis in rats. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 1107-12.
- 27 Tozaki H, Komoike C, Tada C y cols: Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: improvement of insulin absorption from the rat colon. *J Pharm Sci* 1997; 86: 1016-1021.
- 28 Onishi H, Machida Y: Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* 1999; 20(2): 175-82.
- 29 Jameela SR, Misra A, Jayakrishnan: Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs. *J Biomater Sci Polym Ed* 1994; 6(7): 621-632.
- 30 Patashnik S, Rabinovich L, Golomb G: Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing bisphosphonates. *J Drug Target* 1997; 4(6): 371-80.
- 31 Jameela SR, Kumary TV, Lal AV y cols: Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. *J Control Release* 1998; 52 (1-2): 17-24.
- 32 Jameela SR, Latha PG, Subramoniam A y cols: Antitumor activity of mitoxantrone-loaded chitosan microspheres against Ehrlich ascites carcinoma. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48(7): 685-8.
- 33 Kamiyama K, Onishi H, Machida Y: Biodisposition characteristics of N-succinyl-chitosan and glycol-chitosan in normal and tumor-bearing mice. *Biol Pharm Bull* 1999; 22: 179-86.
- 34 Bourlais CL, Acar L, Zia H, y cols: Ophthalmic drug delivery systems. Recent advances. *Prog Retin Eye Res* 1998; 17: 33-58.
- 35 Genta I, Conti B, Perugini P, y cols: Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 737-742.
- 36 Calvo P, Alonso MJ, Vila-Jato JL y cols: Improved ocular bioavailability of indomethacin by novel ocular drug carriers. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48(11): 1147-52.
- 37 Torres-Lugo M, Peppas NA: Transmucosal delivery systems for calcitonin: a review. *Biomaterials* 2000; 21: 1191-96.
- 38 Natsume H, Iwata S, Ohtake K y cols: Screening of cationic compounds as an absorption enhancer for nasal drug delivery. *Int J Pharm* 1999; 185(1): 1-12.
- 39 Shao Z, Mitra AK: Nasal membrane and intracellular protein and enzyme release by bile salts and bile salt-fatty acid mixed micelles: correlation with facilitated drug transport. *Pharm Res* 1992; 9(9): 1184-9.

- 40 Shao Z, Krishnamoorthy R, Mitra AK: Cyclodextrins as nasal absorption promoters of insulin: mechanistic evaluations. *Pharm Res* 1992; 9(9):1157-63.
- 41 Illum L, Farraj NF, Davis SS: Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm Res* 1994; 11: 1186-1189.
- 42 Illum L. *Peptide and protein drug delivery*. Frojaer S, Christrup L, Krogsgaard-Larsen (eds.), Copenhagen 1998.
- 43 Tengamnuay P, Sahamethapat A, Sailasuta A y cols: Chitosans as nasal absorption enhancers of peptides: comparison between free amine chitosans and soluble salts. *Int J Pharm* 2000; 197(1-2):53-67
- 44 Senel S, Kremer MJ, Kas S y cols: Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa. *Biomaterials* 2000; 21(20):2067-71.
- 45 Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y: Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 47(1):39-54.
- 46 Rentel CO, Lehr CM, Bouwstra HL y cols: Enhanced peptide absorption by the mucoadhesive polymers polycarboxylic acid and chitosan. *Proceed Intern. Symp. Control Rel Bioact Mater* 1993; 20:446-447.
- 47 Artursson P, Lindmark T, Davis SS y cols: Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res* 1994; 11:1358-1361.
- 48 Schipper NGM, Olsson S, Hoogstraate AG y cols: Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbed drugs 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm Res* 1997; 14: 923-929.
- 49 Kotze AF, Luessen HL, de Boer AG y cols: Chitosan for enhanced intestinal permeability: prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. *Eur J Pharm Sci* 1999; 7(2): 145-151.
- 50 Thanou M, Florea BI, Langemeyer MW y cols: N-trimethylated chitosan chloride (TMC) improves the intestinal permeation of the peptide drug bureselin in vitro (caco-2 cells) and in vivo (rats). *Pharm Res* 2000; 17(1): 27-31.
- 51 Dodane V, Amin Khan M, Merwin JR: Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm* 1999; 182(1): 21-32.
- 52 Meza I, Ibarra G, Sabanero M y cols: Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol* 1980; 87: 746-754.
- 53 Madarra JL, Barenberg D, Carlson S: Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. *J Cell Biol* 1986; 102: 2125-2136.
- 54 Ouchi T, Banba T, Matsumoto T, y cols: Synthesis and antitumor activity of conjugates of 5-fluorouracil and chito-oligosaccharides involving a hexamethylene spacer group and carbamoyl bonds. *Drug Des Deliv* 1990; 6(4): 281-7.
- 55 Kamiyama K, Onishi H, Machida Y: Biodisposition characteristics of N-succinyl-chitosan and glycol-chitosan in normal and tumor-bearing mice. *Biol Pharm Bull* 1999; 22(2): 179-186.
- 56 Mahato RI, Rolland A, Tomlinson E: Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res* 1997; 14(7): 853-859.
- 57 Tomlinson E, Rolland AP: Pharmaceuticals of non-viral gene delivery system. *J Control Release* 1996; 39: 357-372.
- 58 Duguid JG, Li C, Shi M y cols: A physicochemical approach for predicting the effectiveness of peptide-based gene delivery systems for use in plasmid-based gene therapy. *Biophys J* 1998; 74(6): 2802-2814.
- 59 Lee M, Nah JW, Kwon Y, y cols: Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharm Res* 2001; 18(4): 427-431.
- 60 Sato T, Ishii T, Okahata Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials* 2001; 22(15): 2075-2080.
- 61 Richardson SC, Kolbe HV, Duncan R: Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *Int J Pharm* 1999; 178(2): 231-243.
- 62 Erbacher P, Zou S, Bettinger T y cols: Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res* 1998; 15(9): 1332-1339.
- 63 Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL y cols: Chitosan and chitosan/ethylene oxide propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm Res* 1997; 14: 1431-1436.
- 64 Jabbal-Gill I, Fisher AN, Rappuoli R y cols: Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against Bordetella Pertussis filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice. *Vaccine* 1998; 16(20): 2039-2046.
- 65 Bacon A, Makin J, Sizer PJ y cols: Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infect Immun* 2000; 68(10): 5764-5770.
- 66 McNeela EA, O'Connor D, Jabbal-Gill I, y cols: A mucosal vaccine against diphtheria: formulation of cross reacting material (CRM(197)) of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery. *Vaccine* 2000; 19(9-10): 1188-1198.
- 67 Lim F, Sun AM: Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; 210 (4472): 908-910.
- 68 Scharp DW, Swanson CJ, Olack BJ y cols: Protection of encapsulated human islets implanted without immunosuppression in patients with type I or type II diabetes and in nondiabetic control subjects. *Diabetes* 1994; 43(9): 1167-1170.
- 69 Soon-Shiong P, Otterlie M, Skjak-Braek G y cols: An immunologic basis for the fibrotic reaction to implanted microcapsules. *Transplant Proc* 1993; 23(1 Pt 1):758-759.
- 70 Soon-Shiong P: Treatment of type I diabetes using encapsulated islets. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; 35(2-3): 259-270.
- 71 Sakai S, Ono T, Iijima H y cols: Control of molecular weight cut-off for immunoisolation by multilayering glycol chitosan-alginate polyion complex on alginate-based microcapsules. *J Microencapsul* 2000; 17(6): 691-699.
- 72 Chandy T, Mooradian DL, Rao GH: Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation. *Artif Organs* 1999; 23(10): 894-903.
- 73 Aspden T, Illum L, Skaugrud O: The effect of chronic nasal application of chitosan solution on cilia beat frequency in guinea pigs. *Int J Pharm* 1997; 153: 137-146.
- 74 Aspden T, Adler S, Davis SS y cols: Chitosan as a nasal delivery system: Evaluation of the effect of chitosan on mucociliary clearance rate in the frog palate model. *Int J Pharm* 1995; 122: 69-78.
- 75 Aspden T, Mason JDT, Jones N y cols: Chitosan as a nasal delivery system: The effect of chitosan on in vitro and in vivo mucociliary transport rates. *J Pharm Sci* 1997; 86: 509-513.
- 76 Aspden T, Illum L, Skaugrud O: Chitosan as a nasal delivery system: Evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models. *Eur J Pharm Sci* 1996; 4: 23-31.
- 77 Schipper NG, Varum KM, Stenberg P y cols: Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs 3: Influence of enhancement. *Eur J Pharm Sci* 1999; 8(4): 335-343.
- 78 Arai K, Kinumaki T, Fujita T: Toxicity of chitosan. *Bull Tokai Reg Fish Lab* 1968; 43: 89-94.