Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Tesis presentada para acceder a la

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

Opción BIOTECNOLOGÍA

"Desarrollo de micro-vehículos y membranas biocompatibles para la microencapsulación de ADN, proteínas, bioactivos y sustancias de interés en el sector productivo"

Álvaro Daniel Olivera Martínez

Laboratorio de Biotecnología -
Centro de Investigaciones Nucleares (CIN)
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Laboratorio de Bioprocesos -
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU)

Orientador:

Dra. Mary Lopretti
CIN-LATU

Montevideo – Uruguay

Setiembre de 2011

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a quienes de una u otra forma colaboraron conmigo en la realización de este trabajo:

-A la Dra. Mary Lopretti por aceptarme como orientadora de tesis.

-Al Dr. Juan Claudio Benech del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable por acceder a la corrección de este trabajo

-A la Dra. Filomena Barreiro del Instituto Politécnico de Bragança – Portugal.

-A la Dra. Ana De Nicola del laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias –UdelaR.

-Al Dr. Eduardo Méndez y Lic. Santiago Botasini, Laboratorio de Biomateriales de la Facultad de Ciencias -UdelaR .

-A la Dra. Cristina Arruti, M.Sc. Andrea Toledo y Lic. Daniel Prieto, Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias –UdelaR.

-A la Dra. Anabel Fernández y M.Sc. Santiago Ruiz de la Unidad de Microscopía Confocal del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

-Al Dr. Wilner Martínez del Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo (SECIF) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

-Al Dr. Vicente Garibay del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Ultra Alta Resolución del Instituto Mexicano del Petróleo

-A mis AMIGOS y FAMILIA.

Dedicado a Yaya…

Indice

-Resumen 8

-Introducción 9

-Microesferas de quitosano como vehículo de fármacos y profármacos 9

-Microesferas de quitosano como vehículos para ADN 11

-Inmovilización de enzimas en esferas y films de quitosano 12

-Aplicación de quitosano en el diseño de probióticos para industria alimenticia 13

-Empleo de membranas de quitosano como soporte para crecimiento de células y reparación de tejidos..... 14

-Empleo de esferas de quitosano en métodos analíticos para la separación y preconcentración de analitos a niveles de trazas y ultratrazas 14

-Aplicaciones en el agro, en la industria alimenticia y textil, de microesferas, films y soluciones de quitosano. Mecanismos de acción biocida 14

-Estructura química de los polímeros quitina y quitosano 17

-Diferentes métodos de fabricación de microesferas 18

-Preparación de microesferas por Entrecruzamiento Térmico 18

-Preparación de microesferas por Entrecruzamiento con Glutaraldehído 19

-Preparación de microesferas por Entrecruzamiento con Tripolifosfato 19

-Preparación de microesferas por Emulsión y Gelación Ionotrópica con NaOH 19

-Preparación de microesferas mediante Secado por Aspersión y Entrecruzamiento con aldehídos 19

-Preparación de microesferas por Inversión de Fase Húmeda 20

-Preparación de microesferas por Coacervación 20

-Fundamentación del método seleccionado para este trabajo 20

-Fisicoquímica de interfases y emulsiones 26

-Tensión superficial 26

-Interfases 26

-Emulsiones 27

-Objetivos generales 29

-Cuadro de objetivos específicos e indicadores de éxito 29

-Materiales y métodos 30

1. Estudio del comportamiento del sistema de microencapsulación

-Producción de microesferas para estudios del sistema 30

-Preparación de la fase dispersa 30

-Preparación de la fase continua 30

-Producción de microesferas de quitosano 30

Protocolo 1 30

Lavado y cosecha de las microesferas 30

-Producción de membranas de quitosano 30

2. Microencapsulación de componentes prototipo para ensayos de liberación y tratamiento en medio ácido

-Procedimiento de marcación de la BSA con FITC 31

-Producción de nanopartículas de plata 31

-Producción de microesferas para ensayos de liberación y tratamiento en medio ácido 31

-Encapsulación de sustancias de interés biológico e industrial 31

-Procedimiento para la microencapsulación de ADN 31

-Procedimiento para la microencapsulación de una sustancia aromática 32

-Procedimiento para la microencapsulación de proteínas 32

-Procedimiento para la funcionalización de una membrana con nanopartículas de plata 32

-Ensayos de liberación 32

-Pruebas de resistencia en medio ácido 32

3.Técnicas de evaluación de los resultados obtenidos 33

-Microscopía óptica 33

-Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) 33

-Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución 33

-Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) 33

-Citometría del Flujo 34

-Microscopía Confocal de Barrido LASER (CLSM) 34

-Resultados y Discusión 35

-Microscopía óptica 35

-Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) 35

-Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución 40

-Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) 43

-Citometría del Flujo 45

-Microscopía Confocal de Barrido LASER (CLSM) 46

- Ensayos de liberación 49

-Cálculos de concentraciones en los ensayos de liberación de ADN 49

-Perfil de liberación del ADN microencapsulado 51

-Cálculos de concentraciones en los ensayos de liberación de BSA 52

-Perfil de liberación de la BSA microencapsulada 53

-Velocidad de liberación de ADN 54

-Velocidad de liberación de BSA 55

-Pruebas de resistencia en medio ácido 56

-Membranas de soporte 58

-Conclusión 60

-Referencias bibiográficas 61

RESUMEN

El quitosano o β-1,4-D-glucosamina, es un biopolímero policatiónico soluble en medio ácido. Se destaca por ser biocompatible, biodegradable, por su adsorbilidad , por su potencial bactericida y virucida. Esto lo ha llevado a ser objeto de estudio para diversas aplicaciones en la industria biomédica y alimenticia.

Este trabajo se basó en la experimentación y puesta a punto, de técnicas que permitieron desarrollar microesferas como *carriers* o vehículos para la entrega localizada y descarga controlada de fármacos y ADN, la microencapsulación de componentes de interés para uso industrial, además de films transparentes de quitosano como soporte para su empleo en la inmovilización de bioactivos. Una vez obtenidas las distintas configuraciones, aplicamos dichas técnicas a la microencapsulación de seroalbúmina bovina (BSA), ADN y compuestos aromáticos, así también se emplearon films como soporte para nanopartículas de plata y cultivos celulares, teniendo como meta el desarrollo aplicable de esta tecnología para la inserción de los sistemas en el sector productivo. La metodología y técnicas de análisis, nos permitieron estudiar la distribución del componente microencapsulado en estos sistemas y determinar la cinética de descarga.

Introducción

El quitosano o β-1-4 2-amino-2-deoxi-D-glucosa o D-glucosamina es un polisacárido con excelentes propiedades biológicas. Este biopolímero policatiónico es obtenido por desacetilación química de la quitina (principal componente del exoesqueleto de crustáceos e insectos) y es el segundo polisacárido más abundante en nuestro planeta después de la celulosa (P. Kumar et al., 2004). Se encuentra también como componente de la pared celular de hongos Cigomicetes, donde es sintetizado por acción de la quitina desacetilasa, convirtiendo los resíduos N-acetilglucosamina de la cadena, en resíduos glucosamina.

La carga positiva que se produce en medio ácido, como resultado de la protonación del grupo amino presente en cada unidad glucosamina, le confiere solubilidad en medio acuoso y una de las propiedades más destacables, actividad biocida frente a diversos microorganismos (C. Lárez Velásquez, 2008). Por su excelente biocompatibilidad, capacidad de absorción, potencial bactericida y virucida (S.N. Chirkov, 2002), el quitosano encuentra diversas aplicaciones en el área biomédica, como piel artificial en la sanación de heridas (J. Berger et al., 2004), soporte para la restauración de tejidos (T. Majima et al., 2007), o como vehículo para la descarga sostenida y controlada de fármacos (Y. Kato et al., 2003). Debido a su naturaleza catiónica y gracias a su compatibilidad con sistemas bilógicos, se convierte en una matriz de soporte apropiada para cultivos celulares (M. Zhang et al., 2002). Presenta la capacidad de abrir las "uniones ocluyentes" de tejidos epiteliales facilitando la penetración de sustancias (J. Berger et al., 2004), promoviendo su aplicación en la industria cosmética y farmacéutica. Encuentra también un importante desarrollo de aplicaciones a nivel agroindustrial (C. Lárez Velásquez, 2008), donde se destaca la liberación de factores de crecimiento y fertilizantes, como alternativa natural al uso de pesticidas de síntesis química, así como en el tratamiento post-cosecha de distintas hortalizas, donde es imprescindible extender los períodos de conservación de las mismas durante su almacenaje y transporte. Otra de las propiedades más destacables del quitosano es que se degrada biológicamente, siendo metabolizado enzimáticamente en humanos, principalmente por acción de lisozimas (J. Berger et al., 2004).

Por sus diversas aplicaciones en biotecnología, desarrollamos y estudiamos en este trabajo, algunas de las distintas configuraciones de este biopolímero fundamentadas a continuación.

Microesferas de quitosano como vehículo de fármacos y profármacos (Disponible en http://connection.lww.com/products/sinko/documents/pdf/22.pdf)**:**

Desde finales de los años 70 se han desarrollado investigaciones en la fabricación de micropartículas poliméricas como una alternativa al uso de los liposomas como vehículo para fármacos, debido a que estos últimos presentan problemas de inestabilidad de los fármacos encapsulados, así como una rápida "pérdida" de la droga durante el transporte y una pobre estabilidad durante el período de almacenaje (E. Allémann et al., 1993). Estos *carriers* poliméricos pueden contener varios componentes activos para beneficiar la entrega, la retención en el organismo, o incrementar la eficacia del tratamiento suprimiendo los mecanismos sistémicos o celulares que pueden limitar la respuesta terapéutica a la droga. Un profármaco, es el precursor inactivo de una droga que se mantiene de esta forma durante la entrega a través de distintos compartimientos biológicos hasta alcanzar el sitio de acción. La reconversión del profármaco a su forma activa ocurre una vez alcanzado su objetivo, dentro de un órgano específico, tejido, o célula. En la mayoría de los procesos metabólicos normales, la reconversión se lleva a cabo por el clivaje de enlaces éster catalizado por enzimas esterasas.

Existen dos clases de profármacos generalmente utilizados, los de tipo 1 (clásicos), que sufren reconversión a droga activa dentro de la célula y los de tipo 2, que involucran la combinación de dos o más sustancias, las cuales bajo condiciones específicas del medio reaccionan para formar la droga activa. Un tercer tipo de profármaco más avanzado ha sido desarrollado durante las últimas dos décadas, conforman los **sistemas de entrega y descarga controlada**, una formulación o dispositivo que lleva "a salvo" un agente terapéutico, para alcanzar una concentración efectiva en el sitio de acción específico. Son utilizados para cargar, distribuir o transportar componentes y/o fármacos dentro o a través del organismo, orientados a un órgano, tejido, células, organelos intracelulares o moléculas, y/o programar un perfil de descarga del componente microencapsulado. Generalmente incluyen tres componentes: a) una droga, b) una unidad de guía y c) un transportador. La droga es el componente activo que proporciona tratamiento. El transportador une los componentes del sistema alterando propiedades fisicoquímicas como la solubilidad de todo el complejo. La unidad de guía/penetración dirige la entrega y puede incrementar la internalización del componente activo dentro de las células blanco, mejorando la actividad específica de la droga al tiempo que marca un decremento de los efectos adversos sobre los tejidos sanos. La unión a este vehículo puede permanecer estable durante el transporte hacia el sitio de acción. Las principales ventajas de esta tecnología se deben a que las condiciones de descarga de la droga pueden ser controladas de manera muy precisa mediante cambios en los enlaces químicos o propiedades físicas, la unidad de guía puede ser diseñada según especificaciones concretas, y otros componentes funcionales pueden ser enviados dentro del mismo "carrier".

Como podemos encontrar en la literatura (Tabla 1), el quitosano se ha utilizado con éxito en la microencapsulación de distintos fármacos para diferentes aplicaciones terapéuticas (S. A. Agnihotri et al., 2004), utilizando también diversas vías de administración, nasal, inyectable, oral, intratumoral o aplicación superficial (S. K. Jain et al., 2004) (H. Thakkar et al., 2004) (V.R. Sinha et al., 2004) (A. Berthold et al., 1996) (H. Tokumitsu et al., 2000 en: Y. Kato et al., 2003).

Tabla 1 (en S.A. Agnihotri et al., 2004)

Chitosan-based drug delivery systems prepared by different methods for various kinds of drugs

Type of system	Method of preparation	Drug
Tablets	matrix	diclofenac sodium, pentoxyphylline, salicylic acid, theophylline
	coating	propranolol HCl
Capsules	capsule shell	insulin, 5-amino salicylic acid
Microspheres/Microparticles	emulsion cross-linking	theophylline, cisplatin, pentazocine, phenobarbitone, theophylline, insulin, 5-fluorouracil, diclofenac sodium, griseofulvin, aspirin, diphtheria toxoid, pamidronate, suberoylbisphosphonate, mitoxantrone, progesterone
	coacervation/precipitation	prednisolone, interleukin-2, propranolol-HCl
	spray-drying	cimetidine, famotidine, nizatidine, vitamin D-2, diclofenac sodium, ketoprofen, metoclopramide-HCl, bovine serum albumin, ampicillin, cetylpyridinium chloride, oxytetracycline, betamethasone
	ionic gelation	felodipine
	sieving method	clozapine
Nanoparticles	emulsion-droplet coalescence	gadopentetic acid
	coacervation/precipitation	DNA, doxorubicin
	ionic gelation	insulin, ricin, bovine serum albumin, cyclosporin A
	reverse micellar method	doxorubicin
Beads	coacervation/precipitation	adriamycin, nifedipine, bovine serum albumin, salbutamol sulfate, lidocaine–HCl, riboflavin
Films	solution casting	isosorbide dinitrate, chlorhexidine gluconate, trypsin, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, acyclovir, riboflavine, testosterone, progesterone, beta-oestradiol
Gel	cross-linking	chlorpheniramine maleate, aspirin, theophylline, caffeine, lidocaine–HCl, hydrocortisone acetate, 5-fluorouracil

Microesferas de quitosano como vehículos para ADN (A. K. Pannier & L. D. Shea , 2004)

Los sistemas de "descarga controlada" para fármacos y proteínas de bajo peso molecular se han convertido en una industria multibillonaria, mostrando ventajas potenciales las cuales incluyen: i) mantener los niveles del fármaco dentro de un rango deseable, ii) "entrega localizada" en un tejido o tipo celular blanco reduciendo efectos colaterales adversos, iii) disminución en gramos de dosis y/o el número de dosis iv) facilitar la entrega de compuestos frágiles, por ejemplo aquellos con tiempos de vida media comprometidos. La alternativa de esta tecnología a la administración de vectores virales, tiene la capacidad de superar las barreras extracelulares que limitan la terapia génica. La descarga controlada puede mantener concentraciones elevadas de ADN en el microambiente celular mejorando la efectividad terapéutica. Aunque los vectores virales son utilizados para estos fines, existen riesgos concernientes a la seguridad en su empleo, como la recombinación aleatoria y la inmunogenicidad, encontrando trabas frente a las normas que rigen su utilización en la industria farmacéutica. Si bien existen otros vectores no virales como la poli-L-lisina, estos sistemas descargan su contenido de forma concertada, lo que resulta en períodos cortos de expresión génica y la necesidad de repetir la administración del fármaco (C. Aral & J. Akbuga, 2003). Se ha reportado que plásmidos

microencapsulados en quitosano, inducen una muy alta actividad proteica durante períodos de 12 semanas post transfección (Y. Kato et al., 2003).
La entrega localizada de vectores en sitios específicos evita la distribución indeseada en tejidos distantes, la que puede inducir una expresión génica ectópica y presentar toxicidad para células no diana, provocando una marcada respuesta inmune.
Los sistemas que emplean biomateriales poliméricos para entregar su carga utilizan dos mecanismos generales: i) Descarga polimérica, en la cual el ADN es descargado desde el polímero ii) entrega mediada por sustrato, en la cual el ADN es retenido en la superficie. En el primer caso, el ADN es atrapado dentro del polímero y descargado en el microambiente, como una combinación entre desorción, difusión y degradación del polímero. Esta modalidad favorece la transferencia de genes protegiendo al ADN de la degradación y manteniendo valores de concentración efectivos, incrementando la oportunidad de ser internalizado. La descarga de ADN en el tejido puede ocurrir rápidamente, extenderse durante días o aún durante meses. La entrega mediada por sustrato, implica la inmovilización del ADN al biopolímero y la matriz extracelular, la cual funciona como soporte para la adhesión y la migración celular. Esto posiciona al ADN directamente en el microambiente celular, concentrándolo en el sitio de descarga donde es captado por las células que se encuentran adheridas al sustrato. Este ADN es internalizado directamente desde la superficie o mediante la degradación del enlace entre el vector y el material. La moléculas de ADN o ARN negativamente cargadas, potencialmente acomplejados con proteínas, polímeros o lípidos catiónicos, interactúan con los biomateriales poliméricos a través de mecanismos no específicos, incluyendo interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y Van Der Waals. Estas interacciones han sido bien caracterizadas para la adsorción y descarga de proteínas desde sistemas poliméricos.
Alternativamente, pueden introducirse interacciones específicas a través de grupos funcionales complementarios, tales como antígeno-anticuerpo o biotina-avidina, que permiten controlar la unión del vector al sustrato.
En la terapia con ácidos nucleicos, existen numerosos ensayos clínicos para una variedad de desordenes genéticos que asocian distintas patologías. La mayoría de estos ensayos no muestran eficacia terapéutica significativa debido a la baja tasa de transfección obtenida al inyectar ácidos nucleicos "desnudos", pérdida de estabilidad en la expresión génica, acción del sistema inmune, o la expresión de otro gen desde el vector o las células. Los complejos polielectrolito formados por el ADN cargado negativamente y el quitosano, le brindan protección a los ácidos nucleicos frente a la degradación por nucleasas, lo que se traduce en una mayor eficiencia de transfección (S. A. Agnihotri et al., 2004).
Los sistemas de entrega de genes basados en polímeros, pueden mejorar la entrega de estas macromoléculas y extender la expresión del transgene para sintetizar cantidad suficiente de proteína que actuará en forma local o sistémica (W. Lai & M. Chia-Mi Lin , 2009).

Inmovilización de enzimas en esferas y films de quitosano (S. A. Çetinus et al., 2003)

La aplicación de enzimas en su forma nativa en áreas como biomedicina, biotecnología e industria alimenticia, es un campo que aún no se ha optimizado comercialmente.
La unión de enzimas sobre un soporte sólido es una ventajosa modificación a este tipo de aplicaciones. Las enzimas son inmovilizadas encima o dentro de una matriz sólida, la cual incrementa su termoestabilidad, brinda estabilidad operacional, y asegura su recuperación. Otros beneficios asociados son, el control operacional, la flexibilidad en el diseño de reactores, y la fácil recuperación del producto sin contaminación con el catalizador. El quitosano sirve como "carrier" para enzimas y células

completas, es un producto de muy bajo costo viabilizando su aplicación a escala industrial; es inerte, hidrofílico, biocompatible, y por ende muy atractivo para la inmovilización de macromoléculas.
La inmovilización puede ser llevada a cabo por atrapamiento o por unión covalente mediante sus grupos amino. Un ejemplo de esto es la catalasa inmovilizada, la cual tiene una notable aplicación en la industria alimenticia en la remoción de peróxido de hidrógeno de los alimentos luego de la pasteurización fría, y en el campo analítico, como sistema biosensor de glucosa. La inmovilización de penicilina acilasa extraída de *E. Coli* sobre esferas de quitosano utilizando glutaraldehído, ha mostrado mantener el mismo nivel de actividad luego de 20 semanas (C. B. Patel et al., 2004).

Aplicación de quitosano en el diseño de probióticos para industria alimenticia (W. Krasaekoopt et al., 2006)

Los probióticos son suplementos alimenticios con microorganismos vivos los cuales una vez ingeridos en cierta cantidad, ejercen beneficios a la salud más allá de lo inherente a la nutrición básica y mejoran el balance microbial del hospedador. Entre ellos se destacan, el control de infecciones intestinales, control de los niveles de colesterol en suero, beneficios sobre el sistema inmune, mejoras sobre la utilización de lactosa en personas que son clasificadas como mal digestores de la misma, y posible actividad anticarcinogénica. El yogurt ha sido reconocido como un producto alimenticio de consumo común, mediante el cual los consumidores pueden ingerir un gran número de células probióticas con distintos efectos terapéuticos. El resultado efectivo de la ingesta de un probiótico, está fuertemente influenciado por la habilidad del microorganismo para sobrevivir dentro del hospedador, pero también para sobrevivir dentro del producto durante su almacenamiento. Para desarrollar un efecto benéfico, la cantidad de bacterias probióticas dentro del producto ha sido prescrita como 107 ufc/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro). La protección de los probióticos mediante microencapsulación en esferas de alginato es un método que permite mejorar la viabilidad de los mismos dentro del yogurt. Aunque muchos científicos han reportado el incremento de la supervivencia de microorganismos encapsulados en esferas de alginato "descubiertas", dentro de yogurt procesado con un tratamiento de calor convencional, el uso de alginato es limitado debido a su pobre estabilidad física en presencia de agentes quelantes. Una matriz de alginato expuesta a bajos valores de pH produce una reducción en el peso molecular del alginato causando la rápida degradación y descarga de los ingredientes activos.
Policationes como el quitosano forman fuertes complejos con alginatos, los cuales son estables en presencia de quelantes de Ca2+. Así, cubriendo las esferas de alginato con quitosano se puede mejorar su estabilidad química y mecánica, permitiendo alcanzar el objetivo de la microencapsulación. Este sistema ha sido investigado en Lactobacillus casei, Bifidobacterium bifidum, y L. Acidophilus, dentro de varios sistemas simulados de jugos digestivos y sales biliares. De tres materiales de cobertura estudiados, el quitosano provee la mejor protección para éstas bacterias.

Empleo de membranas de quitosano como soporte para crecimiento de células y reparación de tejidos (M. Zhang et al., 2002)

Varios biomateriales que son clínicamente aplicados, deben poseer excelentes propiedades sobre su superficie. Desde que esta es la primera que entra en contacto con el tejido vivo cuando el biomaterial es implantado en un organismo, la respuesta inicial de éste al biomaterial depende de las propiedades de dicha superficie, incluyendo, la carga y la topografía, así como también de propiedades mecánicas. La

superficie cargada positivamente del quitosano y su biocompatibilidad lo convierten en un soporte adecuado para el cultivo de células.
El quitosano puede ser utilizado como piel artificial para acelerar la curación de heridas y ulceras.
El empleo de mezclas de polímeros como quitosano y polietilenglicol, presenta beneficios en las propiedades mecánicas de éstos soportes. Mezclas de quitosano con ácido hialurónico presentan adecuada biodegradabilidad, biocompatibilidad, y propiedades mecánicas adecuadas al empleo como soporte para la sanación de lesiones en ligamentos y tendones (T. Majima et al., 2007).

Empleo de esferas de quitosano en métodos analíticos para la separación y preconcentración de analitos a niveles de trazas y ultratrazas (A. O. Martins et al., 2004)

El desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la separación y preconcentración de analitos presentes en muestras ambientales a niveles de traza y ultratraza, han despertado el interés de muchos investigadores.
Algunas resinas quelantes tienen grupos funcionales químicamente unidos a matrices poliméricas, las cuales pueden formar quelatos con iones metálicos. La formación de quelatos en fase sólida puede ser afectada por diferentes factores, tales como la actividad química del grupo acomplejante, la naturaleza física de la matriz polimérica, la carga del ión hidratado y el pH de la solución. Resinas con propiedades quelantes pueden ser preparadas por inmovilización de agentes orgánicos acomplejantes y la reacción con una gran variedad de metales iónicos.
El quitosano contiene un alto porcentaje de grupos amino reactivos que favorecen dicha modificación y lo hacen altamente selectivo cuando es modificado con agentes quelantes. La adsorción característica del quitosano se debe a la flexibilidad estructural del polímero, lo cual le permite adoptar una configuración adecuada; además presenta una marcada hidrofilicidad debido a la presencia de grupos hidroxilo.

Aplicaciones en el agro, en la industria alimenticia y textil, de microesferas, films y soluciones de quitosano. Mecanismos de acción biocida (C. Lárez Velásquez, 2008)

La viabilidad comercial de muchos productos del agro, depende no solo de las condiciones adecuadas de cultivo sino también del tiempo de decaimiento post-cosecha de cada producto. La formación de membranas semipermeables muestra un efecto inhibitorio o destructivo (A. El-Ghaouth et al., 2000) para diversos organismos como hongos, levaduras y bacterias.
El quitosano causa cambios morfológicos, alteraciones estructurales y desorganización molecular de las células fúngicas, así como también activa diversos procesos biológicos de defensa en las plantas, por ejemplo los relacionados con actividades enzimáticas que participan en mecanismos tempranos de defensa contra la infección de patógenos (B. Prapagdee et al., 2007) (E. Ait Barka et al,. 2004). Estos mecanismos pueden incluir la producción de quitinasas y glucanasas (Benhamou 1996: en C. Lárez Velásquez 2008), la lignificación en hojas dañadas (Pearce & Ride 1982: en C. Lárez Velásquez 2008) o intactas (Moerschbacher et al. 1986: en C. Lárez Velásquez 2008), la generación de peróxido de hidrógeno (Lee et al. 1999: en C. Lárez Velásquez 2008) o la formación de fitoalexinas en legumbres y plantas solanáceas (Cote & Hahn 1994: en C. Lárez Velásquez 2008).
Se ha descrito su capacidad de destruir microorganismos actuando sobre las paredes celulares, provocando alteraciones estructurales de las paredes bacterianas que afectan la permeabilidad y

provocan pérdida de material intracelular (X. Li et al., 2010) (I.M. Helander et al., 2001) (Y. Chung et al., 2008), así como de inhibir la germinación de esporas. A continuación se mencionan algunos de los mecanismos propuestos para explicar diferentes acciones específicas:

- La interacción electrostática entre el quitosano cargado positivamente (poli electrolito catiónico) y algunas bacterias con membranas celulares cargadas negativamente (Gram negativas como *E. coli, P. aeruginosa, S. typhimurium*) altera las propiedades de barrera de la membrana exterior del microorganismo (I. M. Helander et al., 2001). La formación del complejo polielectrolito bloquea físicamente la membrana externa, impidiendo el flujo normal de nutrientes y desechos, provocando la muerte del microorganismo.

- La interacción electrostática entre los grupos NH_3^+ del policatión y los grupos fosforilo de los fosfolípidos (Fernandez et al. 2003: en C. Lárez Velásquez 2008) presentes en la membrana celular de bacterias Gram negativas causa daños en esta provocando la salida de material celular (Liu et al., 2004: en C. Lárez Velásquez 2008). Más recientemente (Cheng & Chen 2008: en C. Lárez Velásquez 2008) se ha probado que esta salida se ve favorecida cuanto mayor es el grado de acetilación, tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas.

- Para bacterias Gram positivas (como *S. aureus y B. cereus*) que carecen de cargas negativas en la membrana celular, el quitosano ha mostrado actividad incluso mayor en algunos casos, que para Gram negativas. Se ha planteado en el caso de *S. aureus*, la posibilidad de que esta presente poros suficientemente grandes en su membrana para permitir el ingreso del quitosano (Li et al., 2007: en C. Lárez Velásquez 2008) y alterar funciones vitales de las bacterias. Su interacción con el ADN podría inhibir la transcripción y la síntesis de proteínas. El efecto quelante de este biopolímero podría disminuir la concentración de algunos metales necesarios en procesos enzimáticos (Cuero et al., 1991: en C. Lárez Velásquez 2008).

- La interacción selectiva del quitosano con trazas de metales podría inhibir la producción de toxinas y el crecimiento microbiano. El quitosano actúa como un quelante específico (Varma et al., 2004: en C. Lárez Velásquez 2008).

Se infiere de los mecanismos propuestos, que la actividad biocida del quitosano dependerá de la carga positiva que presente el biopolímero dependiendo de factores como el grado de desacetilación, la distribución de los grupos desacetilados a lo largo de la cadena, la longitud de la cadena, la distribución de pesos moleculares, el pH, la fuerza iónica del medio, el contraión asociado en su forma de sal y la temperatura.

Existe una dependencia lineal de la carga con el grado de desacetilación, ya que los quitosanos más desacetilados (con cadenas de igual longitud) presentarán mayor número de grupos amino libres para ionizar, lo cual dependerá del pH del medio. Un peso molecular mayor implicará una molécula con mayor número de grupos cargados (para un mismo grado de desacetilación y pH) y una mayor interacción electrostática con grupos cargados negativamente.

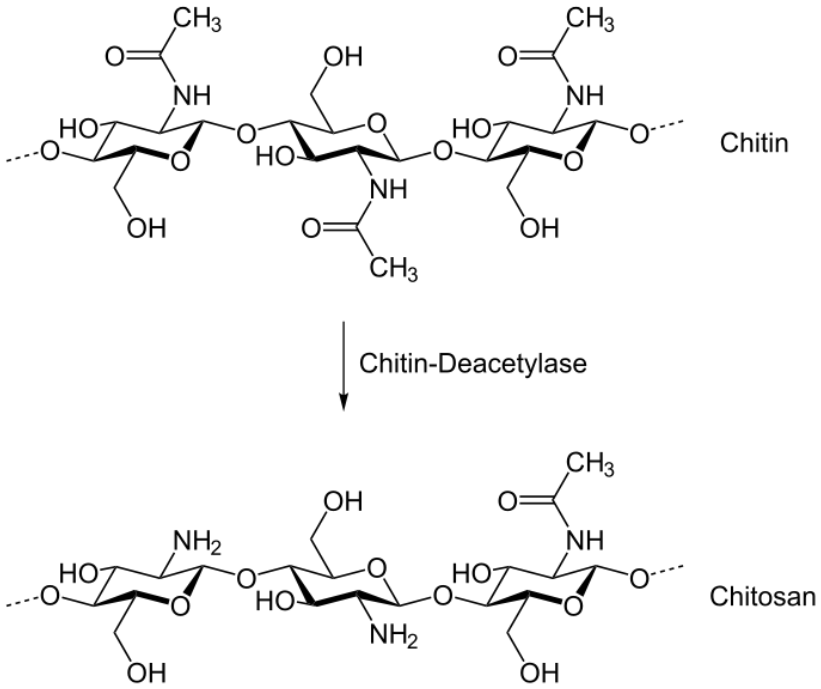
El contraión asociado al quitosano en su forma salina, puede apantallar en una extensión variable las cargas de este, debido entre otras razones a efectos estéricos (C. Lárez Velásquez, 2008).Un estudio sobre la actividad del quitosano disuelto en distintos ácidos sobre *E. coli* confirmó que los ácidos orgánicos de menor tamaño produjeron mejores propiedades bactericidas. El ácido fórmico es más eficaz que el ácido acético. El apantallamiento de las cargas en la cadena también puede deberse a la presencia de iones externos añadidos para controlar la fuerza iónica modificando las

interacciones entre estas (Rinaudo et al., 1993: en C. Lárez Velásquez 2008); sin embargo debe tenerse en cuenta que las moléculas de quitosano tienen una mayor solubilidad a valores de fuerza iónica mayores, con lo cual pueden compensar la mayor flexibilidad que adquieren en estas condiciones. El incremento de actividad bactericida que se observa contra E. coli y S. aureus para valores de fuerza iónica mayores así parece demostrarlo (Cheng & Chen, 2008: en C. Lárez Velásquez 2008).
Así el quitosano encuentra diversas aplicaciones dentro de la industria alimenticia, utilizado en diferentes configuraciones ya sea soluble (T. Fujimoto et al., 2006) o formando películas delgadas para la protección de alimentos (P.K. Dutta et al., 2009) (P. Fernandez-Saiz et al., 2009) (J. Rhim et al., 2006) e impedir el deteterioro de materias primas como la carne (R. L. Beverlya et al., 2008), para evitar el decaimiento postcocecha (A. El Ghaouth et al., 1991), o la clarificación de jugos (S. Chatterjee et al., 2004). Sumado a esto, también se aplica a la elaboración de tejidos antibacteriales en la industria textil (S. Lim & S.M. Hudson, 2004).

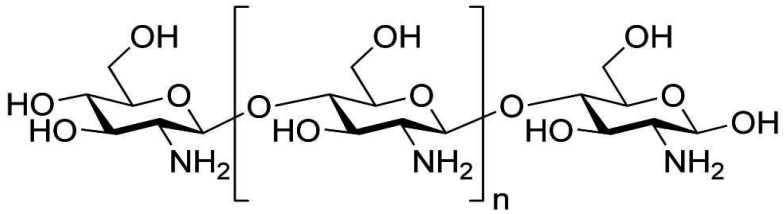
Para la funcionalización de membranas de quitosano elegimos inmovilizar nanopartículas de plata. Las mismas presentan una marcada actividad bactericida (Q. L. Feng et al., 2000) y al combinarse con quitosano, se logra un incremento significativo de la actividad antimicrobiana comparado con los componentes por separado en las mismas concentraciones (P. Sanpui et al., 2008).

El quitosano representa de esta forma, una potencial alternativa a biocidas y otros agroquímicos sintéticos cuyo uso indiscriminado deriva en serios problemas medioambientales y afectaciones en el consumo de alimentos.

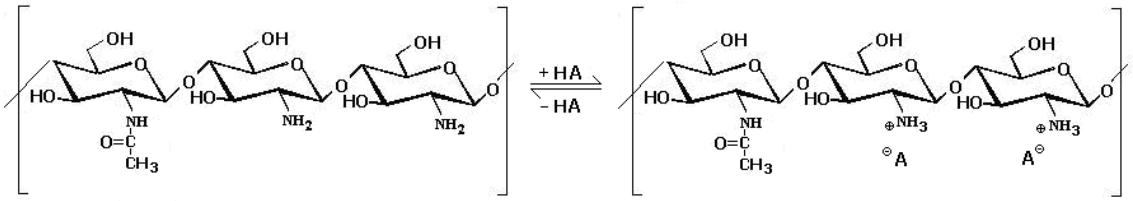
ESTRUCTURA DE LOS POLIMEROS QUITINA Y QUITOSANO



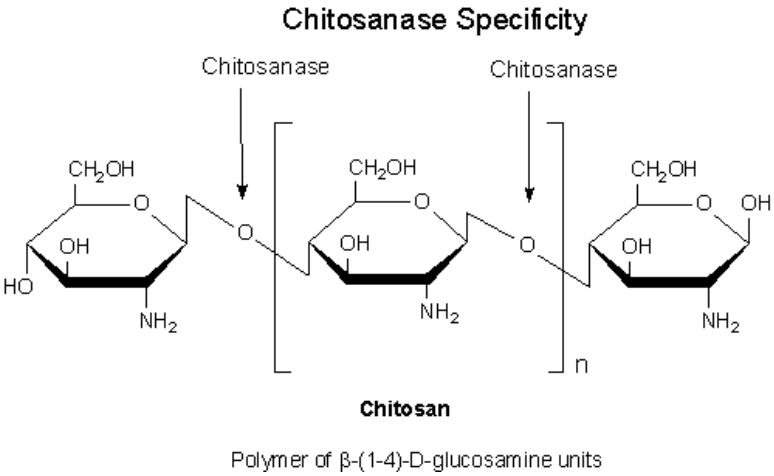
UNIDAD MONOMERICA DEL QUITOSANO



ESTRUCTURAS DEL QUITOSANO EN FUNCIÓN DEL pH DEL MEDIO



SITIOS DE CORTE DE LAS QUITOSANASAS



DIFERENTES METODOS DE FABRICACION DE MICROESFERAS

Preparación de microesferas por Entrecruzamiento Térmico (Sanju Dhawan et al., 2004)

Se preparan 30 mL de solución acuosa (acidificada con ácido acético) de quitosano al 2,5% p/v, al que se agrega ácido cítrico como agente entrecruzante manteniendo constante una razón molar de $6{,}90 \times 10^{-3}$ moles quitosano: 1 mol ácido cítrico. La solución de quitosano +agente entrecruzante se enfría hasta 0°C y luego se le adicionan 25 mL de aceite de maíz enfriados a 0°C, con agitación magnética durante 2 minutos. Esta mezcla se adiciona luego a 175 mL de aceite de maíz mantenido a 120°C con agitación magnética a 1000 rpm durante 40 minutos. Luego de obtenidas las microesferas se filtran y lavan con dietiléter, se secan y se guardan.

Preparación de microesferas por Entrecruzamiento con Glutaraldehído (Sanju Dhawan et al., 2004)

Se prepara una solución acuosa (acidificada con ácido acético) de quitosano al 2,5% p/v, que representa la fase dispersa. Se preparan 125 mL de la fase continua, consistente parafina líquida liviana y parafina líquida pesada en una razón 1:1 con el agregado de Span 85 0,5% p/v para formar una emulsión de agua en aceite. Esta se lleva a agitación magnética a 2000 rpm. Luego se agregan gota a gota, 2,5 mL de glutaraldehído acuoso al 25% v/v, a los 15, 30, 45 y 60 minutos de agitación. Luego del último agregado, se continúa la agitación durante 2,5 horas, se detiene el proceso y se obtienen las microesferas por filtración. Seguido de posteriores lavados con éter de petróleo al 60-80°C y para remover la parafina y luego con agua destilada para remover restos del glutaraldehído. Se dejan secar en un desecador.

Preparación de microesferas por Entrecruzamiento con Tripolifosfato (Sanju Dhawan et al., 2004)

Se prepara una solución acuosa (acidificada con ácido acético) de quitosano al 2,5% p/v. Esta solución (libre de burbujas) se gotea a través de una jeringa hipodérmica, dentro de una solución de tripolifosfato 5% o 10% p/v con agitación magnética constante. Luego de 2 horas las esferas son obtenidas por filtración y lavadas con agua destilada. Se dejan secar al aire.

Preparación de microesferas por Emulsión y Gelación Ionotrópica con NaOH (Sanju Dhawan et al., 2004)

Se prepara la fase dispersa, 40 mL v/v de solución acuosa acidificada con ácido acético conteniendo quitosano al 2,5% p/v. Se prepara la fase continua adicionando Span 85 0,5% a 250 mL de hexano. Se vierte la fase dispersa dentro de la continua para formar una emulsión de agua en aceite bajo condiciones de agitación magnética. Luego de 20 minutos en agitación, se agregan por goteo 15 mL de NaOH 1N a una tasa de 5 mL/minuto, a intervalos de 15 minutos, continuando con la agitación magnética a 2000 – 2200 rpm por un lapso de 2,5 horas. Luego las microesferas son obtenidas por filtración, lavadas con éter de petróleo y a continuación con agua destilada. Se dejan secar al aire.

Preparación de microesferas mediante Secado por Aspersión y Entrecruzamiento con aldehídos (B.F. Oliveira et al., 2006) (K.G.H. Desai et al., 2004)

Se prepara una solución de quitosano 2,5% en agua deionizada conteniendo 0,7% p/v de ácido acético. La solución es atomizada y secada en una máquina Spray Dried Büchi-B190, con una aguja de 0,7 mm de doble fluido a una tasa de 6,0 mL/minuto. El flujo de aire es ajustado a 500-600 nL/h. La temperatura interna es controlada a 122-125°C, y la temperatura externa es determinada por la temperatura interna y otros factores como la tasa de fluido del líquido y el aire, variando entre 85 y 90 °C.
Las esferas así obtenidas son suspendidas en 60 mL de una solución de actenona:agua 2:1 v/v conteniendo el agente entrecruzante (por ej. con 0,15 kg de glutaraldehído/kg de quitosano), en agitador magnético a 500 rpm por determinado lapso de tiempo. Seguido de filtrado y lavado de las esferas con acetona y secadas a vacío por al menos 24 horas.

Preparación de microesferas por Inversión de Fase Húmeda (V.R. Sinha et al., 2003)

Se prepara una solución acuosa (acidificada con ácido acético) de quitosano al 2,5% p/v. Esta solución (libre de burbujas) se gotea a través de una jeringa hipodérmica, dentro de una solución de tripolifosfato. Las esferas así formadas se dejan descansar por 1 hora, luego se enjuagan utilizando como agente entrecruzante, etilenglicol diglicidil éter 5%. Finalmente se lavan y se liofilizan. Cambiando el pH del enjuague en el cual coagulan las esferas, se puede modificar la estructura de los poros formados en las mismas.

Preparación de microesferas por Coacervación (A. Berthold et al., 1996)

En este procedimiento el polímero es solubilizado para formar una solución seguido de la adición de un soluto el cual forma derivados insolubles que precipitan el polímero. Se prepara una solución acuosa de quitosano al 0,25% p/v con ácido acético 2% v/v conteniendo 1% de Polysorbate-80. Se prepara una solución de sulfato de sodio 20% p/v y se gotea sobre la anterior a una tasa de 5 mL/minuto, manteniendo el sistema en agitador magnético a 400 rpm y ultrasonicación. Se continúa en las mismas condiciones durante 1 hora. Luego, las microesferas se purifican por centrifugación durante 15 minutos a 3000 rpm. El sedimento se resuspende en agua destilada, repitiendo por segunda vez este procedimiento. Las esferas así obtenidas se liofilizan. Para la carga de estas microesferas con la droga de interés, se adicionan entre 0,5 y 15,0 mL de la droga a una suspensión acuosa con microesferas al 2% w/v. Se puede requerir sa adición de etanol 30% v/v dependiendo de la solubilidad en agua de la droga elegida. El pH del medio de carga se mantiene a 4,2$\pm$ 0,2 con ácido acético. Se agita vigorosamente cada 15 minutos. Luego de 3 horas las muestras deben centrifugarse por 30 minutos, lo que permitirá retirar el sobrenadante y realizar mediciones espectrofotométricas para determinar la eficiencia de la carga.

Los *micro-carriers* obtenidos por estos métodos pueden ser cargados principalmente por dos métodos; incorporando el componente durante la formación de los mismos a lo que se denomina "incorporación", normalmente utilizado para cargar componentes hidrosolubles, o luego de la formación de partículas vacías, denominado "incubación". Este último consiste en resuspender microesferas vacías dentro de una solución saturada del componente a microencapsular, y es mayormente utilizado cuando se quieren cargar sustancias insolubles en agua o que precipitan a valores de pH ácidos (S.A. Agnihotri et al., 2004).

Fundamentación del método seleccionado para este trabajo

Para este trabajo se escogió el método de Entrecruzamiento con Glutaraldehído, basados en la necesidad de microesferas estables a valores bajos de pH y con buena adhesión a las mucosas tomando en cuenta las condiciones del sistema digestivo durante la administración oral de fármacos, buscando una eficiencia elevada en la incorporación del bioactivo a ser microencapsulado, que presenten un período de descarga controlable en un rango de tiempo amplio, que sea adecuadas teniendo en cuenta la termoestabilidad de los biocomponentes a ser encapsulados, esferas que soporten la agresión provocada por altas temperaturas y estrés mecánico durante tratamientos industriales (S. Dhawan et al., 2004, J. Akbuga et al., 1999, R. R.Dubey et al., 2003, S. Özbas-Turan et al., 2002, Sanju Dhawan & A. Kumar Singla, 2003).

La descarga de componentes hidrosolubles desde micropartículas formadas por entrecruzamiento, involucra la absorción de agua y la desorción del componente microencapsulado, siguiendo un mecanismo controlado por el " hinchamiento por captación de líquido" (en inglés: swelling) (Tarcha et al., en E. Dini et al., 2003). En estos sistemas, la difusión del componente encapsulado y su cinética de descarga son función de las características estructurales del propio componente, la densidad de la matriz polimérica y mayormente por la cinética del proceso de "hinchamiento".
El grado de " hinchamiento" de partículas perfectamente esféricas está gobernado por el grado de reticulación de la red polimérica. Modificando la cantidad de glutaraldehído empleado en la formación de estos *carriers* se puede modificar el grado de "hinchamiento" en un rango muy amplio. Introduciendo variaciones en las características estructurales y moleculares de la matriz polimérica formada por entrecruzamiento, se puede controlar la tasa de descarga de los componentes microencapsulados (E. Dini et al., 2003). Se han reportado gran cantidad de datos introduciendo variaciones en las formulas de generación de vehículos poliméricos que utilizan glutaraldehído como entrecruzante. Cambiando el grado de reticulación, el peso molecular y concentración del quitosano, la cantidad de droga a microencapsular, y la naturaleza de la fase oleosa, se puede controlar la cinética de descarga (E.Dini et al., 2003) y la eficiencia de la microencapsulación (J. Akbuga et al., 1998). Se puede controlar el tamaño de las microesferas variando la velocidad y tiempo de agitación durante el proceso de generación (R. R.Dubey et al., 2003). Se ha reportado que la variación en la concentración de tensoactivo también influye en el tamaño de las partículas obtenidas por este método (E. B. Denkbas et al., 1999).

El glutaraldehído puede ser usado como agente entrecruzante (Fig. 1) para formar la matriz que constituye la microesfera o para crear grupos aldehído en polímeros que contengan grupos amino (Fig. 2).

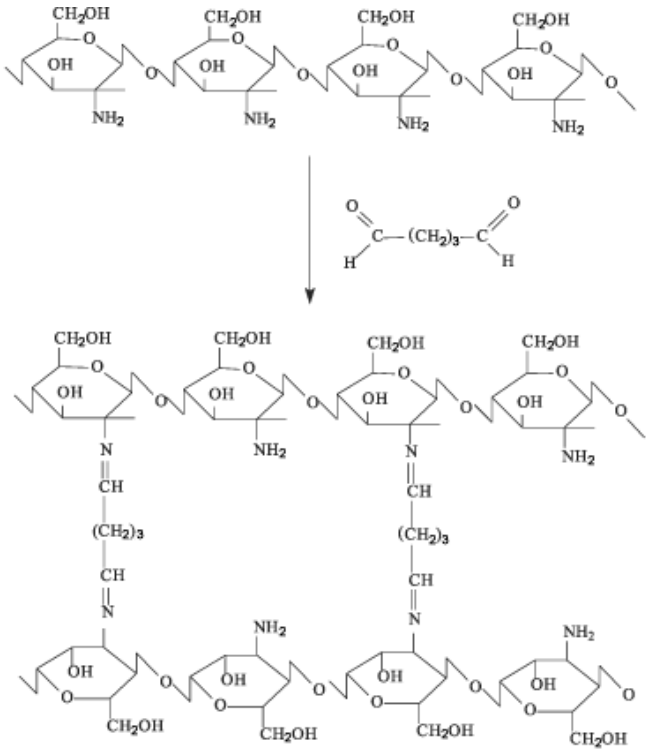


Fig. 1 Proceso de entrecruzamiento del quitosano con el glutaraldehído.

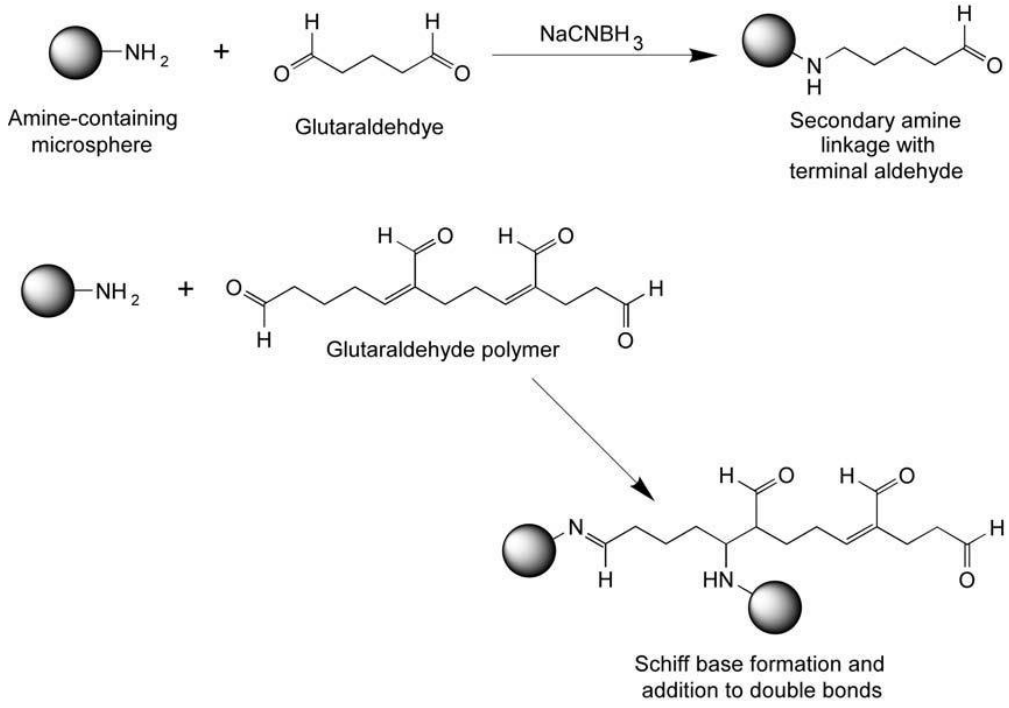


Fig. 2 Formación de grupos aldehído para la posterior funcionalización de las microesferas mediante la unión de ligandos. (En: Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson)

Estos grupos amino presentes en las unidades repetitivas de quitosano pueden reaccionar con los dos grupos aldehído presentes en el glutaraldehído para formar derivados activados capaces de entrecruzarse con otras unidades de este polímero o proteínas (Fig. 3). La reacción con proteínas involucra principalmente los grupos ε-amino de las cadenas laterales de lisina, pero también reacciona con resíduos tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina y cisteína. Así mismo es muy reactivo con grupos α-amino de los residuos aminoacídicos, con los grupos N-terminales peptídicos y con los grupos sulfhidrilo de la cisteína. A la vez, las microesferas de quitosano pueden utilizar sus grupos amino para ser funcionalizadas por otros mecanismos no dependientes del grupo aldehído (Fig. 4).

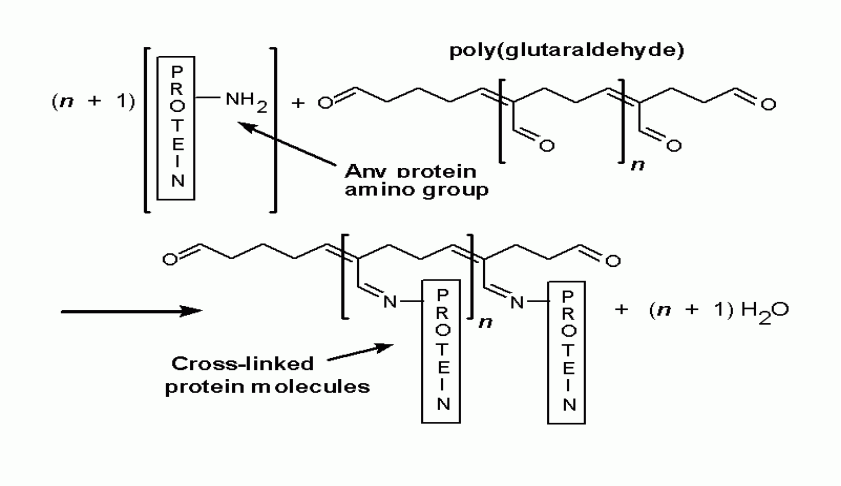


Fig. 3 Sitios de enlace entre el glutaraldehído y proteínas.

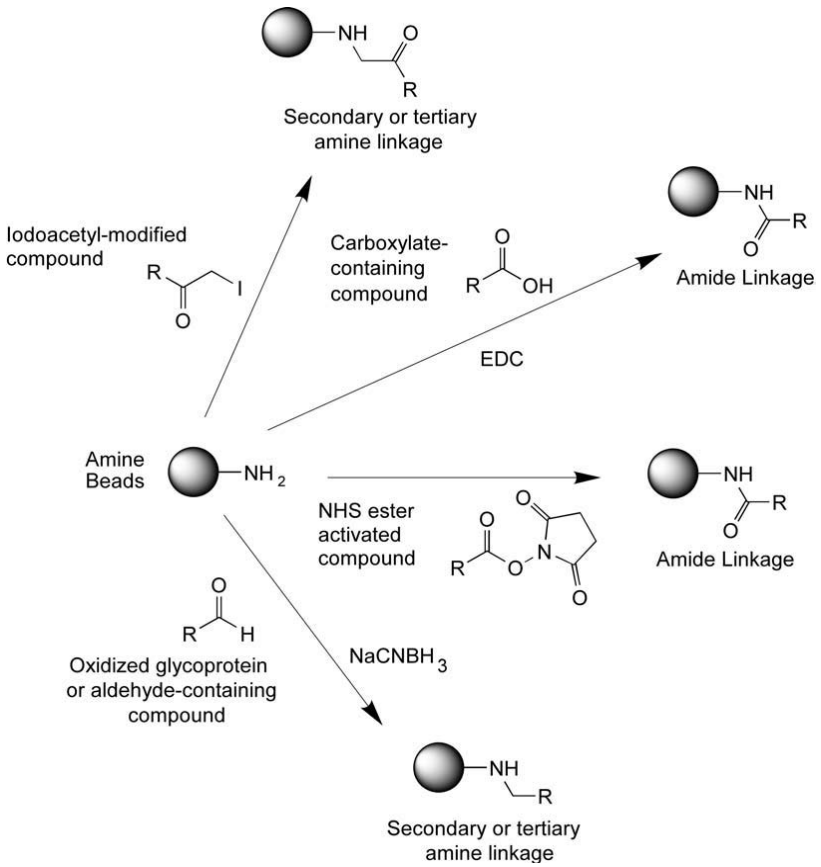


Fig. 4 Microesferas conteniendo grupos amino pueden ser funcionalizadas mediante conjugación por reacciones de alquilación o acilación. (En: Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson)

Hay varios mecanismos de reacción posibles entre moléculas que contienen grupos amino y el glutaraldehído (Fig. 5). Uno de los grupos aldehído puede formar una base de Schiff con α-aminas o ε-aminas de una proteína, dejando el otro grupo aldehído libre para ser conjugado con otra molécula. Una forma cíclica del glutaraldehído, como producto de una condensación aldólica, puede reaccionar con ε-aminas de dos cadenas laterales de residuos lisina en proteínas vecinas para formar derivados de piridina. Alternativamente un polímero de glutaraldehído (Fig. 6) puede experimentar una adición vinílica para crear aminas secundarias estables, dejando expuestos otros grupos aldehído para subsecuentes reacciones de aminación reductiva. Las interacciones tipo base de Schiff entre aldehídos y aminas, normalmente no son lo suficientemente estables como para formar enlaces irreversibles. Aunque el doble enlace de una base de Schiff es una interacción fuerte, este se encuentra en rápido equilibrio. La acidificación del medio durante el entrecruzamiento de proteínas desplaza el equilibrio a la izquierda, resultando en la inestabilidad de las bases de Schiff (M. A. Hayat, Principles and Techniques of Electron Microscopy, 2000). Se ha postulado que la estabilidad que se obtiene en algunos casos, se debe a un mecanismo de adición vinílica el cual no depende de la generación de bases de Schiff (Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 1996).

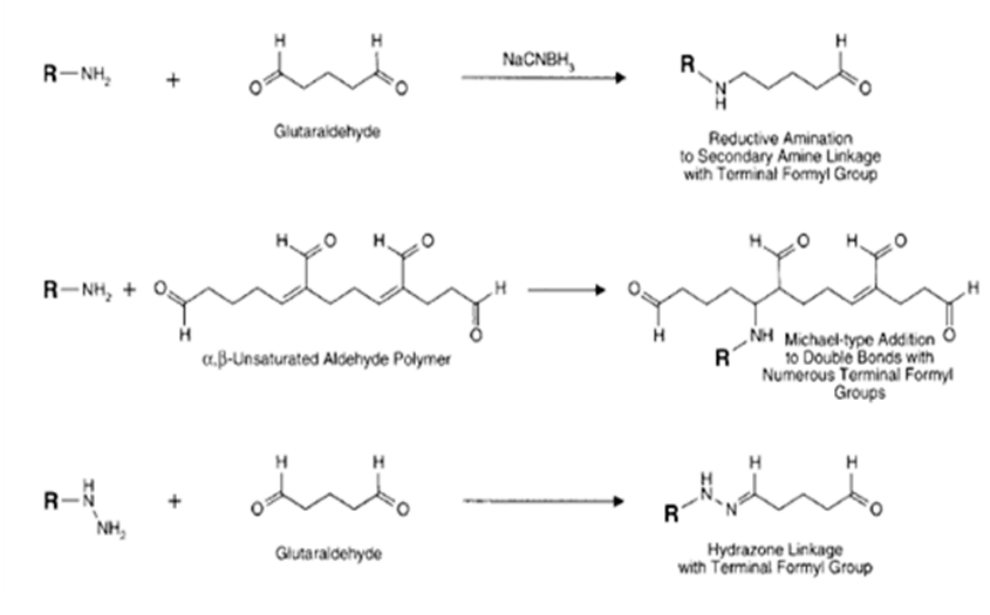


Fig. 5 Distintos mecanismos para la formación de enlaces covalentes entre el glutaraldehído y moléculas que contienen grupos amino. (En: Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson)

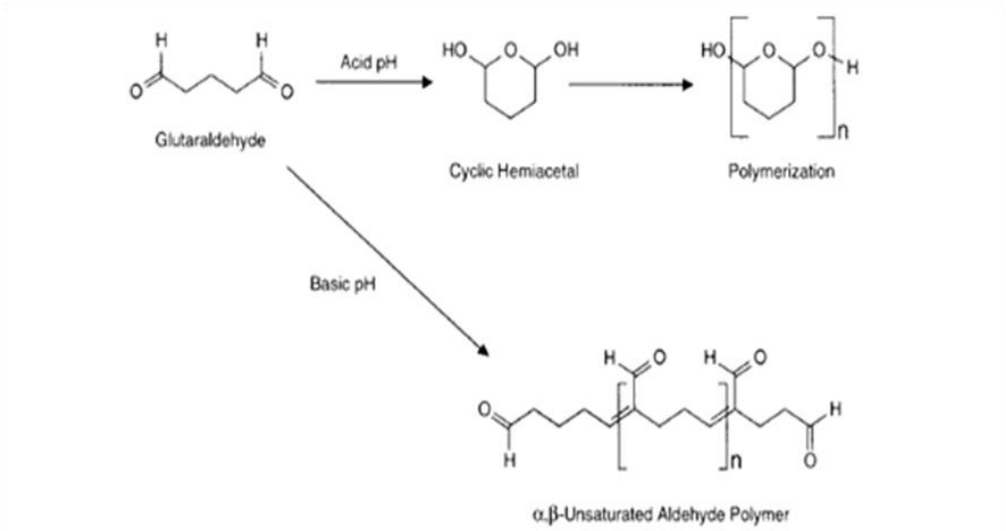


Fig. 6 El glutaraldehído en solución acuosa puede polimerizar a ph ácido o básico. (En: Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson)

Fisicoquímica de interfases y emulsiones

Es necesario introducir algunas definiciones y conceptos teóricos claramente relacionados con el propósito de esta tesis.

Tensión superficial

Las moléculas en el interior de un líquido están sometidas a la acción de fuerzas atractivas de cohesión en todas direcciones (interacciones del tipo Van Der Waals), cuya resultante será nula. Si la molécula está situada en la superficie del líquido, se encuentra bajo la acción de fuerzas de cohesión no balanceadas cuya resultante es perpendicular a la superficie y dirigida al interior del líquido. De esta forma, las moléculas de la superficie tienen mayor energía que las interiores y tienden a desplazarse hacia el seno del líquido. Es necesario realizar un trabajo para mover moléculas hacia la superficie venciendo la resistencia de estas fuerzas. Se define entonces cuantitativamente la *tensión superficial* como el trabajo que debe realizarse para llevar moléculas desde el seno del líquido hasta la superficie para crear una nueva unidad de superficie. Como resultado de este fenómeno, la superficie tiende a contraerse o reducirse formando una tensión y tendiendo a ocupar el área más pequeña posible. Tratándose de una gota, esta tenderá a formar una esfera.

Interfases

Se define fase como un continuo que mantiene sus propiedades en toda su extensión, tanto desde su homogeneidad como isotropía. Un medio es *homogéneo* si mantiene sus propiedades características en todos los puntos del mismo (propiedad escalar) y es *isótropo* cuando mantiene las características físicas en todas direcciones (propiedad vectorial). Por ende, una interfase será una zona heterogénea y anisotrópica ya que se constituye por la interacción de varias fases distintas entre sí. Las propiedades de la misma surgen de las fases que la componen, existiendo una situación límite en las que todas las propiedades liberan las resultantes. De esta manera se establece un elemento de dimensión unidad conocido como *interfaz*.

Emulsiones

Una emulsión es un sistema termodinámicamente inestable constituido por una suspensión de partículas líquidas dentro de otra fase líquida no miscible. Las partículas del líquido dividido constituyen la fase dispersa, y el líquido en el cual estas gotas están dispersas representa la fase continua. Una fase estará constituida por una sustancia acuosa y la otra por una sustancia oleosa. Hay dos clases de emulsiones, agua en aceite W/O donde la fase dispersa es acuosa y aceite en agua O/W donde la fase dispersa es la oleosa. Muchas veces se puede transformar una emulsión W/O en O/W, o a la inversa, por pequeñas modificaciones en el sistema, fenómeno denominado "inversión". Considerando las propiedades termodinámicas de un sistema en su estado inicial, compuesto por dos fases separadas aceite y agua que se emulsionan, tendrá una energía libre " G " tal que:

$$\Delta G = \Delta U - T \Delta S$$

donde U es la energía interna, T es la temperatura y S es la entropía del sistema.
Analizando la variación de la energía interna por el volumen de cada una de las dos fases, así como la variación de la entropía la cual es proporcional al número de gotas de la emulsión, se tiene que:

$$\Delta U = \gamma * \Delta A$$

$$\Delta S = k * N$$

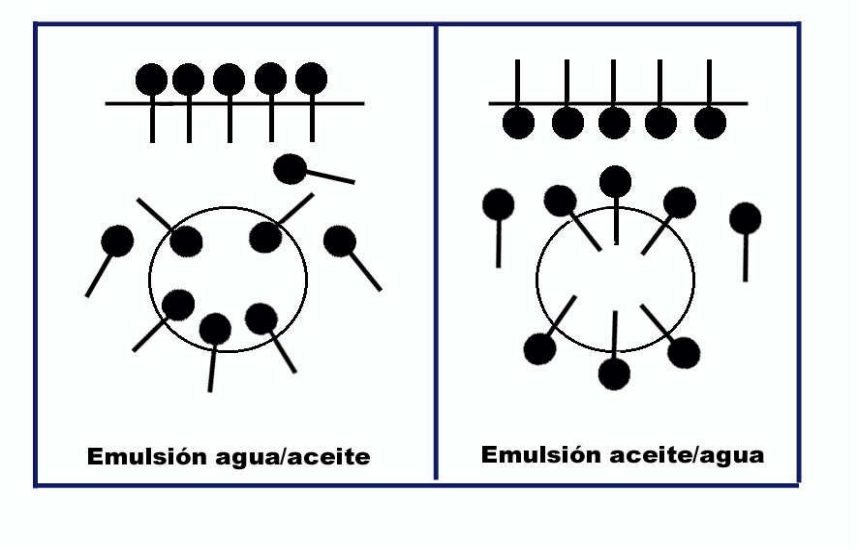
donde γ = tensión interfacial , N = número de gotas , A = área total de la interfaz.
Si se produce la emulsión, N y A aumentan. Esto conduce a un aumento de ΔU y ΔS para aquellos sistemas en los que la fase dispersa está formada por gotas relativamente grandes.
Si la variación de la energía interna es de mayor magnitud que para la entropía, ΔG crecerá y el sistema será inestable. Las gotas más pequeñas conducen a un valor elevado en la variación de entropía, por lo tanto una energía libre negativa, y esto conduce a una emulsión estable. Por regla general, para las emulsiones se habla de estabilidad desde el punto de vista cinético, ya que volverá a separarse en dos fases luego de transcurrido el tiempo suficiente.

El sistema posee una estabilidad mínima que puede ser controlada añadiendo un tensoactivo o emulsificante.
La estabilidad de una emulsión es la propiedad más importante, y el sistema no será clasificado como emulsión sino cumple con un mínimo de estabilidad. Se mide la estabilidad por la velocidad con la cual las gotas de la fase dispersa se agrupan para formar una masa de líquido cada vez mayor que se separa por gravedad.
Los dos factores más importantes para la estabilidad de las emulsiones son:

- La existencia de una película interfacial que se puede considerar como una envoltura alrededor de cada glóbulo dispersado.

- Una débil tensión interfacial gracias a agentes tensoactivos que se adsorben positivamente en la interfaz.

Ni el tipo ni la estabilidad de una emulsión son determinados por la carga eléctrica del emulsificante, componente de la película interfacial. Cuando la emulsión se forma, el emulsificante o tensoactivo se coloca en la interfaz con su cadena hidrófoba orientada hacia el aceite y el grupo hidrófilo orientado hacia el agua.



Una regla general denominada "regla de Banckroff" es que la fase donde el emulsificante es más soluble constituirá la fase continua o externa.
La eficacia de un tensoactivo depende, entre otros factores del modo de agitación. El papel de la agitación es ante todo de dividir las dos fases, de tal forma que una de las fases se convierta en pequeñas gotas. La energía mecánica necesaria que hay que aplicar en esta operación es tanto menor, cuanto la tensión interfacial sea más pequeña. En algunos sistemas si la tensión interfacial es muy pequeña, la emulsificación se producirá espontáneamente sin agitación.
Los agentes tensoactivos pueden seleccionarse según el tipo de emulsión, los hidrófilos para emulsiones aceite en agua y los lipófilos servirán para emulsiones agua en aceite.

La viscosidad es otra propiedad importante de las emulsiones. Esta aumenta con la concentración de la fase dispersa y puede llegar a tener valores donde el sistema se comporte como un sólido. La viscosidad de las emulsiones W/O y O/W está directamente ligada a la relación entre volúmenes de las fases dispersa y continua (donde la curva de viscosidad en función de la relación de volúmenes podrá presentar un máximo cerca del punto de inversión). Una viscosidad elevada disminuye la frecuencia de colisiones entre los glóbulos dispersados y por tanto la energía de colisión, por lo que resulta ser favorable a la estabilidad de la emulsión.

Objetivos generales

El objetivo general de este trabajo es desarrollar y obtener configuraciones controladas y reproducibles del biopolímero quitosano, aplicables al sector productivo.

Objetivos específicos

Cuadro de objetivos específicos e indicadores de éxito

Objetivos específicos	Indicador	Exito
Obtener un sistema controlado de formación de microesferas que sirvan como *carriers* de fármacos, ADN, enzimas y compuestos aromáticos	Comprobar que se obtienen *carriers* estables y de manera reproducible	Cargar estos *carriers* con bioactivos y comprobar que descarguen el componente microencapsulado
Obtener un sistema controlado de generación de membranas que sirvan como soporte de bioactivos para el diseño de reactores de aplicación industrial	Obtención de films estables y de manera reproducible	Funcionalizar un film con un bioactivo

Materiales y Métodos

1. Estudio del comportamiento del sistema de microencapsulación

Producción de microesferas y membranas para estudios del sistema

Preparación de la fase dispersa

Se utilizó quitina cedida por la Universidad de Costa Rica, obteniéndose quitosano por desacetilación alcalina. Se disolvió quitosano al 3.0% (peso/vol) en ácido acético al 5% acuoso (a partir de ácido acético glacial Merck) en agitación contínua durante 24 horas en un agitador magnético Ika Werk. La solución se filtró con bomba de vacío durante 24 horas utilizando un filtro MN 640 w Macherey-Nagel.

Preparación de la fase continua

Se mezcló en matraz de 2 L, 1 L de aceite de girasol y Span 80 al 0.5% (peso/vol) como tensoactivo. Se sometió a agitación durante 5 minutos.

Producción de microesferas de quitosano
Protocolo 1

Se puso a punto la técnica de preparación de microesferas reportada por Thanoo et al. 1992 (en: Sanju Dhawan 2004) (Rajesh R. Dubey et al., 2003) con algunas modificaciones. La misma se basa en la formación de una emulsión de agua en aceite sometida a agitación con el posterior agregado de un coagulante o entrecruzante.
En condiciones de agitación constante a 1100 rpm, se agregaron 40 mL de la fase dispersa por goteo lento a una tasa de 5 mL/minuto.
Luego se adicionó el agente entrecruzante por goteo, 20 mL de glutaraldehído 25% acuoso grado técnico (Droguería Industrial Saxonn S.A.), en 4 aplicaciones a los 15, 30, 45 y 60 minutos. Se mantuvo bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura por 2.5 horas. Una vez finalizado este proceso, se dejó decantar por 24 horas a temperatura ambiente.

Lavado y cosecha de las microesferas

Para la recolección de las microesferas se empleó un sistema de filtración con bomba de vacío. Se utilizó un Kitasato de vidrio y embudo Büchner de porcelana con filtro de 0.8 μm (Gelman Sciences). Se descartó el sobrenadante y se realizaron sucesivos lavados con éter de petróleo. A continuación se realizaron lavados con agua bidestilada Milli-Q para retirar restos de glutaraldehído, finalizando nuevamente con éter de petróleo. Se dejaron secar a temperatura ambiente.

Producción de membranas de quitosano

Se utilizó quitosano diluido y filtrado en concentraciones del 1% y 2% en ácido acético 2% y 5%. Se cubrió el fondo de cajas de petri con una escasa cantidad de esta solución y se dejó secar a temperatura ambiente.

Procedimiento de marcación de la BSA con FITC

Se preparó de acuerdo al protocolo de Levi & González 2002, con ligeras modificaciones. Se disolvieron 30 mg de BSA fracción V en 1 mL de amortiguador MES 60 mM pH 7.9 , para obtener una concentración final de 450 µM. Se agregó FITC en DMSO hasta alcanzar una concentración final de 500 µM y se incubó a temperatura ambiente en agitación y oscuridad durante 4 horas. Luego se detuvo la reacción de marcado con Tris 1 M pH 8,0 a 0°C alcanzando una concentración final de Tris de 100 mM. La muestra marcada se dializó extensamente en oscuridad a 4ºC contra amortiguador fosfato de sodio 50 mM pH 7.4. Se determinó la estequiometria del marcado. A partir de un espectro de absorción en la región UV-visible, se determinó la absorbancia de la proteína a 280 nm y la del fluoróforo presente en el conjugado en su máximo de absorción cercano a los 494nm, con un coeficiente de absortividad molar de 68000 $M^{-1}cm^{-1}$.

Producción de nanopartículas de plata para la funcionalización de membranas

Para la producción de nanopartículas de plata se procedió según el protocolo de Yingju Fan et al. 2009, con ligeras modificaciones. Se lavó el material de vidrio con una mezcla 50:50 de ácido sulfúrico y ácido nítrico para eliminar residuos e impurezas. Se enjuagó con abundante agua Milli-Q. Se disolvieron 0.4 g de almidón en 200 mL de agua Milli-Q a 70°~80°C con agitación constante. Se diluyeron 0.1621g de $AgNO_3$ en 10 mL de agua Milli-Q, protegiendo de la luz con papel de aluminio. Se dio vortex. Se diluyeron 0.399 g de $NaBH_4$ en 10 mL de agua Milli-Q. Se dio vortex y se llevó a hielo. Se enfrió la solución de almidón hasta unos 40°C aproximadamente. Se agregaron 3.0 mL de la solución de $AgNO_3$ a los 200 mL de solución de almidón con agitación de 600 rpm y constante. Se agregaron 6mL de la solución de $NaBH_4$ a la mezcla de forma concertada y se continuó con la agitación durante 30 minutos.

2. Microencapsulación de componentes prototipo para ensayos de liberación y tratamiento en medio ácido

Encapsulación de sustancias de interés biológico e industrial

Basados en los resultados obtenidos en los estudios del sistema, se disminuyó la concentración del polímero para trabajar con quitosano comercial de peso molecular conocido.

Procedimiento para la microencapsulación de ADN

Se agregaron 100 µg de ADN de timo de vaca diluidos en 100 µL de agua Milli-Q a 3.0 mL de quitosano 2% (peso/vol) (peso molecular medio, Aldrich Chemistry) disuelto en ácido acético glacial 5% en agua Milli-Q. Se dio vortex. Se procedió a menor escala como se detalla en el protocolo 1, utilizando como fase contínua 125 mL de aceite conteniendo 0,63 mL de Span 80, se agregó la fase dispersa por goteo a una tasa de 5 mL/min, se gotearon 4 alícuotas de 2,5 mL de glutaraldefído

25% a los 15, 30, 45 y 60 minutos, continuándose la agitación durante 2,5 horas. Los lavados se realizaron como ya fue descrito.

Procedimiento para la microencapsulación de una sustancia aromática

Se adicionaron 10 mL de Limoneno (Abs325=0,890) a 10 mL de aceite de maíz, a continuación se agregaron 10 g de microesferas. Se dio vortex a la mezcla durante 20 minutos, luego se sonicó durante 10 min y se centrifugó a 4000rpm durante 2min. Se dejó decantar.

Procedimiento para la microencapsulación de proteínas

Se mezclaron 0.3 mL de BSA 10% en agua Milli-Q con 3.0 mL de quitosano 2% en ácido acético 5% acuoso. Se dio vortex. Se procedió con el protocolo 1.

Para la BSA marcada, se disolvieron 30 mg de BSA marcada con FITC en 3.6mL de la fase dispersa. Se procedió con el protocolo descrito anteriormente siguiendo algunas modificaciones. Se sustituyó el glutaraldehído por una solución acuosa de paraformaldehído al 30% (J.T. Baker) y se mantuvo todo el proceso en condiciones de oscuridad.

Procedimiento para la funcionalización de una membrana con nanopartículas de plata

Se mezclaron 5 mL quitosano diluido al 2% en ácido acético 5% con 1.0 mL de la suspensión de nanopartículas de plata. Se agito vigorosamente y se cubrió el fondo de una caja de petri. Se dejó secar a temperatura ambiente.

Ensayos de liberación

Se siguió un procedimiento basado en los ensayos de Dini et al.
Se pesaron 50 mg de microesferas cargadas con BSA y 50 mg cargadas con ADN.
Se prepararon 2 batches por separado, resuspendiendo las esferas cargadas con BSA y ADN en 15 mL de buffer fosfato pH 7.4. Se agitaron vigorosamente de forma manual y se retiraron 1.0 ml de cada batch, se centrifugaron durante 20 segundos en una minífuga Beckman Microfugue E. Cada sobrenadante se coloco en cubetas de cuarzo y se midió la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro Varian Cary 50 Tablet UV-Visible Spectrophotometer a 260 nm para el ADN y a 280 nm para la BSA. Esta primer medición se tomó como tiempo 0. Luego de cada medida se devolvieron las muestras a sus batches originales, los cuales se mantuvieron en agitación constante a 80 rpm en un agitador orbital Labnet Intenational, Inc.Orbit 1000. De esta forma se obtuvieron los datos del total acumulado de sustancia liberada por las microesferas en suspensión. Este procedimiento se repitió cada 10 minutos para obtener datos cinéticos de liberación a corto plazo.

Pruebas de resistencia en medio ácido

Se sometieron microesferas con ácido clorhídrico 10% durante 40 días; se incubaron esferas control en agua bidestilada a pH neutro durante el mismo período de tiempo.

3. Técnicas de evaluación de los resultados obtenidos

Microscopía óptica

Se montaron muestras con medio sintético. Se observaron y capturaron imágenes con una Cámara digital marca SAMSUNG SDC-310 acoplada a microscopio marca OLYMPUSBX40 y software de control IMAGE-PROEXPRESS 4.01.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se procesaron muestras metalizando a vacío con oro-paladio. Se observaron en un microscopio JEOL JSM-5900 LV a una aceleración de voltaje de 20kV en la Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias – UdelaR.

Las esferas tratadas en medio ácido y sus controles a pH neutro, se cubrieron con oro/paladio durante 4.5 min en un ION SPUTTER JFC-100 y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6390 del Colegio de Posgraduados (COLPOS), Campus Montecillo, Estado de México – México.

Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución

Se metalizaron muestras con oro y se observaron en una estación de trabajo FEI NOVA-200 NANOLAB DUAL BEAM FIB (FIB: focused ion beam) equipada con cañón emisor de campo.

Se cortaron esferas con y sin recubrimiento metálico utilizando el cañón emisor de iones (FIB). Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Ultra Alta Resolución (MELUAR) del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP).

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Se fijaron las muestras con tetróxido de osmio 1% (EMS) en agua Milli-Q, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y acetona. Se infiltraron las muestras con resina epoxi de baja viscosidad (Durcupan, Fluka) y se armaron bloques por inclusión en plano en moldes de silicona.
Se seccionó ultrafino en un ultramicrótomo marca RMC MT-X, se montaron los cortes en grillas de cobre con film de soporte de formvar y se contrastó con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se observó y capturaron imágenes en un microscopio JEOL JEM-1010 a una aceleración de voltaje de 80kV, con cámara digital acoplada HAMAMATSU DIGITAL CAMERA CCD 4742-95 y software de control AMT ADVANTAGE.
Para las nanopartículas de plata se realizó una dispersión de estas sobre la grilla portaobjeto. Para ello se colocó una gota de 15µL sobre una grilla de malla de cobre con film de soporte de formvar y estabilizadas con carbón evaporado, se dejó la gota durante 2 minutos y se retiró el exceso drenando el mismo con papel de filtro. Se observó en el JEOL JEM-1010 bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Citometría del Flujo

Se resuspendieron esferas en agua Milli-Q sometiendo estas a vortex y sonicador. Se centrifugó, se obtuvo el sobrenadante y se llevó al citómetro FACSVantage – BD del Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo (SECIF) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Para la clasificación de tamaño por poblaciones, se utilizaron esferas estándar de 6 y 12μm.

Microscopía Confocal de Barrido LASER (CLSM)

Se diseñó un experimento que permitiera observar la distribución del producto cargado en las microesferas, utilizando seroalbúmina bovina (BSA) marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) como "proteína reportera". Se necesitó elegir un nuevo agente entrecruzante para disminuir el ruido generado por la autofluorescencia del glutaraldehído y poder distinguir la marca de la sonda. A continuación del proceso de microencapsulación de la BSA marcada como se ha descrito anteriormente, se montaron sobre portaobjetos de vidrio, esferas control cargadas con BSA y cargadas con BSA-FITC utilizando glicerol 80%. Se observó irradiando con láser de 488nm en un microscopio de barrido láser confocal marca OLYMPUS FLUO VIEW FV 300 de la Unidad de Microscopía Confocal del IIBCE.

RESULTADOS y DISCUSION

Microcopía óptica

Este resultó un método adecuado para monitorear rápidamente los productos obtenidos en los distintos reactores de formación de microesferas. Pudimos comprobar que el efecto de agregación o "clustering" de las microesferas (Fig. 1), tiene mayor incidencia luego del proceso de secado de las mismas, siendo que mientras se mantuvieron en suspensión, se mostraban unidades esferoidales más discretas (Fig. 2).

Microscopía Electrónica de Barrido

Por las condiciones en que se realizó esta técnica, fue necesario asegurarse que el producto estuviese totalmente seco, observándose claramente y a mayor magnificación, el efecto de agregación de los microvehículos (Fig. 3).
Se obtuvieron esferas bien definidas con superficie compacta y levemente ondulada (Fig. 4 y 5), con una distribución heterogénea de tamaños. Primeramente llamó la atención la presencia de un orificio en varias partículas, hasta que una observación más detallada permitió encontrar marcas en la superficie de una de ellas, que claramente delatan el sentido del giro durante el proceso de formación (Fig. 6), entendiendo que este orificio corresponde al vórtice formado por el eje de giro durante dicho proceso. Se pudo observar el interior de una esfera partida, donde se destaca una estructura interna maciza.

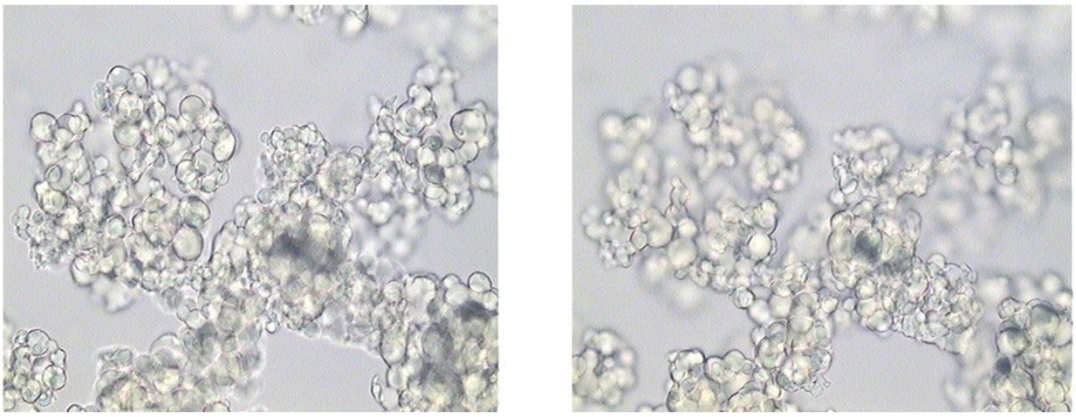


Fig. 1 Microscopía óptica: microesferas del Protocolo 1 donde se observa el "clustering" formado durante el proceso de secado de las mismas. Fueron resuspendidas en agua bidestilada. (micrografías 200X)

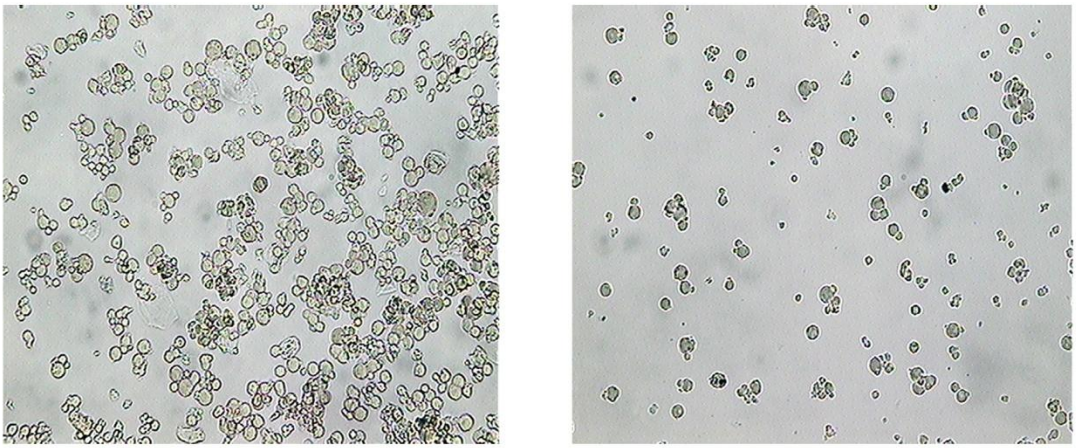
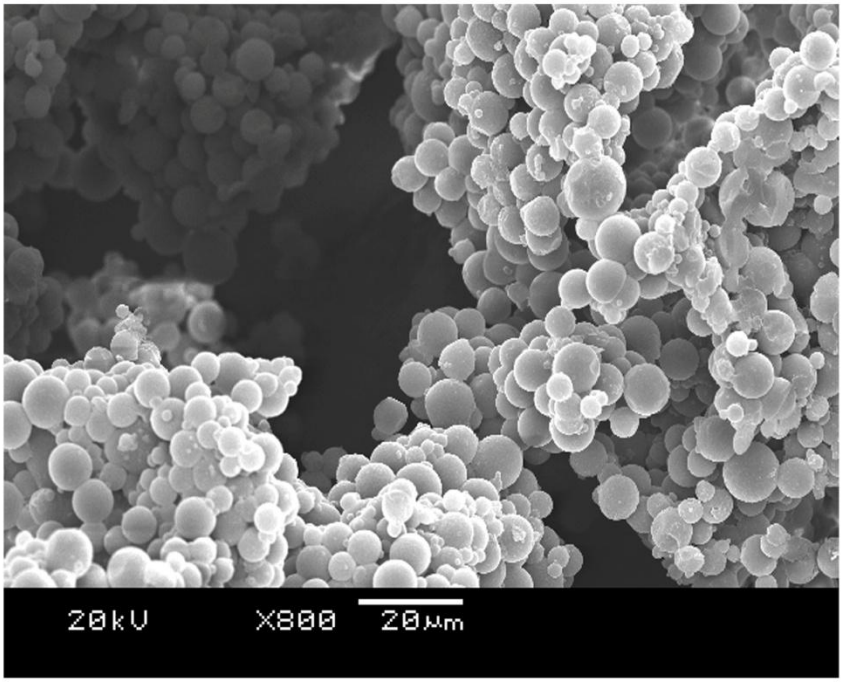


Fig. 2 Microscopía óptica: microesferas del Protocolo 1 húmedas, donde se observa la disminución de "clustering" formado durante el proceso de secado de las mismas. Fueron resuspendidas en agua bidestilada (micrografías 100X)



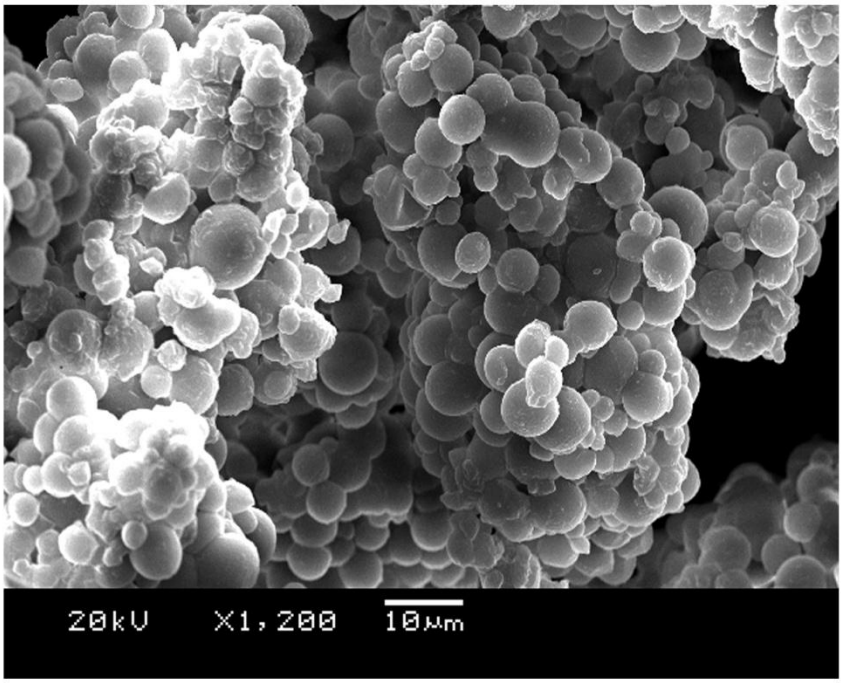


Fig. 3 Microscopía Electrónica de barrido: se puede observar la formación de "clusters" durante el secado

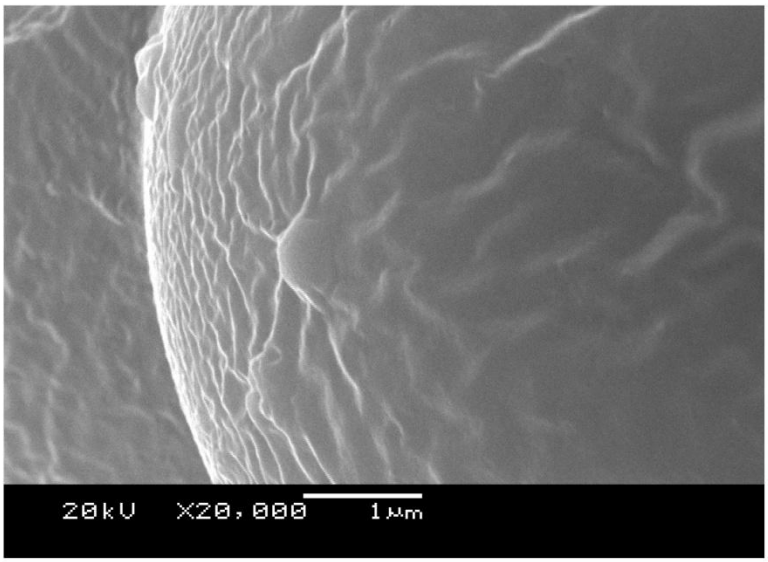


Fig. 4 Microscopía electrónica de barrido: Muestra detalle de la superficie con ondulaciones

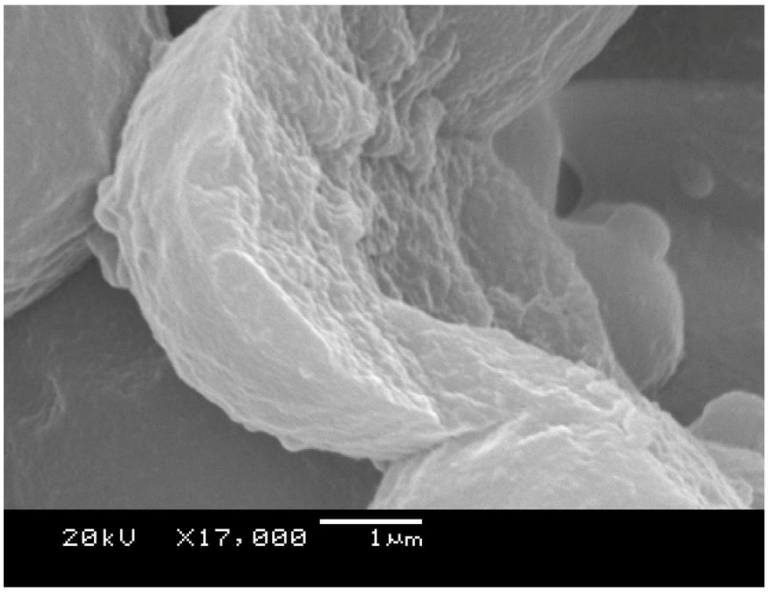


Fig. 5 Microscopía electrónica de barrido: Ee esta micrografía se revela el interior compacto de una esfera partida.

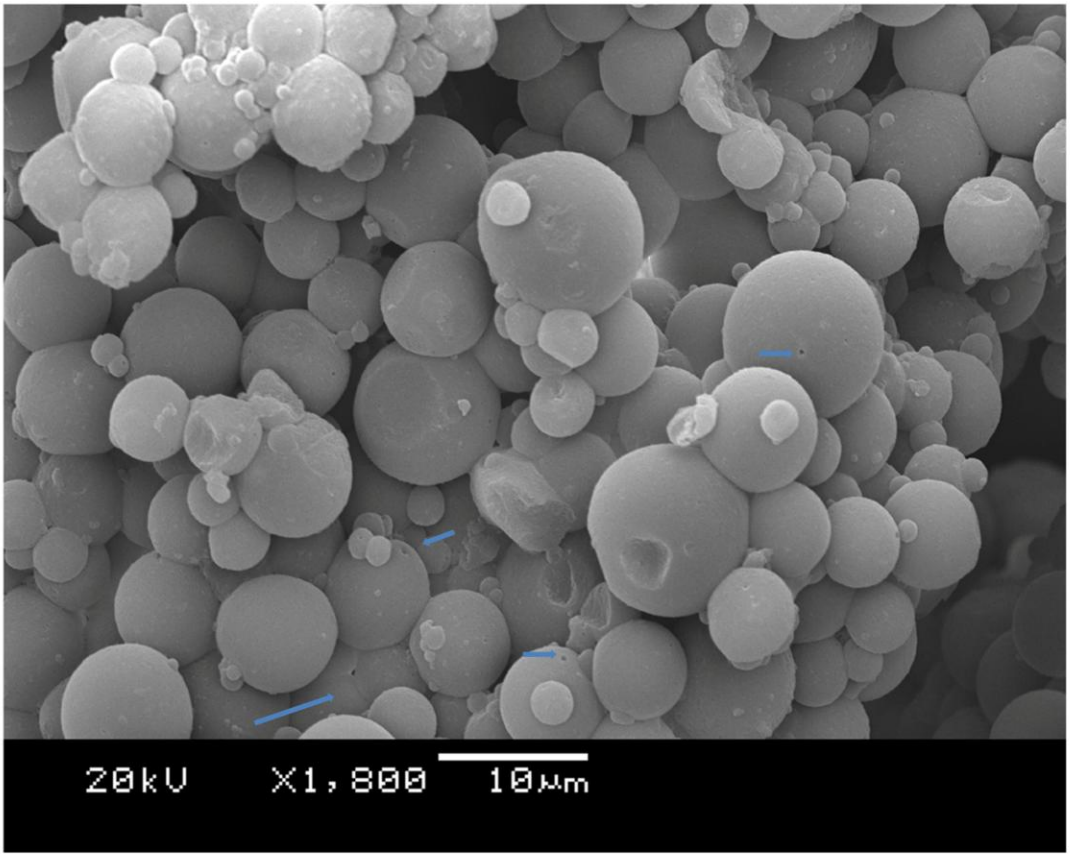
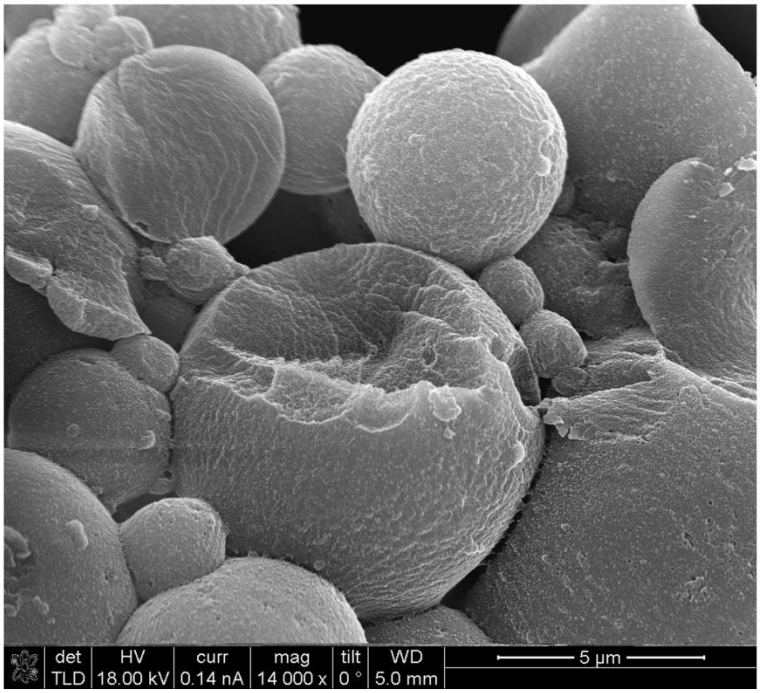


Fig. 6 Microscopía electrónica de barrido: Las flechas cortas indican un orificio presente en varias esferas, producto del eje de giro durantre el proceso de formación, como lo delatan las marcas en la superfice indicadas por la flecha larga.

Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución

Con el objetivo de entender de forma más clara el comportamiento de absorción de líquidos con aumento de tamaño (en inglés:"swelling") y la descarga de componentes desde estas estructuras tan compactas, tuvimos que utilizar un microscopio con cañón emisor de campo y mayor poder de resolución. El mismo posee además un cañón emisor de iones que permitió cortar estos microvehículos para observar su interior. Los resultados así obtenidos revelaron una matriz mucho más "granular" más bien con aspecto de esponja (Fig. 7, Fig. 8 Micrografía 3), donde claramente se observan los espacios que podrán ser ocupados durante la penetración de líquidos y permite apreciar la tortuosidad de los caminos de escape para los componentes microencapsulados durante el proceso de descarga (Fig. 8 Micrografía 1 y 2) , lo que explica la variación de los tiempos de descarga en función del grado de entrecruzamiento de la matriz, la concentración del polímero y el peso molecular seleccionados. Nuevamente tuvimos que fotografiar el interior de esferas quebradas bajo la acción de estrés físico, dado que el haz de iones derrite literalmente las mismas borrando cualquier característica estructural. Ante la pregunta de si este interior tan particular es solo artefactual y generado por el estrés mecánico en el proceso de rotura, volvimos a utilizar los orificios generados durante la formación de los vehículos para observar el interior de los *carriers*, comprobando que mantienen el mismo aspecto granular (Fig. 8 Micrografía 4). Es discutible si se puede tomar el espacio formado por el eje de giro como "interior", ya que como se concluyó anteriormente, fue ocupado por un vórtice durante el proceso de fabricación, el cual formaría un "tubo" que atraviesa la esfera contando como un área adicional de superficie. Pero a los efectos de los resultados generales obtenidos, creemos que la información brindada por la alta resolución y el nivel de magnificación alcanzado de 1 millón de aumentos, brinda datos relevantes y definitivos acerca de las características estructurales de las matrices obtenidas.



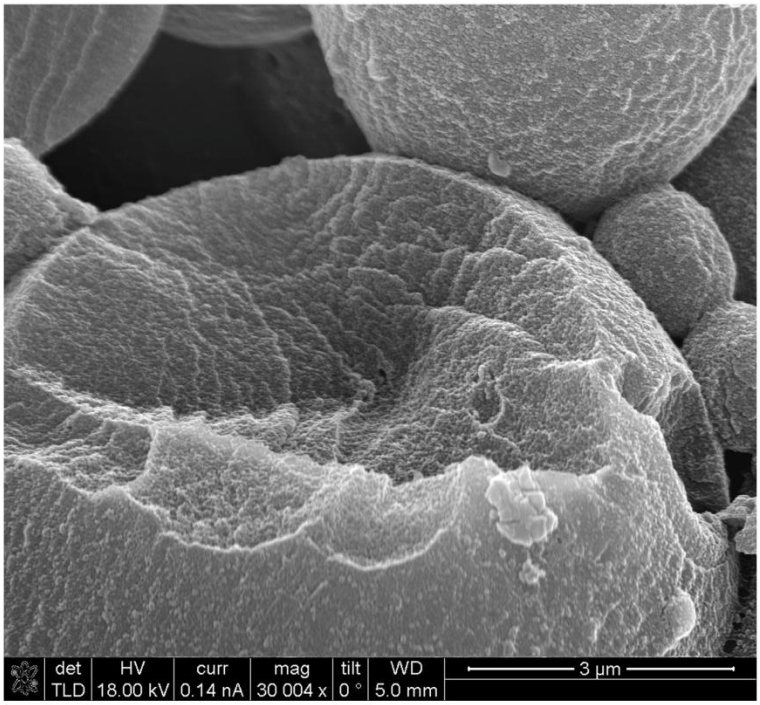
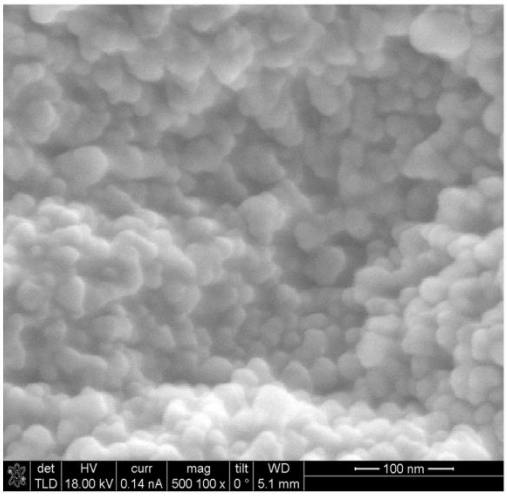
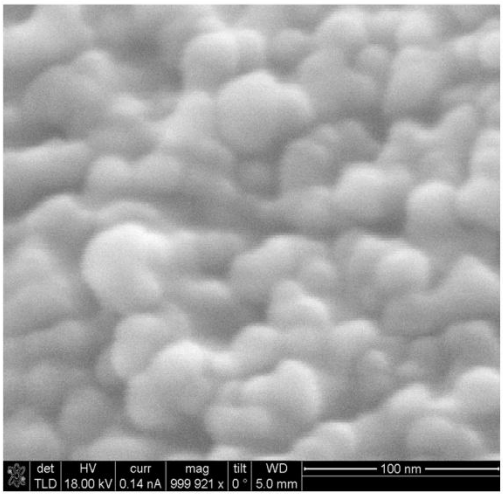


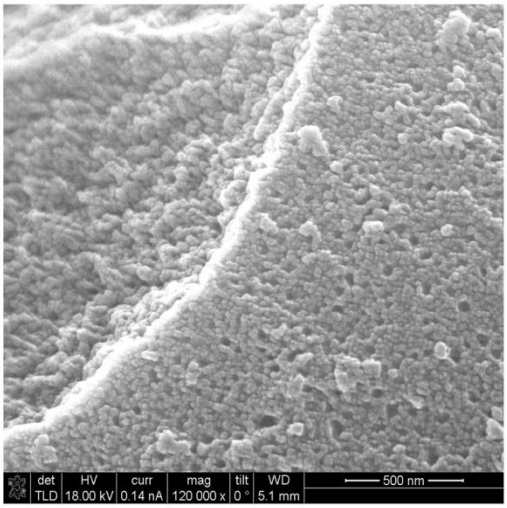
Fig. 7 Microscopía Electrónica de barrido de l alta resolución: permite observar la superficie porosa de estos "carriers".



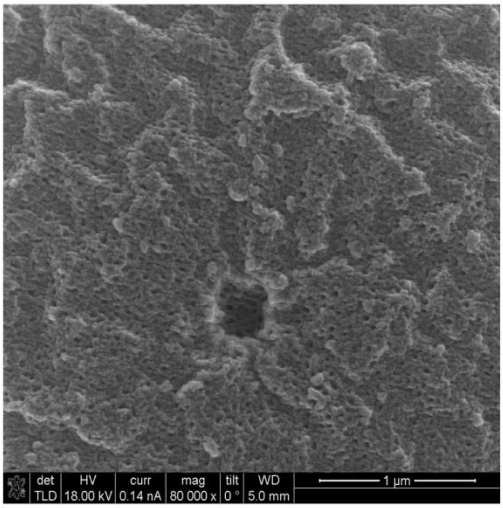
Micrografía 1



Micrografía 2



Micrografía 3

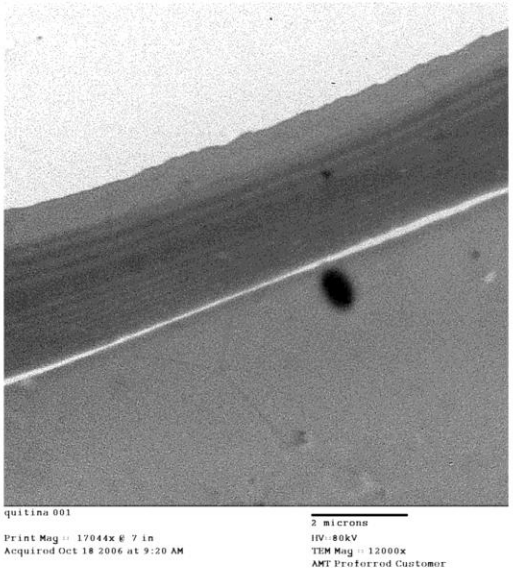


Micrografía 4

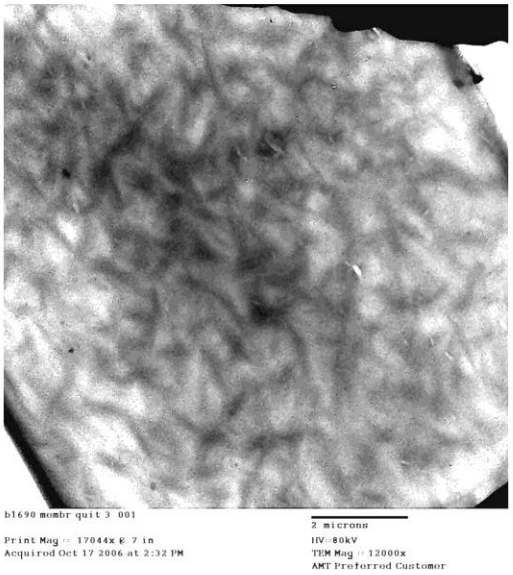
Fig. 8 Microscopía Electrónica de barrido de alta resolución: Las micrografías 1 y 2 muestran la estructura interna del material luego del daño mecánico . La micrografía 3 muestra con más detalle la superficie e interior de una esfera. La micrografía 4 permite ver superficie e interior a través del orificio correpondiente al eje de giro, de una esfera que no ha sufrido daño mecánico.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Se pudo comprobar la formación de films de quitosano de aproximadamente 12 µm de espesor, y se comparó la estructura de la quitina perteneciente al exoesqueleto de un espécimen de *Drosophila melanogaster* con un film de quitosano preparado en el laboratorio (Fig 9 Micrografías 1 y 2). Encontramos un ordenamiento laminar para la quitina y una estructura mucho más desorganizada para el producto formado con quitosano.
Con esta técnica también pudimos comprobar la obtención de nanopartículas de plata en un rango promedio de entre 8 y 40 nm (Fig. 9 Micrografía 3)
No se obtuvieron datos significativos sobre la estructura interna de las microesferas utilizando esta microscopía (Fig 9 Micrografía 4)

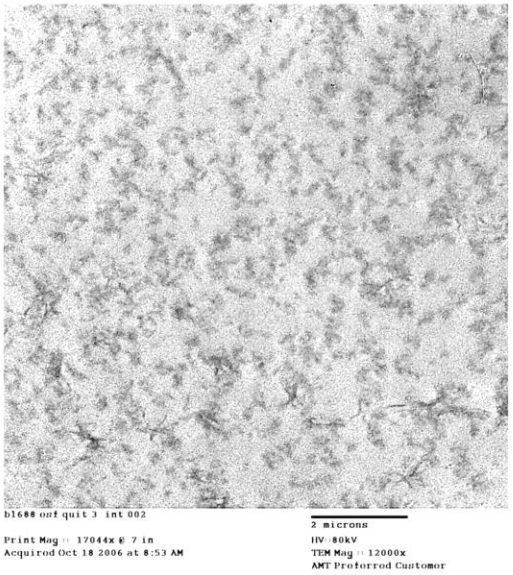


Micrografía 1



Micrografía 2

Micrografía 3

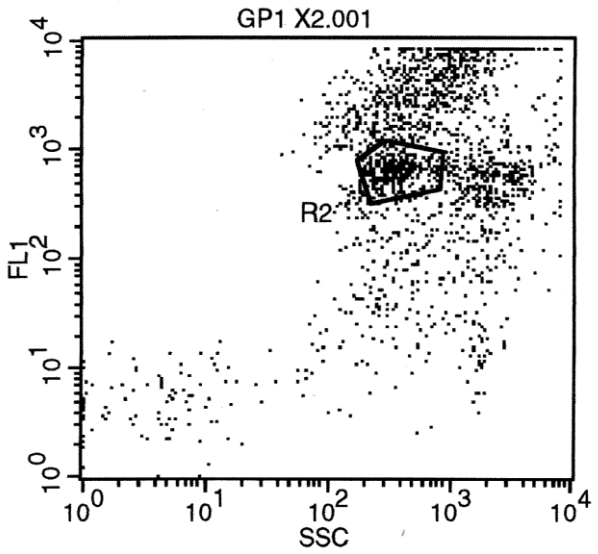


Micrografía 4

Fig. 9 Microscopía electrónica de transmisión: La microfotografía 1 muestra un corte transversal de un exoesqueleto de quitina de insecto, en este caso de *Drosophila melanogaster*. La microfotografía 2 muestra un corte transversal de una membrana de quitosano de unas 13 micras de espesor, donde se denota una estructura desordenada respecto a la quitina. La microfotografía 3 muestra las nanopartículas de plata que se utilizaron para funcionalizar la membrana de quitosano. La microfotografía 4 muestra una sección de una microesfera.

Citometría de Flujo

Como se puede observar en el gráfico de fluorescencia (FL1) contra luz dispersada lateralmente utilizando un detector a 180° (SSC), existe una mayor densidad de eventos en la zona que delimitamos y llamamos R2. Esta engloba 355 eventos de un total de 855 eventos, marcando que un porcentaje del 40% del total de esferas se concentra en una población homogénea dentro de un rango entre 6 y 12 µm según los patrones utilizados para la medición.



Region Statistics

File: GP1/X2.001	Log Data Units: Linear Values
Sample ID: GP1 X2	Patient ID: GP1 X2
Tube:	Panel:
Acquisition Date: 6-Jan-4	Gate: No Gate
Gated Events: 2000	Total Events: 2000
X Parameter: FSC (Linear)	Y Parameter: FL1 (Log)

Region	Events	X Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	885	308.56	2127.97	970.86	1, 3
R2	355	304.77	639.42	622.64	2, 3

Fig. 10 Se muestran las medidas de citometría de flujo, donde cada punto de la grafica corresponde a un evento, es decir, el pasaje de una partícula o "cluster" de ellas frente al detector. La región R1 presenta el total de eventos y la región R2 delimita una nube con alta densidad de eventos.

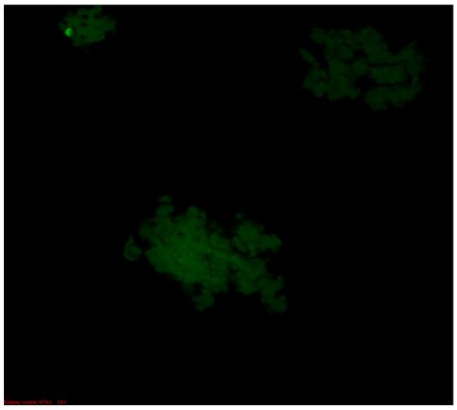
Microscopía Confocal de Barrido LASER

La capacidad de realizar cortes ópticos que brinda la microscopía confocal, nos permitió obtener información proveniente de cada "rodaja" en esferas conteniendo BSA y BSA-FITC, mientras estas mantuvieron su integridad estructural. La Fig. 11 muestra en la secuencia de la izquierda (micrografías 1,3 y 5), imágenes provenientes de un *cluster* de esferas, del corte ecuatorial de una esfera aislada y el stack o acumulado de todos los cortes de la misma esfera aislada cargada con BSA. La serie de la derecha, micrografías 2, 4 y 6, muestran los equivalentes pero en esferas cargadas con BSA-FITC.

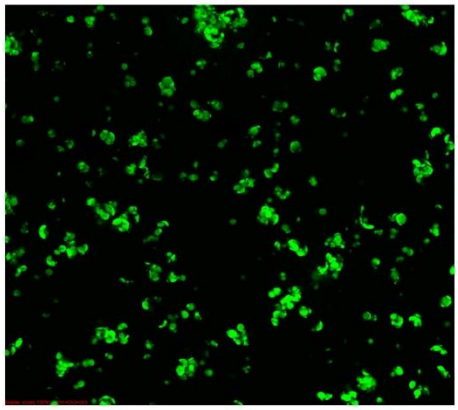
Se observó fluorescencia en las 2 series, siendo que en la primera serie se debió a la autofluorescencia del paraformaldehído y que es tomada como ruido; en la serie de la derecha se observó claramente una fluorescencia mucho mayor proveniente de la sonda. En la Fig. 12, se pudo apreciar una cantidad de fluorescencia similar en cada "rodaja", lo que evidenció una distribución homogénea de la proteína marcada en el volumen completo del *carrier* seleccionado.

Logramos fabricar micro vehículos de forma esférica y bien definida que permiten el diseño de fármacos de administración oral o inyectable, donde el grado de *swelling* es gobernado por la densidad de entrecruzamientos de la matriz polimérica (DINI et al., 2003).

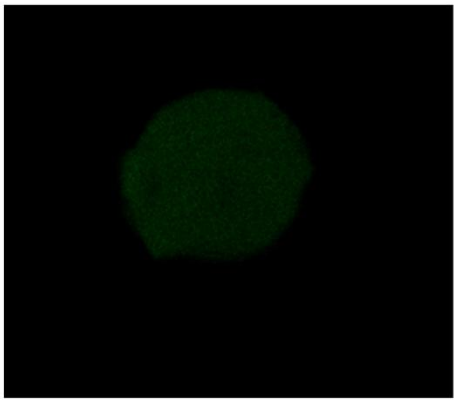
Observamos también la distribución uniforme del componente cargado en toda la matriz. Introduciendo las modificaciones adecuadas en las características estructurales y moleculares de las matrices, tendremos control sobre la tasa de descarga.



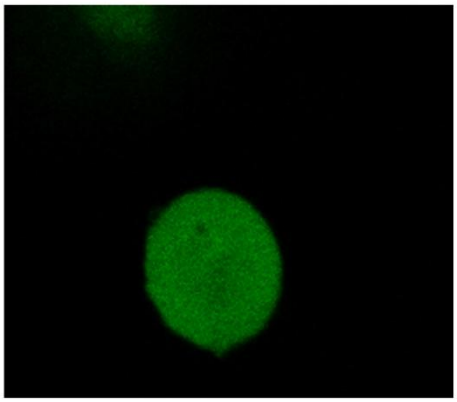
Micrografía 1



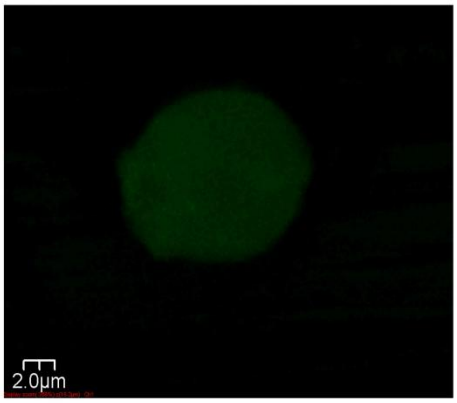
Micrografía 2



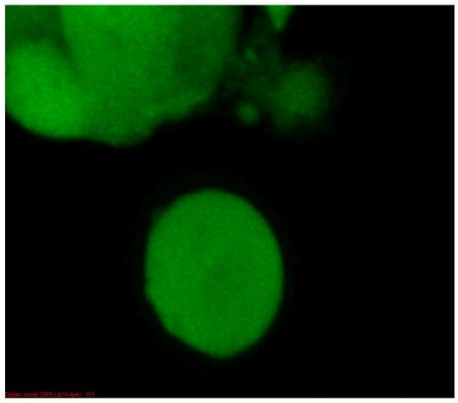
Micrografía 3



Micrografía 4



Micrografía 5



Micrografía 6

Fig. 11 Microscopía confocal de barrido LASER: La micrografía 1 presenta esferas control cargadas con BSA sin marcar, la fluorescencia residual proviene del agente entrecruzante; 2 presenta esferas cargadas con BSA-FITC. 3y4 muestran cortes ecuatoriales de esferas control y marcadas respectivamente. 5y6 muestran el "stack" de las esferas control y marcadas respectivamente.

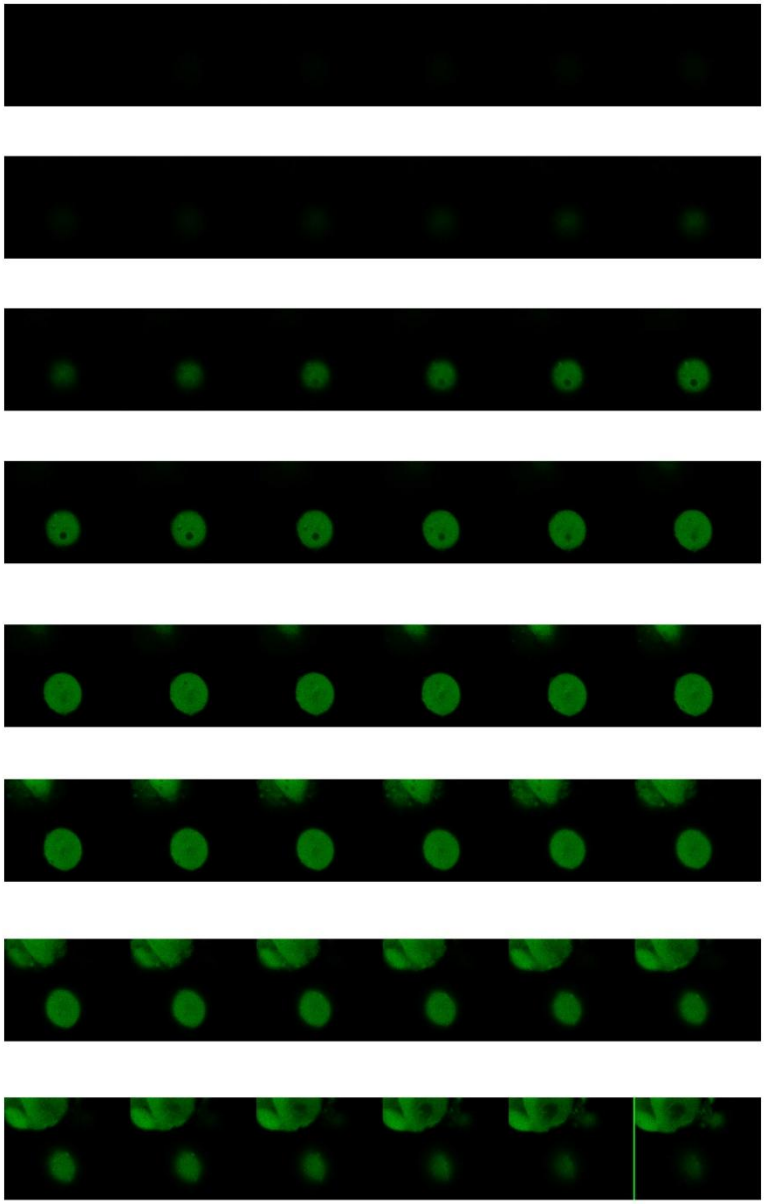


Fig. 12 Secuencia de cortes de Microscopía confocal de barrido LASER donde se aprecia la distribución uniforme de la BSA-FITC cargada en la totalidad de una microesfera.

Ensayos de liberación

Se realizaron ensayos de liberación con esferas cargadas con BSA, ADN y limoneno, realizando mediciones espectrofotométricas que nos permitieron comprobar la liberación de los bioactivos microencapsulados y determinar las cantidades descargadas por estos microvehículos. Las gráficas de concentración en función del tiempo mostraron los perfiles de liberación, presentando una descarga sostenida de las sustancias microencapsuladas durante el período de tiempo en que se realizaron los ensayos.

Cálculos de concentraciones en los ensayos de liberación

ADN

1) *Cálculos de concentraciones de los ensayos de liberación*

Estos cálculos de concentración fueron utilizados para graficar el perfil de liberación de las microesferas cargadas con ADN.

Se utilizó ADN 1 μg/ 1 μL diluido 1/100 y se midió su Abs_{260}

1 μg/ μL: diluido 10x → 0.1 μg/ μL: diluido 10x → 0.01 μg/ μL → UV, Abs_{260} = 1.1177

0.01 μg/ μL presenta una **Abs_{260} = 1.1177**

A = a.b.c donde A = 1.1177 (A = Abs_{260} leída por espectrofotometría) , b = 1 cm (paso óptico de la celda de cuarzo) y c = 0.01 (concentración de ADN) y a es la absortividad que queremos despejar:

Entonces a = 1.1177 / (1 x 0.01) = 111.77 μL/ μg.cm

La relación utilizada para los cálculos de concentración fue: A = 111.77 . c → **c = A / 111.77** (μg/ μL).

Ejemplo

Para t = 10 min, A = 0.2559 → c = 0.2259 / 111.77 = 0.002302 μg/ μL

2) *Cálculo estimativo de la concentración máxima*

Estos cálculos indican la concentración máxima teórica, donde suponemos que se logró microencapsular la totalidad del ADN utilizado en el ensayo. Así esperamos que la concentración de ADN liberado en el batch, tienda a este valor teórico.

Tomando la masa seca de microesferas obtenidas, como la masa utilizada de quitosano 2%, tenemos:

$m_{ESF} = m_{QUIT} =$ 3 mL . (2 g / 100 mL) = 60 mg

Teniendo en cuenta que se utilizaron 100 μg de ADN para microencapsular tenemos:

m_{ADN} / m_{ESF} = 100 µg / 60 mg

Como se utilizaron solo 50 mg de microesferas para los ensayos de liberación, entonces:

m_{ADN} dentro de las esferas = 50 (100 / 60) = 83.3333 µg de ADN

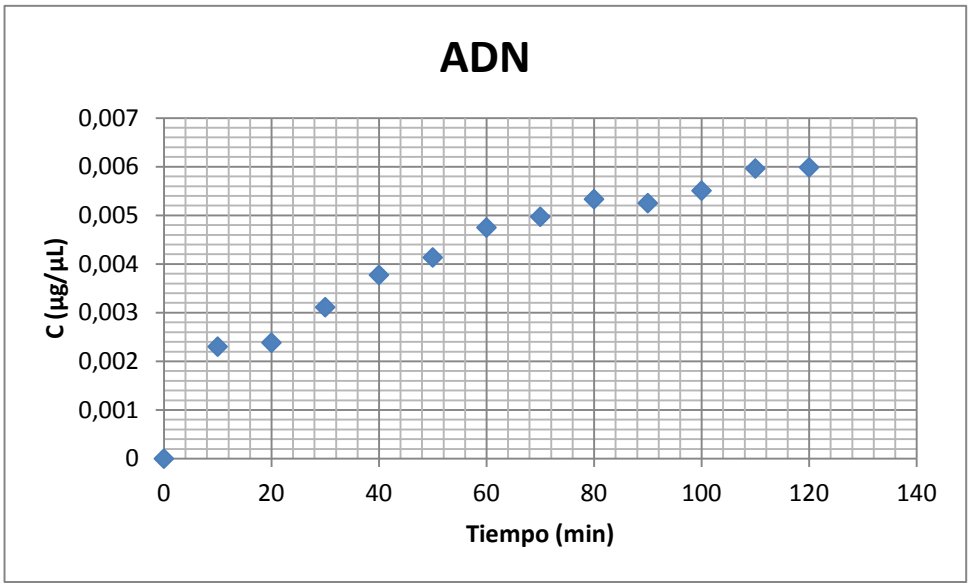
El batch utilizado para los ensayos de liberación contenía 50 mg de esferas en 15 mL de buffer, de esta manera la concentración de ADN máxima teórica es:

C_{MAX} = 83.3333 µg / 15 x 10^3 µL = **0.0056 µg/ µL**

Tabla 2 Concentración de ADN liberado en función del tiempo. Se muestran los valores de Absorbancia a medida que transcurre el tiempo, y la conversión de estos valores a medidas de concentración C.

ADN		
t (min)	Abs_{260}	C (µg/µL)
0	0	0
10	0,2559	0,002302
20	0,265	0,002384
30	0,3461	0,003113
40	0,4197	0,003775
50	0,4597	0,004135
60	0,5281	0,00475
70	0,5527	0,004971
80	0,5929	0,005333
90	0,5838	0,005251
100	0,6123	0,005507
110	0,663	0,005963
120	0,6655	0,005986

Max	**0.0056 µg/µL**



Gráfica 1 Perfil de liberación del ADN microencapsulado. Se muestra el aumento en la concentración del ADN en el sobrenadante del batch a medida que transcurre el tiempo.

BSA

1) ***Cálculos de concentraciones de los ensayos de liberación***

Siguiendo el mismo razonamiento que para el ADN microencapsulado, estos cálculos de concentración fueron utilizados para graficar el perfil de liberación de las microesferas cargadas con BSA.

Se utilizó BSA 10% diluida 1/10 y se midió su Abs_{280}

BSA 10%: diluida 10x → BSA 1%

10 g/ 100 mL = 0.1 g/ mL: diluido 10x → 0.01 g/ mL → UV, Abs_{280} = 1.8936

0.01 g/ mL presenta una **Abs_{280} = 1.8936**

A = a.b.c donde A = 1.8936 (Abs_{280} leída por espectrofotometría) , b = 1 cm (paso óptico de la celda de cuarzo) y c = 0.01 g (concentración de BSA) y a es la absortividad que queremos despejar:

Entonces a = 1.8936 / (1 x 0.01) = 189.36 mL/ g.cm

La relación utilizada para los cálculos de concentración fue: A = 189.36 . c → **c = A / 189.36** (g/ mL).

Ejemplo

Para t = 10 min, A = 0.1470 → c = 0.1470 / 189.36 = 0.000776 g/ mL = 0.776299 mg/ mL

2) ***Cálculo estimativo de la concentración máxima***

Estos cálculos indican la concentración máxima teórica, donde suponemos que se logró microencapsular la totalidad de la BSA utilizada en el ensayo. Así esperamos que la concentración de BSA liberada en el batch, tienda a este valor teórico.

Tomando la masa seca de microesferas obtenidas, como la masa utilizada de quitosano 2%, tenemos:

Teniendo en cuenta que se utilizaron 0.3 mL de BSA 10% para microencapsular, tenemos:

m_{BSA} = (10 g/100 mL) . 0.3 mL = 0.03 g = 30 mg

m_{ESF} = m_{QUIT} = 3 mL . (2 g / 100 mL) = 0.06 g = 60 mg

m_{BSA} / m_{ESF} = 30 mg_{BSA} / 60 mg_{ESF}

Como se utilizaron solo 50 mg de microesferas para los ensayos de liberación, entonces:

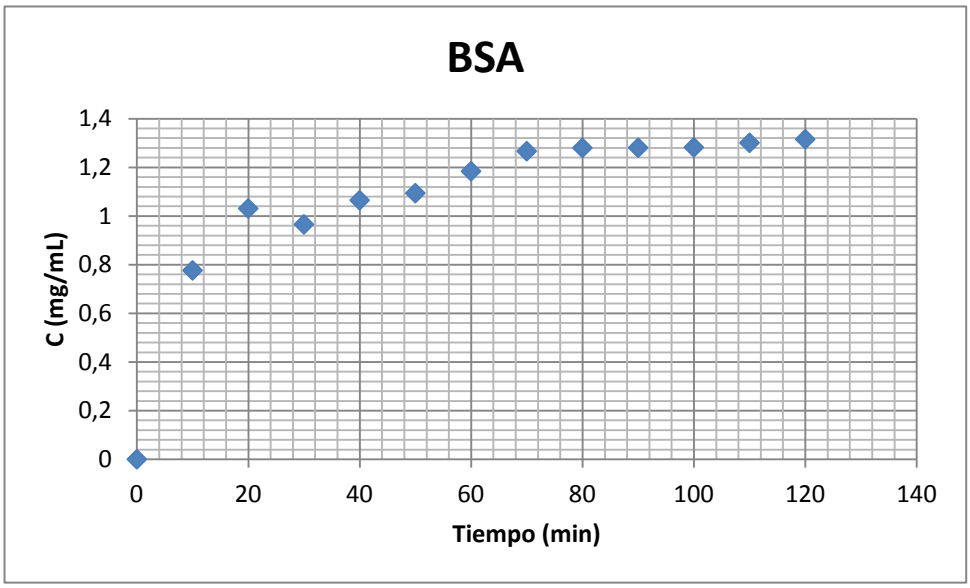
m_{BSA} dentro de las esferas = 50 mg (30 / 60) = 25 mg de BSA

El batch utilizado para los ensayos de liberación contenía 50 mg de esferas en 15 mL de buffer, de esta manera la concentración de BSA máxima teórica es: **C_{MAX} =** 25 mg / 15 mL = **1.6667 mg/ mL**

Tabla3 Concentración de BSA liberada en función del tiempo. Se muestran los valores de Absorbancia a medida que transcurre el tiempo, y la conversión de estos valores a medidas de concentración C.

BSA			
t (min)	Abs_{280}	C (g/mL)	C(mg/mL)
0	0	0	0
10	0,147	0,000776	0,776299
20	0,1952	0,001031	1,030841
30	0,1828	0,000965	0,965357
40	0,2016	0,001065	1,064639
50	0,2071	0,001094	1,093684
60	0,2242	0,001184	1,183988
70	0,2398	0,001266	1,266371
80	0,2424	0,00128	1,280101
90	0,2425	0,001281	1,280629
100	0,2428	0,001282	1,282214
110	0,2463	0,001301	1,300697
120	0,2491	0,001315	1,315484

Max	**1.6667 mg/mL**



Gráfica 2 Perfil de liberación de la BSA microencapsulada. Se muestra el aumento en la concentración de la BSA en el sobrenadante del batch a medida que transcurre el tiempo.

Velocidad de liberación

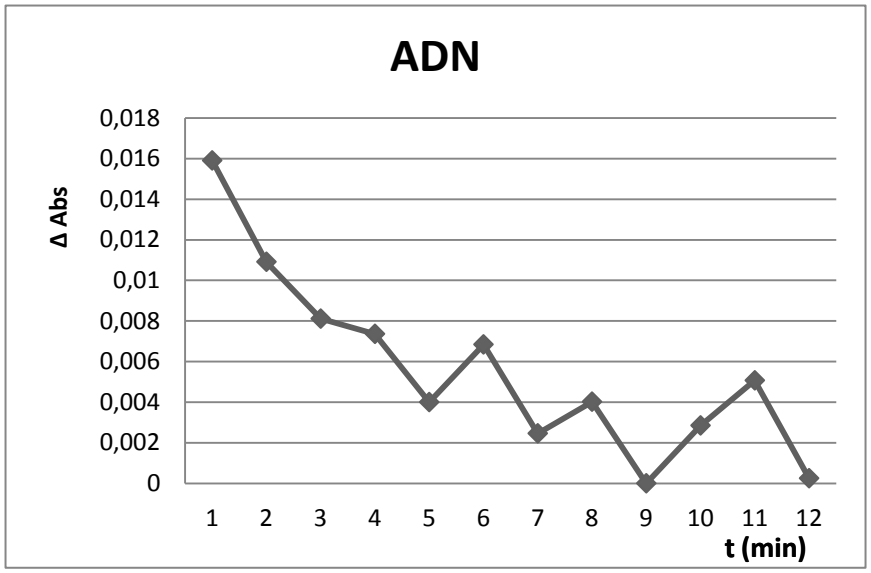
En los ensayos de liberación se realizaron mediciones de absorbancia cada 10 minutos. Calculando los ΔAbs y dividiendo entre 10, pudimos obtener gráficas que representan la velocidad con que las sustancias salen de las esferas por unidad de tiempo, lo que permitió tener una idea de la dinámica del proceso.

Tabla 4 Valores de Absorbancia a 260 nm tomados cada 10 minutos. Se calcularon los ΔAbs de valores consecutivos correspondientes a los intervalos de 10 min y se dividió entre 10 para obtener la variación de velocidad por minuto

ADN

intervalo	Abs_{260}	ΔAbs	Δabs/min
t0	0.000		
1	0.1559	0.1559_{t1-t0}	0.0159
2	0.265	0.1091_{t2-t1}	0.01091
3	0.3461	0.0811_{t3-t2}	0.00811
4	0.4197	0.0736_{t4-t3}	0.00736
5	0.4597	0.04_{t5-t4}	0.004
6	0.5281	0.0684_{t6-t5}	0.00684
7	0.5527	0.0246_{t7-t6}	0.00246
8	0.5929	0.0402_{t8-t7}	0.00402
9	0.5838	0.000^{*}_{t9-t8}	0.000*
10	0.6123	0.0285_{t10-t9}	0.00285
11	0.663	$0.0507_{t11-t10}$	0.00507
12	0.6655	$0.0025_{t12-t11}$	0.00025

*Los valores negativos se ajustaron a 0



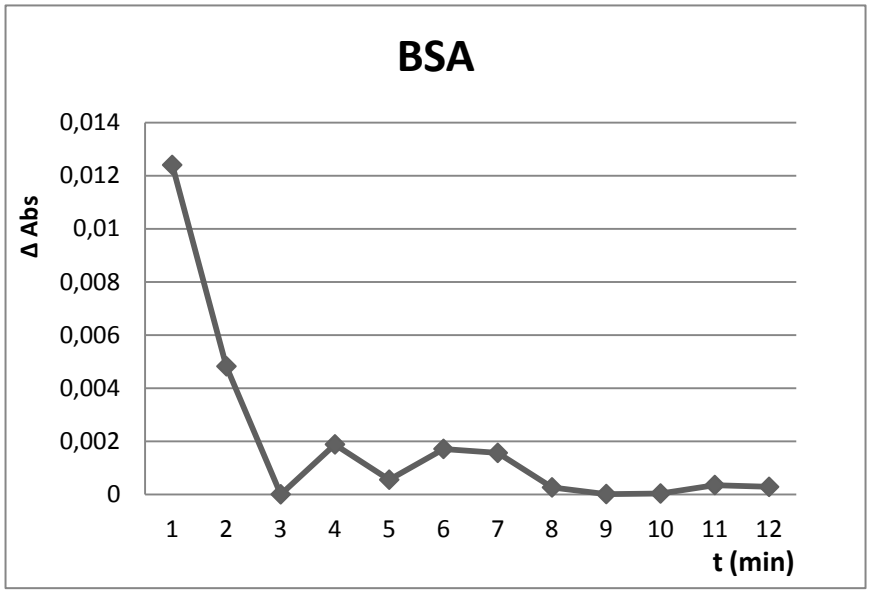
Gráfica 3 Presenta las variaciones de velocidad por minuto de la descarga de ADN desde las microesferas, incubadas en el batch de liberación con buffer fosfato pH 7.4

Tabla 5 Valores de Absorbancia a 280 nm tomados cada 10 minutos. Se calcularon los ΔAbs de valores consecutivos correspondientes a los intervalos de 10 min y se dividió entre 10 para obtener la variación de velocidad por minuto

BSA

intervalo	Abs_{280}	ΔAbs	Δabs/min
t0	0.023		
1	0.147	0.124_{t1-t0}	0.0124
2	0.1952	0.0482_{t2-t1}	0.00482
3	0.1828	0.000^{*}_{t3-t2}	0.000*
4	0.2016	0.0188_{t4-t3}	0.00188
5	0.2071	0.0055_{t5-t4}	0.00055
6	0.2242	0.0171_{t6-t5}	0.00171
7	0.2398	0.0156_{t7-t6}	0.00156
8	0.2424	0.0026_{t8-t7}	0.00026
9	0.2425	0.0001_{t9-t8}	0.00001
10	0.2428	0.0003_{t10-t9}	0.00003
11	0.2463	$0.0035_{t11-t10}$	0.00035
12	0.2491	$0.0028_{t12-t11}$	0.00028

*Los valores negativos se ajustaron a 0



Gráfica 4 Presenta las variaciones de velocidad por minuto de la descarga de BSA desde las microesferas, incubadas en el batch de liberación con buffer fosfato pH 7.4

La relatividad del comportamiento para el proceso de liberación del ADN mostró un decremento de la velocidad hasta los 50 min, donde esta se tornó algo irregular. Para la BSA se observó una rápida liberación hasta los 30 minutos y luego el comportamiento es mucho más estable. La velocidad inicial de ambos se corresponde con la descrita por otros autores, donde se describe tal efecto como

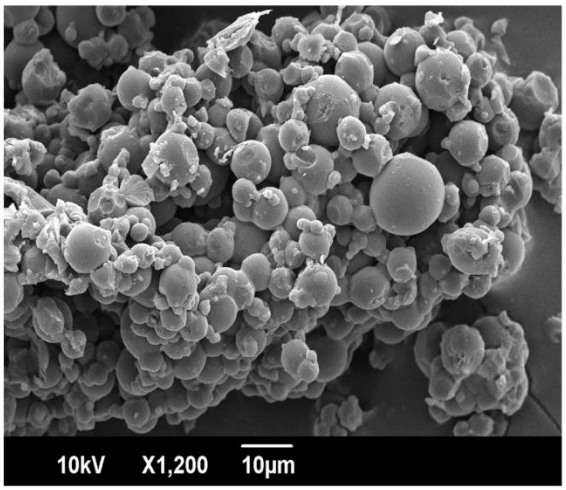
resultante de la desorción rápida del componente adherido a la superficie de las esferas. La irregularidad que se presenta para el ADN luego de los 50 min no constituye un problema para el objetivo buscado durante el envío de material genético a un sitio específico, dado que el éxito en una terapia de estas características será el de proteger el ADN hasta llegar al sitio de acción y mantener una alta concentración de ácidos nucleicos en el microambiente celular incrementando la oportunidad de que estos sean internalizados. En cambio la estabilidad obtenida en la velocidad de liberación de la BSA, permite programar una descarga controlada de forma cuantitativa, cuyo objetivo será la obtención de un método más preciso cuando se intenta definir la dosis de un fármaco o una hormona proteica durante un tratamiento médico.

Hemos obtenido un sistema biocompatible apto para la microencapsulación de drogas y bioactivos, donde la liberación controlada de los componentes permite ensayar diversas aplicaciones en la industria farmacéutica y en el diseño de probióticos.

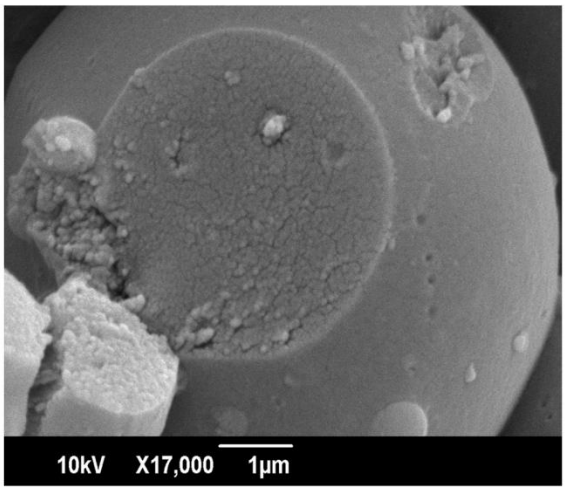
Pruebas de resistencia en medio ácido

Durante estas pruebas, se sometieron las esferas a ácido clorhídrico concentrado y a buffer fosfato pH 7.3 como control. Luego de los 40 días de incubación, se retiraron esferas de ambos batches y tras el secado de las mismas se les realizó microscopía electrónica de barrido para comparar la estabilidad estructural frente a esta agresión. Como se puede observar en la Fig. 13 no se observaron cambios en las esferas tratadas con ácido, lo que permite destacar la estabilidad de las mismas en un sistema digestivo durante la administración oral de un fármaco.). En el tránsito por el tracto digestivo los *carriers* deberán soportar la exposición a valores de pH tan bajos como 1 ó 2.

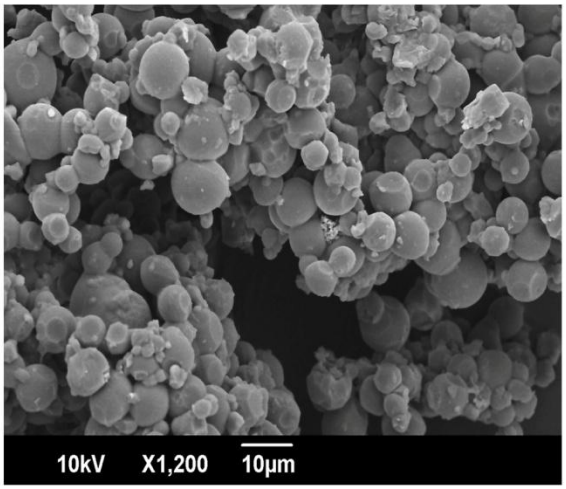
La resistencia de estos micro vehículos muestra el grado de protección que ofrecen a los componentes microencapsulados frente a ambientes hostiles, ya sea en la administración en sistemas vivos, el uso en reactores industriales, o durante períodos de almacenamiento.



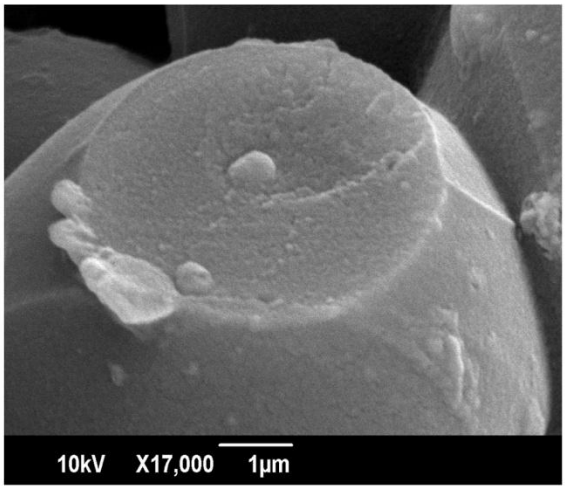
Micrografía 1



Micrografía 2



Micrografía 3



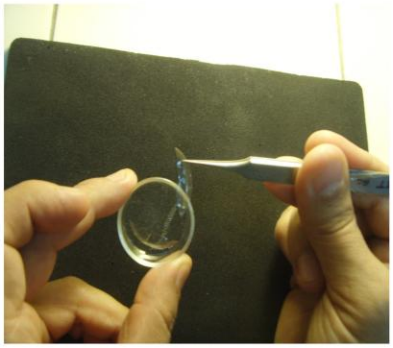
Micrografía 4

Fig. 13 Microscopía electrónica de barrido: En 1 y 2 se muestran esferas tratadas con ácido clorhídrico 10 % durante 40 días. En 3 y 4 sus controles los cuales se mantuvieron en agua bidestilada a pH neutro durante el mismo período de tiempo.

Membranas de soporte

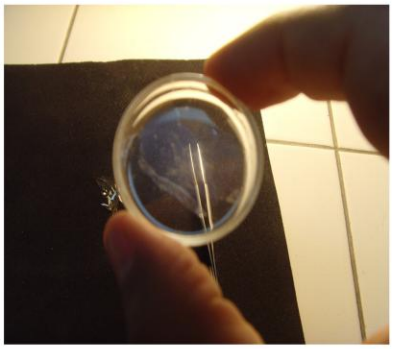
Se obtuvieron membranas transparentes y flexibles (Fig. 14) los cuales se han comenzado a utilizar en ensayos de cultivos celulares de neuroblastos. También se logró funcionalizar estas membranas con nanopartículas de plata, las cuales se encuentran en etapas de prueba para lograr la lisis de bacterias.

Fotografía 1



Fotografía 2

Fotografía 3



Fotografía 4

Fig. 14 Preparación de Films de quitosano: En la fotografía 1 se puede observar un film de quitosano:PEG el cual no presenta buena transparencia. Las fotografías 2 y 4 muestran films de quitosano totalmente transparentes y homogéneos. La fotografía 3 permite comparar la diferencia de transparencia entre los 2 tipos de films.

Conclusiones

Las microesferas y membranas de quitosano logradas en este trabajo presentan características y versatilidad adecuadas para el desarrollo de fármacos, vacunas, asociación con emulsiones de uso farmacéutico o cosmético, diseño de nutracéuticos, fabricación de agroquímicos, aplicación en procesos enzimáticos industriales y más, donde la liberación por períodos prolongados, la protección de componentes, la inmovilización o recuperación de sistemas catalíticos, forman parte de la solución a los problemas que surgen de las diversas estrategias que plantea el sector productivo para mejorar los rendimientos.

REFERENCIAS

A. Berthold, K. Cremer, J. Kreuter. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for antiinflammatory drugs. J. Controlled Release 39 (1996) 17-25.

Ahmed El-Ghaouth, Joseph L. Smilanick, Charles L. Wilson. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. Postharvest Biology and Technology 19 (2000) 103–110.

Ahmed El Ghaouth, Joseph Arul, Rathy Ponnampalam, Marcel Boulet. Chitosan Coating Effect on Storability and Quality of Fresh Strawberries. J. Food Science 56 (6) (1991) 1618-1620.

Amarildo Otavio Martins, Edson Luiz da Silva, Eduardo Carasek, Mauro C.M. Laranjeira, Valfredo T. de Fávere. Sulphoxine immobilized onto chitosan microspheres by spray drying: application for metal ions preconcentration by flow injection analysis. Talanta 63 (2004) 397-403.

Angela K. Pannier, Lonnie D. Shea. Controlled Release Systems for DNA Delivery. Molecular Therapy (2004) 1-8. Review.

B. F. Oliveira, M. H. A. Santana, M. I. Re´. Spray-Dried Chitosan Microspheres as a pDNA Carrier. Drying Technology 24 (2006) 373–382.

Benjaphorn Prapagdee, Kanignun Kotchadat, Acharaporn Kumsopa, Niphon Visarathanonth. The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. sp. *Glycines.* Bioresource Technology 98 (2007) 1353–1358.

Cenk Aral, Julide Akbuga. Preparation and *in vitro* transfection efficiency of chitosan microspheres containing plasmid DNA:poly(L-lysine) complexes. J. Pharm Pharmaceut Sci 6 (3) (2003) 321-326.

Cristóbal Lárez Velásquez. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica2008. UDO Agrícola 8 (1) (2008) 1-22.

Chetan B. Patel, Vilas G. Gaikar. Adsorption and Immobilization of Penicillin Acylase on Chitosan Beads. Separation Science and Technology 39 (11) (2004) 2655–2675.

E. Ait Barka, P. Eullaffroy, C. Clément, G. Vernet. Chitosan improves development, and protects Vitis vinifera L. against Botrytis cinerea. Plant Cell Rep 22 (2004) 608–614.

Eric Allémann, Robert Gurny, Eric Doelker. Drug-Loaded Nanoparticles – Preparation Methods and Drug Targeting Issues. Eur. J. Pharm. Biopharm. 39 (5) (1993) 173-191. Review.

E. B. Denkbas, M. Seyyal, E. Piskin. 5-Fluorouracil loaded chitosan microspheres for Chemoembolization. J. Microencapsulation 16 (6) (1999) 741- 749.

E. Dini, S. Alexandridou, C. Kiparissides. Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications. J. Microencapsulation 20 (3) (2003) 375–385.

Hetal Thakkar, R.K. Sharma, A.K. Mishra, Krishna Chuttani, R.S.R. Murthy. Celecoxib Incorporated Chitosan Microspheres: In Vitro and In Vivo Evaluation. J. Drug Targeting, 12 (9–10) (2004) 549–557.

I.M. Helander, E.L. Nurmiaho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. International Journal of Food Microbiology 71 (2001) 235–244.

J. Akbuga, N. Bergisadi. Effect of formulation variables on cis-platin loaded chitosan microsphere properties. J. Microencapsulation 16 (6) (1999) 697- 703.

J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57 (2004) 19–34.

K. G. H. Desai, H. J. Park. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. J. Microencapsulation 22 (4) (2005) 377–395.

Jong-Whan Rhim, Seok-In Hong, Hwan-Man Park, Perry K. W. Ng. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity. J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 5814-5822.

M. Zhang, X.H. Li, Y.D. Gong, N.M. Zhao, X.F. Zhang. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. Biomaterials 23 (2002) 2641-2648.

Pallab Sanpui, A. Murugadoss, P.V. Durga Prasad, Siddhartha Sankar Ghosh, Arun Chattopadhyay. The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag-nanoparticle composite. International Journal of Food Microbiology 124 (2008) 142-146 .

P.K. Dutta, Shipra Tripathi, G.K. Mehrotra, Joydeep Dutta. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Food Chemistry 114 (2009) 1173–1182.

P. Fernandez-Saiz, J.M. Lagaron, M.J. Ocio. Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. Food Hydrocolloids 23 (2009) 913–921.

Pradip Kumar, Joydeep Dutta, V.S. Tripathi. Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and aplications. J. Scientific & Industrial Research 63 (2004) 20-31.

Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus.* J. Biomed Mater Res 52 (4) (2000) 662-668.

Richelle L. Beverlya, Marlene E. Janes,_, Witoon Prinyawiwatkula, Hong K. No. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of Listeria monocytogenes. Food Microbiology 25 (2008) 534–537.

Senay Akkus Çetinus, H. Nursevin Öztop. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. Enzyme and Microbial Technology 32 (2003) 889–894.

Sandipan Chatterjee, Sudipta Chatterjee, Bishnu P. Chatterjee, Arun K. Guha. Clarification of fruit juice with chitosan. Process Biochemistry 39 (2004) 2229–2232.

S. Dhawan, A.K. Singla. Nifedipine loaded chitosan microspheres prepared by emulsification phase-separation. Biotechnic & Histochemistry 78 (5) (2003) 243-254.

Sanju Dhawan, Anil Kumar Singla, Vivek Ranjan Sinha. Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods. AAPS PharmSciTech 5 (4) (2004) 1-7. Article 67.

S. K. Jain, M. K. Chourasia, A. K. Jain, and R. K. Jain, A. K. Shrivastava. Development and Characterization of Mucoadhesive Microspheres Bearing Salbutamol for Nasal Delivery. Drug Delivery 11 (2004) 113–122.

Sang-Hoon Lim, Samuel M. Hudson. Application of a fiber-reactive chitosan derivative to cotton fabric as an antimicrobial textile finish. Carbohydrate Polymers 56 (2004) 227–234.

S. N. Chirkov. The Antiviral Activity of Chitosan (Review). Applied Biochemistry and Microbiology 38 (1) (2002) 1-8.

Suna Özbas-Turan, Julide Akbuga, Cenk Aral. Controlled Release of Interleukin-2 from Chitosan Microspheres. J. Pharmaceutical Sciences 91 (5) (2002) 1245-1251.

Sunil A. Agnihotri, Nadagouda N. Mallikarjuna, Tejraj M. Aminabhavi. Recent advances on chitosan-based-micro- and nanoparticlesin drug delivery. J. Controlled Release 100 (2004) 5-28.

Takanori Fujimoto, Yasuo Tsuchiya, Michinori Terao, Kazutoshi Nakamura, Masaharu Yamamoto. Antibacterial effects of Chitosan solution against Legionella pneumophila, Escherichia coli, and Staphylococcus aureus. International Journal of Food Microbiology 112 (2006) 96–101.

T. Majima, T. Irie, N. Sawaguchi, T. Funakoshi1, N. Iwasaki, K. Harada, A. Minami, S-I Nishimura. Chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibre scaffold for ligament and tendon tissue engineering. J. Engineering in Medicine 221 (2007) 537-546.

V. Levi, F.L. González Flecha. Reversible fast-dimerization of bovine serum albumin detected by fluorescenceresonance energy transfer. Biochim Biophys Acta 1599 (1-2) (2002) 141-148.

V.R. Sinha, A.K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. International Journal of Pharmaceutics 274 (2004) 1–33. Review.

Wunwisa Krasaekoopt, Bhesh Bhandari, Hilton C. Deeth. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. LWT 39 (2006) 177–183.

Wing-Fu Lai, Marie Chia-Mi Lin. Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives. J.Controlled Release 134 (2009) 158–168. Review.

Xiao-fang Li, Xiao-qiang Feng, Sheng Yang, Guo-qing Fu, Ting-pu Wang, Zhong-xing Su. Chitosan kills Escherichia coli through damage to be of cell membrane mechanism. Carbohydrate Polymers 79 (3) (2010) 493-499

Ying-Chien Chung, Chih-Yu Chen. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. Bioresource Technology 99 (2008) 2806–2814.

Yingju Fan, Zhen Liu, Le Wang. Synthesis of Starch-Stabilized Ag Nanoparticles and Hg^{2+} Recognition in Aqueous Media. Nanoscale Res Lett 4 (2009) 1230-1235.

Yoshinori Kato, Hiraku Onishi, Yoshiharu Machida. Application of Chitin and Chitosan Derivatives in the Pharmaceutical Field. Current Pharmaceutical Biotechnology 4 (2003) 303-309.