

## PROTEINAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA MICROENCAPSULADAS, ULTRAESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN DE CARGA

Alvaro D. Olivera<sup>1</sup>, Maria F. Barreiro<sup>2</sup>, Mary Lopretti<sup>1,3</sup>\*

1) Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: [mlopre@fcien.edu.uy](mailto:mlopre@fcien.edu.uy)

2) Laboratório de Processos de Separação e Reação (LSRE), Laboratório Associado LSRE/LCM, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Santa Apolónia Ap. 1134, 5301-857 Bragança, Portugal.

3) Laboratorio de Tecnológico del Uruguay (LATU), Avenida Italia, 6201 Montevideo, Uruguay

*Recibido: Mayo 2014; Aceptado: Junio 2014*

### RESUMEN

En este trabajo se prepararon microesferas de quitosano cargadas con BSA como proteína modelo, con el objetivo de estudiar el comportamiento de estos sistemas para la microencapsulación de fármacos y bioactivos. La metodología empleada nos permitió obtener información ultraestructural de estos microvehículos, sobre la resistencia a bajos valores de pH, de la distribución del componente encapsulado, y conocer los perfiles de descarga.

**Palabras claves:** quitosano, microesferas, ultraestructura, distribución de carga,

### ABSTRACT

In this work chitosan microspheres loaded with BSA, used as a model protein, have been produced, aiming to study the behavior of these systems for the microencapsulation of drugs and bioactives. The used methodologies allowed obtaining data concerning ultra-structural information of the produced micro-vehicles, on its resistance at low pH, on encapsulated active principle distribution, and know its release profiles.

**Keywords:** chitosan, microspheres, ultrastructure, release profile, pH resistance.

### INTRODUCCION

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” del fármaco durante el transporte y una pobre estabilidad durante el período de almacenaje [1]. El quitosano (1-4-β 2-amino-2-deoxi-D-glucosa o D-glucosamina) es un polisacárido con excelentes propiedades biológicas. 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 es motivo de su actividad biocida [2]. Este polímero biocompatible y biodegradable encuentra diversas aplicaciones en el área biomédica como vehículo para la entrega y descarga controlada de fármacos, *Agnihotri et al.* [3], *Kato et al.* [4]. Estos sistemas son utilizados para distribuir o transportar drogas dentro del organismo, orientados a un órgano, tejido, o grupo de células, permitiendo programar un perfil de descarga del componente microencapsulado, mientras llevan “a salvo” el agente terapéutico para alcanzar una concentración efectiva en el sitio de acción específico. Pueden cargar varios

componentes activos, beneficiando la distribución, la retención en el organismo, o incrementando la eficacia del tratamiento mientras suprimen los mecanismos sistémicos o celulares que pueden limitar la respuesta terapéutica de la droga.

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, se puede enlazar un sistema de guía diseñado según especificaciones concretas, y otros componentes funcionales pueden ser enviados dentro del mismo transportador. La presencia de grupos amino facilita la unión de distintos componentes permitiendo la funcionalización de los microvehículos.

El objetivo de este trabajo se centró en estudiar la compatibilidad y el comportamiento de proteínas con este tipo de matriz, con la meta de lograr la inserción de estos sistemas en el sector productivo. La metodología y técnicas de análisis empleadas, nos permitieron estudiar la distribución del componente microencapsulado en el volumen completo de estos sistemas, calcular el porcentaje de liberación y determinar la cinética de descarga.

## PARTE EXPERIMENTAL

**Procedimiento de marcación de la BSA con FITC.** Se preparó de acuerdo al protocolo de *Levi y Gonzalez* [5], con ligeras modificaciones. Se disolvieron 30 mg de seroalbúmina bovina (BSA) (SIGMA) fracción V en 1 mL de amortiguador MES 60 mM pH 7.9, para obtener una concentración final de 450  $\mu\text{M}$ . Se agregó FITC en DMSO hasta alcanzar una concentración final de 500  $\mu\text{M}$  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 en la oscuridad a 4°C usando como disolvente un tampón de fosfato de sodio 50 mM de pH 7,4. Se determinó la estequiometría del marcado como una molécula de FITC por molécula de BSA. 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 494 nm, con un coeficiente de absorptividad molar de  $68.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

**Producción de microesferas de quitosano.** En este trabajo se puso a punto la técnica de entrecruzamiento con glutaraldehído reportada por *Thanoo et al.* [6] con algunas modificaciones [7]. La misma se basa en la formación de una emulsión agua en aceite con la posterior adición de un agente entrecruzante que coagula las microgotas formadas por la fase dispersada. En condiciones de agitación constante a 1.100 rpm, se agregó la fase dispersa por goteo lento a una velocidad de 5 mL/minuto. A continuación se adicionó por goteo, 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 durante 2,5 horas. Una vez finalizado este proceso, se dejó decantar por 24 horas a temperatura ambiente. Para la recolección de las microesferas se empleó un sistema de filtración con bomba de vacío. Se utilizó un kitasato de vidrio y embudo *Buchner* de porcelana con filtro de 0,8  $\mu\text{m}$  (*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 del entrecruzante, finalizando nuevamente con éter de petróleo. Se dejaron secar a temperatura ambiente.

**Preparación de la fase dispersa.** Se disolvió quitosano al 2,0% (peso/vol) en ácido acético al 5% acuoso (a partir de ácido acético glacial *Merck*) en agitación continua 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 continúa.** Se mezclaron en un matraz Erlenmayer, aceite de girasol y Span 80 al 0,5% (peso/vol) como tensoactivo.

**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 descrito anteriormente.

Para la BSA marcada, se disolvieron 30 mg de BSA marcada con FITC en 3,6 mL 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.

**Ensayos de liberación.** Se siguió un procedimiento basado en los ensayos de Dini et al. [8]. Se pesaron 50 mg de microesferas cargadas con BSA y 50 mg cargadas con ADN.

Se preparó un batch resuspendiendo las esferas cargadas con BSA en 15 mL de buffer fosfato pH 7,4. Se agitaron vigorosamente de forma manual y se retiró 1,0 mL del batch, se centrifugó durante 20 segundos en una minífuga *Beckman Microfugue E*. El sobrenadante se colocó en cubeta de cuarzo y se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro *Varian Cary 50 Tablet UV-Visible Spectrophotometer* a 280 nm. Esta primer medición se tomó como tiempo inicial. Después de cada medida se devolvieron las muestras a su batch original, el cual se mantuvo en agitación constante a 80 rpm en un agitador orbital *Labnet Intenational Inc. modelo 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. Como control, se incubaron microesferas en agua bidestilada a pH 7 durante el mismo período.

**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 *Olympus BX40* 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 20 kV en la unidad de microscopía electrónica de barrido de la Facultad de Ciencias – U de la R. Las esferas tratadas en medio ácido y sus controles a pH neutro, se cubrieron con oro/paladio durante 4,5 minutos 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 ultramicrotomo 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 80 kV, con cámara digital acoplada *Hamamatsu Digital Camera CCD 4742-95* y software de control *AMT Advantage*.

**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 12  $\mu\text{m}$ .

**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 488 nm en un microscopio de barrido láser confocal marca *Olympus Fluo VIEW FV 300* de la Unidad de microscopía confocal del IIBCE.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La microscopía óptica 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 (Figura 1A), tiene mayor incidencia luego del proceso de secado de las mismas, siendo que mientras se mantuvieron en suspensión, se mostraban unidades esferoidales más discretas (Figura 1B).

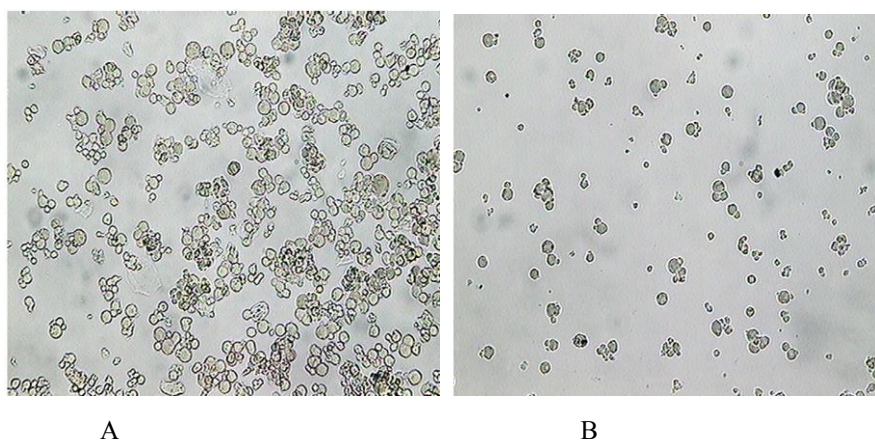


Figura 1. Micrografías de microscopía óptica mostrando microesferas de quitosano cargadas con BSA. A fueron secadas y resuspendidas en agua bidestilada, B se mantuvieron en humedad y se resuspendieron en agua bidestilada.

Se obtuvieron microesferas entre 1 y 20 micras de diámetro (Figura 2). Según los datos aportados por la citometría de flujo, se puede observar en la gráfica de fluorescencia (FL1) contra luz dispersada lateralmente utilizando un detector a 180° (SSC) (Figura 3), que 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 intervalo entre 6 y 12  $\mu\text{m}$  según los patrones utilizados para la medición.

La microscopía confocal permitió determinar que el componente microencapsulado se

distribuye de manera homogénea en todo el volumen de la matriz polimérica (Figura 4).

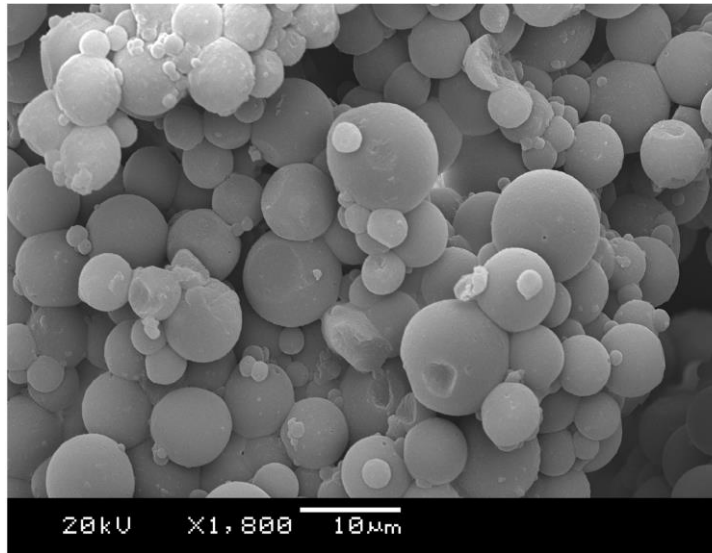
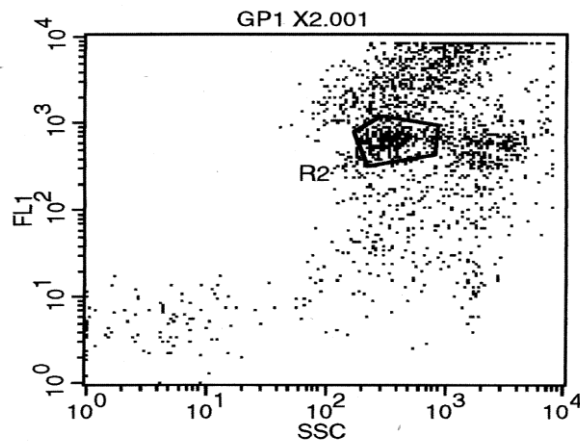


Figura 2. Micrografía SEM mostrando microsferas de quitosano.



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

**Figura 3.** Se muestran las medidas de citometría de flujo, donde cada punto de la figura 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

Los ensayos de liberación y datos cinéticos (Figura 5) sobre una producción de 50,0 mg de

microesferas cargadas, muestran una buena eficiencia de incorporación del material prototipo así como la liberación de casi la totalidad del mismo en el lapso de tiempo ensayado.

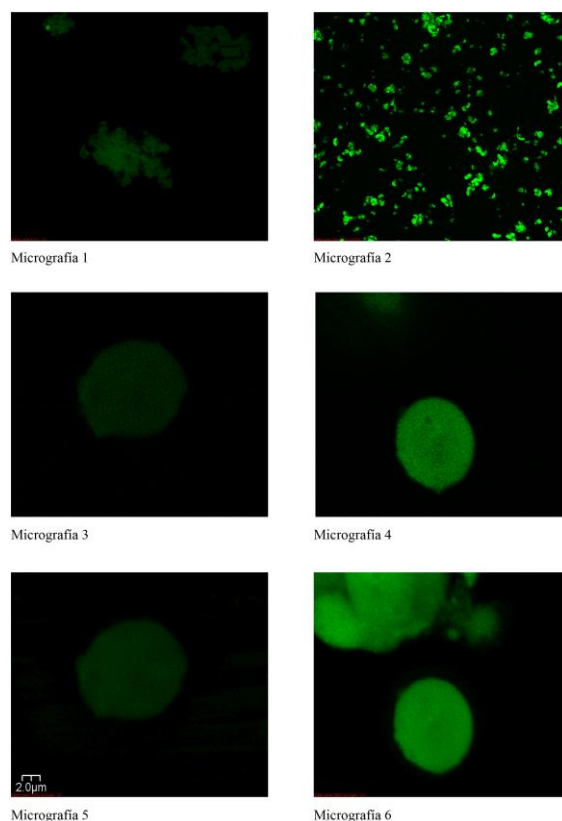


Figura 4. Microscopía confocal de barrido laser. La micrografía 1 presenta esferas control cargadas con BSA sin marcar, la fluorescencia residual proviene del entrecruzante; la figura 2 presenta esferas cargadas con BSA-FITC; las figuras 3 y 4 muestran cortes ecuatoriales de esferas control y marcadas respectivamente; y las figuras 5 y 6 muestran el “stack” de las esferas control y marcadas, respectivamente

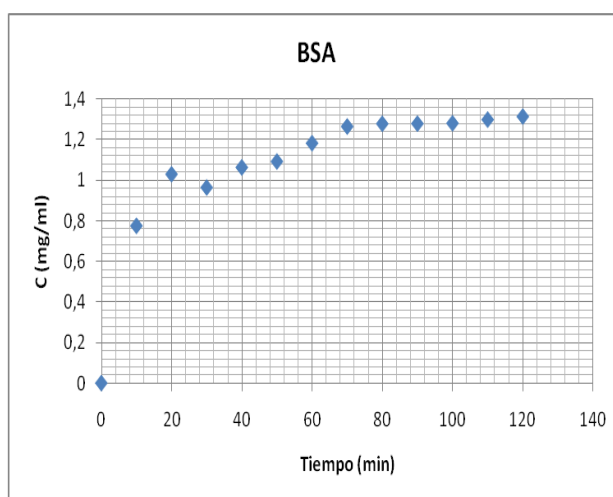


Figura 5. Perfil de liberación de la BSA microencapsulada.

La microscopía electrónica de barrido de alta resolución nos permitió 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. Mostrando una matriz mucho más granular, estas microesferas se parecen más a una esponja donde se observan perfectamente 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 (Figura 6, micrografías 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

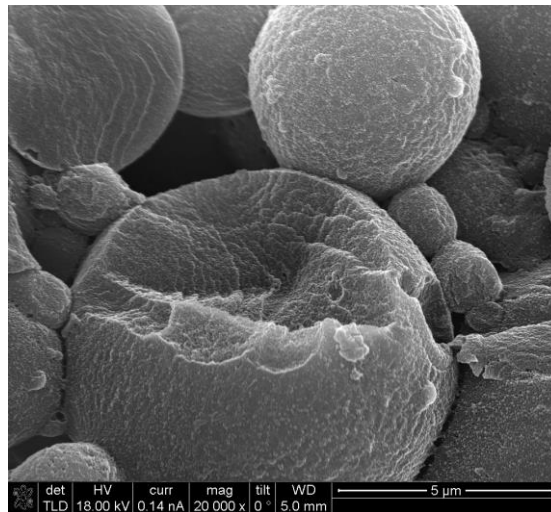


Figura 6. Microscopía electrónica de barrido de alta resolución. Imagen panorámica y zoom de estos microvehículos, donde se observa la superficie de una esfera y el interior de una sola esfera Micrografías 1 (500.100X) y 2 (999.921X).

La microscopía electrónica de transmisión no nos aportó datos relevantes sobre estructura interna y distribución de carga para estos transportadores.

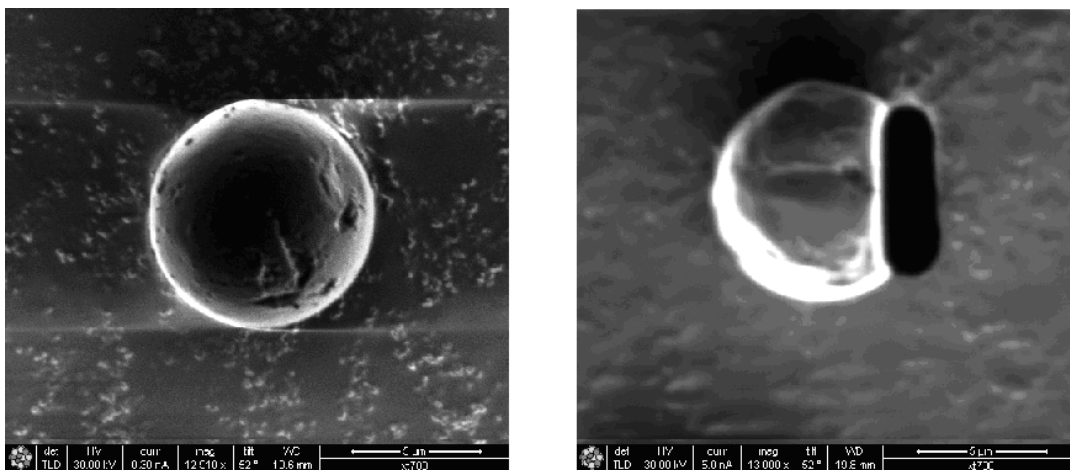
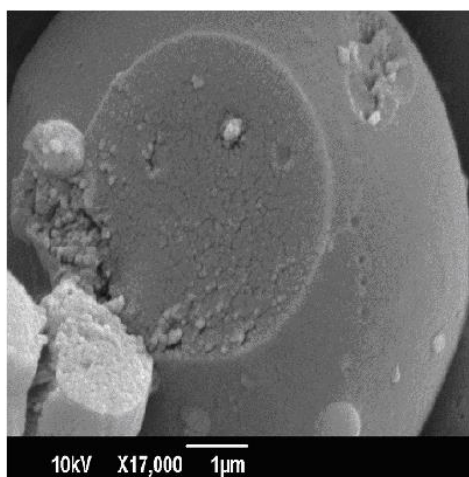


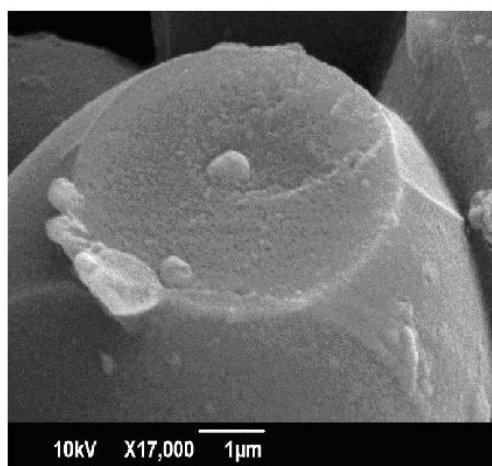
Figura 7. Microscopía electrónica de barrido de alta resolución de una esfera de quitosano antes y después del corte con el haz de iones. Se puede observar el deterioro del material durante el proceso.



El tratamiento en medio ácido mostró la gran resistencia que presentan estos transportadores a pH bajos, no presentando mayores diferencias estructurales entre las esferas incubadas en ácido clorhídrico y las incubadas en agua destilada a pH neutro (Figura 8).



Micrografía 1



Micrografía 2

Figura 8. La micrografía 1 muestra las esferas tratadas con HCl al 10% durante 40 días, y la micrografía 2 muestra las esferas control incubadas en agua destilada a pH neutro.

## CONCLUSIONES

Se mostró que estos sistemas son compatibles con compuestos de interés en tratamientos médicos (hormonas, biofármacos, etc.). La resistencia que presentan estos carriers a bajos valores de pH, permite mantener a salvo el componente microencapsulado durante su tránsito por el tracto digestivo. El empleo de un polímero con actividad biocida incrementa la protección de los bioactivos. Las características de retención de estas matrices, permiten obtener nuevamente en forma libre todo el agente microencapsulado, posibilitando así la programación de dosis de acción terapéutica. La conjunción de estas propiedades viabilizan su desarrollo y aplicación en la industria farmacéutica.

Una amplia gama de aplicaciones en el área médica, industrial y medio ambiente se abren por la posibilidad de microencapsular más de un componente bioactivo en forma de consorcios. Ejemplo de esto son los consorcios enzimáticos en una misma matriz que permite diseñar sistemas multienzimáticos que realicen vías metabólicas deficitarias, o tratamientos ambientales de biorremediación, etc.

Si bien este tipo de encapsulación biocompatible permite obtener una liberación gradual del bioactivo en un organismo vivo, fue nuestro objetivo controlarlo en tiempos no muy prolongados, con el fin de estudiar el comportamiento del sistema prototipo. En futuros trabajos, basados en estos resultados, se ensayará la liberación de bioactivos específicos en sus sitios de acción.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] Allémann E, Gurny R, Doelker E, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **39**(5), 173 (1993)

- [2] Lárez Velásquez C, *UDO Agrícola* **8**(1), 1 (2008)
- [3] Agnihotri S, Mallikarjuna N, Aminabhavi T, *J. Cont. Rel.* **100**, 5 (2004)
- [4] Kato Y, Onishi H, Machida Y, *Curr. Pharm. Biotech.* **4**, 303 (2003)
- [5] Levi V, Gonzalez Flecha F, *Biochim. Biophys. Acta* **1599** (1–2), 141 (2002)
- [6] Dhawan S, Kumar Singla A, Ranjan Sinha V, *AAPS PharmSciTech* **5**(4) 67 (2004)
- [7] Olivera A, Barreiro F, Lopretti M, *Rev. Iberoam. Polim.* 13(5), 238 (2012)
- [8] Dini E, Alexandridou S, Kiparissides C, *J. Microencap* **20**(3), 375 (2003)