

ENCAPSULACIÓN DE UN ESTEROIDE EN MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANO

Anna K. Collado Coello¹, Giselle H. Campoalegre², Vladimir N. Morejón², Francisco C. Manchado², Elián C. Peñalver³, Carlos P. Covas⁴

¹) Centro de Biomateriales (BIOMAT), Universidad de La Habana. La Habana, Cuba. Correo electrónico: akcollado@biomat.uh.cu

²) Centro de Estudios de Productos Naturales (CEPN), Universidad de la Habana, Cuba. Correo electrónico: giselle_hernandez@fq.uh.cu

³) Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana, Cuba. Correo electrónico: elian.cruz@cigb.edu.cu

⁴) Facultad de Química, Universidad de la Habana Cuba. Correo electrónico: peniche@fq.uh.cu

Recibido: Diciembre de 2015; Aceptado: Junio 2016

RESUMEN

El DI-31 análogo sintético de brasinoesteroides, es el principio activo (PA) del Biobras-16, bioestimulador del crecimiento de la planta que ha demostrado impacto positivo en la agricultura cubana, sobre todo en el cultivo de arroz. Sin embargo, tiene el inconveniente de presentar baja solubilidad en agua y de ser metabolizado rápidamente por las plantas. Una alternativa para superar estas limitaciones es su microencapsulación en una matriz polimérica. Se ha investigado que el quitosano constituye un excelente candidato para la microencapsulación de DI-31. El quitosano es un polisacárido natural obtenido a partir de quitina extraída de los exoesqueletos de los crustáceos, que aumenta la resistencia de las plantas al ataque de plagas y promueve el rendimiento de los cultivos, posee además una excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y mucoadhesividad, induciendo también la defensa de las plantas contra el ataque de diferentes patógenos.

Palabras clave: matriz polimérica, quitosano, microsferas, secado por aspersión, DI-31

ABSTRACT

The DI-31, synthetic analogue of brassinoesteroids, is the active principle (AP) of 16 Biobras, bio-stimulator of plant growth that has proven positive impact on Cuban agriculture. However, it has the disadvantages of low solubility in water and the speed with which plants metabolize it. One alternative to overcome these limitations is its microencapsulation into polymeric matrix. It has been investigated that the chitosan constitute an excellent candidate for microencapsulation of DI-31. Chitosan is a natural polysaccharide obtained from chitin extracted from the exoskeletons of crustaceans, that increasing the resistance of plants to attack by various pests and promote crop yields, possesses excellent biocompatibility, biodegradability, and mucoadhesiveness inducing potential defense against attack by different pathogens.

Key words: polymeric matrix, chitosan microspheres, spray drying, DI-31.

INTRODUCCIÓN

Los brasinoesteroides son fitohormonas esteroidales con importantes funciones reguladoras en las plantas. Estos compuestos determinan, entre otros procesos fisiológicos vegetales, la división y crecimiento celular, la germinación de las semillas, el rendimiento de los cultivos, la respuesta a distintas condiciones de estrés (estrés salino, hídrico, térmico) y la protección de las plantas frente a distintas plagas y enfermedades. El papel de los mismos en la germinación de las semillas y crecimiento, en la floración, senescencia, fotosíntesis, contenido de clorofila, diferenciación de tejido vascular vegetal y actividad de algunas enzimas vegetales (anhidrasa carbónica, nitrato-reductasa) ha sido ampliamente estudiado. Varios BR y ABR han sido empleados para el control de

insectos y plagas que afectan a los cultivos, debido a su actividad antiecdiesteroides. El análogo sintético de brasinoesteroides (ABR), DI31 sintetizado en el Centro de estudios de Productos Naturales (CEPN), un agroquímico comercial ampliamente empleado en numerosos cultivos, es capaz de incrementar el rendimiento de distintas cosechas entre un 5 y un 30%. Por otro lado, la baja solubilidad acuosa del mismo; así como la necesidad de realizar dos o más aplicaciones del Biobras-16 (agroquímico comercial a base de DI-31) en distintas etapas en el caso de cultivos de ciclo largo, limitan la expresión de sus beneficios en las plantas y encarecen su empleo.

El quitosano (QUI) es un polisacárido lineal catiónico compuesto esencialmente de unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucosa. Este biopolímero se encuentra raramente en la naturaleza y se obtiene fundamentalmente por desacetilación exhaustiva de la quitina, la cual es el principal constituyente de las paredes celulares de hongos, la cutícula de insectos y el carapacho de moluscos y crustáceos.

Dicho polisacárido es biocompatible, biodegradable, no tóxico y mucoadhesivo; además sus propiedades antifúngicas y antibacterianas, antioxidantes, hipocolestémicas y coagulantes lo hacen muy atractivo para numerosas aplicaciones en medicina y farmacia. Así existen numerosos reportes y patentes de la preparación de microsferas, microcápsulas, hidrogeles, nanopartículas, películas y materiales reforzados (“*composites*”) de QUI y sus derivados para la liberación controlada de distintos fármacos. Por otro lado, la QUI puede inducir cambios metabólicos en las plantas, con un incremento del rendimiento de las cosechas, de la germinación de las semillas y de la resistencia a las plagas. En la revisión bibliográfica realizada por los autores no se encontraron trabajos de obtención de sistemas de liberación controlada de esteroides en base a quitosano, solo se encontraron sistemas de liberación de urea y de otros agroquímicos no esteroideos en base a quitosano. A partir de estos antecedentes, es que surge la necesidad de disponer de sistemas de liberación controlada de esteroides biológicamente activos, especialmente del análogo sintético 3 de brasinoesteroides (DI31), para su aplicación en la agricultura. Es posible preparar un sistema polimérico a base de Quitosano con un esteroide biológicamente activo (micro partículas) que permitan su dosificación de forma controlada en plantas. Por lo tanto, con el fin de validar esta hipótesis, el objetivo general de trabajo es obtener y caracterizar físico-químicamente las micropartículas de quitosano + DI-31, empleando para ello el secado por aspersión (*spray drying*) para su aplicación a las plantas.

PARTE EXPERIMENTAL

El quitosano usada fue la suministrada por *Chitopharm (Haugesund, Norway)*, $M_w = 129.400$ g·mol⁻¹ con grado de acetilación del 20,5%. Se empleó DI-31 (Centro de Productos Naturales de la *Universidad de la Habana*) y tripolifosfato sódico (TPP, *Sigma-Aldrich*).

Estudio de solubilidad del análogo de brasinoesteroide DI31. Se realizó un estudio de solubilidad con el fin de evaluar las características de los disolventes a emplear en el proceso de secado empleando el minisecador o *spray drying*. Así entonces, se prepararon 4 disoluciones de etanol y agua en las proporciones 80/20, 70/30, 60/40, y 50/50 con agitación magnética de 300 rpm mantenida durante un periodo de 15 minutos. Paralelamente se prepararon 4 disoluciones más en las mismas proporciones y condiciones pero de tetrahidrofurano (THF) y agua.

Obtención de micropartículas de quitosano y quitosano+DI31 mediante secado por aspersión. Para obtener las micropartículas de quitosano cargadas con DI-31 se partió de una disolución de QUI al 1% (m/V). El DI-31 (como principio activo a encapsular) y el TPP (como agente entrecruzante) se adicionaron a la disolución de quitosano en un 0,25 y 0,01 respectivamente, con relación a la masa de polímero. La suspensión resultante se atomizó en un mini *Spray-Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza)* con boquilla de 0,7 μm a una temperatura de entrada de 90°C con un flujo de líquido de alimentación a 5 mL/min y una temperatura de salida de 115°C.

Obtención de las micropartículas. Las micropartículas de quitosano cargadas con DI-31 fueron obtenidas mediante secado por aspersión, en un minisecador de la marca BUCHI de Alemania. El proceso transcurrió por etapas sucesivas, la primera de las cuales involucro la formación de una emulsión aceite-agua (O/W). Se empleó además como fase acuosa, una solución de etanol/agua (70/30%), mientras que como fase orgánica se utilizó una disolución de DI-31 (principio activo). Paralelamente, se preparó una solución de quitosano en ácido acético ambas al 1%. La formulación resultante se introdujo por succión al equipo con una temperatura de entrada de 105 grados Celsius y una temperatura de salida de 90°C. Se obtuvieron micropartículas de tamaños comprendidos entre los 1 y los 4 micrómetros.

Caracterización físico-química de las micropartículas obtenidas. Las micropartículas de CHI+DI-31 se caracterizaron por espectroscopia FTIR utilizando un espectrofotómetro *Perkin-Elmer FTIR (Italia)* con 32 exploraciones y 4 cm^{-1} de resolución. Las muestras se prepararon por el método de pastilla de bromuro de potasio. El tamaño de micropartículas se determinó con un microscopio óptico *Nikon Eclipse E-400 (México D.F.)*. La morfología de las micropartículas se estudió por microscopía electrónica de barrido (SEM) con una *TESCAN 5130 SB* microscopio (*República Checa*). Las muestras se recubrieron con Au-Pd utilizando un *POLARON SC 7620 (Reino Unido)*.

Determinación de la eficiencia de encapsulación. 25 mg de micropartículas de CHI + DI-31, y de CHI (placebo), se agitaron a 40°C en ácido acético 0,1 N durante 24 horas. Las soluciones resultantes se filtraron y la cantidad de esteroides encapsulados se estimó mediante la absorbancia

determinada por UV a 245 nm usando un espectrofotómetro *Ultrospec 2100 Pro UV*. La concentración de la disolución se determinó a partir de una curva de calibración obtenida previamente. La cantidad de compuesto encapsulado se expresó como porcentaje de carga (g de *Brasinoesteroides* en 100 g de micropartículas). El porcentaje de carga reportado se expresa como la desviación estándar media \pm DE, de cuatro experimentos.

Estudio de liberación de fármaco in vitro de micropartículas. La liberación in vitro del DI-31 a partir de las micropartículas de CHI se estudió midiendo los correspondientes perfiles usando la detección UV a una longitud de onda específica. 25 mg de micropartículas CHI-DI-31 se colocaron en un matraz aforado que contenía buffer de fosfato y sodio PBS (pH 6,0) y paralelamente solución etanólica al 70% a un volumen total de 25 mL y se incubaron a 30°C con agitación constante a 100 rpm. Una alícuota de 1 mL fue tomada periódicamente del matraz y reemplazada con solución fresca para mantener un volumen constante. A través del valor de la absorbancia UV de la solución, se determinó la concentración de la solución por extrapolación de la curva y con el valor de la pendiente. Estos estudios se realizaron por triplicado para cada muestra.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra la micrografía electrónica de las micropartículas de CHI-DI-31+TPP obtenidas mediante secado por aspersión donde se confirma la obtención de micropartículas con morfología y tamaños característicos de este proceso de secado, el cual describe la literatura y el equipo empleado. Las imágenes muestran la morfología esférica de las micropartículas, atribuible al empleo del minisecador o *spray drying*.

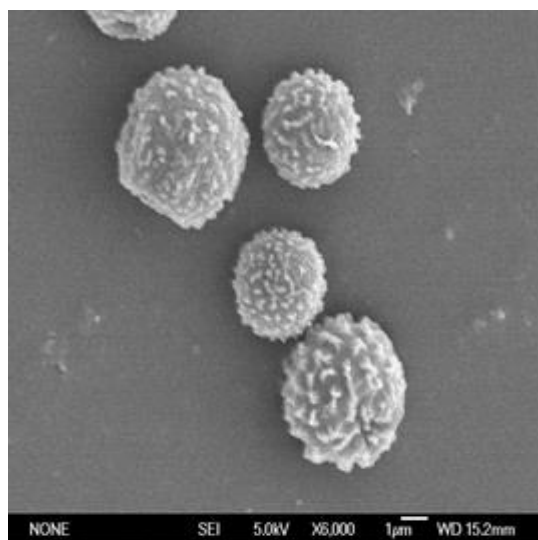


Figura 1. Micrografía SEM de las micropartículas de CHI-DI-31+TPP obtenidas mediante *spray drying*.

La Figura 2 muestra la morfología de las micropartículas de CHI/DI-31. Además se aprecia un moteo en la superficie de las mismas, característico de la insolubilidad en agua del principio activo encapsulado.

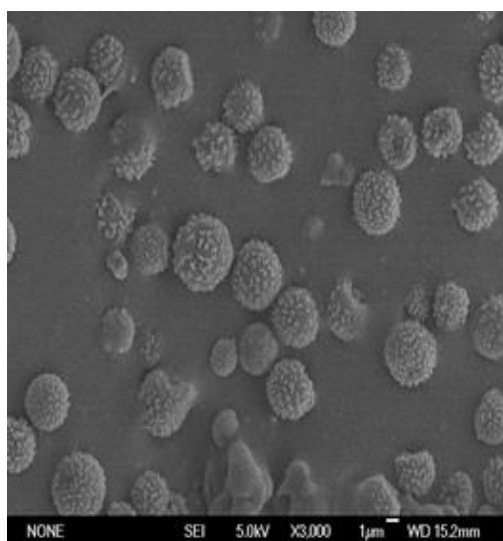


Figura 2. Micrografía SEM de las micropartículas de CHI+DI-31 obtenidas mediante *spray drying*.

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. Los espectros FTIR, del quitosano, de las micropartículas de CHI + DI-31 y de las micropartículas entrecruzadas con TPP se muestran en la Figura 3. También se incluye el espectro de placebo de las micropartículas para la comparación de las bandas características.

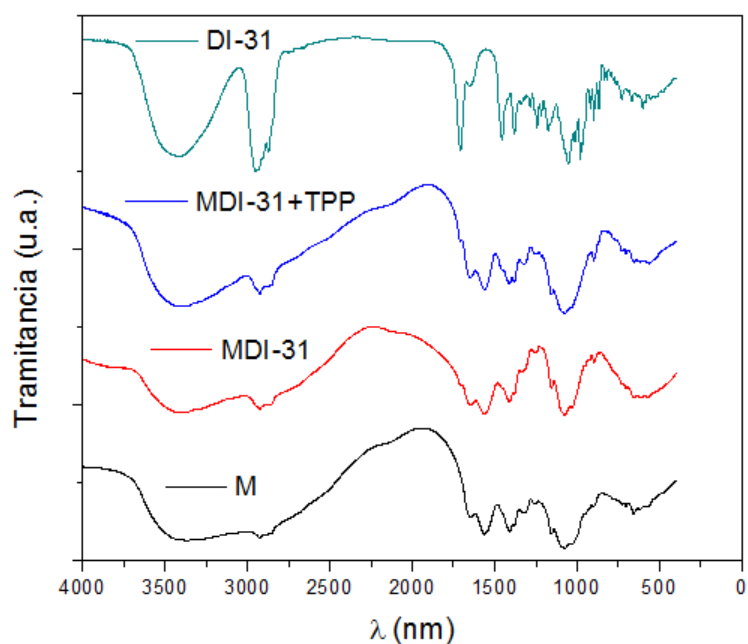


Figura 3. Espectros FTIR de las micropartículas de M (sin DI-31), MDI-31 (con DI-31), MDI-31+TPP (con entrecruzante) y el espectro del esteroide sintético.

Estudio de liberación de las micropartículas de CHI+DI-31 en etanol/agua y en solución buffer-fosfato (PBS). El comportamiento de liberación del DI-31 estudiado, a partir de las micropartículas se evaluó mediante la realización de experimentos de liberación in vitro a pH 6 (PBS) y en mezcla de agua y etanol para simular las condiciones de las actuales formulaciones agroquímicas. En todos los casos se obtuvo una liberación sostenida del esteroide, caracterizada por una velocidad de liberación casi constante (cinética de orden cero) durante las primeras 24 horas. Como era de esperar, la liberación fue siempre mayor en etanol/agua que en PBS, debido a la mayor solubilidad del esteroide en el mencionado disolvente orgánico.

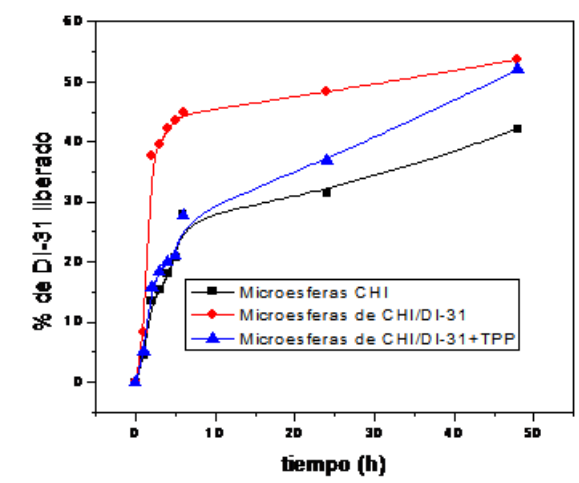


Figura 4. Perfil de liberación de las micropartículas en etanol/agua.

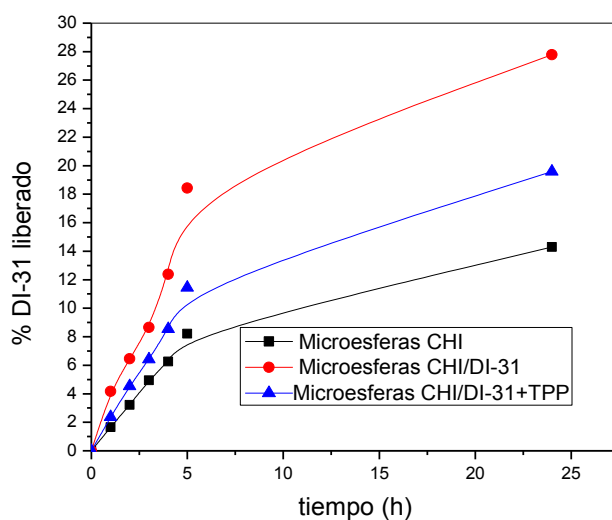


Figura 5. Perfil de liberación de las micropartículas en PBS (pH 6).

DISCUSIÓN

Como se aprecia en la Figura 1, las partículas de CHI-DI31, presentan una apariencia colapsada, mientras que en las partículas de CHI-DI31+TPP la forma predominante es esférica exhibiendo además un moteo peculiar en la superficie. La forma redonda de las partículas de QUI + DI31 puede atribuirse al proceso de secado debido a la evaporación del disolvente que genera una corteza externa, y una vez formada esta es que el disolvente aún presente en su interior se evapora provocándose una reducción parcial de la partícula [11,12]. En el caso de las micropartículas de QUI + DI31 + TPP, la forma es marcadamente esférica, algunas con cierta rugosidad, pero no colapsadas, lo cual es consecuencia de la presencia del TPP en la mezcla atomizada.

Según el equipo empleado que dispone de una boquilla con diámetro interno de 0,7 μm , el tamaño de partículas debe ser inferior a 10 μm . Tomando en cuenta la escala de la micrografía, el tamaño de partículas oscila alrededor de los 4 μm , lo cual concuerda con la boquilla empleada y con los resultados reportados por *Desai* y otros [5] en un estudio de obtención de micropartículas de quitosano con TPP en el que el tamaño de partículas obtenidas varía de 3,1–10,1 μm .

En cuanto al rendimiento del proceso, se obtuvo un $69 \pm 1\%$ para las micropartículas de quitosano/DI31 y un $54,4 \pm 0,8\%$ para las micropartículas de quitosano/DI31/TPP. Otros autores reportan resultados similares y asocian la pérdida de masa al material que queda adherido a las paredes de la cámara y el ciclón del *spray*, lo cual es inherente al proceso tecnológico cuando se trabaja a escala de banco [5–7]. La eficiencia de encapsulación alcanzada fue de un $46,8 \pm 0,7\%$. Ese resultado se debe, entre otros factores, al hecho conocido que cuando se atomiza una suspensión, parte de los cristales de fármaco quedan fuera de las microgotas, por lo que no se encapsulan [6]. Esta baja eficiencia de encapsulación podría mejorarse desde un punto de vista tecnológico a partir de un estudio de las concentraciones de polímero, fármaco y agente entrecruzante en la mezcla a atomizar, además de la optimización de los parámetros de secado.

El espectro IR de las micropartículas CHI/DI-31 muestra bandas de absorción a 2.942–2.784 cm^{-1} (banda alifático C–H estiramiento), 1.657 cm^{-1} (amida I), y 1.597 cm^{-1} ($-\text{NH}_2$) de flexión (amida III). Las bandas de absorción a 1.154 cm^{-1} (anti estiramiento simétrico del puente C–O–C), 1.082 y 1.032 cm^{-1} (vibraciones esquelético que implican el C–O estiramiento) son características de su estructura de sacárido (*Argüelles et al.*, 1999). Los espectros de micropartículas CHI/DI-31 están dominados por los picos de CHI debido al exceso de CHI sobre el DI-31 en las micropartículas. El espectro de DI-31 muestra una banda más intensa y estrecha en 1700 cm^{-1} , que está ausente en el espectro de las micropartículas sin cargar (M). Estas bandas se solapan, la amida I y los $-\text{NH}_2$ bandas en 1.650 y 1.597 cm^{-1} , respectivamente, produciendo una banda ancha que va

desde 1.700 hasta 1.500 cm^{-1} . El cambio hipsocrómico observado de estos picos es probablemente el resultado de una interacción de los grupos hidroxilo y/o carbonilo grupos del DI-31 con el grupo amina de moléculas de CHI.

CONCLUSIONES

El ABR DI-31 se cargó en presencia de una matriz formada por quitosano y TPP como agente entrecruzante formando micropartículas. Los porcentajes de carga más altos se obtuvieron utilizando solución etanólica del esteroide. Aunque en ambos casos la carga nunca superó el 50%, un notable incremento en el porcentaje de carga se obtiene cuando el DI-31 se encuentra solo en el sistema. Un perfil de liberación sostenida se obtuvo para los dos medios estudiados (tendencia a la cinética de orden cero). Los resultados indican que al introducir un novedoso proceso de obtención como el minisecador por *spray drying* sería posible diseñar un eficiente sistema de suministro a base de quitosano para la liberación sostenida de brasinoesteroides para su aplicación como productos agroquímicos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Akbuga J "A Biopolymer: Chitosan", *International J. Pharm. Advances*, **1**, 3 (1995)
- [2]. Berthold A, Cremer K, Kreuter J "Influence of Crosslinking on the Acid Stability and Physicochemical Properties of Chitosan Microspheres", *S.T.P. Pharma Sciences*, **6(5)**, 358 (1996)
- [3]. Bulgarelli E, Forni F, Bernabei MT "Casein/Gelatin Beads: I. Cross-linked Solution Composition Effect on Cross-linking Degree", *Intern. J. Pharmaceutics*, **190**, 175 (1999)
- [4]. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M "Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, **62**, 83 (2010)
- [5]. He P, Davis SS, Illum L "Chitosan Microspheres Prepared by Spray-drying", *Intern. J. Pharmaceutics*, **187(1)**, 53 (1999)
- [6]. Huang YC, Chiang CH, Yeh MK "Optimizing Formulation Factors in Preparing Chitosan Microparticles by Spray-drying Method", *J. Microencapsulation*, **20(2)**, 247 (2003)
- [7]. Kim CJ, Lee PI "Synthesis and Characterization of Suspension-polymerized Poly(Vinyl Alcohol) Beads with Core-Shell Structure", *J. Appl. Polymer Sci.*, **46(12)**, 2147 (1992)
- [8]. Ré MI "Microencapsulation by Spray Drying", *Drying Technology*, **16(6)**, 1195 (1998)
- [9]. Vandelli MA, Pifferi G, Seghizzi R, Cameroni R "Swelling Behaviour of Gelatin Microspheres Crosslinked with d,l-glyceraldehyde. The Effect of the Preparative Factors, Pharmacy and Pharmacology", *Letters*, **5**, 116 (1995)
- [10]. Tewes F, Boury F, Benoit JP. Biodegradable Microspheres: Advances in Production Technology. En Benita S (editor) "Microencapsulation Methods and Industrial Applications" 2nd ed. USA: Taylor & Francis Group, 2006
- [11]. Desai KGH, Park HJ "Preparation and Characterization of Drug-Loaded Chitosan-Tripolyphosphate Microspheres by Spray Drying", *Drug Development Research*, **64**, 114 (2005)
- [12]. Peniche C, Fernández M, Gallardo A, López-Bravo A "Drug Delivery Systems Based on Porous Chitosan/Polyacrylic acid Microspheres", *Macromolec. Biosci.*, **3**, 540 (2003)
- [13]. The United States Pharmacopeia, USP 30. The National Formulary, NF 25 (USP30-NF25). The dissolution procedure: development and validation. Rockville: Mack Printing; 2007.
- [14]. The United States Pharmacopeia, USP 30. The National Formulary, NF 25 (USP30-NF25). Bisacodyl Delayed-Release Tablets. Rockville: Mack Printing; 2007