



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

**DESARROLLO DE MATRICES BIOPOLIMERICAS
PARA LIBERACION
DE MOLECULAS
DE INTERES BIOLOGICO**

Bioq. Valeria E. Bosio

Director de Tesis: Guillermo R. Castro, PhD
Co-Director de Tesis: Frank Boury, PhD

2012

Centro de Biotecnología Aplicada (CINDEFI)
Universidad Nacional de La Plata (UNLP) – Argentina
Instituto de « Micro y Nanomedicinas biomimeticas » (MINT U1066)
Université d'Angers – Francia

AGRADECIMIENTOS

A Guillermo, por todas las enseñanzas que de él recibí. Por el incentivo constante a superarme y avanzar. Por los desafíos permanentes y la libertad que me brindó al desarrollar esta tesis. Por haberme acompañado en esta etapa de mi vida desde lo intelectual y lo emotivo, dispuesto a hacerme crecer siempre.

A mi "mentor", un verdadero amigo, Edgardo. Por haberme acompañado, aconsejado y ayudado desde el día cero. Por estar siempre a mi lado, aún cuando la vida no era sólo risas. Por estar presente hasta el día de hoy, lo que me brinda esa incomparable sensación de tranquilidad y confianza.

A Cristina, por haberme incentivado siempre a que encontrara mi camino, por alentarme en los momentos duros y alegrarse hasta las lágrimas con los pequeños logros...

A "los chicos del lab", compañeros de ruta devenidos en amigos: German, Yani, Maxi, Vicky y Jose. Por todo lo que hemos compartido juntos; las eternas jornadas en el laboratorio, las meriendas bulliciosas en el box, los asados en lo de Maxi, las salidas a Buenos Aires, las despedidas con empanadas-party en lo de Guiye, la INTER!!!! Los infaltables roces, las confesiones, el apoyo... Gracias por hacer que todos esos pequeños-grandes momentos marquen a esta etapa como una de las más lindas que me han tocado vivir...

A Vero, por su generosidad al rediseñar el lugar de trabajo sin pedir nada a cambio, por dejarnos un ambiente alegre y comfortable que aprendimos a querer.

A Frank, por brindarme la posibilidad de llevar adelante esta empresa, tan lejana en mi mente en su momento... Gracias por creer en mí, tomando la codirección de este proyecto de tesis.

A los chicos del laboratorio de CO₂ Supercrítico de Francia: Brice, Leila, Kien y Thomas. Gracias por todos los momentos de trabajo que pasan a ser recordados como momentos llenos de alegría y calidez. Gracias a todos los chicos de allá, por recibirme con los brazos abiertos y hacerme compartir todas sus costumbres que tan afines y emocionantes encontré!

A Corinne y su familia, por abrirme la puerta de su casa y su corazón, por hacerme sentir una más en una cultura nueva que terminara por hacer mía. Por transformar mi estadía en Angers de 2010 en una experiencia única.

A Félix, por acompañarme en esta última etapa... por aconsejarme y esperar paciente el regreso de la calma... Por estar conmigo y apoyarme en el momento más difícil...

A mi familia (Lore, de más esta aclarar que vos sos parte también), por apoyarme, escucharme y estar siempre, dispuesta a todo.

Al jurado, los Dres. Roberto Salvarezza, Noemí Zaritzky, Faustino Siñeriz , Marc Antón y Emmanuel Gracion, por tener tan buena predisposición todos desde el primer momento en que nos embarcamos en este proyecto distinto; por su tiempo y dedicación y su paciencia, sin los cuales no sería posible la cristalización de la doble titulación...

A todos los investigadores que participaron en distintas experiencias comprendidas en este trabajo de tesis: a los Dres. Jorge Guida y Elizabeth Chacon Villaba (CEQUINOR, La Plata) por su apoyo y participación activa en todo lo referido a los trabajos de Espectroscopia vibracional; al Dr. Arup Muckhjeery (Universidad de Calcuta, India), por sus aportes en la síntesis y caracterización de derivados poliméricos; al Dr. Gustavo Marcheti (CINDECA, La Plata) y la Dra. Magdalena Mechetti (Universidad Nacional de Tucumán) por su colaboración en las experiencias de espectroscopia y análisis reológicos que se cristalizaron en un trabajo publicado; a la Dra. Noemí Zaritzky (CIDCA, La Plata) por sus valiosos aportes en los sistemas de modelado matemático, al Dr. Santacoloma, por su hospitalidad y solidaridad al facilitarnos equipamiento de citometría y análisis confocal; al equipo de investigación de la línea de luz Sincrotrón de Infra Rojo (SIMIS) dirigida por el Dr. Paul Dumas en París (SOLEIL): por su asesoramiento y buena predisposición; al Dr. David Kaplan del Instituí de Ingeniería Tisular (TERK, Boston), por facilitarnos biopolímeros purificados para diferentes análisis; al equipo de investigación del Departamento de Física de la Universidad de Le Mans (Francia), en especial al Dr. Thomas Beuvier; y a la Empresa Quality Pharma (Bs. As.), quien nos donara Doxorubicina desinteresadamente.

A los organismos de investigación y empresas privadas que hicieron posible el desarrollo de este trabajo de tesis en el Laboratorio de Nanobiomateriales perteneciente al Centro de Biotecnología Aplicada (CINDEFI) en la Argentina, y en el Instituto de Investigación en Micro y Nanomedicinas bio miméticas (MINT, INSERM U1066) en Francia:
al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET),
a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPyCT),
al Programa de Ayuda para Movilidades (ARIANES) de Francia,
a la empresa LKM, Sociedad Anónima, Argentina
a la Universidad de Angers, Pays de la Loire, Francia,
y al Consorcio CONICET (contraparte Argentina) - INSERM (contraparte Francesa)

A mi papá.

OBJETIVOS	11
------------------	-----------

INTRODUCCION GENERAL	12
-----------------------------	-----------

REFERENCIAS GENERALES	23
------------------------------	-----------

CAPITULO 1

"Rojo Congo, una molécula modelo para estudiar interacciones entre geles de matrices biopoliméricas y fármacos"

***Interacción con Biopolímeros
Selección de la Matriz
Caracterización de la Matriz
Recubrimiento de la Matriz***

INTRODUCCION	26
---------------------	-----------

MATERIALES Y METODOS	28
-----------------------------	-----------

1. Determinación cuantitativa de Rojo Congo (RC)
2. Selección de biopolímeros según interacción con RC
3. Síntesis de GG Carboxi-Metilada
4. Formulaciones biopoliméricas. Formación de microesferas
5. Determinación de grado de substitución en CMGG
6. Análisis de composición centesimal
7. Estudios Térmicos
8. Estudios de Tensión Superficial
9. Estudios de Viscosimetría
10. Análisis Vibracionales: Espectroscopías FTIR y Raman
11. Microscopía electrónica de barrido (SEM)
12. Microscopía Óptica (OM). Análisis de hinchamiento
13. Carga de RC
14. Cinéticas de liberación
15. Estabilidad de microesferas y liberación de RC a pH diferentes
16. Optimización de la matriz: Procesos de recubrimiento con Emulsano

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
-------------------------------	-----------

CONCLUSIONES	50
---------------------	-----------

REFERENCIAS	51
--------------------	-----------

ANEXO CAPITULO 1

"Caracterización de biopolímeros EPS/Emulsano para su uso en recubrimiento de matrices"

***Caracterización Fisicoquímica
Ensayos de recubrimiento para Sistemas Inorgánicos
Ensayos biológicos: Respuesta Inflamatoria***

INTRODUCCION	53
MATERIALES Y METODOS	55
1. Producción de Emulsano - Purificación para obtención de EPS	
2. Estudio de cinéticas de tensión superficial	
3. Formación de monocapas en interfases de aire/solución	
4. Medidas de potencial Z vs. pH	
5. Determinación de la movilidad electroforética vs. fuerza iónica	
6. Formación de agregados en solución, estudios dimensionales y de carga	
7. Ensayos de recubrimiento para matrices inorgánicas. Estabilidad en medios acuosos.	
8. Ensayos de compatibilidad biológica: Estudios de respuesta inflamatoria con monocitos humanos.	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS	68

CAPITULO 2

"Selección de biopolímeros para el fármaco modelo (Doxorubicina): interacciones con el fármaco"

***Doxorrubicina-Biopolímeros
Selección de la Matriz
Caracterización de la Matriz***

INTRODUCCION	70
MATERIALES Y METODOS	71
1. Preparación de soluciones stock, curvas de calibración y soluciones de los diferentes biopolímeros	
2. Determinación de la interacción moléculas cargo / biopolímeros	
3. Formulación de matrices por gelificación iónica	
4. Ensayos de carga	
5. Microscopía óptica y de Fluorescencia	
6. Ensayos Reológicos	
7. Estudios vibracionales: Espectroscopía IR	
8. Ensayos de liberación de Dox a partir de matrices de pectina	
9. Modelado matemático de la cinética de liberación de Dox	
10. Estudios de saturación de unión biopolímero-Dox	
11. Estudios de almacenamiento	
12. Estudios cinéticos de liberación en distintas condiciones	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
CONCLUSIONES	89
REFERENCIAS	90

CAPITULO 3

"Síntesis y comportamientos de micropartículas híbridas (MPh) para Doxorubicina"

***Templado con Biopolímeros
Selección del Método de Síntesis
Optimización de las condiciones de Síntesis y Carga
Caracterización Fisicoquímica y Biológica***

INTRODUCCION	93
MATERIALES Y METODOS	95
1. Preparación de las soluciones reactivo	
2. Formulación de micropartículas	
2.1 Cristalización coloidal	
2.2 Condiciones experimentales de síntesis con CO ₂ Súper Crítico	
3. Caracterización de las micropartículas por técnicas de espectroscopia y microscopía	
3.1. Difracción de Rayos X	
3.2. Microscopía confocal	
3.3. Microscopía Óptica y de fluorescencia	
3.4. Espectroscopía-Microscopia Raman	
3.5. Espectroscopía IR	
3. 6. Microscopía electrónica de barrido	
3. 7. Citometría de Flujo	
3. 8. Detección electroquímica de Ca ⁺²	
4. Incorporación del fármaco modelo: Doxorubicina	
5. Cinéticas de liberación de los sistemas seleccionados	
6. Estudios <i>in vitro</i> : citotoxicidad	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
CONCLUSIONES	123
REFERENCIAS	125

CONCLUSIONES **126**

APENDICE 1 **128**

"Control release applications in food technology"

Bosio V.E., Islan G.E., Martínez Y.E., Castro G.R. (2011). Advances in Bioprocesses in Food Industry - Vol. 4. (C.R.Soccol, A. Pandey, V.T. Soccol, C. Laroche, Eds.) Asiatech, New Delhi, India. **Cap 1, pp. 1-13**

APENDICE 2 **129**

"Congo red as molecular probe to study interactions between biopolymeric gel microspheres and drugs"

Bosio V. E., Basu S., Chacon Villalba M. E., Güida J.A., Mukherjee A., Castro G.R. (2012). **Enviado.**

APENDICE 3 **130**

"Binding and encapsulation of doxorubicin on smart hydrogels for oral delivery"

Bosio V.E., Machain V., Pérez De Berti I.O., Gómez López A., Marchetti S.G., Mechetti M., Castro G.R. (2012) Applied Biochemistry and Biotechnology. DOI: 10.1007/s12010-012-9641-8. **Publicado.**

APENDICE 4 **131**

"Properties of immobilized lipase on pectin microspheres in organic solvents"

Costas L, **Bosio V.E.**, Pandey A., Castro GR. (2008) Applied Biochemistry and Biotechnology **151:578–586.**

OBJETIVOS

Lograr dosis terapéuticas con drogas de elevada toxicidad y/o importantes efectos secundarios, sigue siendo un desafío para la tecnología farmacéutica. Los métodos de liberación controlada y sostenida de moléculas constituyen una nueva estrategia de desarrollo en la industria farmacéutica que permite reducir dosis, frecuencias de administración y toxicidad de fármacos con el consecuente impacto social y económico.

A tal fin, el objetivo del presente trabajo de tesis es desarrollar vehículos más eficientes para el transporte y liberación de moléculas, que si bien pueden ser de interés biológico y de utilidad en el tratamiento de patologías agudas y crónicas, su toxicidad limita el uso terapéutico.

Se postula desarrollar partículas que mejoren la administración de drogas anticancerosas encapsuladas con una alta eficacia y baja incidencia en sus efectos secundarios.

Se propone el empleo de biopolímeros naturales para su utilización como matrices transportadoras y el desarrollo de tecnología de producción de micropartículas nanoestructuradas a escala de laboratorio, con la finalidad de una potencial aplicación en el ámbito farmacéutico.

En forma preliminar, se trabajará con una molécula modelo, rojo congo como análogo de fármacos, con la finalidad de explorar, determinar y optimizar condiciones experimentales de síntesis de biogeles y sus propiedades. En una segunda etapa se realizarán estudios con un fármaco seleccionado, Doxorubicina, anticancerígeno perteneciente a la familia de las antraciclinas con elevada toxicidad, y de amplio uso en tratamientos oncológicos, para desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos.

Se trabajará sobre diferentes matrices biológicas naturales, empleando polímeros de origen vegetal: alginatos (producidos por algas), pectinas y gomas; y a su vez se empleará un polímero de origen microbiano (EPS y Emulsano) cuya producción y purificación será incluida en el presente proyecto.

Se explorará el desarrollo de microesferas generadas a partir de diferentes estrategias con biopolímeros simples, mezclas biopoliméricas, recubrimientos biopoliméricos, y/o sistemas híbridos (inorgánicos-biopoliméricos), mediante el empleo de diferentes polímeros tanto de origen vegetal como sintetizados en nuestro laboratorio, con diferentes estrategias metodológicas: técnicas de gelación iónica, síntesis química por coprecipitación coloidal y fluidos supercríticos.

Se caracterizarán y evaluarán sistemas seleccionados, empleándose técnicas de microscopía, espectroscopía vibracional (FTIR y RAMAN) y de dispersión de luz (*light scattering*, AFM, etc), análisis reológicos y modelamiento cinético. Se analizarán las capacidades de almacenamiento y condiciones de entrecruzamiento, estabildades en medios simulados al fluido gástrico e intestinal y las cinéticas de liberación, así como toxicidad en sistemas *in vitro*.

INTRODUCCION

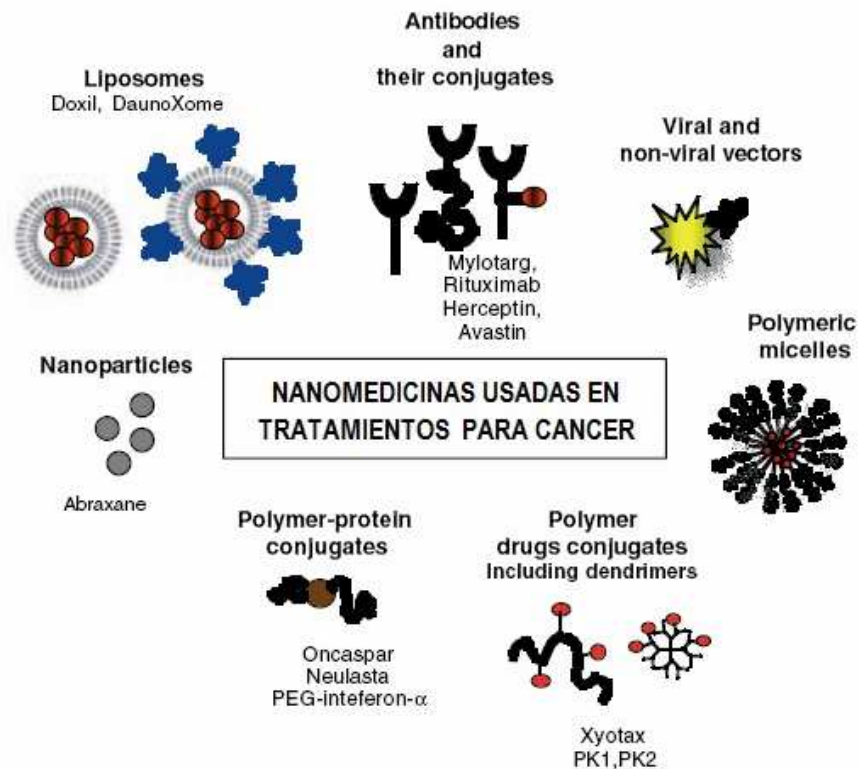
Las micro- y nano-tecnologías prometen un avance revolucionario para el tratamiento de enfermedades de alta complejidad como cáncer, sida, neurodegenerativas, entre otras. En la actualidad existe una gran variedad de sistemas nano-estructurados cuyas propiedades especiales debido a su tamaño y/o poros diminutos, podrían ser utilizados para la administración de fármacos con el objeto de mejorar la eficacia, especificidad y seguridad biológica. La selección de la mejor combinación entre el transportador y la sustancia activa ante una situación biológica específica permitirá definir tratamientos médicos personalizados efectivos en patologías complejas. Por lo tanto, la adaptabilidad de los micro- o nano-transportadores no debe ser considerada de manera simplista basada en términos de eficacia aparente. Debe ser analizada en términos de las interacciones moleculares entre los componentes de los vectores, así como con los sistemas biológicos.

La liberación controlada de fármacos es una nueva modalidad para tratar patologías de diverso tipo y características, y actualmente se reconoce su uso como necesario para las terapias de las patologías crónicas o de acción prolongada, tal es el caso del tratamiento de enfermedades como cáncer y diabetes. El concepto de liberación controlada de moléculas está asociado a la capacidad de un sistema de administración de fármacos de prolongar la disponibilidad de la molécula en el organismo durante un largo y sostenido período, a una tasa controlada, y de esta manera reducir los potenciales efectos tóxicos del mismo. En el desarrollo de sistemas de liberación controlada de moléculas es indispensable establecer las posibles interacciones entre la molécula transportada, la matriz de transporte, y el ambiente fisiológico en donde se efectuaría la liberación (órgano blanco).

La encapsulación de sustancias en micro- o nano-partículas ha recibido un gran interés durante los últimos años para usos variados en campos diversos como la medicina, la química, cosméticos, y alimentos. Por ejemplo, en el campo farmacéutico, la incorporación de las moléculas farmacológicamente activas en microesferas permite controlar su entrega espacial y temporal en el cuerpo humano y protegerlos contra procesos de inactivación. El objetivo central de un sistema de transporte de éstas características es liberar el principio activo en el sitio blanco deseado y mantener la concentración del fármaco dentro de una ventana terapéutica en un período de tiempo establecido. El estudio de nanoesferas, nanocapsulas, nanoemulsiones, ha venido teniendo gran importancia en el campo tanto de la ciencia básica como de la aplicada [Duran y cols., 2011]. A su vez, en el último tiempo se ha incorporado la utilización de diferentes hidrogeles para sistemas de liberación biodegradables y biocompatibles. Además, el empleo de sistemas poliméricos de autoensamblado capa por capa ha demostrado ser de gran utilidad en aplicaciones biomédicas: producción de películas para recubrimiento, micromodelado de superficies, nanobioreactores, células artificiales y sistemas de transporte de drogas [Hua Ai y cols., 2003; Zonghua y cols., 2008].

Las formulaciones orales representan la plataforma más sencilla para el transporte de fármacos. En formulaciones farmacéuticas convencionales, como pastillas y cápsulas, el transporte de moléculas relativamente pequeñas se produce por vía gastrointestinal, y la

absorción del principio activo se realiza mediante un gradiente de concentraciones en un proceso de absorción pasiva sobre las superficies intestinales, proceso gobernado por tres factores primarios: grado de ionización, peso molecular (MW), e hidrofobicidad (que puede ser determinada por el log P, coeficiente de reparto de soluto en el sistema de n-octanol/agua). Por lo tanto, es importante considerar las posibles interacciones entre el fármaco y la matriz elegida para poder establecer perfiles de liberación y controlar dichos procesos mediante modificaciones de la matriz, o bien de la molécula fármaco o ambos.



Esquema de las nuevas tecnologías empleadas para sistemas de drug-delivery en tratamientos para el cáncer [Winship Cancer Institute]

Polímeros biodegradables y bioresorbibles. Desde su inclusión en el campo de la salud en los años 80, las aplicaciones de los biopolímeros constituyen uno de los campos de mayor interés en la academia e industria por su utilización en dispositivos terapéuticos cardiovasculares, ortopédicos, oftalmológicos, dentales, sustitutos de piel, sistemas de liberación controlada de fármacos, y sensores para propósitos de diagnóstico. Sus propiedades notables tales como la diversidad estructural y propiedades biológicas específicas, junto a la producción mediante procesos de síntesis “suave”, biodegradabilidad, y propiedades reológicas hizo de los biopolímeros instrumentos muy atractivos para una miríada de usos [Panilaitis y cols., 2007; Bosio y cols, 2011].

El desarrollo y descubrimiento de nuevos biopolímeros, así como las nuevas tecnologías de síntesis, purificación y modificación, han permitido grandes avances en la liberación controlada de principios activos, localización de dianas farmacológicas, sobrepaso de barreras fisiológicas, protección de principios activos sensibles a condiciones fisiológicas de deterioro de la molécula, entre otros [Pal y cols., 2009].

Algunos polímeros han recibido la denominación de "inteligentes" por su rápida respuesta frente a modificaciones de las condiciones fisicoquímicas ambientales, que involucran cambios pronunciados en sus propiedades. Los estímulos a los que responden los polímeros pueden ser: físicos como temperatura, fuerza iónica, solventes, radiaciones, campos eléctricos, estrés mecánico, presión, radiaciones sónicas y campos magnéticos; químicos como pH, iones específicos y agentes químicos; bioquímicos como sustratos de enzimas, ligandos afines y otros agentes biológicos. A su vez, la síntesis y funcionalización de polímeros sintéticos biodegradables para aplicación biomédica ha venido desarrollándose ampliamente [Tian y cols., 2012]. Sin embargo, existen severos inconvenientes en términos tecnológicos y/o costos en la producción [Luckachan y cols., 2011].

Como se ha observado hasta aquí, los polímeros han jugado un papel integral en el avance de tecnología del transporte de fármacos en el campo de la biomedicina proporcionando liberación controlada de agentes terapéuticos en dosis constantes durante períodos largos, dosificación cíclica, y una liberación de la molécula cargo tanto para el caso de fármacos de naturaleza hidrofílica como hidrofóbica. La disponibilidad y estudio de éste tipo de materiales ha crecido ampliamente, en parte debido a los grandes avances en la tecnología de las diversas áreas de las ciencias. En los últimos años se ha incrementado la búsqueda de sistemas diseñados especialmente con polímeros derivatizados y moléculas específicas con la finalidad de realizar alguna acción en especial y con diversas funciones biológicas.

En el transporte de drogas se utilizan comúnmente sistemas poliméricos obtenidos esencialmente por síntesis química para la elaboración de micro- y nano-partículas, con el objetivo de obtener sistemas biocompatibles en una primera instancia, y biodegradables como segundo objetivo. En especial los de naturaleza biológica, prometen proveer biocompatibilidad y biodegradabilidad en su gran mayoría. En este sentido, varios polímeros han sido utilizados, incluyendo ácido poliláctico, policaprolactona, polisacáridos (quitosano, almidones, celulosas etc...), proteínas y polipéptidos (*e.g.* albúmina, gelatinas), etc.

Los biopolímeros de naturaleza polisacáridica han tenido especial atención en las diferentes industrias, en las cuales el desarrollo de transportadores activos de moléculas de interés biológico es un área prioritaria. En particular, son considerados materiales muy promisorios para la síntesis de micro- y nano-transportadores de moléculas de interés. La síntesis de partículas a base de éstos polímeros puede ser resumida en cuatro mecanismos básicos: entrecruzamiento covalente o inotrópico, formación de complejos de polielectrolitos, y auto ensamblaje de polisacáridos modificados [Gandini y cols. 2010].

Los biopolímeros pueden provenir de diferentes fuentes, como ser algas (en el caso de alginatos), plantas (pectinas y goma guar por ejemplo), microorganismos (dextrano, goma xantan, emulsano entre otros) o animal (quitosano o condritin-sulfato por ejemplo). Los polisacáridos, poseen como característica la de presentar un gran número de grupos reactivos, amplio rango de pesos moleculares, y composiciones químicas diferentes, presentándose variaciones para un mismo tipo de biopolímero, lo cual contribuye a la gran biodiversidad existente para este grupo de macromoléculas. Los polisacáridos pueden ser clasificados de acuerdo a su carga neta en neutros y polielectrolíticos, los últimos a su vez pueden subdividirse en catiónicos (quitosano) o aniónicos (alginatos, heparina, ácido hialurónico, pectinas, etc). Debido a la presencia de varios grupos derivables en la cadena carbonada, los polisacáridos son fácilmente modificables químicamente, lo que permite generar nuevas moléculas adaptadas a requerimientos específicos. Particularmente, la mayoría de los polisacáridos presentan grupos

hidrofílicos como ser, principalmente, grupos hidroxilo, carboxilo y amino, los cuales pueden formar enlaces covalentes con tejidos biológicos (fundamentalmente epitelios y mucosas) participando en procesos de bioadhesión. Considerados como biomateriales naturales, los polisacáridos, son altamente estables, seguros, no tóxicos, y biodegradables en la mayoría de los casos. Adicionalmente, existen diversas y abundantes fuentes naturales para la extracción de polisacáridos así como un bajo costo en su procesamiento [Liu y cols.].

Entre los biopolímeros naturales, que se han comenzado a utilizar para el desarrollo de diferentes tipos de vehículos para transporte de moléculas [Castro y cols., 2005 y 2006; Costas y cols., 2008; Missirlis y cols., 2006; Panilaitis y cols., 2007; Tang y cols., 2010;], se pueden destacar:

Los **alginatos**, biopolímeros lineales compuestos de ácido β -manurónico (denominadas unidades M) y ácido α -gulurónico (denominadas unidades G) unidos por enlaces 1-4, han adquirido especial atención por presentar una alta estabilidad y resistencia mecánica. El alginato puede ser obtenido de algas y de algunas especies microbianas, y su importancia tecnológica radica en su capacidad para formar hidrogeles. El alginato ultrapuro producido bajo normas GMP/ISO 9000 es uno de los geles biopoliméricos más usados en industrias de alimentos y farmacéuticas. Ha sido empleado exitosamente para numerosas aplicaciones en salud humana, incluyendo implantes en tejido e inmovilización de células [Dornish y cols., 2001]. Además, muchos productos comerciales conteniendo alginatos de tipo ultrapuro son frecuentemente usados como excipientes en la industria farmacéutica. El alginato como hidrogel, posee la capacidad de absorber grandes cantidades de agua y, en presencia de iones multivalentes (*e.g.* calcio, zinc y otros) es capaz de formar geles poliméricos, proceso que se denomina *gelación iónica*. En el caso del alginato, la red polimérica está compuesta de moléculas lineales conectadas entre sí por interacciones iónicas dando lugar a entrecruzamientos denominados comúnmente "caja de huevos" (*egg shell*). Sin embargo son inestables a condiciones de deshidratación intensas, por lo que pierden su estructura de gel y se vuelven amorfos [Castro y cols., 2005].

Los **galactomananos** también han sido y son foco de estudios de diversas áreas de la tecnología de biopolímeros. Estos son polisacáridos que consisten de una cadena de manosa con grupos laterales de galactosa. Las unidades de manopiranososa están unidas por enlaces $\beta 1 \rightarrow 4$, y las unidades laterales de galactopiranososa se unen a la cadena central con enlaces $\alpha 1 \rightarrow 6$. Los galactomananos se encuentran formando parte de las denominadas gomas vegetales, utilizadas comúnmente como viscosantes de productos alimenticios. Para las diferentes gomas varía la relación entre las moléculas de manosa y galactosa. Así, para la Goma de Alholva, será 1:1, 2:1 para la Goma Guar, 3:1 para la Goma de Tara y 4:1 para la Goma de Algarrobo o Goma Garrofin. La goma guar se deriva de la endosperma molida de las semillas la planta de Guar (*Cyamopsis tetragonoloba*). Aproximadamente el 85 % de la goma guar es guarán, un polisacárido soluble en agua formado por cadenas lineales de manosa con enlaces $\beta 1 \rightarrow 4$ a las cuales están conectadas unidades de galactosa con enlaces $\alpha 1 \rightarrow 6$. La proporción de manosa a galactosa es 2:1. La goma guar posee cinco u ocho veces más capacidad espesante que el almidón, y es por ello que ha sido ampliamente usada en la industria farmacéutica, y como estabilizante de productos alimenticios.

Las **carrageninas** son hidrocoloides extraídos de algas marinas rojas de las especies *Gigartina*, *Hypnea*, *Eucheuma*, *Chondrus* y *Iridaea*. Este tipo de biopolímero es utilizado en diversas aplicaciones en la industria alimentaria como espesante, gelificante, agente de

suspensión y estabilizante, tanto en sistemas acuosos diluidos como en productos lácteos. Puede ser utilizada, también, como agente de suspensión, retención de agua, gelificación, emulsificación y estabilización en otras diversas aplicaciones industriales. Es clasificada de acuerdo con su estructura y propiedades físico-químicas ó según su proceso de producción: *Kapa*, forma un gel rígido, quebradizo, termoreversible, elevada resistencia mecánica, alta fuerza de gel, que presenta sinéresis; a su vez la *Iota* genera un gel elástico, termoreversible, no presenta sinéresis, posee tixotropía; mientras que la *Lambda* es soluble en frío, no gelificante, produce soluciones de elevadas viscosidades. Los procesos de gelificación de las carrageninas están mediados por iones (*e.g.* potasio o calcio) y/o presencia de solutos.

Las **pectinas** son polisacáridos compuestos por ácido α -galacturónico conteniendo un número variable de metil ésteres., La estructura química de pectinas consiste en un éster metilado del ácido poligalacturónico, y consiste en cadenas de 300 a 1000 unidades de ácido galacturónico conectadas por enlaces $\alpha 1 \rightarrow 4$. El grado de esterificación (GE) afecta las propiedades gelificantes de la pectina. Las pectinas pueden ser agrupadas de acuerdo a su grado de metoxilación en tres grupos: las de bajo metoxilo (LM) con un grado de esterificación menor al 40%; las de medio metoxilo (MM) con un porcentaje de metoxilación comprendido entre 40 y 60%; y las de alto metoxilo (HM) con un porcentaje de esterificación mayor al 60%. Las pectinas de LM y de MM pueden ser gelificadas en presencia de cationes multivalentes, mientras que las de HM pueden hacerlo solo a pH ácidos y en presencia de solutos. Además de las diferencias que presentan en sus interacciones con iones, sus pKas varían en un rango de 3,5 a 4,1. [Plaschina y cols., 1978; Funami y cols., 2011].

El **Emulsano** es una mezcla de polímeros, entre ellos el **EPS**, de origen microbiano, y ha sido utilizado por más de una década con diversas aplicaciones por sus propiedades de emulsificante natural. Se trata de un exopolisacarido excretado por una bacteria Gram negativa: *Acinetobacter venetianus* RAG-1. Antiguamente esta bacteria era denominada *Acinetobacter calcoaceticus*, y fue con esta cepa que Rosenberg y Rosenberg (1981) y Zosim, Gutnick y Rosenberg, (1983) trabajaron para aislar un emulsano, denominado así por sus propiedades de emulsificación de hidrocarburos a los cuales la bacteria se adhería. Por varios años, se pensaba que el complejo de Emulsano actuaba como un potente biosurfactante a consecuencia de sus elevadas propiedades anfífilas. Esta propiedad fue originalmente atribuida a la presencia de ácidos grasos distribuidos a lo largo de la cadena polisacáridica, lo que le permitía al complejo polimérico estabilizar emulsiones de aceite en agua por su presencia a lo largo de la interfase aceite-agua. Recientemente, Mercaldi y cols. (2008) demostraron que el Emulsano en realidad consistía en un complejo polimérico físicamente separable en un lipopolisacárido (LPS) de bajo peso molecular (80%, p/p), iónicamente unido a un exopolisacarido (EPS), complejo nitrogenado de alto peso molecular (20%, w/w) cargado positivamente. Además, estos autores demostraron que la capacidad de estabilizar emulsiones del complejo Emulsano era debida exclusivamente a la fracción polisacáridica (EPS, recientemente denominado APE: *Acinetobacter polyelectrolitic exopolysaccharide*). Debido a que los estudios con Emulsano se han enfocado en las áreas que explotan estas propiedades de estabilización de emulsión, como es el campo de la biorremediación de metales pesados y petróleo crudo, ahora se encuentra apropiado enfocar los estudios hacia el APE. Dado el alto grado de pureza con el que se puede obtener, sumado a las propiedades de emulsificación nuevas de este compuesto, surge la necesidad de considerar el empleo de APE sólo y en el lugar de Emulsano para usos biomédicos como adyuvantes de vacunas y sistemas de transporte de drogas en medicina [Panilaitis y cols., 2002; Castro y cols.,

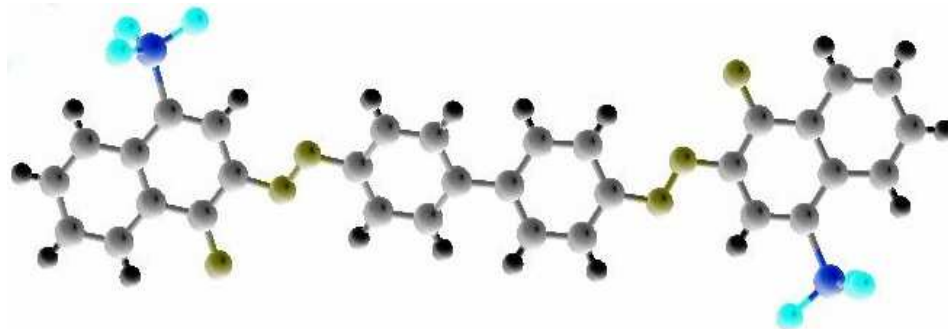
2005a y b; Castro y cols., 2006,]. Debido a sus propiedades de carga, ésta molécula permitiría desarrollar reacciones suaves de complejamiento iónico para la síntesis de matrices transportadoras de drogas y/o su utilización en procesos de recubrimiento de micro o nanopartículas en el área de liberación controlada.

Debido a la existencia de una gran variedad de biopolímeros aptos para ser utilizados en sistemas de transporte de moléculas y de su gran variedad de propiedades se hace imprescindible la sistematización de los procedimientos de selección de matrices en función de su interacción con la molécula a transportar, y/o de las características de estabilización de interfases y/o retardo en la liberación cuando sean utilizados para la formación de coberturas de las matrices desarrolladas. Los mecanismos por los cuales la matriz se desintegrara a lo largo del tiempo vendrán dados por la degradación y la erosión que se diferencian entre si por la presencia, en el primer caso, de uniones covalentes que por reacciones químicas daran lugar a la degradación propiamente dicha se. Por otro lado, la erosión ocurre por la disolución de fragmentos de las cadenas biopoliméricas en sistemas unidos por entrecruzamientos sin alteraciones químicas de la estructura molecular. Para que la disolución pueda producirse, el polímero debe absorber el solvente circundante y actuar recíprocamente con el agua vía interacciones iónicas y/o débiles y/o puentes de hidrogeno. La degradación como la erosión pueden producirse como procesos masivos o superficiales. En la degradación superficial, la matriz del polímero queda cada vez más expuesta a la superficie, pero la fracción de volumen de polímero permanece esencialmente inalterada. En la degradación masiva no ocurren cambios significativos en el tamaño del polímero hasta que finalmente la matriz es completamente degradada o erodada, sin mebargo durante todo el proceso la fracción remanente de polímero en la matriz va disminuyendo gradualmente. El proceso dominante es determinado por las velocidades relativas de penetración del solvente en el polímero, la difusión del producto de degradación, y la degradación o la disolución de la estructura macromolecular. El estudio de estas velocidades son sobre todo importantes en el diseño de hidrogeles biodegradables porque ellos a menudo son polimerizados en medios acuosos.

Las interacciones matriz-fármaco. A partir de la década del 60 se ha producido un vertiginoso desarrollo de las herramientas de la biología molecular, espectroscopía y modelado molecular, las cuales han permitido una mayor comprensión de las interacciones moleculares en diferentes campos. La racionalización de las interacciones moleculares puede aplicarse a diversas áreas de investigación como la de alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos y nuevos materiales. Las interacciones moleculares en la industria farmacéutica, en particular, fueron empleadas para determinar principios activos en mezclas moleculares complejas para modificar y rediseñar nuevos fármacos [Murphy y cols., 1966; Patel, 1998]

El **Rojo Congo** (RC) es un colorante diazo aniónico secundario con estructura plana, soluble en solventes polares como acetona (alta solubilidad) y etanol (soluble); en agua a 25°C presenta una solubilidad de 1g/30ml, mientras que ésta se ve incrementada en agua a menor temperatura. El RC disuelto en soluciones acuosas da lugar a la formación de soluciones coloidales mediado por un mecanismo de agregación. El mecanismo postulado para la agregación de RC es por interacción hidrófoba mediada por interacciones electrónicas de tipo II-II pertenecientes a los anillos aromáticos, las que conducen a constituir agregación de

moléculas de RC con características de apilamiento [Findaly y cols., 2010; Bosio y cols., 2012]. Recientemente, el RC fue empleado en estudios histológicos para detectar la presencia de proteínas fibrilares enriquecidas en conformación de lámina plegada (estructuras tipo β). Estos estudios sirvieron para evidenciar algunas patologías neurodegenerativas como Alzheimer, Creutzfeldt-Jacob, Huntington y Parkinson [Frid y cols., 2007]. Asimismo, el RC fue usado para marcar y detectar algunos tipos de hidrolasas como mananasas, xilanasas, deshidrogenasas, celulasas, y otras [Breccia y cols., 1995; Ott y cols., 1954] cuyos mecanismos probablemente estén relacionados a la presencia de conformaciones de tipo lámina- β plegada en la estructura de estas proteínas.

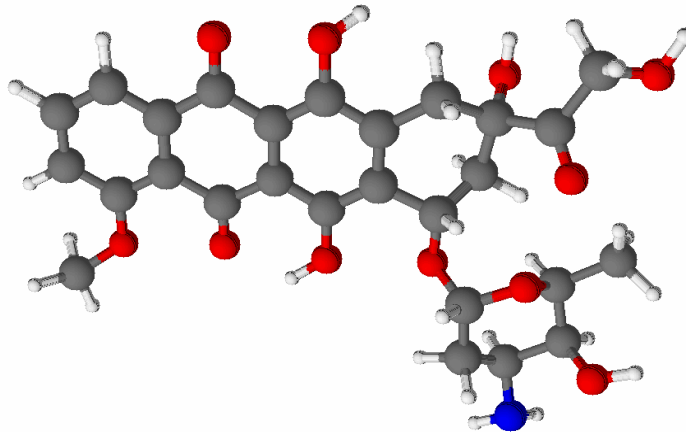


Estructura molecular de Rojo Congo (Lye y col., 2000)

Por otro lado, moléculas de uso terapéutico corriente como tetraciclinas, antraciclinas (por ej. Duanomicina, Doxorubicina) y fluoroquinolonas (por ej. Ciprofloxacina, Enrofloxacina) poseen anillos aromáticos en su estructura química, y se ha descrito en ellas fenómenos de apilamiento similares al observado con el RC mediante interacciones hidrofóbicas de tipo π - π .

Doxorubicina (Dox) es una droga antineoplásica de amplio uso pero con toxicidad secundaria elevada. En tumores sólidos (ovarios, mamas, etc...) el uso de Dox está limitado por su hemato- y cardio-toxicidad, las cuales son dosis dependiente y acumulativas. Diferentes sistemas fueron desarrollados para reducir los efectos secundarios de Dox: micelas, liposomas y/o derivatización con polioles y/o proteínas. Algunas de estas nuevas vectorizaciones han disminuído la cardiotoxicidad de la droga, pero se han presentado problemas inmunológicos, y con una sobrevivencia promedio de los pacientes similar [Caiyu Peng y cols., 2010; Nielsen y cols., 2006; Vignaud y cols., 2010; von Maltzahn y cols., 2011].

Las consecuencias fisiológicas no deseadas de la dispersión de Dox en el organismo y su efecto en órganos no blanco son importantes durante tratamientos a largo plazo como quimioterapias y/o patologías recurrentes.



Estructura molecular de Doxorubicina [Chemometrics & Informatics, 2009].

La interacción hidrofóbica y procesos de agregación entre las moléculas del fármaco representan un serio problema en términos de la biodisponibilidad y un desafío para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos nuevos y alternativos. La gran diversidad de biopolímeros naturales permite avizorar una novedosa opción para el desarrollo de matrices transportadoras que pueden ofrecer opciones nuevas en este campo, y el RC se nos presenta como una molécula modelo ideal para evaluar interacciones con este tipo de matrices [Bosio y cols., 2012]

Materiales híbridos. En los últimos tiempos, la síntesis de materiales híbridos ha recibido especial atención en el campo de la medicina relacionado a la reparación y/o reemplazo de huesos, en el uso de las llamadas "cirugías de mínimo grado de invasión" (*MIS*). En tal sentido, el carbonato de calcio está comenzando a ser utilizado como fuente de calcio, para la síntesis y la caracterización de nuevos sistemas híbridos constituidos por biopolímeros y carbonato de calcio, para el empleo potencial en biomedicina. Este compuesto es uno de los minerales más abundantes en la naturaleza debido a que es un material estructural en organismos vivos (caparazones de moluscos por ejemplo), el cual se genera por un proceso de biomineralización. El compuesto formado puede presentarse principalmente en seis polimorfismos diferentes, y sus combinaciones. El polimorfismo más atractivo para esta sal en función de sus aplicaciones en biomedicina es el llamado vaterita, red cristalina más estable termodinámicamente, que presenta ventajas para desarrollar nano- o micro-partículas debido a una mayor homogeneidad en la distribución de tamaño y geometría esférica y presentar una nanoestructura porosa. Esta red puede ser cinéticamente estabilizada por diferentes moléculas como ser ácido poliglútamico, glicina, L-alanina, o ácido aspártico [Beuvier y cols., 2011]. Estas partículas han atraído considerablemente la atención para su uso en encapsulamiento de moléculas.

Métodos de síntesis de micro- y nano-partículas vía química y en condiciones supercríticas. Los procesos de encapsulación usados en la industria farmacéutica deben cumplir exigencias como la estabilidad de las moléculas activas, la producción y la eficacia del fármaco en la encapsulación, la reproducibilidad de la calidad de las microsferas, el perfil de

liberación del fármaco, así como un mínimo nivel residual de solvente orgánico en las micropartículas (el cual, debe ser inferior al valor límite impuesto por la Farmacopeas).

Sin embargo, las técnicas comunes usadas por la industria farmacéutica para encapsular moléculas activas, como el empleo de solventes en métodos de emulsificación, separación de fases de polímeros, métodos de spray dryer, no siempre son convenientes para formular partículas dentro de estas exigencias. Estos, a menudo emplean condiciones de formulación agresivas, que pueden inducir cambios físicos y/o químicos de las sustancias activas, sobre todo si se trata de una proteína, y se han detectado en algunos casos cantidades de solvente residuales que son difíciles de eliminar por debajo de los valores superiores autorizados por los organismos regulatorios. De hecho, los productos químicos volátiles orgánicos (VOC), por lo general usados en estos procesos, son sujetos a regulaciones muy estrictas internacionales debido a su toxicidad para los seres humanos y para el medio ambiente [ICH la Pauta Armonizada Tripartita para Solventes Residuales, 1997].

Para la síntesis de micropartículas de CaCO₃ cristalizadas como vaterita, la precipitación puede ser típicamente obtenida por la mezcla de una sal de calcio y otra de carbonato en solución [Caiyu Peng y cols., 2010] , o bien por el método de templado por emulsión haciendo pasar una corriente de CO₂. En este último caso, las cinéticas para la obtención de partículas precipitadas como vaterita alcanzan tiempos finales de 24 hs [Houg y Feng, 2005]. Por lo que el proceso se convierte en poco rentable y dificultoso técnicamente para la incorporación de moléculas cargo. Utilizando CO₂ en condiciones supercríticas (Sc-CO₂: 73.8 bar y 31.1 °C) estos procesos se pueden acelerar [Boury y cols., 2004].

Los fluidos supercríticos (FSC), gracias a su alta difusividad y a la alta miscibilidad con distintos gases, permiten desarrollar reacciones homogéneas como heterogéneas. La velocidad y selectividad de las mismas pueden modularse a través de la presión y temperatura. En cuanto a las reacciones homogéneas se pueden destacar algunas ventajas como que los fluidos supercríticos aumentan la velocidad de reacción y la selectividad como resultado de la alta solubilidad de los reactivos gaseosos en FSC, elevada difusión de los solutos y los débiles efectos de solvatación del FSC.

Estado físico	Densidad (kg/m ³)	Viscosidad (μPa·s)	Difusividad (mm ² /s)
Gaseoso	1	10	1-10
Fluidos Supercríticos	100-1000	50-100	0,01-0,1
Líquidos	1000	500-1000	0,001

Comparación de Gases, Fluidos Supercríticos y Líquidos

Un fluido supercrítico posee propiedades intermedias entre las de un gas y de un líquido. A continuación se muestran las propiedades de algunos compuestos, usados comúnmente como fluidos supercríticos.

Solvente	Peso molecular (g/mol)	T crítica (K)	Presión crítica MPa (atm)	Densidad crítica (g/cm ³)
Dióxido de carbono (CO ₂)	44,01	304,1	7,38 (72,8)	0,469
Agua (H ₂ O)	18,02	647,3	22,12 (218,3)	0,348
Metano (CH ₄)	16,04	190,4	4,60 (45,4)	0,162
Etano (C ₂ H ₆)	30,07	305,3	4,87 (48,1)	0,203
Propano (C ₃ H ₈)	44,09	369,8	4,25 (41,9)	0,217
Etileno (C ₂ H ₄)	28,05	282,4	5,04 (49,7)	0,215
Propileno (C ₃ H ₆)	42,08	364,9	4,60 (45,4)	0,232
Metanol (CH ₃ OH)	32,04	512,6	8,09 (79,8)	0,272
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	46,07	513,9	6,14 (60,6)	0,276
Acetona (C ₃ H ₆ O)	58,08	508,1	4,70 (46,4)	0,278

Propiedades críticas de varios solventes (Reid y col., 1987)

En la necesidad de encontrar nuevos métodos de encapsulación, que ofrezcan buen rendimiento de carga, sin la presencia de solventes orgánicos, y por sobre todo que no dañen la estructura de las moléculas intervinientes, algunas investigaciones comenzaron a orientarse a métodos alternativos, como el uso de dióxido de carbono comprimido (en condiciones supercríticas) en vez de los solventes orgánicos.

Por consiguiente, las investigaciones sobre las propiedades y los usos posibles de CO₂ comprimido rápidamente han progresado durante los últimos diez años. Numerosas investigaciones se han llevado a cabo en dióxido de carbono en agua (*W-C*) como sistemas binarios [Boury y cols. (2004)], dado que ofrecen la ventaja de interpretación como solventes "universales", debido a que se permite tanto la disolución de especies polares como apolares de bajo peso molecular. De acuerdo a estos últimos métodos han sido micronizadas proteínas y polímeros en micropartículas

El método de síntesis con fluidos en condiciones supercríticas a partir de CO₂ en disolución presenta grandes ventajas frente a otros sistemas similares en donde la mayoría apenas hacen posible controlar la morfología y el tamaño de las partículas obtenidas. Finalmente, un número grande de estos métodos terminan empleando como cosolventes solventes orgánicos que pueden acarrear problemas ambientales y de seguridad. Sin embargo, pocos equipos de investigación han hecho uso de este método de síntesis para partículas de CaCO₃. Recientemente, Beuvier y cols. (2011), describieron un método para la síntesis de

partículas esféricas con un diámetro de 5 μm usando CO_2 en condiciones supercríticas (SC-CO_2) en medio acuoso, las cuales presentaban nanoestructura porosa con nano-granos de 40 nm de diámetro, los cuales se presentaban menos empaquetados desde el exterior hacia el interior de las partículas, con un centro hueco de 0.7 μm . Cabe mencionar que mediante la variación de las condiciones de síntesis y de la presencia de diferentes moléculas para el templado, la proporción de vaterita obtenida en la precipitación podría ser controlada.

Las matrices minerales mesoporosas como el carbonato de calcio presentan ventajas frente a otros sistemas de transporte de moléculas debido a que son biocompatibles y bioresorbibles: pueden ser usadas como excipiente para la fabricación de tabletas, y para la regeneración de tejidos orgánicos y óseos. Por otro lado, los biogeles son sistemas muy atractivos debido a que poseen estereoselectividad, su síntesis es realizada en medios acuosos, su producción es fácilmente escalable y son modificables covalentemente, biodegradables, biocompatibles, y permiten estabilizar moléculas. Además, la oportunidad de incorporarlos en sistemas de liberación controlada podría permitir la simultánea liberación del cargo, y respuestas sinérgicas del sistema biológico. Micropartículas de CaCO_3 se han sintetizado en presencia de ácido hialurónico (posible transportador de moléculas bioactivas) con éxito, los cuales proponen en sus trabajos posteriores resultados promisorios para la elaboración de materiales biocompatibles híbridos para su utilización en (i) aplicaciones terapéuticas para la encapsulación de moléculas bioactivas y/o (ii) aplicaciones para procesos de diagnóstico en la incorporación de agentes de contraste [Boury y cols., 2004; Beuvier y cols., 2011]. Así, los antecedentes en la síntesis de este tipo de sistemas híbridos permiten avizorar resultados positivos con otros biopolímeros, y principalmente aquellos que presenten algún tipo de interacción con el fármaco a ser transportado para ser empleados en sistemas de liberación controlada.

REFERENCIAS GENERALES

- Ai H., Jones S.A., Lvov Y.M. (2003) Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles *Cell Biochemistry and Biophysics*, 39, 23-43.
- Beuvier T., Calvignac B., Delcroix G., Tran K., Kodjikian S., Delorme N., Bardeau JF, Gibauda A. y Boury F. (2011) *J. Mater. Chem.*, 21, 9757
- Bosio V.E.**, Islan G.E., Martínez Y.E., Castro G.R. (2011). Control release applications in food technology. Cap 1, pp. 1-13. In *Advances in Bioprocesses in Food Industry - Vol. 4.* (C.R.Soccol, A. Pandey, V.T. Soccol, C. Laroche, Eds.) Asiatech, New Delhi, India.
- Bosio V.E.**, Machain V, Gómez López A, Pérez De Berti IO, Marchetti S.G., Mechetti M, Castro G.R. (2012) Binding and encapsulation of doxorubicin on smart hydrogels for oral delivery *Applied Biochemistry and Biotechnology*. En prensa . DOI: 10.1007/s12010-012-9641-8
- Bosio V.E.**, Basu S, Chacon Villalba M. E., Güida J.A., Mukherjee Arup, Castro G.R. (2012) Congo red as molecular probe to study interactions between biopolymeric gel microspheres and drugs. Enviado.
- Bosio V.E.**, Calvignac B., Beuvier T., Boury F., Castro G.R. (2012) Synthesis and characterization of CaCO₃ biopolymers hybrid microparticles for drug delivery systems. En preparación.
- Boury F. and coll. (2004) METHOD FOR PREPARING PARTICLES FROM AN EMULSION IN SUPERCRITICAL OR LIQUID CO₂ Inventors: Frank BouryJean-Pierre Benoit Olivier Thomas Frederic Tewes Agents: STITES & HARBISON PLLC Assignees:Origin: ALEXANDRIA, VA US IPC8 Class: AA61K914FI USPC Class: 424489
- Breccia J.D., Baigorí M.D., Castro G.R., Siñeriz F. (1995). Detection of endo-xylanase activities in electrophoretic gels with Congo Red staining. *Biotechnology Techniques* 9: 145-148.
- Caiyu Peng C., Zhao Q., & Gao C. (2010) Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO₃ and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO₃ microparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 353, 132–139.
- Castro G.R., Kamdar R., Panilaitis B., Kaplan D.L. (2005). Triggered release of proteins from emulsan–alginate beads, *Journal of Controlled Release* 109, 149–157.
- Castro G.R. Panilaitis B. Kaplan D. (2006). Controlled Release Biopolymers for Enhancing the immune Response, *Molecular Pharmaceutics*, 4, 33-46.
- Costas L., **Bosio V.E.**, Pandey A., Castro G.R. (2008) Properties of immobilized lipase on pectin microspheres in organic solvents. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151:578–586.
- Cunha A.G., Gandini A. (2010) Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review Part 2. Hemicelluloses, chitin/chitosan, starch, pectin and alginates *Cellulose*, 17, 1045-1065.
- DeAnn B., Kaplan D.L., Wintera W.T., Panilaitis B., Kiemle D.J. (2012). Structural details of the Polyelectrolytic Exopolysaccharide (APE), the stabilizing component of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 emulsan complex. *Carbohydrate Polymers*, 88, 257–262.
- Dickinson S.R., McGrath K. M. (2001). *Analyst*. 126, 1118.

- Dornish, M., Kaplan, D., Skaugrud, O. (2001). Standards and Guidelines for Biopolymers in Tissue Engineered Medical Products – ASTM Alginate and Chitosan Standard. Guides. *Annual New York Academy of Sciences*, 944, 388-397.
- Durán N., Teixeira Z., Marcato P.D. (2011) Topical Application of Nanostructures: Solid Lipid, Polymeric and Metallic Nanoparticles. *Nanocosmetics and Nanomedicines*, II, 69-99.
- Findaly SM. (2010) Drug discovery technologies, industry research, global. Frost and Sullivan (<http://www.frost.com/prod/>).
- Frid P., Anisimov S.V., Popovic N. (2007). Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev.*; 53: 135-60.
- Funami T., Nakauma M., Ishihara S., Tanaka R., Inoue T., Phillips G.O. (2011) Structural modifications of sugar beet pectin and the relationship of structure to functionality. *Food Hydrocolloids*, 25; 221-229.
- Luckachan G.E., Pillai C.K.S. (2011) Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives *Journal of Polymers and the Environment*, 19, 637-676.
- von Maltzahn G., Park J.H., Lin K.Y., Singh N., Schwöppe C., Mesters R., Berdel W.E., Ruoslahti E., Sailor M.J., Bhatia S.N. (2011) Nanoparticles that communicate in vivo to amplify tumour targeting. *Nature Materials*, 10, 545–552.
- Mercaldi M.P., Dams-Kozłowska H., Panilaitis B., Joyce A.P., Kaplan, D.L. (2008). Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component. *Biomacromolecules*, 9, 1988–1996.
- Missirlis D. and col. (2006). Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 120–129.
- Murphy C.B., Corp X., Webster N.Y. (1966). Thermal Analysis . *Analytical Chemistry* 38 , 443.
- Nielsen O.S., Reichardt P., Christensen T.B., Pink D., Daugaard S., Hermans C., Marreud, van Glabbeke M., Blaye J. (2006). Phase I. European Organisation for Research and Treatment of Cancer study determining safety of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in combination with ifosfamide in previously untreated adult patients with advanced or metastatic soft tissue sarcomas. *European Journal of Cancer*, 42, 2303 –2309.
- Ott E., Spurlin H.M., Grafflin M.W. (1954). Cellulose and cellulose derivatives. p760, Interscience Publishers .(New York, EE.UU.).
- Panilaitis B., Castro G.R., Solaiman D. and Kaplan D.L. (2007). Biosynthesis of emulsan biopolymers from agro-based feedstocks. *Journal of Applied Microbiology* 102, 531–537.
- Pal K., Paulson A.T., Rousseau D. (2009). CHAPTER 16 –Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems *Modern Biopolymer Science*, 519-557
- Patel A.D. (1998) "Water-Based Drilling Fluid with High Temperature Fluid Loss control Additives" . United States Patent . Patent Number 5789349
- Plaschina, I.G., Braudo, E.E., Tolstoguzov V.B. (1978). Circular dichroism studies of pectin solutions. *Carbohydrate Research*, 60, 1–8.
- Rosenberg M., Rosenberg E. (1981). Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Journal of Bacteriology*, 148, 51–57.
- Tian H., Tang Z., Zhuang X., Chen X., Ping X. (2012) Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science*, 37, 237-280.

- Vrignaud S., Anton N., Gayet P., Benoit J.P., Saulnier P. (2010). Reverse micelle-loaded lipid nanocarriers: A novel drug delivery system for the sustained release of doxorubicin hydrochloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79, 197-204.
- Winship Cancer Institute (EMORY) Biodegradable nanoparticle formulated taxol for target therapy of head and neck cancer. (<http://winshipcancer.emory.edu/SPORE-ed/project4.htm>).
- Xiao-Hai Tang and col. (2010) Synthesis, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of a novel pectin–adriamycin conjugate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 1599–1609.
- Zonghua L., Yanpeng J. , Wang Y., Zhou C., Zhang Z. (2008). *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 1650–1662.
- Zosim Z., Gutnick D., Rosenberg E. (1983). Uranium binding by emulsan and emulsanosols. *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 1725–1735.

CAPITULO 1

"Rojo Congo, una molécula modelo para estudiar interacciones entre geles de matrices biopoliméricas y fármacos"

Interacción con Biopolímeros

Selección de la Matriz

Caracterización de la Matriz

Recubrimiento de la Matriz

INTRODUCCION

MATERIALES Y METODOS

- 1.** Determinación cuantitativa de Rojo Congo (RC)
- 2.** Selección de biopolímeros según interacción con RC
- 3.** Síntesis de GG Carboxi-Metilada
- 4.** Formulaciones biopoliméricas. Formación de microesferas
- 5.** Determinación de grado de sustitución en CMGG
- 6.** Análisis de composición centesimal
- 7.** Estudios Térmicos
- 8.** Estudios de Tensión Superficial
- 9.** Estudios de Viscosimetría
- 10.** Análisis Vibracionales: Espectroscopías FTIR y Raman
- 11.** Microscopía electrónica de barrido (SEM)
- 12.** Microscopía Óptica (OM). Análisis de hinchamiento
- 13.** Carga de RC
- 14.** Cinéticas de liberación
- 15.** Estabilidad de microesferas y liberación de RC a pH diferentes
- 16.** Optimización de la matriz: Procesos de recubrimiento con Emulsano

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

Rojo Congo, una molécula modelo para estudiar interacciones entre geles de matrices biopoliméricas y fármacos

INTRODUCCION

Las moléculas bioactivas con propiedades terapéuticas que presentan grupos aromáticos como ser polipéptidos, tetraciclinas, antraciclinas y quinolonas representa compuestos sumamente usados debido a sus propiedades antibacterianas, y/o antitumorales, y/o actividades antivirales. Sin embargo, la mayor parte de ellas muestran efectos secundarios tóxicos indeseables en órganos que no son blanco para su acción (p.ej. el corazón, el hígado, riñones, estómago, sangre y líneas de células madre, etc.). Estas consecuencias fisiológicas graves son maximizadas durante tratamientos a largo plazo como quimioterapias y/o patologías recurrentes. Todos los tipos de moléculas terapéuticas mencionadas comparten una estructura común de al menos un grupo aromático, y un fenómeno de apilamiento por la interacción aromática de tipo π - π . La interacción hidrofóbica y procesos de agregación entre las moléculas de antibióticos representan un problema serio para la bioactividad y biodisponibilidad de estas moléculas en medicina, y un desafío para el desarrollo nuevos y alternativos sistemas de liberación controlada de moléculas en general. Por otro lado, el empleo de biopolímeros en áreas de transporte de drogas es considerado altamente efectivo para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos. Entre ellos, los polisacaridos han sido tomados con especial atención.

El objetivo del presente capítulo es el desarrollo y estudio de matrices para la síntesis de microesferas mediante mezclas biopoliméricas. En tal sentido, se realizará un relevamiento de nueve biopolímeros de naturaleza polisacáridica para estudiar su interacción con Rojo Congo como molécula modelo típica para la administración oral de antibióticos aromáticos. Diversas mezclas de polímeros, coacervados, serán estudiados para la obtención de microesferas de gel y optimizadas mediante estudios de la liberación controlada, estudios cinéticos y de hinchamiento *in vitro*, y en diferentes condiciones experimentales.

Además, será parte de los objetivos identificar los grupos funcionales involucrados en las interacciones entre el RC y las matrices biopoliméricas. Los estudios se complementarán mediante microscopía óptica y electrónica de barrido (*OM* y *SEM*). Las interacciones entre los componentes de hidrogel serán analizadas por viscosimetría y correlacionadas con estudios espectroscópicos antes mencionados (FTIR y Raman). A su vez, se estudiarán los efectos de protección mediante recubrimiento con el objeto de mejorar las propiedades de la matriz, ya sea en cuanto a su estabilidad y/o cinética de liberación de la molécula carga. Para tal fin se empleará Emulsano, un complejo biopolimérico de naturaleza microbiana, el cual será producido y purificado y caracterizado (Anexo 1).

MATERIALES Y METODOS

En los ensayos realizados en el presente capítulo se emplearon: la sal sódica de Rojo Congo (RC, ácido benzodinediazo-bis-1-naftilamina-4-sulfónico $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$; peso molecular: 696.66 g/mol, pureza mayor al 99%) obtenido por Merck (AG Darmstadt), pectina citrus (74 % metoxilación) y carragenina lambda (CAR λ , clasificación según cantidad de grupos sulfonatos en su unidad monomérica) (Sigma-Aldrich). Además se emplearon: sal sódica de alginato (ALG, de baja viscosidad, peso molecular viscosimétrico promedio: 1×10^5 Da) provista por Biochem (SA), gelatina (GELA) provista por PARAFARM, goma arábica (GARAB) provista por DROAN, goma guar (GG) provista por Nutrial (Buenos Aires, Argentina). La goma guar fue provista por Hindustan Gums & Chemicals (India) y derivatizada: carboximetilada (CMGG) en el laboratorio del Prof. Arup Mukherjee (Univ. de Calcuta, Kolkata, India). La goma garrofín (GGARR) provista por Saporiti Hnos. (Buenos Aires, Argentina). Las pectinas de 33,0 %, 35,4 %, 55,3% y 67,2% (PEC 33, PEC 35, PEC 55y PEC 67 según sus grados de metoxilación) fueron provistas por CPKelco (Dinamarca); y las carrageninas iota y kapa (CAR I y CAR K, clasificación realizada según cantidad de grupos sulfonatos en su unidad monomérica) son compuestos provistos Satiagel. Todos los restantes reactivos fueron de grado analítico o superior de Sigma (St. Louis, MO) o Merk (Darmstadt). Las soluciones estándar de RC (1,0 g/l), las soluciones biopoliméricas, y las soluciones reguladoras (*buffers*) utilizadas, así como sus diluciones fueron realizadas con agua calidad ultra pura (miliQ, Millipore, Bellerica, EE.UU.).

Determinación cuantitativa de RC

La longitud de onda máxima de absorción fue determinada en un espectrofotómetro mediante un barrido espectral comprendido entre 200 a 700 nm. Las concentraciones experimentales de RC fueron determinadas en el máximo de absorción a 497 nm en un intervalo de concentraciones comprendido entre $1,5$ a $2,5 \times 10^{-2}$ mg/ml en un espectrofotómetro UV-Visible (Beckman, USA).

Síntesis de GG Carboxi-Metilada (CMGG)

La CMGG fue provista generosamente por el Prof. Arup Mukherjee (Universidad de Calcuta, Kolkata, India). La síntesis de CMGG se detalla a continuación: 50,0 g de GG fueron distribuidos en tres tubos de fondo cóncavo y colocados en un rotavapor con condensador al que se le adosó un tubo de nitrógeno para su purga bajo agitación constante. 100 ml de isopropanol fueron agregados bajo agitación mecánica a 5,0 ml/min. Luego de 30 minutos de incubación, 30,0 ml de solución acuosa de Na(OH) (0,25 %) fue añadida por la salida del condensador y la mezcla fue agitada por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, 17,0 g de ácido cloroacético disuelto en 100 ml de agua y ajustado a pH $7,0 \pm 0,2$ con Na(OH) (1,0 %) fueron añadidos a la mezcla de reacción bajo continua agitación y purga con nitrógeno gaseoso. El tiempo de agregado total fue de 1 hora, seguidamente se dejó agitando al sistema por tres horas más, a 55 °C. La mezcla fue enfriada y un sólido amarillo fue separado por filtración mediante un embudo Büchner. El precipitado obtenido fue lavado dos veces con 80 % de una solución de isopropanol en agua; posteriormente lavado con una solución 50% de etanol en

agua, y por último fue secado en un desecador al vacío. El rendimiento obtenido en el proceso de síntesis fue de 86 %.

Selección de biopolímeros mediante determinación de la interacción con RC

Se pesó la cantidad necesaria de cada biopolímero comprendidas entre 0,5 y 2,0 % para ser disuelto en agua de calidad MiliQ suplementada con azida de sodio (10 μ M) (Tabla 1). La disolución se llevó a cabo bajo agitación suave durante 12 horas; una vez finalizado este proceso se mantuvo a cada solución a 5 °C hasta su utilización.

Biopolímero	Concentración (%, p/v)
Gelatina (GELAT)	2,0
Alginato de sodio (ALG)	1,5
Pectinas (PEC)	1,5
Carrageninas (CAR)	1,0
Gomas (G)	0,5

Tabla 1: Soluciones empleadas en ensayos de interacción.

El procedimiento consistió en tomar una alícuota de 375 μ l de solución *stock* de cada biopolímero (Tabla 1), los cuales fueron incubados con 125 μ l de solución de RC por 15 minutos y 2 horas a 25 °C. Luego, se procedió a precipitar el complejo de unión biopolímero-molécula cargo (RC) de cada sistema mediante el agregado de 1,0 ml de acetona y posterior centrifugación (5 minutos, 10.000 xg). La concentración de RC fue determinada según los métodos anteriormente mencionados en el sobrenadante de cada sistema luego de hacer diluciones ($D=1/10$) con etanol 96 %. La curva de calibración se realizó para RC disuelto en etanol.

Formulaciones biopoliméricas. Formación de microesferas

Diferentes proporciones de mezclas de hidrogel ALG:CMGG (100:0 a 68,5:31,5) fueron ensayadas con el objeto de determinar condiciones óptimas para la encapsulación de RC y la estabilidad de las microesferas. Se estudió la capacidad de la carga y la liberación en el tiempo de RC, empleada como molécula modelo para una posible utilización en sistemas de administración oral de fármacos.

Las microesferas de hidrogel fueron obtenidas mediante un proceso de extrusión mecánica de la mezcla biopolimérica al forzar el pasaje de la solución a través de una jeringa de 100 μ m de diámetro mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow, el Reino Unido). Una solución de ALG (3,5 % p/v) y GG (0,5 % p/v) con o sin RC (0,4 % p/v) fue goteada sobre una solución 50 mM CaCl_2 (0 °C) bajo continua agitación mecánica para evitar la coalescencia de las microesferas en formación de gel. Posteriormente, las microesferas fueron envejecidas en una solución de cloruro de calcio (50 mM) durante 48 h, seguido de la filtración sobre papel (Whatman #1). Las microesferas filtradas fueron almacenadas en una solución de CaCl_2 ,

conteniendo NaN_3 (10 μM) a 5 °C. Alternativamente, las microesferas fueron liofilizadas y/o secadas por aire a temperatura ambiente.

Determinación de grado de sustitución en CMGG

La síntesis de la goma guar carboximetilada y su caracterización fueron llevadas a cabo en los laboratorios del Dr. Arup Mukherjee (*Dept of Chemical Technology, Universidad de Calcuta, Kolkata, India*). El grado de superficial de funcionalización sobre la estructura de goma de guar fue determinado por titulación con hidróxido de sodio estándar. La metodología empleada fue: 1,0 g de CMGG fueron suspendidos en 5,0 ml de una solución de isopropanol y 15,0 ml de HCL concentrado y se incubó la mezcla resultante durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, 250 ml del agua fueron añadidos mediante agitación suave a temperatura ambiente, y el sólido obtenido fue separado por filtración. El residuo sólido fue lavado con 250 ml de agua y filtrado repetidamente hasta no detectar iones cloruro en el agua de lavado mediante un electrodo ión selectivo. La mitad de la masa tarada de la muestra fue disuelta en un exceso de NaOH (100 mM) y agitada durante 20 minutos. El exceso de hidróxido de sodio sin reaccionar se tituló por retorno con una solución estándar de HCl (100 mM) empleando naranja de metilo (rango de pH 3,1 a 4,4) como indicador ácido-base. Simultáneamente, una titulación blanco fue realizada para NaOH (100 mM) en ausencia de la muestra de CMGG. La mitad restante de CMGG fue lavada y secada en horno a 102 °C hasta peso constante. Este peso fue definido como igual al peso de la muestra en la titulación de álcali. El grado de sustitución de GG fue estimado mediante el siguiente cálculo:

$$DS = \frac{T M_1 (V_0 - V_1)}{W - [M_2 \cdot T (V_0 - V_1)]} = \frac{T \cdot 162 (V_0 - V_1)}{W - [58 T (V_0 - V_1)]} \quad (\text{I})$$

En donde la W es el peso del material lavado empleado para la prueba (calculado en base al material secado en horno a 102 °C); V_0 , el volumen del HCl necesario para la titulación del blanco sin muestra de CMG; V_1 , el volumen del HCl necesario para la titulación de la muestra en estudio; T, el título de la solución de HCl (100 mM); M_1 , el peso molecular de la unidad monomérica no substituida (1); M_2 , el peso molecular de la unidad substitutiva.

Análisis de composición. Porcentajes de C, H, N y S

Los porcentajes de C, H, N, y S fueron determinados por la técnica de combustión en un Analizador CHNS (modelo CHNS-932, M/s Leco Corporation, EE.UU.). Las muestras fueron pesadas en una balanza SEMimicro de Paul Bunge (modelo 23, Hamburgo, Alemania), posteriormente fueron sometidas hasta combustión completa dentro de un recipiente metálico en atmósfera de oxígeno. Los óxidos generados de cada elemento que se desarrollan fueron monitoreados con espectroscopía IR y comparados contra estándares internos de acetofenona, y cisteína (Leco, EEUU). Los resultados son presentados en la Tabla 3.

Estudios Térmicos

El efecto ante el cambio en la temperatura sobre la estabilidad y características de los polímeros resultan importantes parámetros a comprar [Murphy y cols., 1966]. El análisis térmico diferencial (DTA) y los estudios de termo-gravimetría (TGA) fueron llevados a cabo en un equipo de TG/DTE Pyris-Diamond (Perkin-Elmer, EE.UU.). Una pequeña muestra de cada polímero fue introducida en una cápsula de platino bajo condiciones inertes mediante purgado con N₂ y el análisis térmico fue llevado a cabo en un rango de temperaturas entre 30 a 350 °C con una rampa de ascenso térmico de 10 °C /min. Los estudios de DTA y TGA para GG y CMGG fueron presentados en la Figura 1, 2 y 4,5 respectivamente.

Estudios de Tensión Superficial

Se realizaron determinaciones de la tensión superficial en agua para la GG y la GG derivatizada. Soluciones de GG y CMGG (0,1 %, w/v) fueron preparadas en agua destilada libre de dióxido de carbono (pH definido) para realizar medidas de ángulo de contacto dinámico y de tensiometría (DCAT, Data Physics, Alemania). Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Estudios de Viscosimetría

El análisis viscosimétrico se realizó empleando soluciones de GG y CMGG (2.0 % en agua grado HPLC), las cuales fueron sometidas a un proceso de degaseado en vacío. Las viscosidades de ambas soluciones fueron medidas usando números desde el LV-2 al LV-4 en un viscosímetro Brookfield (modelo LVT, Brookfield, EE.UU.). Los resultados fueron comparados con la muestra de viscosidad estándar suministrada por el fabricante. Los resultados de viscosidad fueron registrados en 30 °C y fueron tabulados en la Tabla 4.

Las viscosidades aparentes de la mezcla de formulación ALG-CMGG fueron determinadas utilizando un viscosímetro de Ubbelohde (S 100) con o sin RC a 37 °C. Todas las soluciones utilizadas fueron de 8,0 ml finales y preparadas como se mencionara anteriormente. El tiempo de escurrimiento fue controlado mediante cronómetro. Las viscosidades relativas de cada mezcla fueron estimadas por las viscosidades aparentes de las soluciones divididas por la viscosidad aparente del solvente.

Análisis Vibracionales: Espectroscopias FTIR y Raman

Los estudios de FTIR de GG y CMGG fueron realizados en un FTIR Jasco (modelo 670 Plus, Jasco, Japón). Cada compuesto fue molido en un mortero y posteriormente mezclado con Bromuro de Potasio de grado FTIR, luego del cual se obtuvo una pastilla de KBr. La muestra fue analizada con la corrección de fondo en 256 como número de exploración, contra una fuente de cerámica de alta energía y detector DLATGS. Los espectros de FTIR correspondientes a GG Y CMGG se muestran en la Figura 3.

Alternativamente, los espectros de infrarrojo para las formulaciones se midieron en un espectrofotómetro FTIR Bruker Equinox 55 (Billerica MA, USA) entre 4.000 y 400 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹. El RC fue previamente purificado por recristalización en agua para su estudio. Las muestras se prepararon de la manera usual, diluidas en pastillas de KBr.

Los espectros Raman se obtuvieron en la región 3500-100 cm^{-1} , con la misma resolución, empleando el accesorio Raman FRA 106 de un espectrofotómetro FTIR Bruker 66 (Billerica MA, USA), con radiación de 1064 nm de longitud de onda proveniente de un láser de Nd-YAG.

La interacción entre grupos diferentes en la formulación ha sido analizada mediante la comparación de los espectros de Raman correspondientes a RC recristalizado desde una solución acuosa.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El examen y análisis de la morfología superficial y características microestructurales de micropartículas liofilizadas y/o secadas por corriente de aire fue determinada usando un microscopio electrónico de barrido (Philips SEM 505, Holanda). Para la preparación de las muestras, no conductoras, se realizó un depósito delgado de Au por el método de *sputtering* en un metalizador Balzers SCD 030 hasta alcanzar un espesor que comprendido entre 150 y 200 Å. La exploración de las muestras se llevó a cabo a 25 kV y el registro en forma de imágenes digitales mediante un digitalizador de imagen *Soft Imaging System ADDA II (SIS)*.

Microscopía Óptica (OM) de microesferas para análisis de hinchamiento de hidrogeles de ALG-CMGG

La propiedad de hinchamiento de microesferas ALG-CMGG en medios acuosos fue determinada utilizando el método de pesadas (Chen y col., 2004). Las muestras se secaron para luego incubarlas en 5,0 ml de buffer fosfato de sodio (100 mM, pH 7,4) durante 12 h. Posteriormente, las muestras fueron filtradas y secadas mediante filtro de papel para absorber el agua de exceso sobre la superficie. Los radios de hinchamiento (*swelling*) Q_s fueron calculados de la ecuación:

$$Q_s = \frac{W_s - W_d}{W_d} \quad (1)$$

Donde W_s es el peso de la muestra húmeda luego del proceso de hinchamiento y W_d es el peso de la muestra seca.

Carga de RC

El rendimiento de carga de la molécula de RC en la matriz fue determinado incubando 100 mg de microesferas en 5,0 ml de buffer fosfato de sodio (100 mM, pH = 7,4) hasta disolución total y posteriormente centrifugando a 10.000 xg durante 10 minutos (5 °C). Luego el seguimiento de la concentración de RC fue determinado mediante espectrofotometría del sobrenadante como se mencionara anteriormente. Para evaluar el rendimiento de carga, fue usada la ecuación 2 de la siguiente manera:

$$\text{Eficiencia de carga} = \frac{[\text{RC}] \text{ en el sobrenadante}}{[\text{RC}] \text{ Teórica}} \quad (2)$$

Cinética de liberación

Se pesaron 200 mg de microesferas de ALG-CMGG (conteniendo 0,4 % RC) y en 5,0 ml en una solución conteniendo NaCl (154 Mm) y buffers (20 mM): Clark y Lubs (pH 1,2), buffer fosfato (pH 6,8, 7,4, 8,0), buffer TES (pH 6,8, 7,4, 8,0) con agitación magnética suave incubados a 37 °C durante tiempos determinados. Alícuotas de 750 µl fueron retiradas de los frascos (5,0 ml), y el volumen retirado fue substituido por el buffer respectivo. Las muestras fueron centrifugadas (10,000 xg durante 5 minutos a 5 °C). Los sobrenadantes fueron colectados y medidos espectrofotométricamente (497 nm) como se mencionara previamente. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

Estabilidad de microesferas y liberación de RC a pH diferentes

Microesferas de la mezcla ALG-CMGG gelificada conteniendo RC fueron incubadas a pH 1,2 y 37 °C durante 25 minutos, lavadas y resuspendidas en buffer fosfato (20 mM, pH= 7,4). La cantidad de RC liberado de las microesferas fue seguida espectrofotométricamente a 497 nm.

Por otra parte, se trabajó en presencia y ausencia de agentes quelantes para comparar las respuestas de las microesferas protegidos con un recubrimiento biopolimérico, para tal fin fue empleado emulsano, producido por cultivos en medio líquido de la cepa *Acinetobacter venetianus* RAG-1 según protocolo que se detalla (Anexo Capitulo 1, sección de Materiales y Métodos, apartado "Producción de Emulsano). Ensayos control fueron realizados con microesferas sin recubrimiento.

Optimización de la matriz: Procesos de coating con Emulsano

Se llevaron a cabo experiencias equivalentes a las realizadas en los estudios de estabilidad microesferas y liberación de RC en este caso partiendo de sistemas sometidos a un proceso de recubrimiento con Emulsano. Para ello, durante el proceso de síntesis de las microesferas se adicionó emulsano (0,15 mg/ml) a la solución de CaCl₂ y fueron empleadas las mismas condiciones detalladas en el protocolo de síntesis de microesferas. Posteriormente, las microesferas fueron sometidas a un proceso de maduración en presencia de la solución de recubrimiento durante períodos de 12, 24 y 48 hs. Cada lote luego fue ensayado por individualmente para determinar el efecto protector del biopolímero sobre estas matrices.

Estadísticas

Dos o tres experimentos independientes se realizaron como mínimo por duplicado (N=2) en todos los casos. Los datos presentados en los gráficos se representaron como promedios con su desviación estándar asociada.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Nueve biopolímeros con diferentes estructuras moleculares fueron ensayados en presencia de Rojo Congo durante distintos tiempos de incubación, a saber: 15 minutos o 2 horas (Figura 1). Tres biopolímeros presentaron una interacción considerablemente mayor que el resto luego de 15 minutos de incubación, así como también luego de 2 hs de incubación, pero el número asciende a cinco biopolímeros al analizar la interacción en los ensayos de 2 horas, a saber: ALG, CMGG, GG, GARAB, GGARROF.

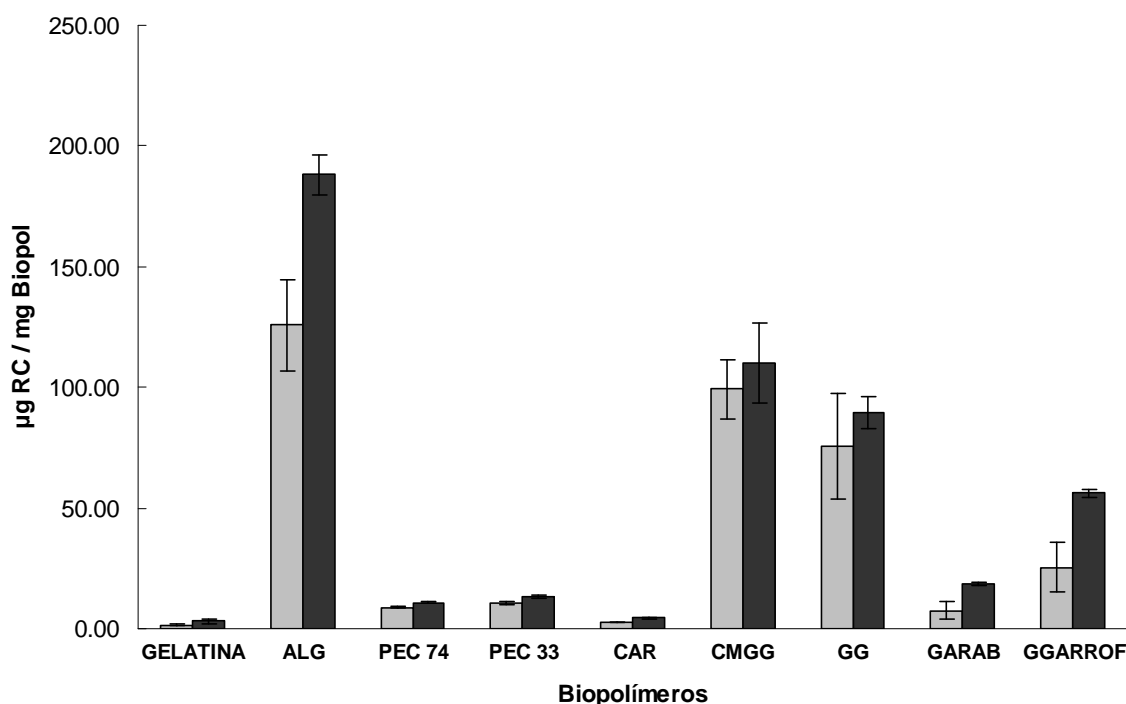


Figura 1. Ensayos de interacción entre RC y diferentes biopolímeros. RC adsorbido luego de 15 min de incubación (□) o luego de 2 horas (■).

El ALG mostró una mayor interacción con RC respecto del resto de los polímeros (con un porcentaje mayor al 40% de interacción con RC por encima de las demás macromoléculas ensayadas), mientras que CMGG y GG le siguen en magnitud de interacción con valores comparables entre ellas. Los restantes polímeros mostraron un incremento de interacción a la molécula de RC al aumentar el tiempo de incubación hasta dos horas (Tabla 2).

Biopolímero	Incremento (%)
GELAT	54,7
ALG	33,1
PEC 74	18,1
PEC 33	20,5
CAR	42,5
CMGG	10,0
GG	15,3
GARABIGA	60,3
GGARROFIN	54,8

Tabla 2. Incremento en el porcentaje de RC unido a cada biopolímero entre ensayos independientes de incubación por 15 min y 2 horas.

Las diferencias encontradas en la magnitud de la interacción entre cada biopolímero y la molécula de RC a los diferentes tiempos de incubación sugieren la presencia de un proceso de naturaleza cinética. Luego de 15 minutos, el proceso de interacción probablemente se encuentre en un equilibrio transiente, en donde la interacción es más favorable energéticamente que cinéticamente en nuestras condiciones experimentales.

De acuerdo a los resultados de selección: ALG, GG y CMGG fueron los polímeros seleccionados para el desarrollo de matrices para la carga y liberación de la molécula cargo.

El derivado aniónico CMGG fue obtenido a partir de GG como se indica en el esquema de la Figura 2. Las propiedades del derivado CMGG fueron analizadas mediante FTIR, análisis elemental y estudios de viscosidad.

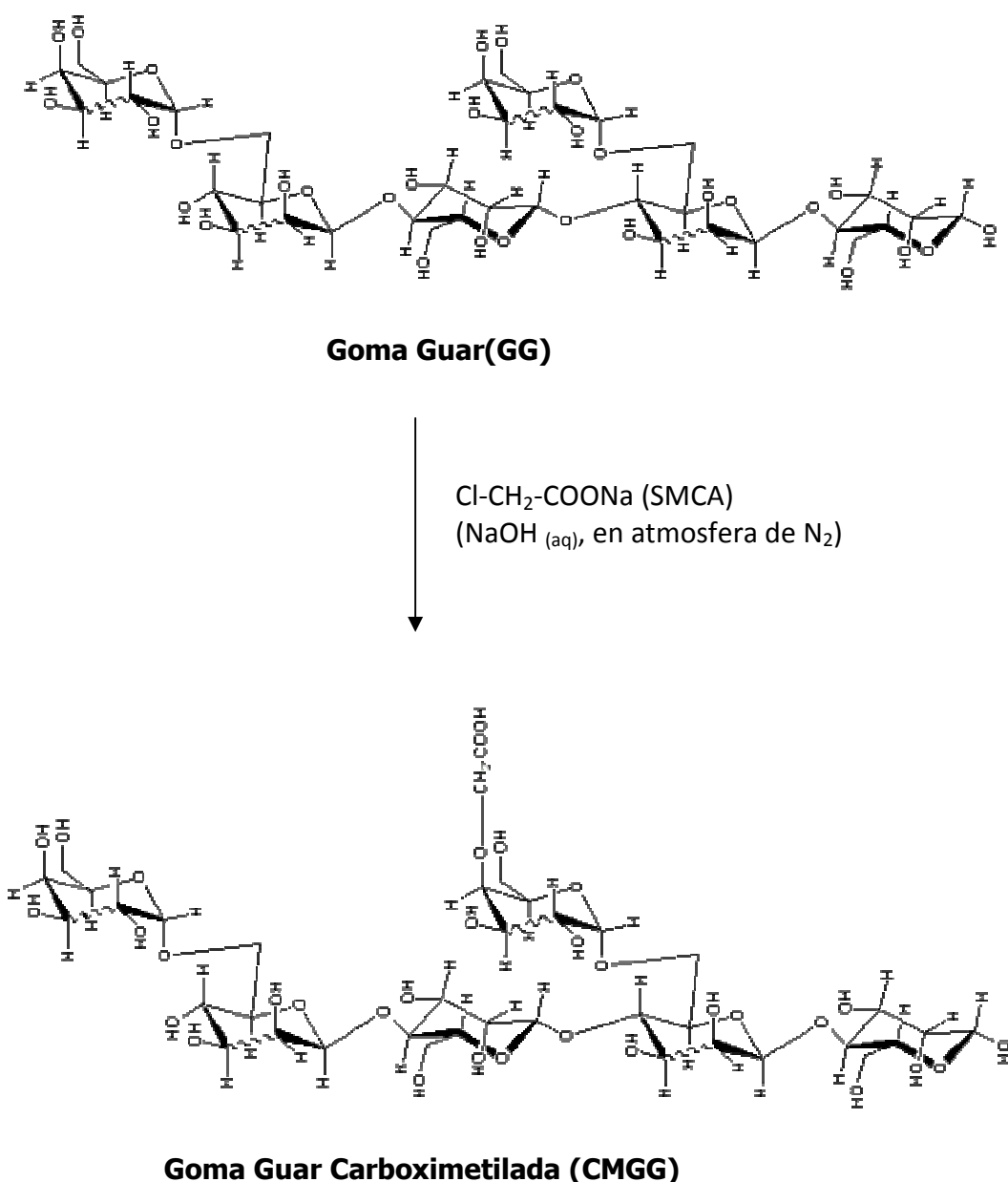


Figura 2. Esquema de la obtención de CMGG a partir de la derivatización de la GG.

El estudio mediante FTIR de GG y CMGG permitió observar bandas vibracionales distintivas entre ambas muestras. En el espectro de la GG, el estiramiento O-H de los grupos funcionales C-OH se observan a 3407 cm^{-1} y los acoplamiento éter del azúcar fueron observados a 1058 cm^{-1} . En el espectro para el derivado carboximetilado de la GG, se visualiza una banda más intensa y amplificada para la función -COOH a 1709 cm^{-1} (correspondiente al modo vibracional de estiramiento del grupo C=O), y también en 2337 cm^{-1} para el modo de estiramiento -C-OH (Figura 3, línea verde). La estructura de la GG se encontró constituida de enlaces C-C de tipo azúcar, asociados a una unión de tipo éter, representados en la banda de 1058 cm^{-1} , el modo vibracional de estiramiento que se registra al analizar pastillas de bromuro

de potasio conteniendo la muestra previamente molida en mortero de ágata (Figura 3, línea azul). El grupo hidroxilo de la GG está fuertemente comprometido en uniones tipo puente de hidrógeno, banda que se observa a 3407 cm^{-1} . En el derivado CMGG una banda distintiva del carboxilo fue observada en 1709 cm^{-1} (modo vibracional de estiramiento del grupo carbonilo) y el grupo -OH del azúcar mostró un corrimiento hacia menores frecuencias (3429 cm^{-1}) respecto del espectro del polímero sin derivatizar así como un ensanchamiento de la banda vibracional del grupo -OH que manifiesta la presencia de puentes de hidrógeno en el compuesto sintetizado, posiblemente debido a presencia de la función COOH presente en la vecindad. De éstos análisis se puede observar la presencia de la funcionalidad adicional del grupo -COOH sobre el esqueleto original de GG. La estructura del esqueleto del azúcar en la CMGG, sin embargo, permanece intacta como se detecta en la vibración típica cercana a 1022 y 1152 cm^{-1} , la cual fue observada en el espectro de CMGG como en los espectros de GG.

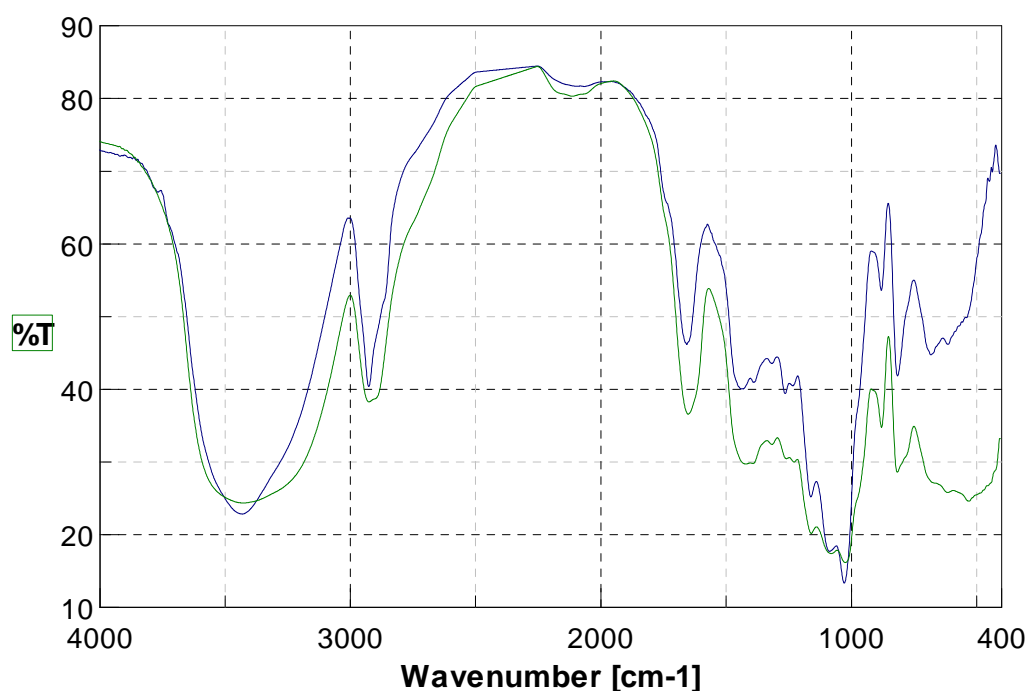


Figura 3. Espectroscopia de FTIR: GG (línea azul) y CMGG (línea verde).

El análisis elemental y el porcentaje de C, H, N, y la S fue realizado por la técnica de combustión y los resultados fueron resumidos en la Tabla 3 (No fueron detectados presencia de N y S). Además, el derivado aniónico CMGG resultó ser fácilmente soluble en el agua y en particular en solución de hidróxido de sodio lo que sugiere la presencia de grupos RCOO^- en el medio de álcali en el biopolímero (resultados no mostrados).

Compuesto	Análisis de CH (%)				Grado de Substitución	Rendimiento (%)
	Calculado		Observado			
	C	H	C	H		
Goma-Guar	32,9	4,57	30,2	4,79	-	-
CMGG	43,8	5,48	45,0	5,79	0,18	96

Tabla 3. Análisis de la composición estructural de Goma Guar y su derivado carboximetilado.

La reacción de derivatización de la GG para sintetizar un polímero carboximetilado (CMGG) permitió obtener un producto polimérico que presentaba una reducción considerablemente de la tensión superficial del agua un 42 % (de 72 dinas/cm a 36,59 dinas/cm) para una concentración de 0,359 g/l, lo que podría ser atribuido a la presencia de grupos funcionales polares: iones carboxilato. Mientras que, la GG mostró una disminución de la tensión superficial del agua de 10 unidades (72 dinas/cm a 62,15 dinas/cm, aproximadamente un 13,7 %) cuando la concentración de goma de guar fue disminuida a 0,278 g/l (aproximadamente el 22,6 %).

La viscosidad de una solución acuosa al 2,0 % (w/v) de GG fue de 30.000 cps, y como es de esperar en un gel tixotrópico vinculado a la presencia de puentes de hidrogeno en agua desmineralizada, presenta como consecuencia características higroscópicas. Sin embargo, la CMGG a la misma concentración y la misma temperatura (30 °C) mostró una dramática disminución de la viscosidad a 350-400 cps (75 a 85 veces menor), indicando una fluidez de tipo pseudoplástica.

Compuesto	TGA (°C)	Viscosidad (cps)	Tensión Superficial (dinas/cm)
Goma Guar	275	30.000	62,15
Goma Guar carboxilmetilada	212	350-400	36,59

Tabla 4. Caracterización fisicoquímica de GG y su derivado carboxilmetilado.

El estudio de DTA de polímeros puede aportar información valiosa como ser la estabilidad térmica y el tipo de conformación que adopta la molécula en diferentes condiciones. Para la GG se encontró una considerable estabilidad: su descomposición fue detectada a partir de los 275 °C (Figura 4). La descomposición endotérmica posiblemente esté asociada con el dióxido de carbono y la pérdida estructural de agua alrededor de los 31 °C. La CMGG, presentó una estabilidad térmica menor: su descomposición comienza a los 212 °C (Figura 5). La naturaleza de descomposición de la GG observada en los perfiles térmicos obtenidos indica la ausencia de cristalinidad, mientras que en el caso de su derivado, la CMGG, se observa una naturaleza parcialmente cristalina, asociada a una temperatura de transición casi lineal en el intervalo de temperaturas comprendidas entre 184,6 a 216,0 °C. La mencionada curva representa un área exotérmica que indica la liberación de calor, muestra de la completa degradación del polímero.

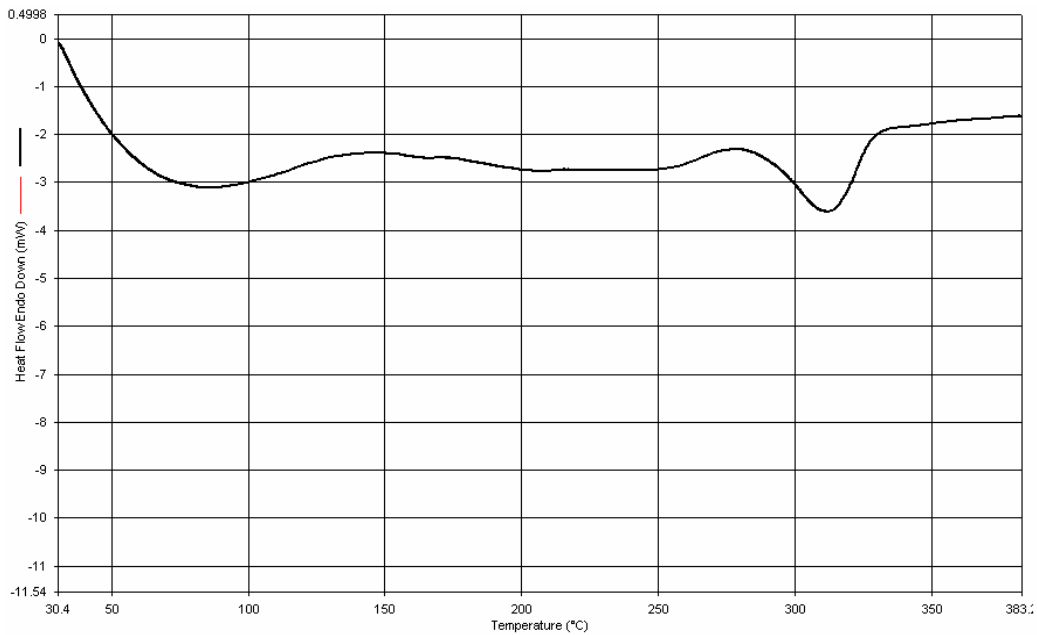


Figura 4. Estudios de DTA para GG.

La curva de DTA para la GG (Figura 4) presenta un máximo endotérmico cercano a los 74 °C. Debido que el mencionado máximo se encuentra por debajo de los 100 °C no es posible asociarlo a la pérdida de agua, pero sí a algún cambio estructural probablemente asociado a la conformación del polímero en solución y la posible pérdida de agua de solvatación, hecho que ha demandado energía. Para la CMGG esta baja temperatura de relajación del sistema fue muy pronunciada, tal vez asociada a máximos correspondientes a simultáneas pérdidas de agua alrededor de 100 °C.

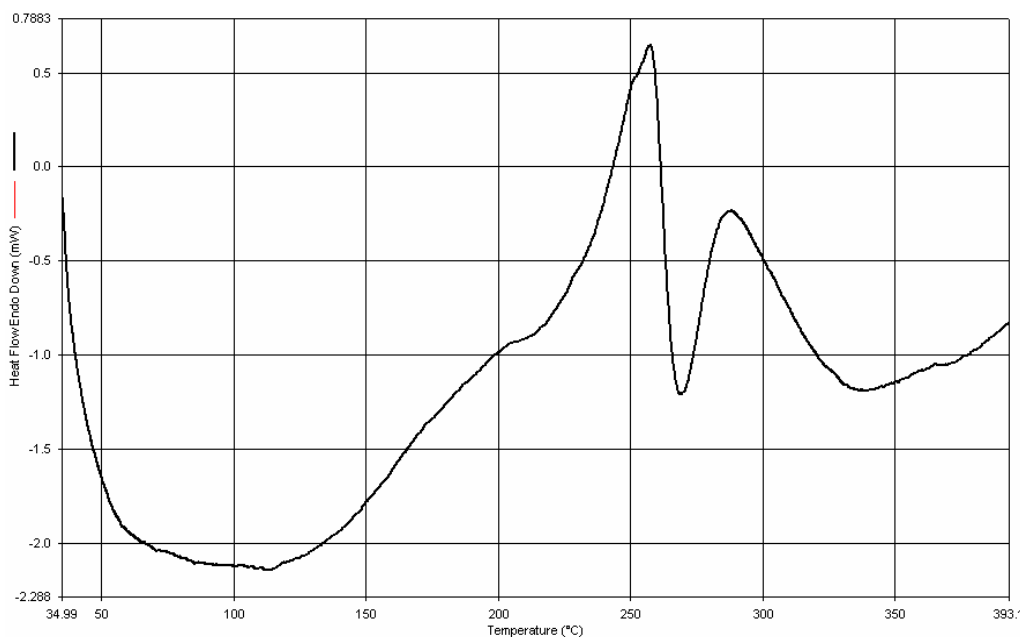


Figura 5. Estudios de DTA para CMGG.

El estudio termogravimétrico implica el seguimiento de la disminución de masas con el aumento gradual de la temperatura de la muestra. La curva de termogravimetría experimentalmente puede reproducirse para polímeros dado que por ejemplo, en el caso de la GG, la pérdida de peso gradual es directamente proporcional al aumento de la temperatura; en este caso la pérdida de peso en el intervalo de temperaturas comprendidas entre 50 a 100 °C puede ser interpretada como una pérdida de moléculas de agua. Sin embargo, posteriormente de este evento, el polímero se hace estable y deshidratado no presenta ningún cambio de masas hasta los 259,2 °C (Figura 6).

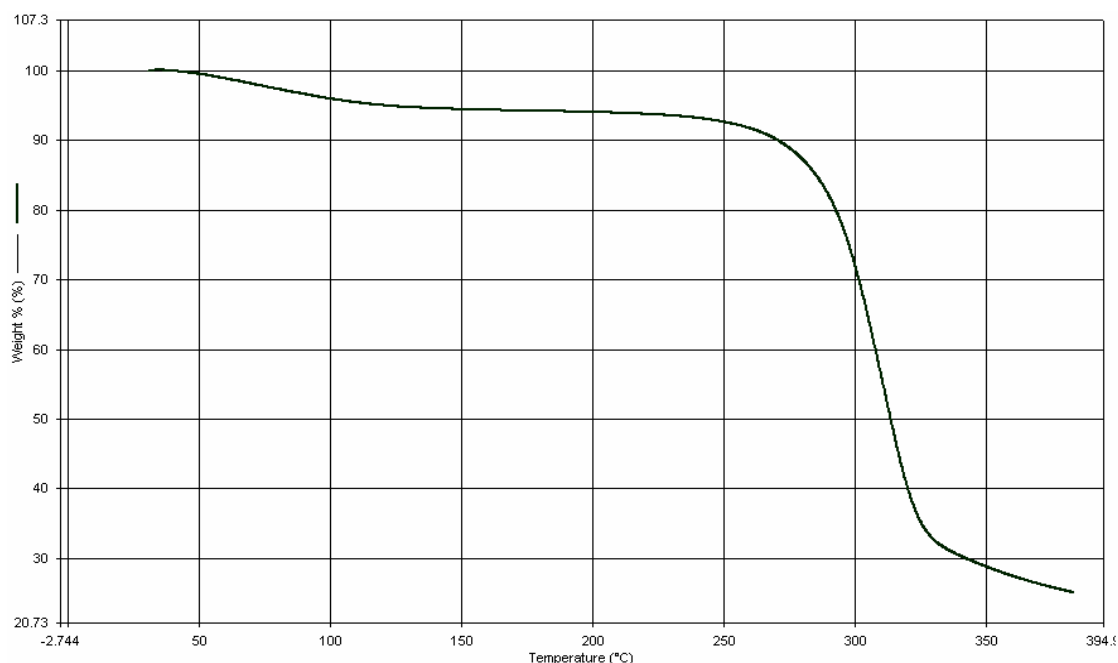


Figura 6: Estudios de TGA para GG.

En la CMGG la curva de TGA (Figura 7) representa una descomposición gradual y marcada del polímero que comienza a partir del principio hasta 210 °C, y ninguna fase de descomposición se observa en el intervalo de 210 a 240 °C. A mayores temperaturas, ninguna otra descomposición fue registrada, solo se puede observar una pérdida de peso rápida posiblemente debido a la liberación de CO₂. La descomposición total se da para la CMGG antes de 300 °C.

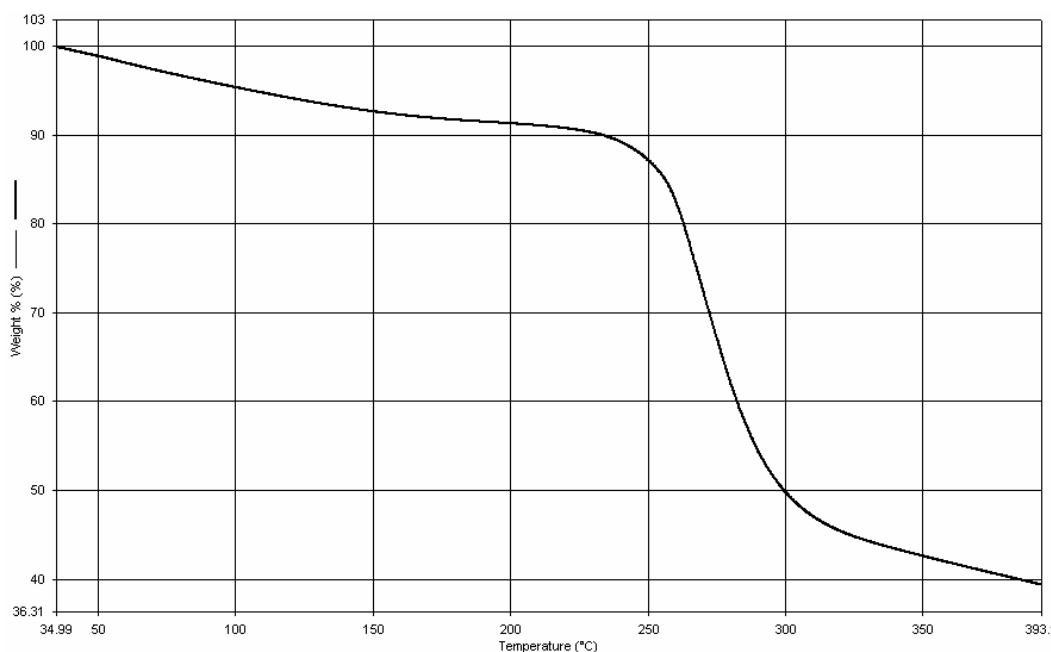


Figura 7: Estudios de TGA para CMGG.

Previsiblemente, la GG presenta una estructura basada en galactomanano para su esqueleto sacarídico, y una superficie funcionalizada muy diferente la cual no se puede considerar formando parte de la robusta estructura que presenta la cadena del esqueleto del polímero por no presentar las mismas propiedades. Los puentes de hidrogeno de los grupos –OH con la superficie serían los responsables de tal robustez, considerablemente disminuida en el derivado CMGG de mayor naturaleza iónica.

Considerando las interacciones con RC, fueron seleccionados ALG, CMGG y GG para desarrollar matrices apropiadas para la carga. A su vez, en base a los estudios de caracterización de la CMGG sintetizada y sus ventajas respecto de la GG para este tipo de sistemas, mezclas de ALG-CMGG fueron ensayadas en un rango de proporciones de 100:0 a 68:32 para el encapsulamiento óptimo de RC en la presencia de cloruro de calcio. Los porcentajes de CMGG en la mezcla más altos que el 32 % no fueron capaces de formar hidrogeles estables en nuestras condiciones experimentales (datos no mostrados). Por otro lado, en presencia de un 100 % de ALG el hidrogel no es capaz de preservar su morfología, y sostener una liberación constante de carga, hecho que fue determinado mediante estudios de cinética de liberación post proceso de liofilización (datos no mostrados). Un encapsulamiento del 0,4 % de RC fue óptima en presencia de cloruro de calcio 50 mM para la relación 7:1 (ALG:CMGG), es decir, una proporción de 87,5:22,5. La microscopia óptica de las partículas de hidrogeles reveló una morfología de características esferoides con un diámetro medio de 25 μm aproximadamente. Las microesferas presentan una distribución heterogénea de zonas coloreadas debido a la presencia de RC en el gel (Figura 8).

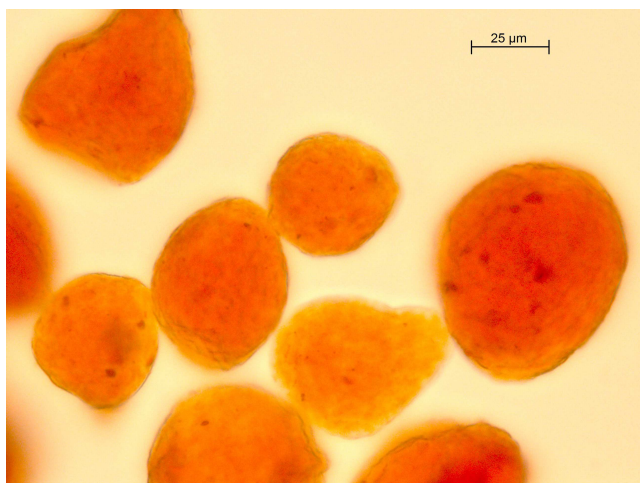


Figura 8. Microscopia Óptica de microesferas de geles de ALG-CMGG (68:32) conteniendo RC.

Se debe mencionar que los procesos de agregación del RC fueron descritos en concentraciones mayores o iguales a 0,3 % en medios acuosos salinos. Las estructuras supramoleculares de RC han sido atribuidos a fenómenos de apilamiento molecular debido a interacciones a lo largo del eje principal de la molécula planar que tiende a formar estructuras micelares Semejantes a barras y/o cintas [Ojala y cols. 1995]. Sin embargo, estas estructuras micelares son dependientes del tiempo (es decir, son termodinámicamente inestables), y su estabilidad esta fuertemente relacionada con factores fisicoquímicos ambientales. Considerando este hecho, la estructura del gel podría jugar un papel clave en la liberación controlada de la molécula de RC, análoga a otras moléculas de uso terapéutico mencionadas con anterioridad.

Los ensayos de hinchamiento realizados *in vitro* en medio acuoso demostraron la incorporación de un 135 % (p/p) de agua en microesferas secas de ALG-CMGG (datos no mostrados). La liberación del fármaco podría estar controlada no solo por la estructura del gel, sino también por su interacción con éste; las estructuras micelares del fármaco se encontrarían disueltas en los intersticios de la matriz, permitiendo de esta manera una liberación mas controlada. Esto podría servir a los fines de una administración oral de moléculas que presenten estructuras y/o comportamientos de apilado como el RC (por ejemplo Doxorubicina) desde matrices formuladas con la mezcla ALG-CMGG, para lograr una liberación controlada del fármaco.

Las imágenes obtenidas mediante análisis *SEM* de las microesferas presentaron una estructura de mayor rugosidad para las microesferas de gel de ALG (Figura 9 A y B) en comparación al gel formado por la mezcla de ALG-CMGG, la cual presenta superficies más lisas observables en las imágenes de microscopia de mayor aumento (figura 8C y D). Estas diferencias encontradas en las imágenes de morfologías de superficie permiten confirmar la presencia de CMGG en las microesferas de ALG.

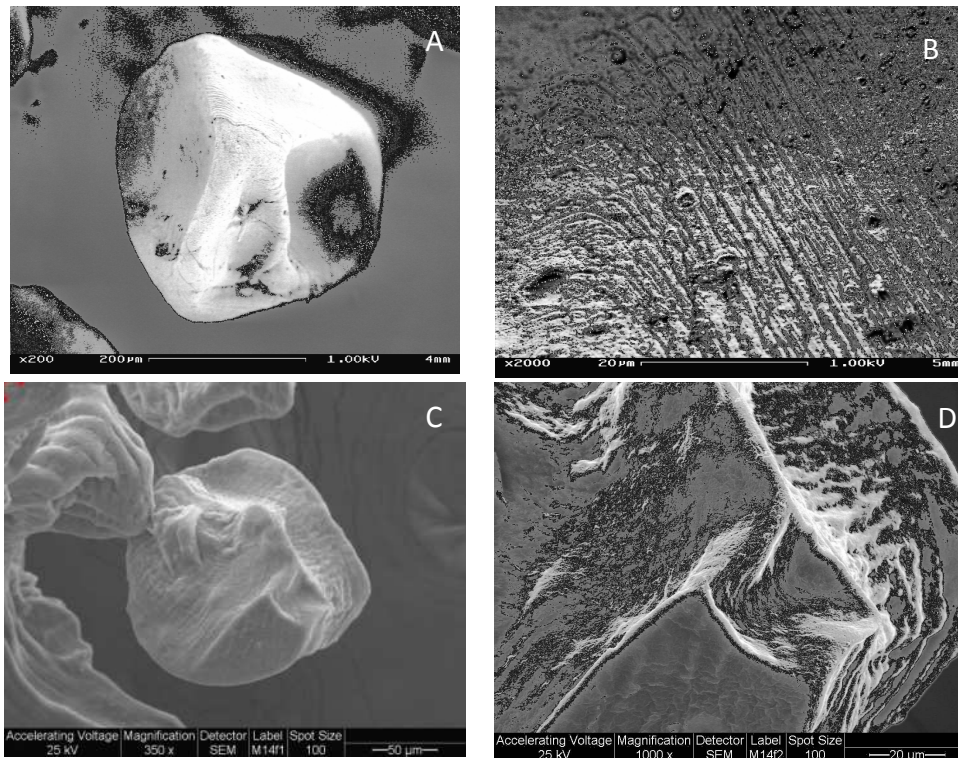


Figura 9. Microscopia SEM de microesferas de ALG (A, B) y ALG-CMGG (C, D)

La viscosidad relativa en las soluciones de mezcla de ALG-CMGG seleccionadas en presencia o ausencia de RC fue analizada. Se observaron respuestas lineales en ambos casos. Sin embargo, la incorporación de RC a la mezcla de ALG-CMGG permitió observar una reducción de la viscosidad relativa en aproximadamente un tercio (Figura 10). Estos resultados sugieren una fuerte interacción entre RC y la solución de ALG-CMGG. En tal sentido, las espectroscopías Raman y FTIR fueron empleadas para ensayar la hipótesis de la interacción entre RC con la matriz de ALG-CMGG.

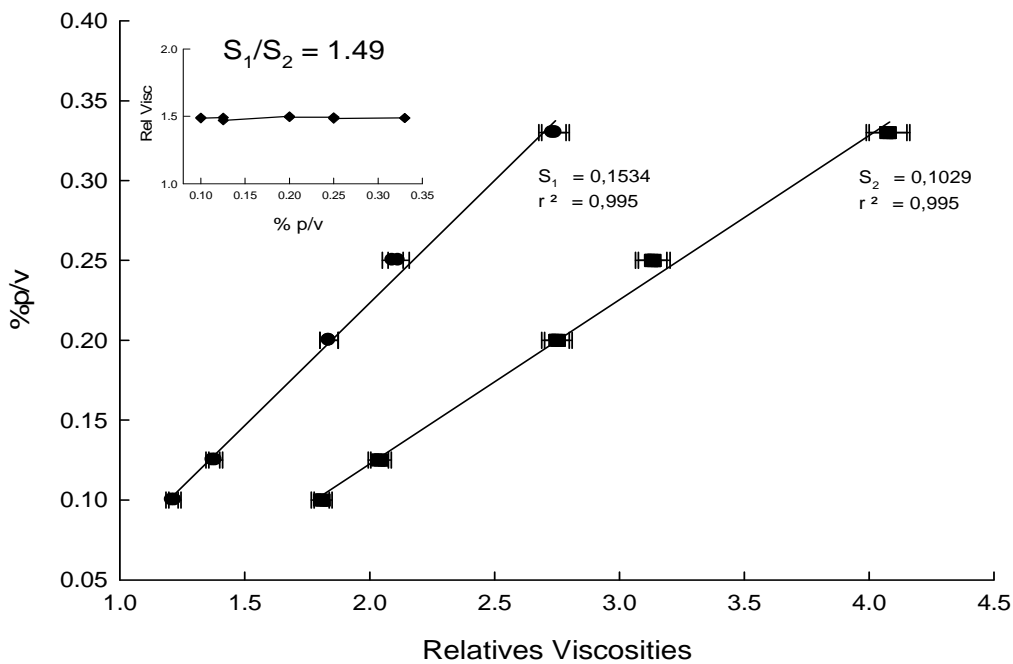


Figura 10. Cambio en la viscosidad relativa de una solución de la mezcla ALG-CMGG ensayada en ausencia (●) o en presencia (■) de RC, y el cociente entre ambas curvas (◆).

La Figura 11 muestra un esquema de la estructura molecular del RC. En azul y celeste se representan los azufres y oxígenos pertenecientes a los grupos sulfónicos, en verde claro los nitrógenos de los grupos amino. La formulación (coacervado de ALG-CMGG) con el RC incorporado se estudió simultáneamente por espectroscopias de infrarrojo y Raman debido que ambas técnicas proveen información complementaria. El espectro de FTIR revela las interacciones entre los componentes de la matriz mientras que el espectro Raman pone en evidencia las interacciones entre el RC y la matriz. Las bandas correspondientes a la molécula de RC no son observadas en los espectros de infrarrojo debido a la baja concentración en la formulación analizada.

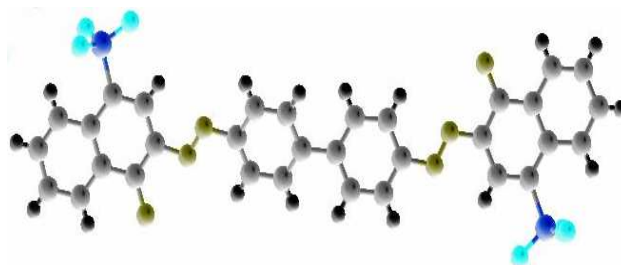


Figura 11: Estructura molecular de Rojo Congo (Lye y col., 2000).

La Figura 12 compara los espectros Raman del RC comercial con el del recristalizado de agua. Entre estos espectros se observa una marcada diferencia de algunas de las bandas, la cual es posiblemente debido a la presencia de impurezas provenientes de la síntesis química del colorante. Por lo tanto, el espectro de referencia que corresponde elegir para comparar con el de la formulación es el del RC recristalizado de agua, debido a que es similar al medio de la formulación.

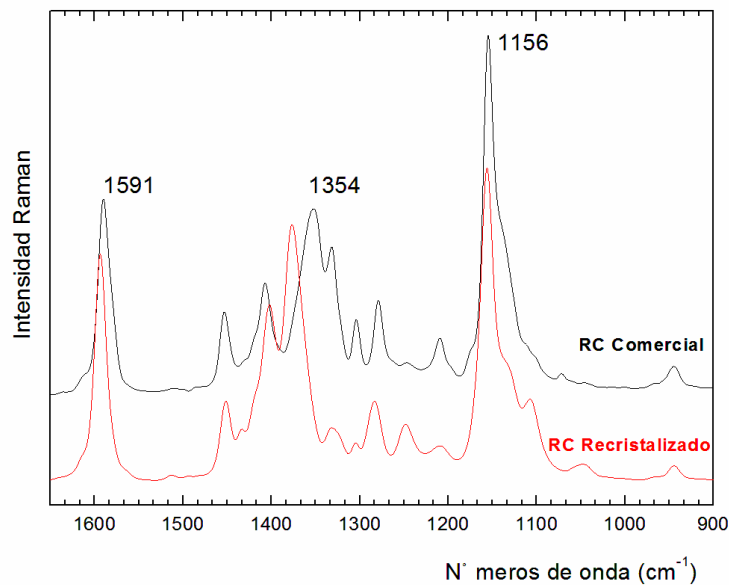


Figura 12: Espectros Raman para Rojo Congo comercial y recristalizado en agua.

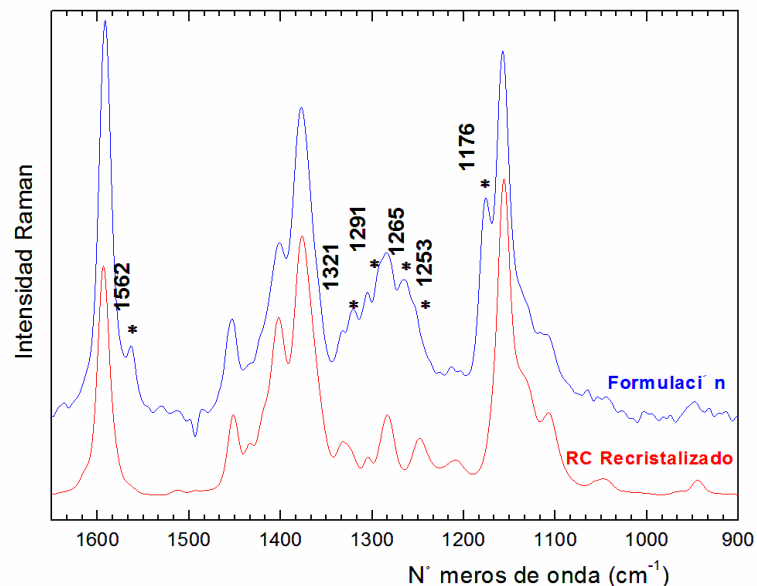


Figura 13: Comparación de espectros Raman de Rojo Congo recristalizado de agua y en la formulación. Las bandas nuevas observadas son indicadas con asteriscos (ver en Tabla 3).

Frecuencias Raman observadas				
RC Comercial	RC Recristalizado	Formulación	Nuevas Bandas	Asignaciones
1591	1614 sh 1595 s	1614 sh 1592 vs	1562w	Anillo fenilo
1453	1453	1454		$\nu(\text{N}=\text{N})$ (*)
1408	1403 s	1402		
1354 s	1378 vs	1378	1321	Anillo naftilo (*)
1332	1333	1333		
1305	1306	1305		?
1279 w	1285	1285	1291sh 1265	$\nu(\phi-\phi)$ $\nu_{as}(\text{SO}_3)$
1247 vw	1249	1253 sh		
1210 vw	1210 vw			
1156 vs	1158 vs	1158	1176	$\nu(\phi-\text{N})_{\text{azo}}$
1136 sh	1134 sh	1130sh		?
1106 w	1109 w	1120		?

Tabla 5. Asignaciones de banda para los espectros Raman de la molécula de RC (estado sólido) puro y en la formulación (ALG-CMGG). Abreviaturas: sh: hombro, vs: muy intensa, s: intensa, w: débil, vw: muy débil.

La Tabla 5 reúne las posiciones y asignaciones de las bandas Raman para el RC comercial, recristalizado en agua y en la formulación. Las asignaciones del RC fueron realizadas basadas en informaciones provenientes de diferentes fuentes bibliográficas [Ojala y cols, 1995; Bonancea y cols. 2006; Turrel y cols, 1997; Smith, 1999].

Las diferencias observadas en los espectros Raman e infrarrojo del RC recristalizado en agua respecto del RC en la formulación están asociadas a las bandas vibracionales asignadas a los grupos sulfonato, amino, fenil-N-azo y grupo fenilo.

El espectro Raman de la formulación biopolimérica conteniendo RC reveló la aparición de cinco nuevas bandas situadas en 1562, 1321, 1291 (sh), 1265 y 1176 cm^{-1} . Las mencionadas bandas pueden ser atribuidas a las interacciones entre la matriz y la molécula de RC (ver Tabla 5 y Figura 13). Las intensidades relativamente bajas de las nuevas bandas evidencian un entorno anisotrópico de las moléculas de RC en la matriz. La banda a 1562 cm^{-1} (-30 cm^{-1} de corrimiento) fue asignada a la vibración del anillo fenólico, la banda observada a 1321 (-12 cm^{-1} de corrimiento) al anillo naftilo, la bandas correspondientes a 1291 cm^{-1} (+6 cm^{-1}) y 1265 (-20 cm^{-1}) fueron asociadas con las vibraciones C-C de los grupos bifenilos. Finalmente, la banda registrada a 1176 cm^{-1} fue asignada a la vibración fenil N-azo (corrimiento: +18 cm^{-1}). De acuerdo a las asignaciones consideradas anteriormente, las interacciones moleculares del RC con la matriz podrían originarse principalmente en los grupos aromáticos.

Las bandas correspondientes a los modos vibracionales $\nu(-N=N-)$ azo localizadas en 1453 y 1403 cm^{-1} no se desplazan significativamente cuando el colorante se encuentra incorporado en la matriz. En razón de ello, se puede afirmar que el grupo azo del RC no interactúa con la mezcla del biopolímero. A similar conclusión se puede concluir al analizar la estructura del RC (Figura 11), debido a que los pares libres de los nitrógenos pertenecientes a los grupos azo están poco disponibles debido por impedimento estérico de los grupos fenilo y naftilo [Ojala y cols, 1995]. De acuerdo a los análisis espectroscópicos se puede concluir que la interacción principal entre el RC y la matriz está basada en los grupos aromáticos del RC asociados con las regiones no polares de la mezcla de polímeros. Si se considera la estructura típica del ALG al gelificar denominada en la literatura "caja de huevos", las regiones hidrofóbicas del gel quedan protegidas del resto de la estructura naturaleza hidrofílica. Y si se considera el bajo peso molecular y estructura planar del RC, es posible suponer que la molécula de RC podría estar localizada en el espacio libre no iónico entre dos moléculas de ALG entrecruzadas, en donde la CMGG no podría alojarse, debido a su peso mayor molecular e hidrofiliidad. Un caso similar ha sido descrito para la interacción entre celulosa y el colorante Azul directo 1, perteneciente a la familia de colorantes diazo lineales y portador de un sistema de electrones- π conjugados en el plano. La absorción de Azul directo 1 en fibrillas de celulosa determinado por estudios de espectroscopia Raman y por espectroscopias de UV-VIS fue atribuida a la presencia de puentes de hidrógeno y a la interacción hidrofóbica entre los grupos bifenilo del colorante y las regiones apolares de celulosa [Abbott y cols., 2004; Ott y cols, 1974].

La cinética de liberación del RC desde microesferas de ALG-CMGG fue estudiada *in vitro* simulando el fluido fisiológico del estómago (pH 1,2) y condiciones intestinales (pH 7,4) en con buffer fosfato. En las condiciones simuladas del estómago (pH 1,2 y 37 °C), no se observo ningún cambio sobre la morfología de las microesferas, así como tampoco la liberación de RC en el medios luego de 25 minutos de incubación. Por el contrario, cuando el pH del medio de incubación es desplazado hacia valores superiores de 6,0, una liberación gradual de RC desde las microesferas fue detectada. La liberación en el tiempo de RC describe un comportamiento hiperbólico a pH 7,4 con el 68,2 % RC liberado en aproximadamente 8 horas (Figura 14).

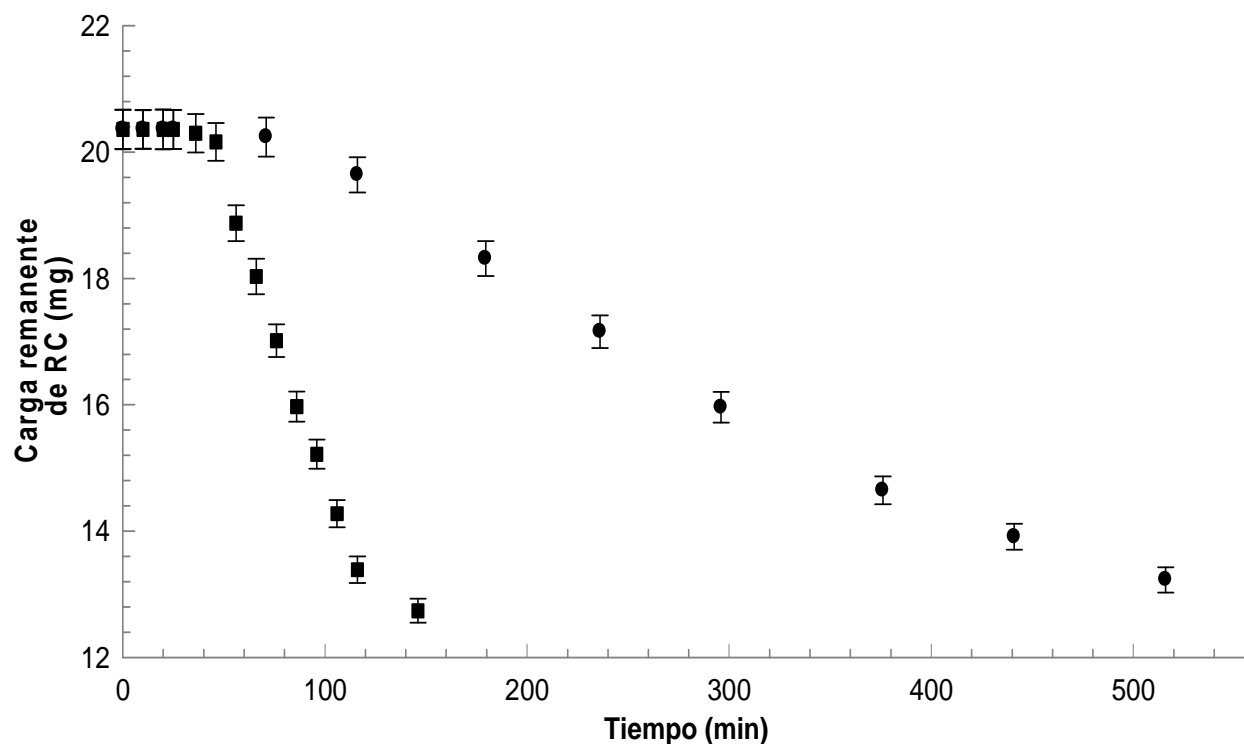


Figura 14. Tiempo de liberación de RC desde esferas de ALG (■) y ALG-CMGG (●).

Se realizaron estudios de estabilidad de geles de ALG-CMGG sin y con recubrimiento de emulsano en condiciones fisiológicas (ver pH y buffers utilizados en la Tabla 6). Las liberaciones para 24 hs de incubación mostraron perfiles de cinéticas de primer orden (ver gráficos de la Figura 15) con diferentes porcentajes de RC liberados al medio para los sistemas sin protección (sin coating de emulsano) y con protección (con coating de emulsano). A su vez, dependiendo del sistema buffer en el cual se realizase la liberación (en presencia o ausencia de iones quelantes) se pudieron observar diferencias significativas. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 6.

Buffer	pH	Porcentaje de liberación		Diferencia
		sin recubrimiento	con recubrimiento	
Fosfato	6,8	78,10	52,52	25,58
	7,4	82,51	53,21	29,00
	8,0	82,74	62,08	20,66
TES	6,8	45,99	24,48	21,51
	7,4	56,17	32,35	23,82
	8,0	63,17	43,01	20,16

Tabla 6. Liberaciones para 24 hs de incubación en diferentes buffers y a diferentes pHs para sistemas con y sin recubrimiento.

El incremento del pH en soluciones reguladoras de fosfato conduce a un aumento de la degradabilidad de las microesferas en todos los casos, este efecto puede ser atribuido a dos razones: la inestabilidad de la matriz debido al pH alcalino y la competencia del fosfato con las sales carboxílicas de calcio pertenecientes a la matriz.

Asimismo, se observa un aumento gradual en la carga liberada con el aumento del pH en el buffer TES tanto en las microesferas sin recubrimiento. En el medio conteniendo iones fosfato se observa una liberación mucho mayor (aproximadamente 18 a 32%) respecto del medio conteniendo buffer TES. Esto se debe al efecto de inestabilidad del gel obtenido mediante entrecruzamiento de iones calcio debido al pH sumado al efecto quelante del fosfato.

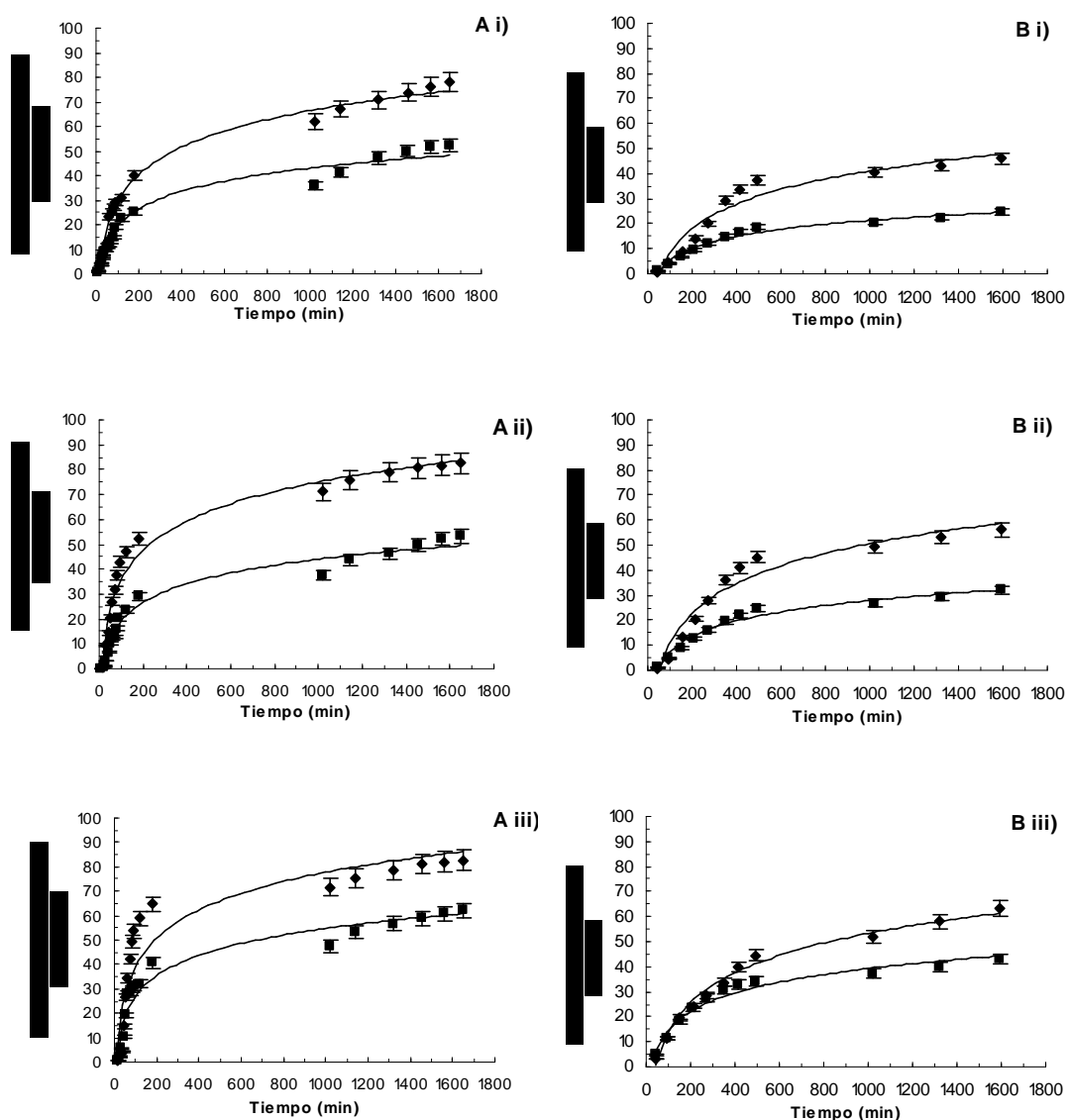


Figura 15. Liberaciones acumuladas de RC (%) bajo diferentes condiciones de incubación. **A.** Perfiles de liberación en Buffer Fosfato: i) pH 6,8; ii) 7,4; iii) 8;0. **B.** Perfiles de liberación en Buffer TES: i) pH 6,8; ii) 7,4; iii) 8,0. Símbolos: Sistemas en ausencia de recubrimiento (■) y sistemas en presencia de recubrimiento de Emulsano (◇).

El análisis comparativo de las liberaciones entre las microesferas sin y con el recubrimiento revela aproximadamente un retardo en la liberación de un 20% en las microesferas recubiertas con emulsano.

Al igual que en el caso anterior la liberación de RC a partir de microesferas recubiertas con emulsano fue mayor en buffer fosfato que en TES, hecho que probablemente atribuido al efecto antes mencionado. A su vez se observa que entre pH 6,8 y 7,4 las diferencias de liberación son mínimas. Este hecho probablemente sea debido al efecto de recubrimiento en este rango de pHs. Sin embargo, a pHs mayores la estructura de la cobertura comienza su deterioro (proceso de saponificación de las cadenas de triacilgliceroles) observándose una mayor liberación.

CONCLUSIONES

Los ensayos de interacción entre RC y diferentes biopolímeros permitieron la selección de un polímero base para la generación de una matriz estándar como es la constituida por ALG, y un biopolímero que presente propiedades diferentes y complementarias al primero para el armado de un coacervado en la construcción de una matriz mixta. Axial, entre CMGG y GG como segundo polímero para desarrollar estas matrices, las formulaciones ensayadas se realizaron con CMGG y ALG, debido que la derivatización de GG en CMGG permite obtener un biopolímero más soluble, de fácil manejo debido a la baja viscosidad de la mezcla y capacidad de generar soluciones lípidas, ambas propiedades relevantes para su empleo a gran escala. Además, la CMGG presenta la capacidad de estabilizar geles de ALG y permite realizar procedimientos de liofilización sin que se dañe la estructura de gel, lo que es de gran importancia en procesos de almacenamiento de fármacos.

Los análisis de viscosimetría y espectroscopía revelan la interacción entre la mezcla biopolimérica ALG-CMGG con RC debido a la presencia de los grupos aromáticos de RC que interactúan con zonas hidrofóbicas de las biopolímeros, lo que permitiría el uso de este tipo de matrices para una gran gama de fármacos que presentan grupos aromáticos en su estructura.

El resultado de interacción entre la molécula modelo-matriz mediante estudios espectroscópicos vibracionales (FTIR y Raman) muestran la relevancia de estas técnicas para determinar interacciones entre moléculas en geles biopoliméricos comúnmente desarrollados para sistemas de liberación controlada, de gran aplicación en las industrias de alimentos, cosméticos y farmacéutica.

Los experimentos de liberación controlada desarrollados *in vitro* revelan una liberación más lenta de RC de la matriz de ALG-CMGG comparado a microesferas de ALG (menos del 50 %) en más de 8 horas, lo que supone una aplicación directa para sistemas de administración oral con estos biopolímeros como matrices transportadoras.

Los resultados presentados permiten especular sobre la interacción positiva entre moléculas relevantes de uso farmacológico como fluoroquinolonas y antraciclinas y los geles de ALG-CMGG. Entre sus usos potenciales y ventajas de la matriz ALG-CMGG se pueden mencionar quimioterapias como en cáncer de colon, o en serias infecciones microbianas, donde matrices de ALG-GG podrían constituir una alternativa factible en el terreno de administración/liberación de fármacos.

La optimización del sistema mediada por la presencia del recubrimiento con Emulsano se observa para todas las condiciones de liberación ensayadas, haciendo de esta macromolécula una candidata para ser utilizada en sistemas de liberación prolongada. En este contexto se plantea la necesidad de caracterizar a este biopolímero en aspectos que no habían sido descritos previamente en la bibliografía (Véase Anexo Capítulo 1)

REFERENCIAS

- Abbott LC, Batchelor SN, Jansen L, Oakes J, Lindsay JR, Moore JN. (2004) Spectroscopic studies of direct blue 1 in solution and on cellulose surface: effects of environment on bis-azo dye. *New J Chem*; 28: 815-
- Arvind .D. Patel. (1998) Water-Based Drilling Fluid with High Temperature Fluid Loss control Additives . United States Patent . Patent Number 5789349
- Bonancea C.E., Do Nascimento G.M., de Souza M.L., Temperini M.L.A., Corio P., (2006). *Applied Catalysis B:Environmental* 69, 34).
- Lye J., Freeman H.S., Cox R.D. (2000) Molecular modeling of Congo Red analogues containing terphenyl and quarterphenyl moieties. *Dyes and Pigments* 47: 53-64.
- Murphy C. B., X.Corp, N.Y.Webster. (1966). *Thermal Analysis . Anal.Chem* , 38 , 443.
- Ojala W.H., Ojala C.R., Gleason W.B. ; (1995) *Antiviral Chemistry Chemotherapy* 6: 25.
- Ott E., H.M. Spurlin , M.W. Grafflin . (1974) *Cellulose and cellulose derivatives*. p760, Interscience Publishers .(New York, U.S.A) .
- Sajid J., A. Elhaddaoui, S. Turrell. (1997). *Journal of Molecules Structure* 408/409 181
- Skowronek M, Stopa B, Konieczny L, Rybarska J, Piekarska B, Szneler E, Bakalarski G, Roterman I. (1998) Self-assembly of Congo Red - A theoretical and experimental approach to identify its supramolecular organization in water and salt solutions. *Biopolymers*; 46: 267-81.
- Smith B. (1999) *Infrared spectral interpretation*, CRC Press, Boca Raton.

ANEXO CAPITULO 1

"Caracterización de biopolímeros EPS/Emulsano para su uso en recubrimiento de matrices"

***Caracterización Fisicoquímica
Ensayos de recubrimiento para Sistemas Inorgánicos
Ensayos biológicos: Respuesta Inflamatoria***

INTRODUCCION

MATERIALES Y METODOS

- 1.** Producción de Emulsano - Purificación para obtención de EPS
- 2.** Estudio de cinéticas de tensión superficial
- 3.** Formación de monocapas en interfases de aire/solución
- 4.** Medidas de potencial Z vs. pH
- 5.** Determinación de la movilidad electroforetica vs. fuerza iónica
- 6.** Formación de agregados en solución acuosa, estudios dimensionales y de carga.
- 7.** Ensayos de recubrimiento para matrices inorgánicas.
Estabilidad en medios acuosos.
- 8.** Ensayos de compatibilidad biológica:
Estudios de respuesta inflamatoria con monocitos humanos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

Caracterización de EPS/Emulsano para su utilización en recubrimientos de partículas

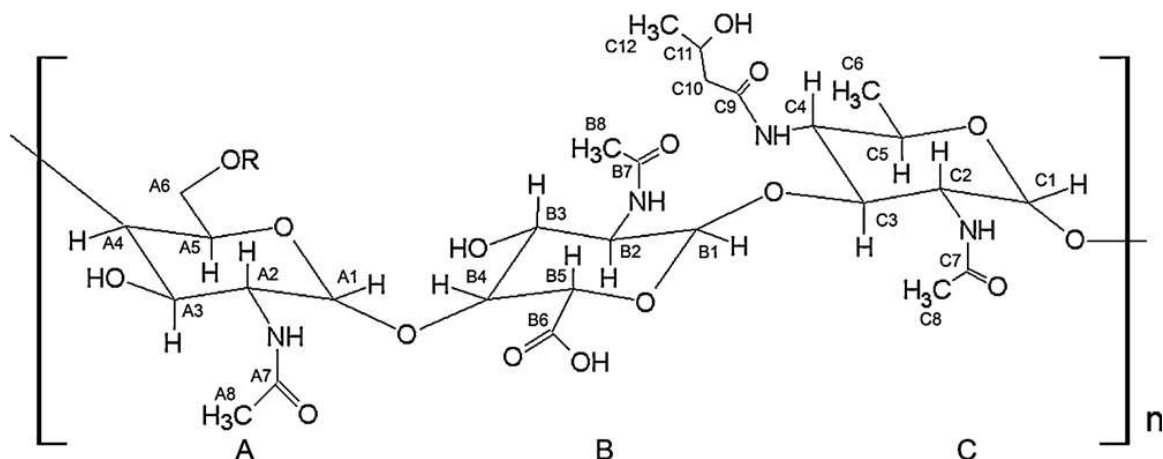
INTRODUCCION

El emulsano, un complejo polimérico de origen microbiano, excretado como exopolisacárido aniónico por la bacteria Gram negativa: *Acinetobacter Venetianus* RAG-1, ha sido utilizado con diversas aplicaciones por sus propiedades de emulsificante natural.

A partir de métodos de purificación de extractos crudos de emulsano se han obtenido diferentes fracciones , a saber:

1. Emulsano "crudo": se obtiene de realizar sólo una precipitación con Sulfato de amonio o Etanol.
2. ApoEmulsano: (hoy se lo llama Emulsano) es el resultado de realizar la extracción de las proteínas bacterianas en una segunda etapa con el agregado de sucesivas porciones de fenol en caliente.
3. EPS + LPS: (Apoemulsano dividido en dos) según Mercaldi y cols. (2008) son los LPS (lipopolisacáridos bacterianos: 80%) cargados negativamente unidos iónicamente al EPS (exopolisacárido catiónico: 20%), en donde sólo un 0.5% corresponde a proteínas y un 0.01% a DNA, los cuales provienen del ApoEmulsano original. Mediante estudios fisicoquímicos preliminares, Mercaldi y col. (2008), concluyeron sobre la naturaleza catiónica de esta molécula y su capacidad de estabilizar emulsiones.

Según Zuckerberg y cols., 1979, y Rosenberg y cols., 1979, el tamaño promedio de la molécula de Emulsano desplegada es de unos 200 nm de largo por unos 3 nm de ancho. Por otro lado, Mercaldi y cols. (2008) proponen dos porciones que constituyen al conocido Emulsano: el EPS (por SDS-PAGE y método de identificación mediante Alcian Blue) que tendría un PM elevado (250 kDa), y el LPS que presentaría un PM bajo (entre 6 y 14 kDa). Axial, el EPS lo describen formado por la interacción iónica de dos estructuras poliméricas diferentes: una de naturaleza lipopolisacáridica y otra de tipo polisacáridica. El exopolisacárido excretado (EPS, ahora denominado APE) fue descrito en un principio como un polímero lineal comprendido por tres unidades de amino-azúcares: d-galactosamina, diamino-6-deoxi-glucosa, y un ácido urónico desconocido en una relación aproximada de 1:1:1, con cadenas de ácidos grasos unidos por enlaces O-acilo y N-acilo. (Mercaldi y cols., 2008). Adicionalmente se describió un grupo ácido (el 3-hidroxitributírico) unido a la cadena polisacáridica mediante una unión amida (Mercaldi y cols., 2008). Según el trabajo de (Barnharta y cols., 2012), el APE se presenta conteniendo residuos de 6-O-acetil-2-acetamido-2-deoxi- α -d-galactopyranose, 2-acetamido-2-deoxy- α -d-galacto piranosil-acido urónico, y 2-acetamido-4-(3-hidroxitributiramido)-2,4,6-trideoxi- α -dglucopiranosose.



Unidad repetitiva del APE. Compuesto aislado desde Emulsano producido por *Acinetobacter venetianus* RAG-1. (R = grupo acetilo o alcohol) (DeAnn Barnharta y cols, 2012)

Sin embargo, Dearman y cols. (2009) proponen seguir trabajando con el Emulsano como se venía haciendo, y determinan el tamaño del complejo "molécula" por el método dispersión de luz (*light Scattering*) luego de sucesivos pasos de filtración por distintos tamaños de poro con lo q llegan a la conclusión (y fotografía por SEM) que la molécula puede adaptarse a los poros.

Por otro lado, en el trabajo de Mercaldi y col.,(2008) informan haber obtenido al EPS purificado en un 98%, el cual estaría preparado para ser utilizado en aplicaciones biomédicas para trabajos en fase preclínica, en búsqueda de una seguridad biológica y biomédica adecuadas para su uso eficaz en humanos. En el trabajo de Barbharta y cols, se basan en este estudio para seguir sus investigaciones, proponiendo al EPS para los mismos fines.

En la presente sección del trabajo de tesis se intentará caracterizar al Emulsano y al EPS para su uso en procesos de recubrimientos de matrices ya desarrolladas en experiencias mostradas en el capítulo primero, así como en matrices que se detallaran en el último capítulo. Se estudiará la presencia de funciones de estabilización de dichas matrices en solución o retardo en los procesos de liberación de la molécula cargo desde las mismas. Por último se realizará un testeo para comprobar la inocuidad del sistema para respuestas inflamatorias en humanos y comprobar así las proyecciones que se vienen proponiendo en la bibliografía sobre el uso de estos compuestos en humanos.

MATERIALES Y METODOS

En los ensayos realizados en el presente capítulo se emplearon reactivos de grado analítico o superior de Sigma (St. Louis, MO) o Merk (Darmstadt). Las soluciones reguladoras (*buffers*) utilizadas, así como sus diluciones fueron realizadas con agua calidad ultra pura (miliQ, Millipore, Bellerica, EE.UU.).

Producción de Emulsano - Purificación para obtención de EPS

El complejo polimérico Emulsano fue producido y purificado mediante el cultivo en fase líquida de la bacteria *Acinetobacter venetianus* RAG-1 (ATCC 31012) según el protocolo detallado en el trabajo de Panilaitis y cols. (2006). Brevemente, el protocolo para el crecimiento de la cepa, adquirida en el American type Culture Collection, fue el siguiente: se creció a 30 °C, con inóculo al 8%, en un medio definido (Shabatai & Wang): (por litro de agua): K₂HPO₄, 17 g; KH₂PO₄, 7.26 g; MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g; (NH₄)₂ SO₄, 4 g; y 3 mL de solución con metales traza, la cual contuvo: (para 100 ml): CaCl₂, 36.8 mg; FeSO₄ · H₂O, 60.4 mg, ZnSO₄ · 7H₂O, 42.2 mg, Na₂MoO₄, 69.6 mg; CuSO₄ · 5H₂O, 62.4 mg; MnSO₄ · 4H₂O, 59.4 mg; CoCl₂ · 6H₂O, 78.8 mg. La solución stock de MgSO₄ · 7H₂O fue esterilizada a parte y luego agregada al medio de cultivo. La fuente de carbono fue de etanol al 1%, (p/v). Todos los reactivos químicos para el medio de cultivo fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Argentina).

Cada cultivo fue incubado por 72 hs en erlenmeyers de 1 litro con una agitación de 250 rpm. Luego se procedió a los procesos de purificación para la obtención del Emulsano según el trabajo de Panilaitis y cols. (2006).

El aislamiento del EPS (o APE) desde el complejo Emulsano fue realizado en el laboratorio del Dr. David Kaplan según el método descrito por Mercaldi y cols (2008) con una purificación del 98%, p/p.

Estudio de cinéticas de tensión superficial

Las cinéticas de tensión superficial de interfases de aire/solución acuosa fueron realizadas usando el método dinámico de gota pendiente con un Tensiómetro de Gota (Traker ®, ITConcept, Longessaigne, Francia) para las soluciones de Emulsano y EPS de diferentes concentraciones. La tensión interfacial fue determinada analizando la forma axial simétrica (Laplacian el perfil) de gotas pendientes de soluciones de los polímeros. Todas las medidas de la tensión interfacial fueron registradas en tiempo real (cinco medidas por segundo) con un volumen de gota constante mediante el uso de un motor para controlar el volumen de la gota.

Formación de monocapas en interfases de aire/solución acuosa

La propiedad tensioactiva del Emulsano, y sobre todo de su producto de purificación (EPS), ha sido estudiada mediante la posibilidad de formación de monocapas en superficies acuosas. El estudio de la capacidad de la formación de una monocapa en una interfaz agua/aire, fue realizado para determinar la presión superficial dependiendo de la relación área/masa de las muestras mediante el uso de una balanza de Langmuir.

Medidas de potencial Z vs. pH

Una solución 0,1 mg/ml de EPS fue usada para realizar las medidas de Potencial Z (Zetasizer 2000, Malvern Instruments) en condiciones diferentes de pH. Ácido acético (HA) (50,0 %, p/v) y NaOH (0,4 %, p/v) fueron usados para generar las mezclas de pH diferentes.

Todas las medidas de Potencial Z fueron realizadas con una precisión de +/-1,5mV.

Determinación de la movilidad electroforética vs. fuerza iónica

La movilidad electroforética del polisacárido EPS en solución acuosa fue determinada para las concentraciones diferentes de fuerza iónica en el medio (generada a partir de soluciones de diferentes concentraciones de NaCl), de manera de generar una nube de carga progresiva alrededor de la macromolécula que apantalle al polímero en su migración por la solución. Los experimentos fueron realizados con un Zeta-Sizer 2000 (Malvern Instruments) a 25°C para soluciones 0,1 mg/ml de EPS en medios de concentración de NaCl diferentes. En nuestros estudios se aplicó el Modelo de Oshima para la interpretación de las propiedades de carga del EPS en solución (Oshima, 1994).

Formación de agregados en solución acuosa, estudios dimensionales y de carga

Para evaluar el comportamiento de estas especies en solución se procedió a determinar el radio medio para diferentes concentraciones de los polímeros en solución acuosa. En estos experimentos se usó un Nanómetro Malvern 2000.

Ensayos de recubrimiento para sistemas inorgánicos

Se procedió a la síntesis de sistemas microparticulados de CaCO₃ en condiciones supercríticas con CO₂ como reactivo para ensayar sobre estos la posibilidad de ser recubiertos por un proceso de recubrimiento con EPS o Emulsano. Para esta formulación se utilizó una solución de CaCl₂ (1,0 %, p/v), buffer Glicina (pH 10) y CO₂ en condiciones supercríticas (40 °C, 220 bar) de acuerdo al protocolo descrito previamente (Boury y cols., 2004).

Luego, un recubrimiento de EPS o de Emulsano fue realizado sobre las micropartículas liofilizadas. Para este procedimiento 1,5 mg de partículas de CaCO₃ fueron incubadas bajo agitación magnética suave a 44 °C durante 24 hs, en 5,0 ml de solución de EPS o de Emulsano (0,1 mg/ml). Los respectivos controles fueron realizados bajo las mismas condiciones pero en ausencia de los biopolímeros.

Ensayos biológicos: Respuesta inflamatoria

Se evaluó la capacidad de los biopolímeros estudiados (EPS y emulsano) así como de la matriz inorgánica ensayada, micropartículas de CaCO₃ con y sin recubrimiento, de generar una respuesta inflamatoria en monocitos humanos. Para ello se estudió la activación de monocitos mediada por la generación de IL-6 (interleuquina 6). Esta IL-6 producida por los monocitos humanos bajo diferentes condiciones fue cuantificada según el siguiente protocolo, y las propiedades de estimulación por EPS, Emulsano, partículas de CaCO₃ y partículas de CaCO₃ con recubrimiento fueron comparadas con la activación inducida por LPS de *Escherichia coli*.

Reactivos: Lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 0111:B4 y polimixina B fueron provistos por Sigma. IL-1 \cdot humana y TNF \cdot humano fueron adquiridos a Immunotools. El Emulsano fue sintetizado en nuestro laboratorio según el protocolo antes descrito, el EPS fue provisto por el laboratorio del Dr. Kaplan (Tufts University) y las micropartículas de CaCO₃ así como el complejo CaCO₃-EPS (3:1), fueron sintetizados en nuestro laboratorio.

Células: Monocitos de sangre periférica (*Peripheral blood mononuclear cells PBMCs*) fueron aislados de un dador de sangre sano mediante un gradiente estándar de Ficoll (Ficoll-Paque density-gradient) (Amersham Biosciences). Los monocitos CD14⁺ fueron aislados mediante PBMCs por selección positiva (MACS technology; Miltenyi Biotec). La células seleccionadas fueron cultivadas en un medio de cultivo comercial: RPMI 1640 medium (Lonza) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Biowest), L-glutamina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM), amino ácidos no esenciales (0.1 mM), buffer HEPES (10 mM), 100 U/mL de penicilina, y 100 μ g/mL de streptomina (provistos por Lonza).

Protocolo de activación de células: Los monocitos purificados frescos fueron activados por 24 hr con LPS (100, 33, 11 and 3.7 pg/ml), Emulsano (100, 20, 4 ng/ml), EPS (100, 20, 4 ng/ml), CaCO₃-EPS (100, 20, 4 ng/ml) o CaCO₃ (300, 60, 12 ng/ml) con o sin polimixina B (10 μ g/mL). Los sobrenadantes de los cultivos fueron recolectados y almacenados a -20°C hasta proceder a la cuantificación de IL-6.

Protocolo de cuantificación de citoquina: La IL-6 ha sido cuantificada por el método de reconocimiento por unión enzimática (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay). El kit de ELISA para IL-6 (Diacclone) fue provisto por Tepnel Lifecodes Corp.

Estadísticas

Dos o tres experimentos independientes se realizaron como mínimo por duplicado (N=2) en todos los casos. En el caso de los estudios de biológicos con monocitos humanos, los datos fueron analizados usando un Test-t de Student. La significancia estadística de los valores obtenidos experimentalmente fu definida con $p < 0.05$. Los datos mostrados en los gráficos se representaron como promedios con su desviación estándar asociada.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los estudios de las propiedades de superficie e interfase de los biopolímeros Emulsano y EPS se realizaron mediante diferentes técnicas.

Se ensayaron diferentes concentraciones de cada biopolímero para realizar cinéticas de tensión superficial y poder así determinar valores de tensión superficial (γ) en función del tiempo para ambos polímeros en solución acuosa como se detalló en la sección de Materiales y Métodos. Los valores para un seguimiento luego de 2 horas se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 1.

Concentración (mg/ml)	γ_{final} (mN/m)	
	EPS	Emulsano
0,00005	71,8 +/- 1,5	62,5 +/- 1,5
0,005	72,1 +/- 1,5	59 +/- 1,5
0,5	53 +/- 1,5	50,6 +/- 1,5

Tabla 1: Dependencia de la tensión superficial con la concentración de EPS y emulsano luego de 2 horas a 25 °C en una interfase aire/líquido.

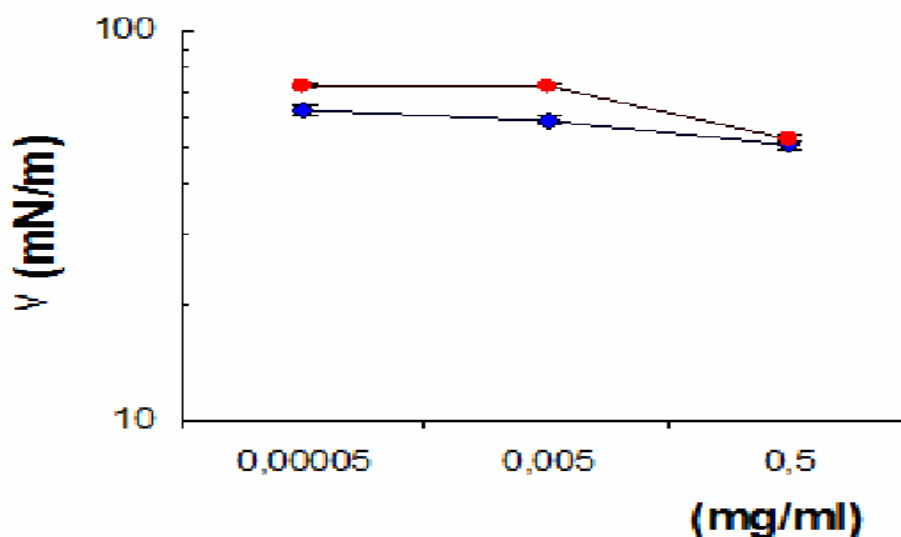


Figura 1: Tensión superficial en función de la concentración de biopolímero en solución para Emulsano (azul) y para EPS (roja).

En los valores iniciales de tensión superficial se encontraron diferencias significativas entre ambos polímeros. El emulsano presentó una γ_{inicial} de 63 mN/m, mientras que para el EPS fue de 72 mN/m (como para el agua pura) (Ducel y cols. 2004). Basados en las diferencias encontradas en el comportamiento para los dos polímeros, se decide ampliar el rango de concentraciones y tiempos de seguimiento de las cinéticas de tensión superficial sólo para el EPS. La información de tensión superficial para cada solución de EPS de diferente concentración alcanzada luego de 12 horas de seguimiento fue expresada en mN/m y empleada para reconstruir el siguiente gráfico de tensión superficial vs. concentración EPS. (Figura 2)

A través de los datos hallados de tensión superficial vs. concentración de EPS en agua, se observó la presencia de un punto de cambio de concavidad en la curva, valor equivalente a la concentración de micelar crítica de surfactantes ordinarios en soluciones acuosas, en este caso la concentración máxima a la cual la tensión superficial final alcanza un valor mínimo, es decir: la concentración máxima de EPS a partir de la cual cualquier otra mayor excederá la cantidad necesaria para disminuir la tensión superficial del sistema al valor mínimo posible. (Figura 2)

[EPS] (mg/ml)	V (mN/m)	
	2 hs	12 hs
0,00001	72,0 +/- 1,5	71,0 +/- 1,5
0,0005	72,0 +/- 1,5	70,5 +/- 1,5
0,005	72,0 +/- 1,5	67,7 +/- 1,5
0,05	61,0 +/- 1,5	53,0 +/- 1,5
0,5	53,0 +/- 1,5	40,0 +/- 1,5
1	54,0 +/- 1,5	34,7 +/- 1,5
1,5	47,0 +/- 1,5	34,7 +/- 1,5

Tabla 2: Valores de tensión superficial finales a tiempos de 2 y 12 hs.

Todas las cinéticas presentaron inicialmente una $V = 72$ mN/m, similar valor al de agua pura.

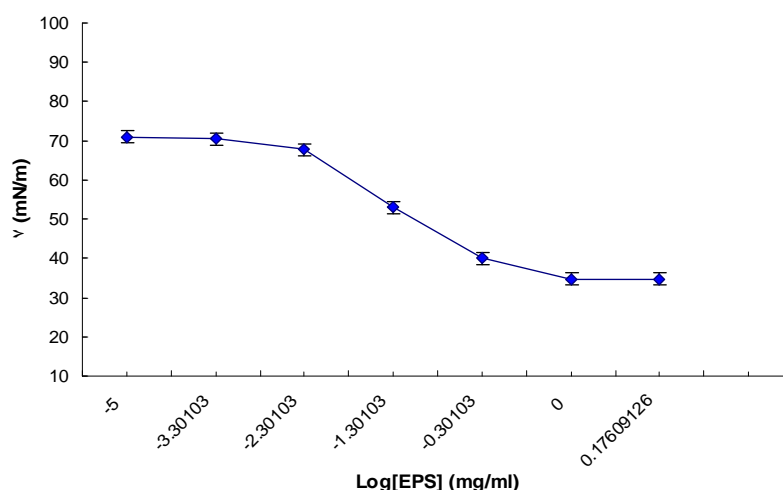


Figura 2: Determinación de la CMC para el EPS: 1,0 mg/ml aproximadamente.

Las isotermas de Langmuir no fueron generadas por las soluciones acuosas de Emulsano ensayadas, ni tampoco por las soluciones acuosas de emulsano en presencia de propanol al 1,0 % (para alcanzar una fase con un coeficiente de miscibilidad en el agua menor que la solución acuosa). Tampoco los esfuerzos por generar monocapas dieron resultados positivos en el caso de recurrir a la técnica de esparcido de una pequeña cantidad del emulsano sólido homogéneamente sobre la fase acuosa.

Por lo tanto, este tipo de polímero no es capaz de formar monocapas sobre una fase acuosa pura, probablemente debido a su elevada solubilidad en agua.

Las muestras de EPS no fueron ensayadas debido a la mayor solubilidad de este polímero en agua comparada con la del emulsano, y a su naturaleza hidrofílica, que permitiría predecir una baja a nula capacidad para lograr generar monocapas en superficies acuosas (Ducel y cols. 2004).

Estudios de carga superficial (Potencial Z) en función del pH se llevaron a cabo para comparar el comportamiento del EPS con otros polisacáridos de la literatura. (Tabla 3, Figura 3).

Pot Z(mV)	pH
-0,8	1,94
-7,0	2,44
-13,5	2,74
-14,5	3,03
-16,7	3,09
-19,0	3,53
-19,3	3,59
-21,0	3,94
-35,0	7,00

Tabla 3: Medidas de potencial Z (+/-1,5) vs. pH en medios acuosos para EPS.

Los resultados obtenidos, muestran el mismo tipo de perfil para polisacáridos de carga negativa reportados en la literatura (Ducel y cols. 2004).

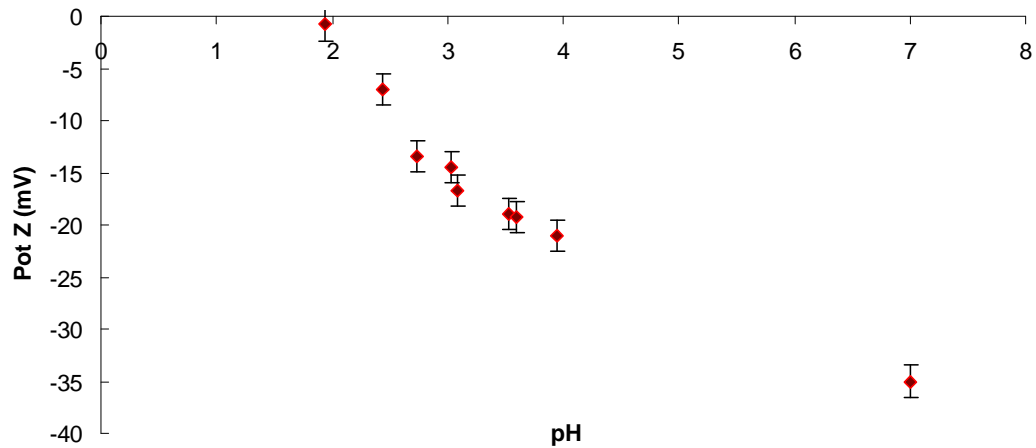


Figura 3: Medidas de Potencial Z de EPS en solución acuosa en función del pH del medio.

El empleo de este tipo de datos experimentales puede dar origen a un conocimiento mas acabado de las propiedades de carga de la molécula en cuestión en función de los cambio ambientales. De esta forma se puede llegar a predecir comportamientos de entidades cargadas, donde las partículas son caracterizadas por la presencia de una capa superficial penetrable de iones expuestos al camino a recorrer constante.

En esta clase de modelos hay diferentes variables para realizar la caracterización, como la densidad de carga eléctrica en la región polielectrolítica, la valencia de estas cargas, y un parámetro relacionado con el grado de resistencia del flujo del líquido en la región polielectrolítica. En nuestro estudio fue aplicado el modelo de Oshima para entender el comportamiento del EPS en la solución y sus propiedades de carga (Oshima, 1994).

(NaCl) mol/m ³	Movilidad Electroforética ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}\cdot\text{V}^{-1}$)	
	Teórica	Experimental
0,0		-3,17 +/-0,3
3,25	-2,61	-2,85 +/-0,3
4,55	-2,42	-2,56 +/-0,3
6,84	-2,25	-2,42 +/-0,2
10,27	-2,13	-2,18 +/-0,2
13,69	-2,07	-2,12 +/-0,2
17,11	-2,03	-2,17 +/-0,2

20,53	-2,00	-2,13 +/-0,2
23,96	-1,99	-2,17 +/-0,2
27,38	-1,97	-2,14 +/-0,2
30,8	-1,96	-2,11 +/-0,2
34,22	-1,95	-2,08 +/-0,2

Tabla 4: Resumen de datos de movilidad electroforética en función de la concentración de NaCl a utilizar para el desarrollo del método de Oshima.

Se determinaron propiedades de carga superficial por aplicación del método de Oshima sobre los datos experimentales obtenidos de la Tabla 4. En este método se realiza el cálculo del parámetro ZM , que representa la densidad de carga espacial de la región en superficie del electrolito y λ , denominado también "*softness parameter*":

$$\begin{aligned}
 1/\lambda &= 7,51473 \cdot 10^{-09} \text{ m} \\
 ZNe &= -1,84 \cdot 10^{+24} \text{ charge / m}^3 \\
 ZNe &= -2,95 \cdot 10^{+05} \text{ C/m}^3
 \end{aligned}$$

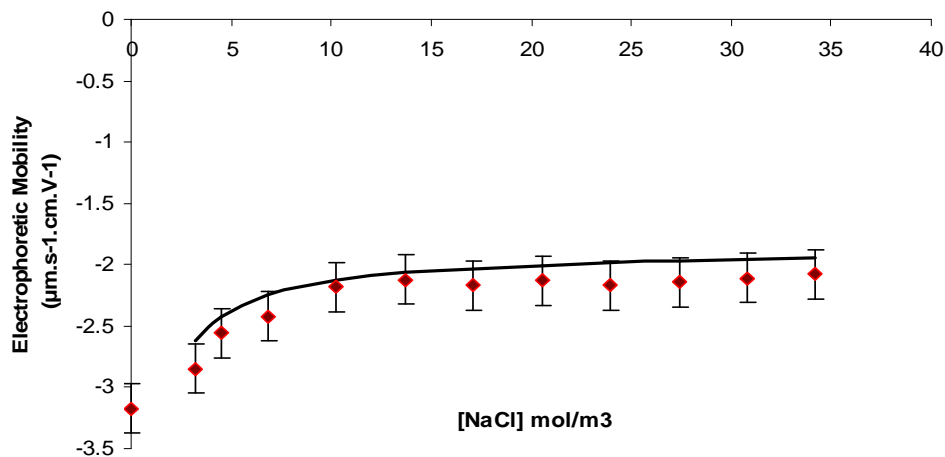


Figura 4: Perfil de movilidad electroforética en función de la fuerza iónica del medio para soluciones acuosas de EPS.

Por último, para evaluar otro aspecto del comportamiento de estas especies en solución se procedió a determinar el radio medio para diferentes concentraciones de los polímeros en solución acuosa (Tabla 5).

De los resultados aquí obtenidos se puede concluir a cerca de la formación de agregados en soluciones de EPS, y no así en las soluciones de emulsano. El potencial Z de ambos tipos de polímeros pone de manifiesto, al igual que en ensayos anteriores la naturaleza de carga negativa para ambos polímeros, a diferencia de los modelos teóricos propuestos en la

bibliografía. Los valores de potencial Z para las distintas concentraciones se condicen con los distintos tamaños hallados, resultado que hace confiable la hipótesis de carga negativa promedio de las moléculas en solución.

Compuesto	Concentración (mg/ml)	d (nm)	PdI	PotZ (mV)
EPS	0,1	474	0,36	-37,2
	0,0001	237	0,13	-16,1
Emulsano	0,1	370	0,45	-55,0
	0,0001	302	0,19	-40,4

Tabla 5: Diámetros promedio junto a los índices de polidispersión para moléculas de EPS y emulsano en solución a distintas concentración. Medidas de potencial Z para esos mismos sistemas.

Debido a los resultados obtenidos para el Emulsano y el EPS en cuanto a sus propiedades de estabilización de emulsiones y sistemas de interfase se propone estudiar su adhesión a la superficie de partículas biopoliméricas o inorgánicas y la posible estabilidad que esta cobertura le otorgará a las mismas.

Para ello se procedió a la síntesis de sistemas microparticulados de CaCO_3 en condiciones supercríticas para ensayar la capacidad del EPS y del Emulsano de actuar como biopolímeros de recubrimiento.

Una vez sintetizadas las partículas, liofilizadas y sometidas al proceso de recubrimiento con cada biopolímero por 24 hs (tiempo de recubrimiento óptimo para estas partículas seleccionado a partir de ensayos realizados a 12, 24 y 48 hs de incubación, datos no mostrados) se observaron diferencias en los sistemas resultantes respecto de los blancos: dada la baja solubilidad de este tipo de partículas, los blancos no presentaron alta turbidez una vez que se los alejara del sistema de agitación, mientras que fuera observado en los sistemas con recubrimiento (tanto de EPS como de Emulsano). Esto sugiere que la presencia del recubrimiento estabilizaría al sistema en suspensión acuosa.



Figura 5. Sistemas de micropartículas híbridas en solución: A. Sistema de recubrimiento con EPS y su control. B. Sistema de Emulsano y su control.

Para determinar si el biopolímero de cada sistema se encontraba realmente en la superficie de las partículas estudiadas constituyendo la cobertura y no solo se debía la estabilización del sistema a la presencia de biopolímero en solución, se procedió a la centrifugación de las muestras, eliminación del sobrenadante y posterior resuspensión del precipitado por agitación magnética. Las soluciones obtenidas luego de este tratamiento presentaron los mismos grados de turbidez (Figura 5).

Una inspección microscópica de las partículas, llevada a cabo mediante microscopio óptico, reveló la capacidad de estabilización de los polímeros ensayados para este tipo de partículas: un impedimento en la formación de agregados entre partículas que evita la posterior precipitación de la muestra (Figura 6).

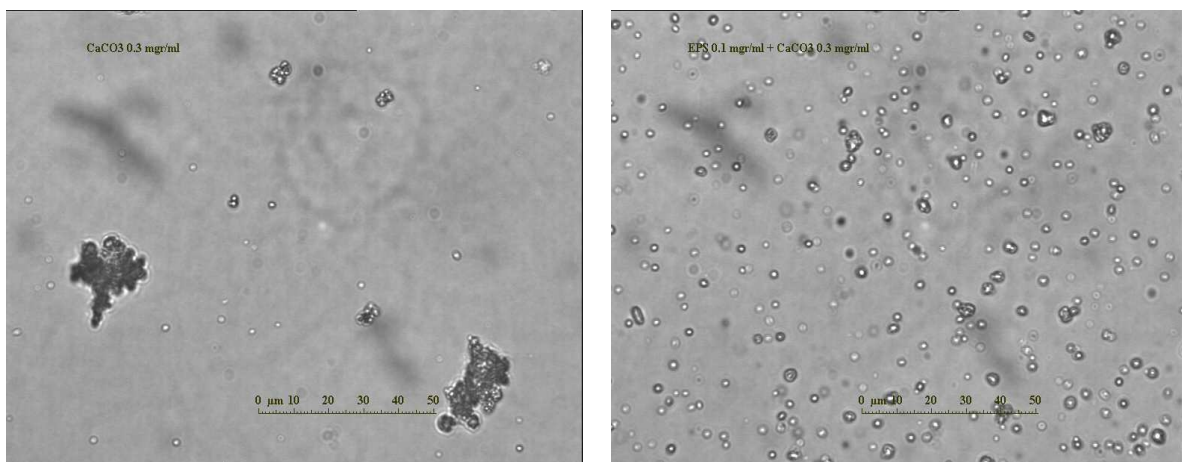


Figura 6. Microscopía óptica de las suspensiones de micropartículas de CaCO_3 con y sin recubrimiento.

Una posible interpretación de los resultados experimentales puede ser basada en la repulsión de cargas entre las superficies recubiertas por estos polímeros cargados, que estarían saturando la superficie de las partículas.

Por último, para proponer la utilización de este tipo de biopolímeros en sistemas de liberación controlada en humanos, se evaluó la capacidad del EPS y del Emulsano, así como de la matriz inorgánica ensayada (micropartículas de CaCO_3 con y sin recubrimiento) de generar una respuesta inflamatoria. Para ello se estudió la activación de monocitos humanos incubados en contacto con los diferentes sistemas.

La IL-6 producida por los monocitos en las diferentes condiciones de incubación fue cuantificada y las propiedades de estimulación por EPS, Emulsano, partículas de CaCO_3 y partículas de CaCO_3 con recubrimiento fueron comparadas con la activación inducida por LPS de *Escherichia coli* (Tabla 6). La IL-6 es usada en estos experimentos como un mediador.

En la Tabla 6 se enumeran los resultados de la detección de IL-6 por el método de ELISA para las diferentes concentraciones ensayadas de cada sistema. Los valores obtenidos presentaron un error inferior a 20 pg/ml en todos los sistemas enumerados en la tabla. En el caso del Emulsano, los resultados excedieron el rango de detección por lo que no se lo incluyó en la tabla: ni en su forma asilada ni formando el recubrimiento de las matrices inorgánicas.

Px	LPS (pg/ml)					EPS (ng/ml)			CaCO3 (ng/ml)			CaCO3-EPS (ng/ml)		
	0	100	33	11	3,7	100	20	4	300	60	12	100	20	4
Sin	3	11060	4371	512	10	1722	51	1	8	0	12	773	20	1
Con	0	40	53	23	0	9	5	0	0	0	0	13	5	0

pg/ml

Tabla 6. Respuesta inflamatoria mediada por IL-6 (pg/ml producidos) en monocitos humanos activados con LPS, EPS, CaCO3 y CaCO3-EPS (3:1).

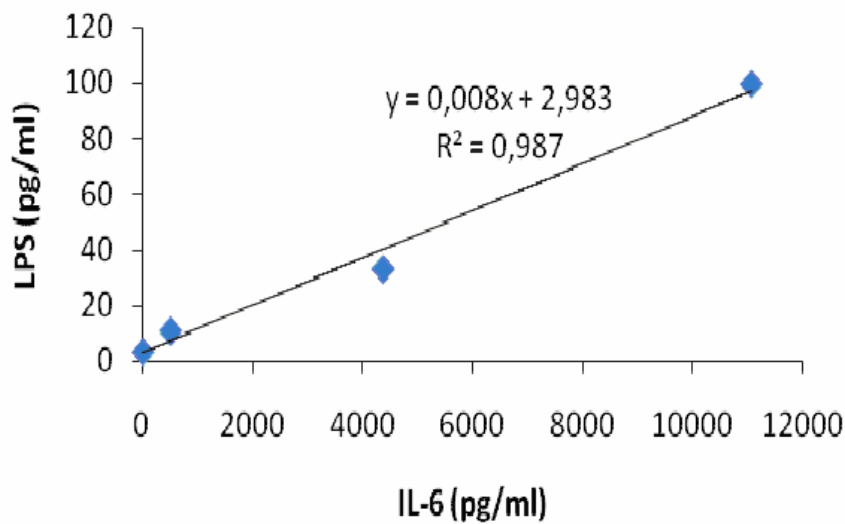


Figura 7. Curva de calibración para la producción de IL-6 en función de la cantidad de LPS agregada al medio de incubación de los monocitos para su activación.

Las equivalencias (pesos referidos a pesos) expresadas como concentración de LPS (pg/ml) de los sistemas estudiados para alcanzar el mismo grado de activación monocitaria se detallan en la Tabla 7.

Muestra	Concentración (ng/ml)	LPS equivalentes	Desv std
EPS	100	15,7	1,5
CaCO₃-EPS	100	6,5	3,7
CaCO₃	300	0,0	0,0

Tabla 7. Equivalentes de LPS para los sistemas estudiados.

Como puede observarse, los sistemas inorgánicos de CaCO₃ no inducen respuesta inflamatoria sobre las líneas monocitarias, mientras que el EPS, así como el sistema CaCO₃-EPS generan una respuesta inflamatoria que se encuentra en relación proporcional a su concentración. Los elevados valores se estudiaron en término de las posibles impurificaciones (estructura de LPS unido al EPS) que pudieran ser responsables de dicha respuesta, lo que arrojó una proporcionalidad entre las concentraciones de LPS y las de EPS utilizadas.

CONCLUSIONES

Se caracterizaron Emulsano y su producto purificado (EPS) a fin de comprender más sobre sus características, mecanismos de acción y proponer su uso para otros sistemas de interfase como ser en coberturas en sistemas de liberación controlada de matrices diferentes a las descritas en la literatura.

Se relacionó la capacidad emulsificante de los complejos poliméricos con su potencial Z, su movilidad electroforética, y tamaño de agregados en solución, resultados que permitieron concluir sobre la naturaleza de carga superficial negativa para ambos polímeros.

No obstante la eficacia del sistema de cobertura para la estabilización de las matrices (biopoliméricas o inorgánicas) y/o retardo de liberación de moléculas (Capítulo 1), en esta sección del trabajo de tesis se establece que estos complejos biopoliméricos no deben ser empleados en sistemas humanos, pero que podrían emplearse en sistemas de diagnóstico *in vitro*. Debido a la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria elevada (sobre monocitos humanos) ambos tipos de estructuras (Emulsano o EPS) por lo que no estarían en condiciones de ser utilizadas para el desarrollo de matrices para el transporte de fármacos (u otras moléculas de interés) en el humano.

REFERENCIAS

- Barnharta DeAnn, Kaplan David L., Wintera William T., Panilaitis Bruce J., Kiemle David J. (2012) Structural details of the Polyelectrolytic Exopolysaccharide (APE), the stabilizing component of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 emulsan complex. *Carbohydrate Polymers* 88 257–262
- Boury Frank, Benoit Jean-Pierre, Thomas Olivier, Tewes Frederic. (2004) METHOD FOR PREPARING PARTICLES FROM AN EMULSION IN SUPERCRITICAL OR LIQUID CO₂. Agents: STITES & HARBISON PLLC. Assignees: Origin: ALEXANDRIA, VA US, IPC8 Class: AA61K914FI, USPC Class: 424489
- Castro G.R., Kamdar R.R., Panilaitis B., Kaplan D.L. (2005) Triggered release of proteins from emulsan–alginate beads, *Journal of Controlled Release* 109 149–157
- Castro GR., Panilaitis B., Bora E., Kaplan D.L. (2006) Controlled Release Biopolymers for Enhancing the immune Response, *molecular pharmaceuticals*, 4, 33-46
- Ducel V. y cols. (2004) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engeneering Aspects*. 232, 239–247
- Ducel V. y cols. (2005) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41, 95–102
- Mercaldi, M. P., Dams-Kozłowska, H., Panilaitis, B., Joyce, A. P., & Kaplan, D. L. (2008). Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component. *Biomacromolecules*, 9(7), 1988–1996
- Oshima, H. (1994) Electrophoretic mobility of soft particle. *J. Colloid Interface Sci.* 163 (2) 474-483.
- Panilaitis, B., Castro, G.R., Solaiman, D., Kaplan, D.L. (2006). Biosynthesis of emulsan biopolymers from agro-based feedstocks. *J. Appl. Microbiol.* 102, 531–537.
- Panilaitis B., G.R. Castro, D. Solaiman and D.L. Kaplan. (2007) Biosynthesis of emulsan biopolymers from agro-based feedstocks, , *Journal of Applied Microbiology* 102, 531–537
- Rosenberg, E.; Zuckerberg, A.; Rubinovitz, C.; Gutnick, D. L. (1979) *Appl. EnViron. Microbiol.* 3, 402–408.3, 414–420.
- Rosenberg, M., & Rosenberg, E. (1981). Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Journal of Bacteriology*, 148(1), 51–57.
- Zuckerberg, A.; Diver, A.; Peeri, Z. . (1979) *Applied EnVironmental Microbiology*.

CAPITULO 2

"Selección de biopolímeros para el fármaco modelo (Doxorrubicina): interacciones con el fármaco"

***Doxorrubicina-Biopolímeros
Selección de la Matriz
Caracterización de la Matriz***

INTRODUCCION

MATERIALES Y METODOS

- 1.** Preparación de soluciones stock, curvas de calibración y soluciones de los diferentes biopolímeros
- 2.** Determinación de la interacción molécula carga / biopolímeros
- 3.** Formulación de matrices por gelificación iónica
- 4.** Ensayos de carga
- 5.** Microscopía óptica y de Fluorescencia
- 6.** Ensayos Reológicos
- 7.** Estudios vibracionales: Espectroscopía IR
- 8.** Ensayos de liberación de Dox a partir de matrices de pectina
- 9.** Modelado matemático de las cinéticas de liberación de Dox
- 10.** Estudios de saturación de unión biopolímero-Dox
- 11.** Estudios de almacenamiento
- 12.** Estudios cinéticos de liberación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

Selección de biopolímeros para el fármaco modelo (Doxorubicina): interacciones con el fármaco

INTRODUCCION

Los biopolímeros naturales presentan ventajas frente a los polímeros sintéticos debido a un número elevado de propiedades notables como la enorme diversidad en la estructura química, funcionalidad, estereoespecificidad, propiedades biológicas, amplio rango de pesos moleculares, y en general sobre todo la falta de efectos secundarios tóxicos. Además, la síntesis "blanda" y la biodegradabilidad, junto a propiedades reológicas, hacen que sean moléculas muy atractivas y útiles para un sinnúmero de potenciales usos. Entre ellos, los de naturaleza polisacáridica han tenido especial atención en las diferentes industrias como se ha detallado [Introducción General].

Diferentes sistemas fueron desarrollados para reducir los efectos secundarios de drogas anticancerígenas como la Doxorubicina (Dox): micelas, liposomas y/o derivatización con polioles y/o proteínas. Algunas de estas nuevas vectorizaciones han disminuido la toxicidad de la droga, pero se han presentado problemas inmunológicos, y con una sobrevivencia promedio de los pacientes similar [Peng y cols., 2010; Nielsen y cols., 2006; Vrignaud y cols., 2010; von Maltzahn y cols., 2011]. El empleo de biopolímeros de naturaleza polisacáridica para el transporte de principios activos anticancerígenos, entre ellos Dox, constituye una de las áreas más promisorias en la liberación controlada de moléculas [Bouhadir y cols. 2001; Missirlis y cols., 2006; Xia Tao y cols., 2007; Jianing Qi. Y cols., 2010].

Por otro lado, procesos de modelado son utilizados con frecuencia en sistemas de transporte de drogas buscando complementar el análisis de los sistemas para la predicción de comportamientos en diversas condiciones ambientales. [Grassi y cols., 2011; Polakovic y cols, 1999; Crank, 1975].

En el presente capítulo se realizará un relevamiento de biopolímeros con el objeto de emplearlos como matrices para el transporte de Doxorubicina, droga anticancerígena. Asimismo, se estudiarán las interacciones entre la matriz seleccionada y la molécula carga. Por último, se ensayará la capacidad de carga y liberación desde la matriz seleccionada en condiciones fisiológicas simuladas y se propondrá un modelo matemático que permita predecir comportamientos similares para futuras aplicaciones.

MATERIALES Y METODOS

Los materiales empleados fueron: doxorubicina (Dox, clorohidrato de Doxorubicina, $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$, peso molecular: 579.98 g/mol, grado de pureza HPLC), pectina citrus (74 % metoxilación) y carragenina lambda (CAR λ , clasificación según cantidad de grupos sulfonatos en su unidad monomérica) (Sigma-Aldrich). Además se emplearon: sal sódica de alginato (ALG, de baja viscosidad, peso molecular viscosimétrico promedio: 1×10^5 Da) provista por Biochem (SA), gelatina (GELA) provista por PARAFARM, goma arábica (GARAB) provista por DROAN, goma guar (GG) provista por Nutrial (Buenos Aires, Argentina). La goma guar fue provista por Hindustan Gums & Chemicals (India) y derivatizada: carboximetilada (CMGG) en el laboratorio del Prof. Arup Mukherjee (Univ de Calcuta, Kolkata, India). La goma garrofin (GGARR) provista por Saporiti Hnos. (Buenos Aires, Argentina). Las pectinas de 33,0 %, 35,4 %, 55,3% y 67,2% (PEC 33, PEC 35, PEC 55y PEC 67 según sus grados de metoxilación) fueron provistas por CPKelco (Dinamarca); y las carrageninas iota y kapa (CAR I y CAR K, clasificación realizada según cantidad de grupos sulfonatos en su unidad monomérica) son compuestos provistos Satiagel. Todos los restantes reactivos fueron de grado analítico o superior de Sigma (St. Louis, MO) o Merk (Darmstadt).

Las soluciones estándar de Dox, las soluciones biopoliméricas, y las soluciones reguladoras (*buffers*) utilizadas, así como sus diluciones fueron realizadas con agua calidad ultra pura (miliQ, Millipore, Bellerica, EE.UU.).

Preparación de soluciones stock y curvas de calibración

Se preparó una solución de Doxorubicina (Dox) patrón 1.55 mM en solución salina de NaCl 154 mM a pH = 3,0 y se realizaron diluciones en serie con el objeto de determinar la relación entre fluorescencia y concentración. Las determinaciones cuantitativas de Dox se realizaron por fluorimetría en un fluorímetro Perkin Elmer LS 50B. La técnica fluorimétrica de determinación de Dox ha sido publicada previamente [Husain N. y cols., 1993; Karukstisu K.K. y cols. 1998] y modificada de acuerdo a nuestras condiciones experimentales. En éste sentido, se realizó un barrido espectral de soluciones de baja concentración de la droga y se determinó por fluorescencia las longitudes de onda máximas de excitación y emisión para cada medio acuoso a diferentes pH o bien en medios orgánicos conteniendo acetona o etanol. Las longitudes de onda máximas encontradas para los procesos de excitación y emisión determinaron la $\lambda_{exc} = 454$ nm y la $\lambda_{em} = 588$ nm en medio acuoso a pH 7,4.

Una vez realizadas las medidas de fluorescencia de las soluciones de distinta concentración con las longitudes de onda del barrido espectral obtenidas para cada ambiente, se analizó el intervalo de linealidad de las mismas y se calcularon los valores de cada ecuación y los coeficientes de correlación (r) para determinar el ajuste de la regresión lineal en cada caso.

Preparación de soluciones de los diferentes biopolímeros

Se pesó la cantidad necesaria de cada biopolímero, fueron disueltos en agua MiliQ suplementada con azida de sodio 10 μ M (para evitar posible degradación microbiana durante su almacenamiento) hasta concentraciones comprendidas entre 0,5 y 2,0 % (Tabla 1). La disolución se llevó a cabo bajo agitación suave; posteriormente se almacenaron a 5 °C hasta su posterior utilización.

Biopolímero	Concentración (% p/v)
Gelatina	2,0
Alginato de sodio	1,5
Pectinas	1,5
Carrageninas	1,0
Gomas	0,5

Tabla 1: Soluciones empleadas en ensayos de interacción.

Determinación de la interacción molécula cargo / biopolímeros

Se incubaron 375 μ l de soluciones stock de biopolímero con 125 μ l de solución de Dox (dilución 1/10 de la solución patrón 1.55 mM) durante 15 minutos a temperatura ambiente (25 °C). A continuación, se agregó 1 ml de acetona (0 °C), se homogenizó la solución obteniéndose una suspensión la cual fue centrifugada a 10,000 xg durante 5 minutos. A un grupo de muestras se les separó el sobrenadante, y a otro se las dejó en incubación por 2 horas más y a continuación se les retiró el sobrenadante. Posteriormente se determinó la concentración de Dox en todos los sobrenadantes mediante espectrofluorimetría.

Para seleccionar entre los distintos tipos de pectinas, se incubaron soluciones de cada biopolímero al 2,0 % en presencia de una concentración final de Dox de 300 μ M a pH 7,0 (buffer MOPS 50 mM) y 25 °C. Los sistemas fueron agitados magnéticamente (500 rpm) durante el transcurso de la experiencia (2 hs).

Formulación de matrices por gelificación iónica

Se estudiaron los procesos de gelación iónica de las pectinas con diferentes grados de metoxilación (de 33,0 % a 67,2 %), así como sus capacidades de encapsulamiento de Dox. Para ello, las pectinas fueron disueltas bajo agitación en presencia o no de solución de Dox. La encapsulación de la doxorubicina se realizó en buffer Tris-HCl (100 mM, pH=8,9); y la disolución de las pectinas se realizó en buffer MOPS (50 mM, pH=7,0).

Las microesferas de los hidrogeles fueron preparadas mediante goteo de 2 ml de solución formada por el complejo PEC/Dox, en 25 ml de una solución de CaCl₂ (250 mM, preparada en el correspondiente buffer) durante un lapso de 20 minutos, y con agitación suave (200 rpm) en baño de hielo (0 °C). Las esferas formadas fueron maduradas en presencia de CaCl₂ durante 1 hora, para luego ser filtradas utilizando una placa filtrante de porcelana y papel de filtro (Whatman #1).

Al filtrado se le determinó el volumen y la fluorescencia mediante la técnica previamente descrita para Dox. Las esferas filtradas fueron almacenadas en una solución conteniendo 50 mM de CaCl₂ y 10 μ M de azida de sodio a 5 °C hasta ser utilizadas en posteriores experimentos.

Alternativamente, se procedió al secado de las esferas obtenidas por medio del agregado de acetona (3,0 ml para cada lote producido) durante 1 h a temperatura ambiente. Se dejó secar bajo corriente de aire durante 12 horas, para luego ser almacenadas como se mencionó anteriormente.

Ensayos de carga

La eficiencia del encapsulamiento de la droga en las matrices propuestas fue determinada disolviendo 100 mg de microesferas en 5,0 ml de solución de buffer de fosfato de sodio 100 mM (pH 7,4) hasta disgregación total de la matriz mediada por efectos de agitación mecánica fuerte. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 xg a 5 °C. Se determinó espectrofluorimétricamente la concentración de Dox en los sobrenadantes como fuera mencionado anteriormente. La capacidad de carga de Dox fue evaluada de la siguiente manera:

$$\text{Eficiencia de carga} = \frac{[\text{Dox}] \text{ en cada sobrenadante}}{[\text{Dox}] \text{ teórica}} \quad (2)$$

Microscopía óptica

Las observaciones se llevaron a cabo mediante un microscopio óptico con fuente UV adosada y filtros de fluorescencia (495-505 nm) marca Leica (modelo DM 2500, Alemania).

Ensayos Reológicos

La caracterización reológica de los sistemas en solución de PEC y PEC-Dox fue realizada en un Reómetro de esfuerzo de corte controlado (Anton Paar MCR 301) con paralelo de 43 mm (PP43/GL-SN16497 *Measurements system*) y un sistema accesorio P-PTD120-SN80470786. El rango utilizado fue de 0.7 mm. Para el estudio de los efectos de corte, se utilizaron velocidades de corte en el rango de 1 a 1000 s⁻¹ y se registraron los resultados ante estas perturbaciones. Todos los ensayos de reología fueron llevados a cabo a 37 °C y las curvas mostradas corresponden a los valores promedios de los cuadruplicados para cada medida. Los datos recolectados de tensión de corte, velocidad de corte, así como la viscosidad aparente fueron obtenidos directamente del instrumento. La caracterización reológica fue realizada en el Laboratorio de la Dra. Magdalena Mechetti (Fac. de Cs Exactas, Universidad Nacional de Tucumán).

Estudios vibracionales: Espectroscopía IR

Las formulaciones de PEC y PEC-Dox fueron analizadas mediante un equipo de FTIR (JASCO FT/IR- 4200) Las pastillas fueron preparadas por la mezcla de cada muestra al 5,0 % p/p con bromuro de potasio (KBr, Pike technologies) y escaneadas con una corrección de fondo para 256 escanes, contra una fuente de alta energía de cerámica y un detector. Los espectros correspondientes a los análisis de FTIR para PEC y PEC-Dox fueron realizados para el intervalo de 4000 – 400 cm⁻¹ con 4 cm⁻¹ de resolución. Los estudios de FTIR se realizaron en el Laboratorio del Dr. Gustavo Marchetti, CINDECA, UNLP), y en la Línea SMIS del Sincrotrón SOLEIL (SMIS *beamline*, Soleil, *French National Synchrotron Facility*, Francia).

Ensayos de liberación de Dox a partir de matrices de pectina

Se pesaron 200.0 mg de esferas deshidratadas en una balanza analítica (Adventurer OHAUS) de alta precisión (0.1 mg) y luego colocadas en un tubo Reacti-vial® de 4 ml de capacidad, con el agregado de 1,0 ml de solución buffer. La cinética de liberación de Dox fue realizada a temperatura ambiente (25 °C) en buffer HEPES (pH= 7,4) y a 37 °C en buffer Clark & Lubs (pH= 2,0) o en buffer fosfato (pH= 7,4) con una agitación de 500 rpm. A determinados intervalos de tiempo se tomó una muestra de 300 µl de la fase líquida y se agregó un volumen igual de buffer. A la fracción extraída se le determinó la concentración de Dox por fluorescencia.

Modelado Matemático

La liberación de Dox desde la matriz seleccionada (PEC 55) se modeló matemáticamente aplicando las ecuaciones de derivadas parciales de transferencia de materia en estado no estacionario para una geometría esférica. Se consideró que el fenómeno de liberación de droga (Dox) está gobernado por un proceso difusivo y que el coeficiente de difusión es constante e independiente de la concentración de droga. Asimismo se consideró condiciones de mezclado perfecto en la solución, esto es que la concentración de droga en la superficie de las partículas es igual a la concentración en el seno del fluido.

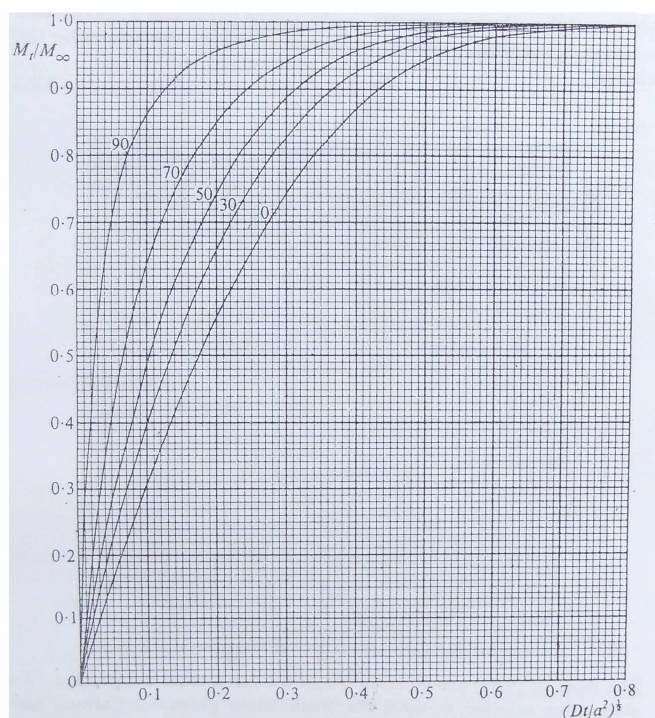
En el caso particular de estos sistemas de partículas que liberan la droga cargada a un medio se consideró el volumen limitado hacia el cual difunde la misma. La resolución de estas ecuaciones presenta solución analítica exacta [Crank, 1975]. Para determinar que tipo de modelo se ajusta mejor a nuestros resultados experimentales se evaluaron diferentes parámetros:

- Para la matriz: geometría, tamaño, masa total de partículas, número de partículas, distribución de la droga (imágenes de fluorescencia), masa total de droga almacenada.
- Para el medio de liberación: volumen total del líquido, volumen de muestreo, temperatura, agitación.

Como se puede observar para una disolución de las partículas a muy largo plazo (tiempos que exceden los de liberación ensayados) es válido considerar que el análisis del proceso de liberación está controlado principalmente por un proceso de difusión en un volumen de disolución limitado. Tales sistemas como se mencionó anteriormente presentan solución analítica para geometrías sencillas como son cilindros, esferas y placas. En este caso la distribución de droga inicial fue considerada uniforme en las pastillas de geometría esférica, y según el modelo de Crank la representación grafica de la masa de droga inicial en la matriz transportadora respecto de la masa de droga liberada al líquido para tiempos infinitos

$\left(\frac{M_{0\text{solido}}}{M_{\infty\text{liquido}}} \right)$ vs. el tiempo adimensional $\left(\frac{Dt}{R^2} \right)^{1/2}$ (D: coeficiente de difusión a calcular, t: tiempo y

R: radio de las partículas) es la siguiente:



Liberación teórica según el modelo de Crank para un proceso difusivo desde una matriz sólida a una solución homogénea de volumen limitado. Los números en las curvas muestran el porcentaje de soluto liberado a t_{∞} . Observaciones: $M_{0\text{solido}}/M_{\infty\text{liquido}} = M_t/M_{\infty}$ y $R = a$ (expresado en metros).

Estudios de saturación de unión biopolímero-Dox

Para determinar la capacidad máxima de unión entre el biopolímero y la droga, se procedió a titular la cantidad de droga máxima que el biopolímero puede unir en las condiciones de trabajo, es decir en las mismas condiciones en que la solución de biopolímero-Dox deberá ser preparada para ser utilizada en la formación de las microesferas: solución regulada por buffer MOPS a 25 C.

Estudios de almacenamiento y posterior liberación de Dox

Estudios de cinética de liberación fueron llevados a cabo con micropartículas almacenadas a 4 °C durante 12 meses.

Estadísticas

Dos o tres experimentos independientes se realizaron como mínimo por duplicado (N=2) en todos los casos. En el caso de los estudios de interacción con pectinas, cuatro experimentos independientes fueron llevados a cabo por duplicado (N=2) para cada caso. Los datos de estos experimentos fueron analizados usando un Test-t de Student. La significancia estadística de los valores obtenidos experimentalmente fu definida con $p < 0.05$. Los datos mostrados en los gráficos se representaron como promedios con su desviación estándar asociada.

RESULTADOS Y DISCUSION

Selección de biopolímeros: interacción biopolímero – molécula cargo

Se testaron nueve biopolímeros de estructura molecular diferente por su capacidad de unión a Dox. Sólo tres biopolímeros presentaron unión a la Dox luego de 15 minutos de incubación (Figura 1), pero el número se incremento a cuatro biopolímeros luego de 2 hs de incubación mas: las dos PEC de diferente grado de metoxilación (33 y 74 %) utilizadas en el ensayo mostraron una alta interacción, la CAR presentó una interacción intermedia y el ALG una baja interacción con la molécula de Dox. Para determinar cuantitativamente el contenido de Dox se llevaron a cabo precipitaciones de los diferentes polímeros luego de un tiempo de interacción establecido con etanol y con acetona. La precipitación fue realizada con acetona, debido la precipitación completa de todos lo biopolímeros estudiados. De manera cuantitativa las interacciones fueron de 37,9; 39.0 % y 46,8; 49,0 % para las PEC 33 y PEC 74 a los 15 y 120 minutos respectivamente. Para la CAR y el ALG los porcentajes de unión de Dox encontrados fueron de 20,0; 0,0 % y 24,6; 20,0 % a 15 y 120 minutos respectivamente. Las medidas de Dox unida a los biopolímeros para los sistemas que se incubaron 15 minutos y 2 horas se muestran en las Figuras 1 y 2.

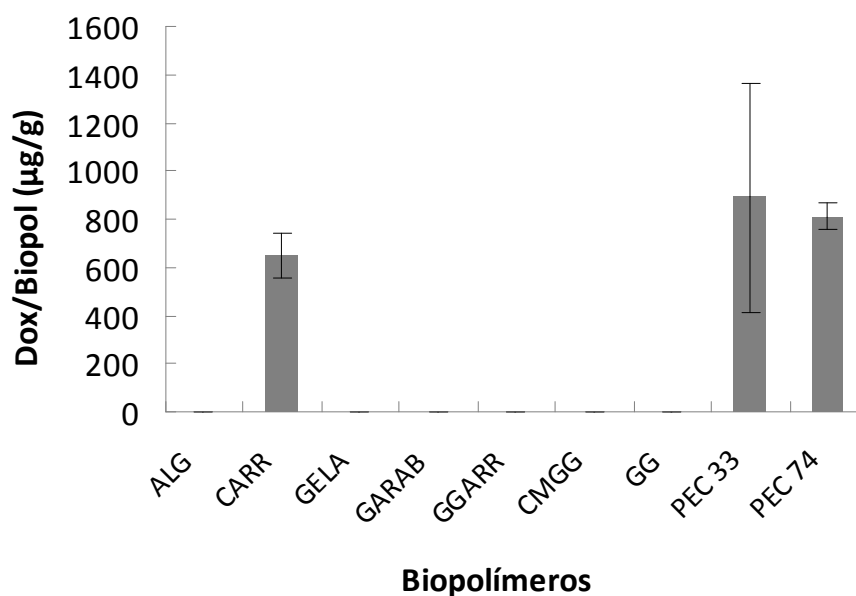


Figura 1: Precipitación de la Dox unida a cada biopolímero luego de 15 min de incubación.

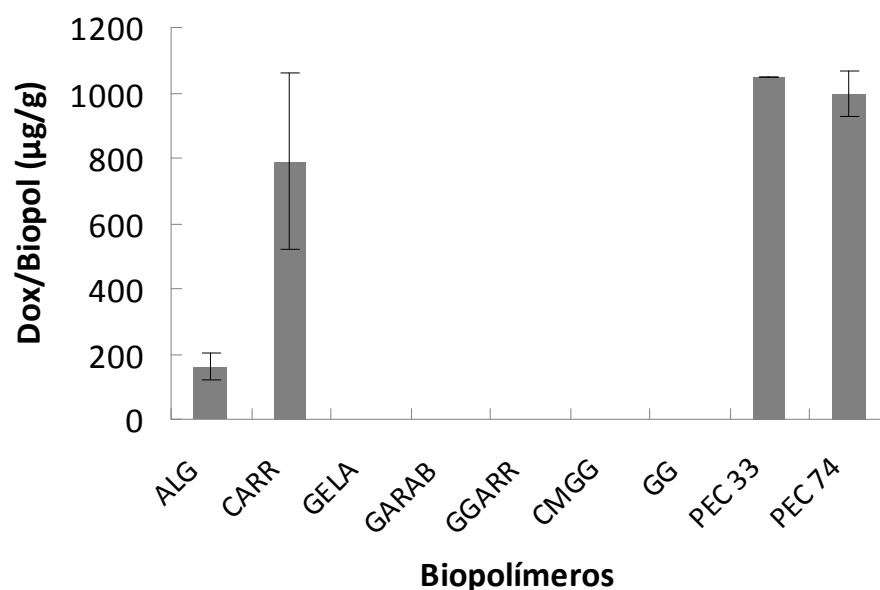


Figura 2: Precipitación de la Dox unida a cada biopolímero luego de 2 hs de incubación.

Las diferencias entre los porcentajes de unión observados con el tiempo de incubación sugieren la presencia de un control de proceso de naturaleza cinética. Luego de 15 minutos, el proceso de interacción probablemente se encuentre aún en un equilibrio transiente, en donde la interacción es más favorable energéticamente que cinéticamente bajo nuestras condiciones experimentales.

A partir de estos resultados se seleccionaron las pectinas con el objeto de determinar que grado de metoxilación presentaba mayor afinidad por la droga.

Para ello, se amplió el procedimiento de selección a 5 pectinas de diferentes grados de metoxilación empleando el mismo procedimiento que para la selección previamente desarrollada. Los resultados son mostrados en las Figuras 3 y 4.

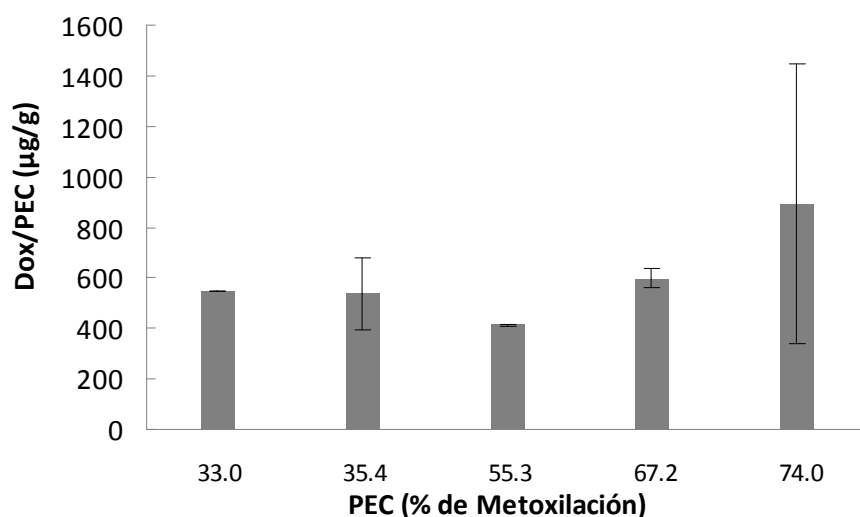


Figura 3: Precipitación de la Dox unida a cada pectina expresada en µgDox/g polímero luego de 15 min de incubación.

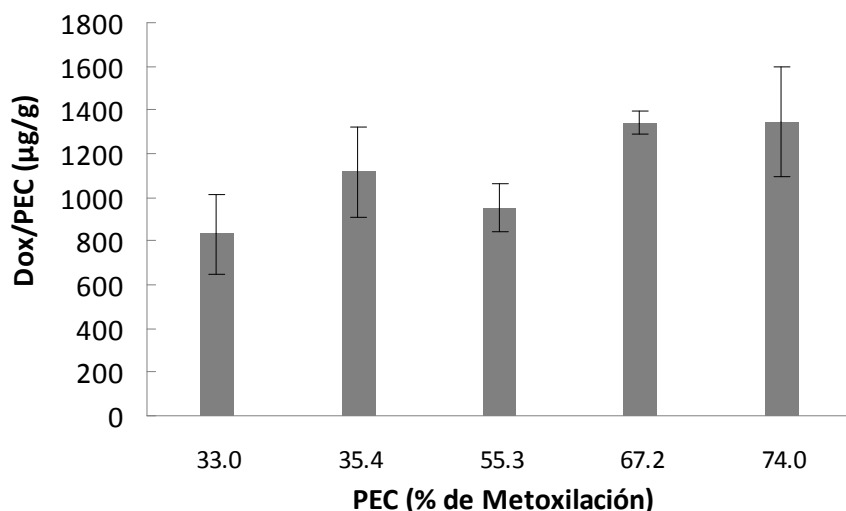


Figura 4: Precipitación de la Dox unida a cada pectina expresada en µgDox/g polímero luego de 2 hs de incubación.

En la figura 5 se muestran los resultados de interacción de Dox relacionados con el grado de metoxilación de las pectinas ensayadas. Dada la similitud de los valores obtenidos se procedió a realizar un tratamiento estadístico.

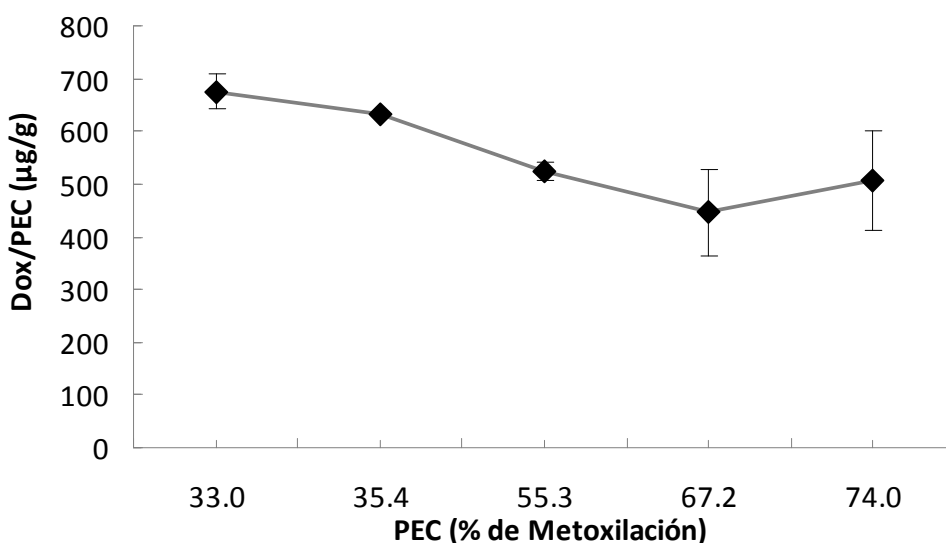


Figura 5: Cantidad de Dox unida a las pectinas en función de los porcentajes de metoxilación en 2hs de incubación.

Para discriminar entre los distintos grados de metoxilación y conocer cual de las pectinas unía mas cantidad de Dox se procedió a realizar un tratamiento estadístico mediante el Test-t de Student:

Prueba entre pectina 33% y 55% de metoxilación:

Hipótesis:

Hipótesis alterna (Ha)= las diferencias son significativas.

Hipótesis nula (Ho)= las diferencias se deben al azar.

Nivel de significación: para todo valor de probabilidad igual o menor que 0,05 se acepta Ha y se rechaza Ho (o sea $P > \alpha = 0,95$).

Zona de rechazo: para todo valor de probabilidad mayor que 0,05 se acepta H_0 y se rechaza H_a ($P < 0,05$).

$t = -2,62$ GL= 2, $P = 0,939$.

Se acepta H_0 y rechaza H_a con un nivel de confianza de aproximadamente 95%.

Por lo tanto, en los resultados se observa que no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grados de metoxilación en cuanto a las propiedades de interacción a Dox.

Formulación de matrices por gelificación iónica

Para la optimización de las condiciones para la gelificación de las pectinas se ensayaron diferentes soluciones buffers, en presencia o no de diferentes porcentajes de solventes orgánicos. Estos ensayos no arrojaron diferencias significativas a la hora de justificar su elección frente a sistemas acuosos (datos no mostrados). Sin embargo, en medios acuosos las pectinas con diferente grado de metoxilación presentaron grandes diferencias de gelificación: las pectinas de bajo y medio metoxilo presentaron mayor capacidad para gelificar. En base a los resultados obtenidos, sumados a datos preliminares de cinéticas de liberación (ver apartado de Ensayos de Liberación de Dox a partir de matrices de pectina), se decidió continuar los estudios con las matrices de PEC 35 y PEC 55.

Ensayos de carga

Se realizaron ensayos de carga para las partículas formadas por matrices de PEC 35 y PEC 55 según fuera detallado. Las cantidades incorporadas de Dox en la matriz se determinaron luego de gelificar, madurar y secar a las partículas mediante un proceso de desintegración total de las mismas. Los cálculos de eficiencia de carga se realizaron según la Eq. (2), a partir de los que se obtuvieron porcentajes de 66% y 88% para las PEC 55 y 35 respectivamente.

Ensayos Reológicos

En una primera instancia se llevaron a cabo mediciones reológicas a diferentes temperaturas (10 y 20 °C) para los sistemas de PEC 35-Dox y PEC 55-Dox así como para cada de las PEC puras. Una vez determinado el intervalo de trabajo se determinaron: la viscosidad y el esfuerzo de corte (*shear stress*) en función de la velocidad de deformación (*shear rate*) y en función del tiempo (aumentando la velocidad de deformación y disminuyéndola) para el estudio de tixotropía. Por otro lado, se realizaron estudios dinámicos de las muestras para analizar el comportamiento viscoelástico.

Se realizaron medidas de viscosidad aparente (Pa s), fuerza de corte (Pa) y velocidad de deformación (s^{-1}) para diferentes velocidades de agitación (rpm). La velocidad de deformación fue incrementada de 0 a $1000 s^{-1}$ en un período de 175 s para obtener la curva de ascenso, luego fue reducida desde 1000 hasta $0 s^{-1}$ para recoger datos de la curva descendente para el mismo periodo de tiempo y así estudiar la naturaleza de las muestras en su dependencia con el tiempo. Se detectó una leve tixotropía, que puede establecerse debido a una despreciable área entre las curvas. Esta observación es válida para las formulaciones ensayadas con droga, es decir: PEC 35-Dox y PEC 55-Dox, no así para las PEC sin la presencia de la droga. En la Figura 5 se ha representado el logaritmo natural de la fuerza de corte en función de la velocidad de deformación.

La viscosidad aparente se vio disminuida al incrementarse la velocidad de deformación e incrementada ante un aumento de la velocidad de deformación, indicando así un comportamiento pseudoplástico. La viscosidad aparente fue mayor para la pectina de menor

grado de metoxilación de las ensayadas y se observó un aumento de por lo menos 5 veces para los sistemas conteniendo Dox. La PEC 55 presentó una menor resistencia al fluido de corte. Estas observaciones fueron reforzadas por los resultados obtenidos de las propiedades dinámicas viscoelásticas de las muestras (datos no presentados).

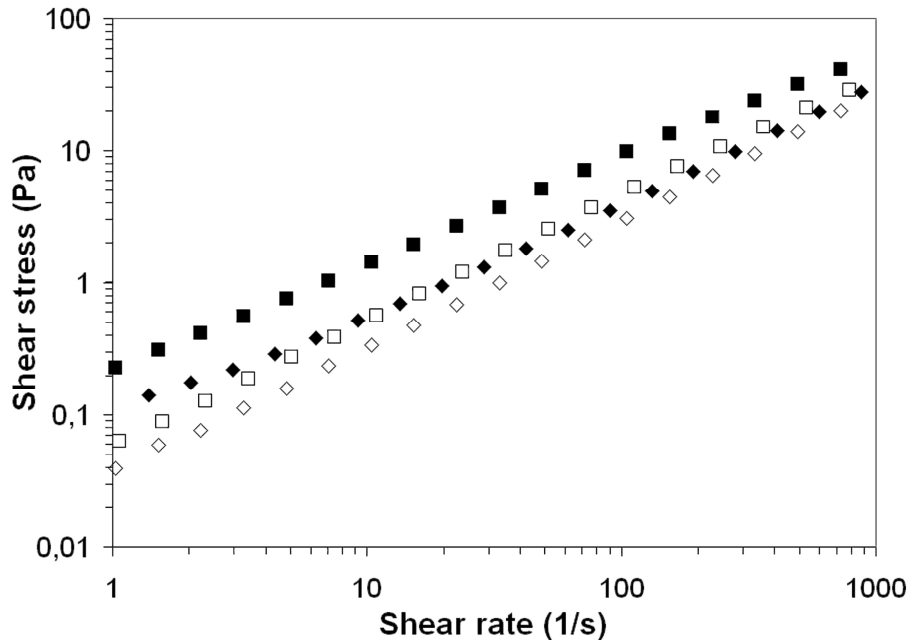


Figura 5. Comportamiento de flujo para PEC y PEC-Dox. Tensión de corte vs. velocidad de deformación. Símbolos: PEC 35 (\square); PEC 35-Dox (\blacksquare); PEC 55 (\diamond); PEC 55-Dox (\blacklozenge).

La PEC 55, con mayor grado de metoxilación, con y sin Dox exhibieron una baja viscosidad en acuerdo a observaciones similares reportadas anteriormente. [Fraeye y cols., 2009 y Bockki y cols., 2011] La viscosidad aparente a 1 s^{-1} fue de aproximadamente 0.06 Pa s y 0,04 Pa s para la PEC 35 y la PEC 55 respectivamente, pero estos valores crecen hasta 0.22 Pa s para el sistema PEC 35-Dox y 0.102 Pa s para el sistema PEC 55-Dox, la cual se muestra en la Figura 6.

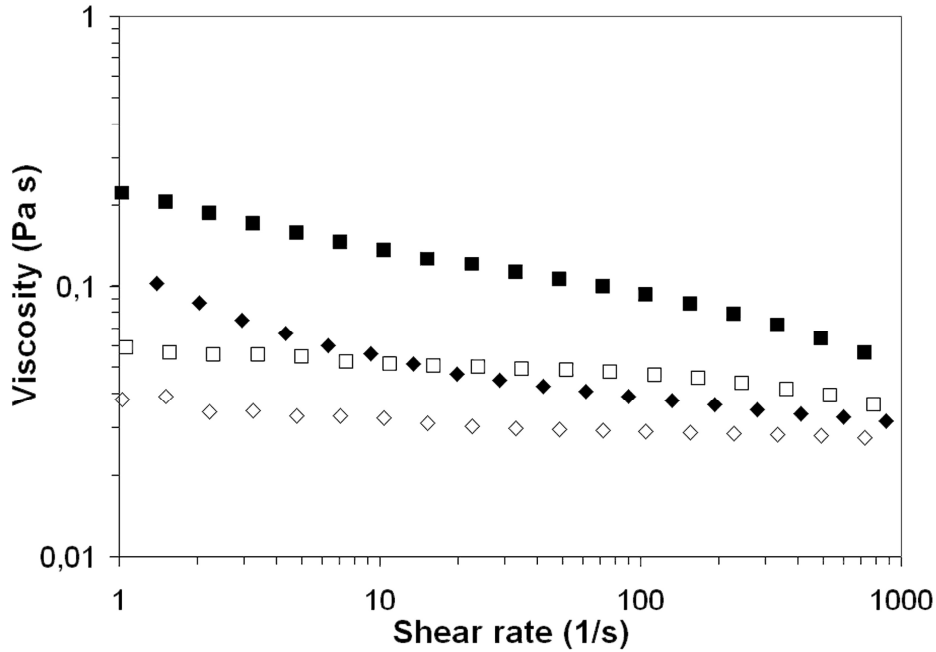


Figura 6. Comportamiento de flujo para PEC y PEC-Dox. Viscosidad aparente en función de la velocidad de deformación. Símbolos: PEC 35 (□); PEC 35-Dox (■); PEC 55 (◇); PEC 55-Dox (◆).

Modelo Reológico

Los datos experimentales obtenidos por las gráficas de esfuerzo de corte vs. velocidad de deformación fueron ajustados a la ley del modelo teórico seleccionado para determinar el coeficiente de consistencia (K) y el índice de flujo (n). La ecuación fundamental para este modelo es:

$$\tau = K(\dot{\gamma})^n \quad (a)$$

donde τ es la fuerza de corte (Pa), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación (s^{-1}), K es el índice de consistencia ($Pa \cdot s^n$) y n el índice para el comportamiento del flujo, cuyo valor es una medida del grado de comportamiento no-Newtoniano. Para fluidos pseudoplásticos, el índice de flujo n toma un valor entre 0 y 1 (para valores más alejados de la unidad el comportamiento presentará pronunciadas propiedades no-Newtonianas)

Mediante el empleo de un análisis de regresión lineal en escala logarítmica se evaluaron K , n y el coeficiente de regresión (R) (Tabla 2). Como se puede observar el valor de n se encuentra lejos de la unidad. Así, los sistemas estudiados exhibieron un comportamiento de tipo pseudoplástico. Las muestras de PEC-Dox mostraron características más pronunciadas de este tipo de comportamiento como se puede observar en la Figura 6.

De los análisis reológicos surge que la PEC 55 fue seleccionada como matriz para el encapsulamiento de Dox.

Sistemas	Índice de Flujo	Índice de consistencia K (Pa s)	R^2
PEC 35	0.939	0.060	0.9997
PEC 55	0.952	0.037	0.9998
PEC 35 - Dox	0.807	0.218	0.9997
PEC 55 - Dox	0.833	0.087	0.997

Tabla 2. Características reológicas de PEC 35 y PEC 55 con y sin Dox.

Ensayos de carga

Se realizaron ensayos de carga máxima la PEC 55 para poder determinar la capacidad total de unión del biopolímero a Dox en las condiciones de encapsulamiento detalladas anteriormente. Así, se obtuvo una concentración de saturación de Dox de 5.50 μmoles por gramo de biopolímero. La titulación de la droga en interacción con la matriz se esquematiza en la Figura 7.

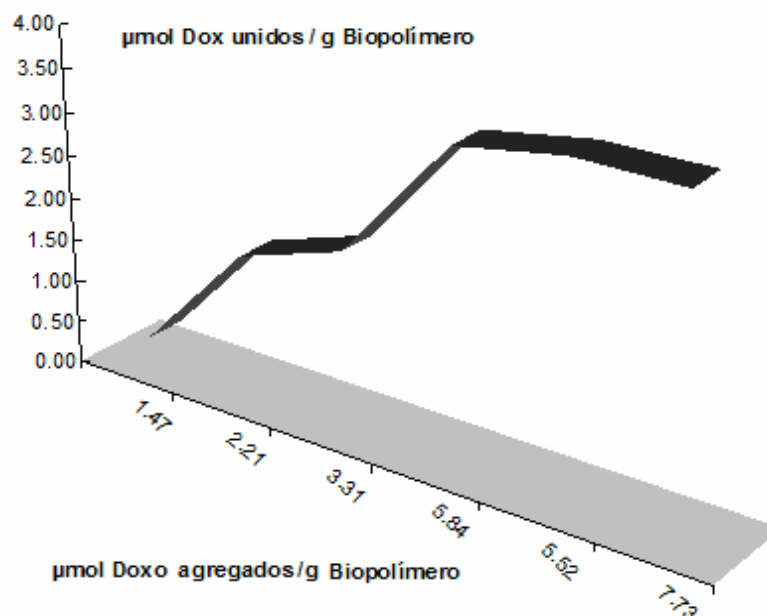


Figura 7: Titulación de PEC 55 con Dox a 25 C según procedimiento de unión detallada en el apartado de Selección de biopolímeros en esta misma sección.

Estudios vibracionales: Espectroscopía IR

Los análisis de FTIR confirmaron la presencia de la interacción entre PEC 55 y Dox (Tabla 3). Se encontró un desplazamiento del máximo característico para el grupo N-H de la Dox hacia valores mayores de frecuencia en presencia de la matriz (PEC 55): 1615 a 1628 cm^{-1} ($\Delta\nu = 13 \text{ cm}^{-1}$). Asimismo se encontró un desplazamiento para el máximo correspondiente a los grupos carbonilos de Dox, no diferenciables entre si, de Dox (a 1733 cm^{-1}), originalmente presente en 1722 cm^{-1} ($\Delta\nu = 11 \text{ cm}^{-1}$).

Además, las bandas asociadas al grupo carboxilo de la PEC 55 se desplazó desde 1609 hasta 1628 cm^{-1} ($\Delta\nu = 19 \text{ cm}^{-1}$). Las bandas asociadas a los grupos aromáticos de la Dox presentes a 1743 cm^{-1} para la droga pura, se observaron a 1733 cm^{-1} ($\Delta\nu = 10 \text{ cm}^{-1}$) en la formulación PEC 55-Dox, lo que sugiere una posible interacción generada entre las regiones hidrofóbicas de la pectina (carboxilatos de con medio y/o alto grado de metoxilación) y los grupos hidrofóbicos de la antraciclina: los anillos aromáticos presentes en Dox. (Tabla 3).

El complejo de PEC 55-Dox muestra también un corrimiento hipsocrómico para el modo vibracional $\sigma_{\text{C-C}}$ comparado con el espectro de Dox.

Los estudios de FTIR sugieren fuertemente una compleja interacción entre molécula cargo y su matriz. (Tabla 3). [Kayal y cols., 2010 y Purcell y cols., 1987]

Longitudes de onda (cm ⁻¹)			Δu (cm ⁻¹)	Asignaciones
Dox	PEC	Formulación		
3389	-	3380		σ (N-H)
3330	-	3269		σ (H-O)
2932	2936	2929		σ (C-H)
1722	1743	1733	11-10	σ (C-C), ν(-COOCH₃)
1615	1609	1628	13-9	δ (N-H), ν(-COOH), ν(=O) and phenyl breathing modes
1408	-	1459, 1443	~ 43	σ (C-C)
-	1328	1331		σ (C-O-C)
1077	1100	1099		σ (C-O)

Tabla 3. Bandas espectroscópicas encontradas en análisis FTIR (cm⁻¹) y sus asignaciones para: Dox pura, PEC 55 (en estado sólido) y la formulación PEC 55-Dox a pH= 7,4.

Ensayos de liberación de Dox a partir de matrices de pectina

Los ensayos de liberación para las pectinas de bajo y medio grado de metoxilación (PEC 33, PEC 35 y PEC 55) seleccionadas en base a su capacidad de gelificación mostraron una tendencia que podría relacionarse con el grado de metoxilación. La PEC 55, comparada con las restantes, fue la que por más tiempo retuvo a la droga en la matriz gelificada. La PEC 55 libera al medio de reacción aproximadamente un 15 % de la carga a la hora de incubación, mientras que la PEC 35 libero casi el 75% de la carga inicial en el mismo tiempo. La PEC 33 fue descartada por presentar valores de liberación aun mayores (datos no mostrados) En las Figura 6 se muestran los perfiles de liberación para las PEC 35 y 55% de grado de metoxilación

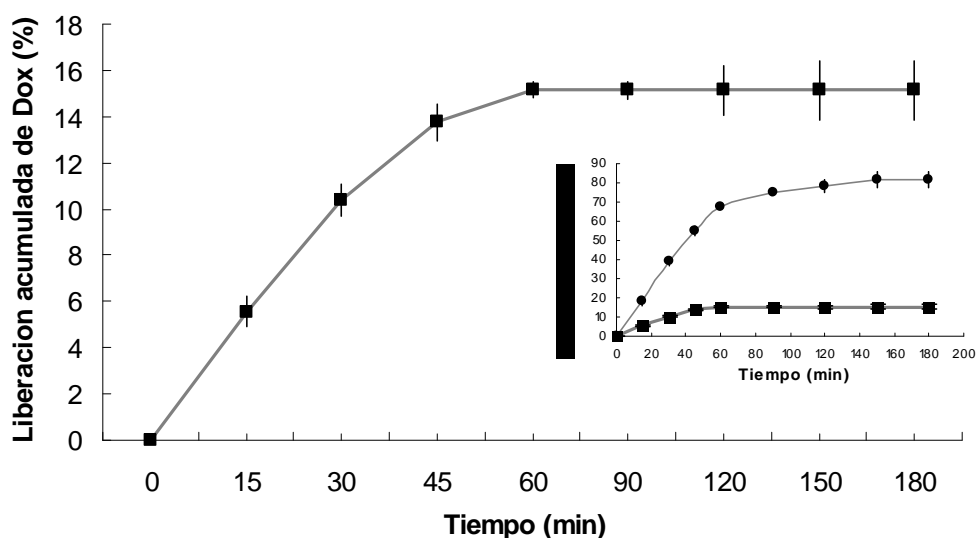


Figura 6: Perfil de liberación a 25 C en buffer HEPES para la Dox desde una matriz compuesta por pectina 35% (●) y 55% (■).

Microscopías de partículas ensayadas con y sin carga de Dox se muestran en la Figura 8.

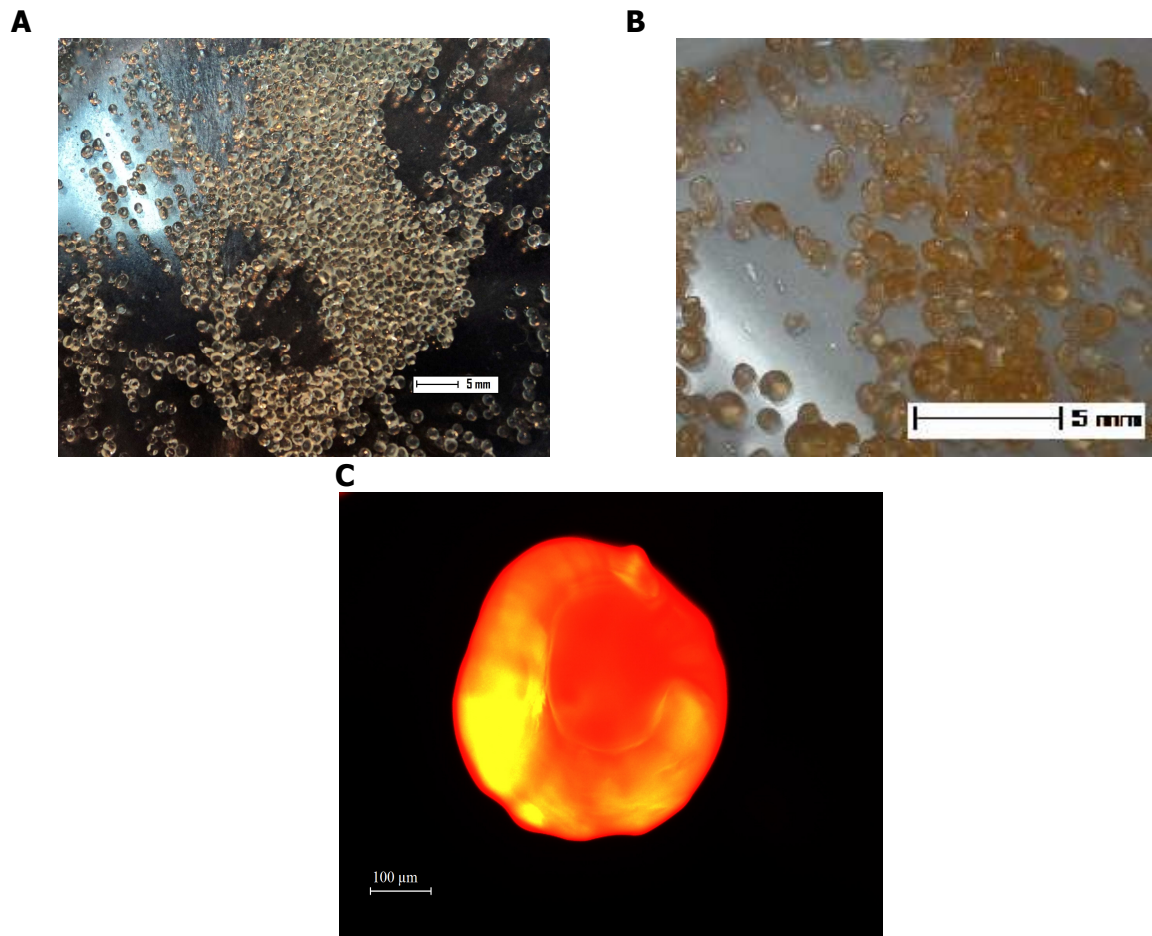


Figura 8: Microscopia óptica para partículas de PEC 55 sin o con Dox (A y B respectivamente) y de fluorescencia para una partícula cargada (C)

Modelado Matemático de la cinética de liberación de Dox

Estudios de modelado analítico de la cinética de liberación de Dox se realizaron para describir el comportamiento de los sistemas particulados en suspensión, y el perfil de liberación de la droga al medio de reacción. Para describir el comportamiento experimental desde un modelo teórico se analizaron diferentes parámetros experimentales que permitieron definir las condiciones de contorno.

Si se considera al sistema gobernado por un proceso difusivo, el proceso de liberación de solutos desde matrices sólidas obedece a la segunda Ley de Fick [Polakovic y cols. 1999] Para partículas esféricas la ley adquiere la siguiente expresión:

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t}\right) = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r}\right) \quad (1)$$

Donde c es la concentración local de la droga a un tiempo t y a una distancia r del centro de la partícula, y D el coeficiente de difusión. Para la resolución de la ecuación acorde a las condiciones de contorno de nuestro sistema, se propone el empleo de un modelo de difusión hacia un volumen finito de líquido agitado cuya concentración es homogénea en todo su seno. [Crank, 1975].

Las condiciones de contorno e iniciales son las siguientes:

$$-\frac{V}{K_p} \left(\frac{\partial c}{\partial t} \right)_{r=R} = 3 \frac{V_s}{R} D \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right)_{r=R} \quad (a)$$

donde V es el volumen del líquido, V_s el volumen total ocupado por las partículas y $K_p = K_{eq}$ la constante de equilibrio entre las concentraciones de la droga en la partícula y el seno del líquido,

$$C = C_0 \quad (b)$$

$$0 \leq r \leq R \quad R = \text{radio de la partícula} \quad (c)$$

$$-D \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right) = 0 \quad \text{cuando } r = 0 \quad (d)$$

Para determinar el valor de K_p se plantea un balance de materia y una relación de equilibrio entre concentraciones (Eq. 2 y 3) donde C_0 es la concentración inicial de droga en la partícula sólida, $C_{\infty \text{solido}}$ es la concentración final de la droga en la partícula sólida, $C_{\infty \text{liquido}}$ es la concentración final de la droga en el volumen de liberación, V_{liquido} es el volumen total del medio de liberación y V_{solido} el volumen que ocupa la masa de micropartículas:

$$C_0 V_{\text{solido}} = C_{\infty \text{solido}} V_{\text{solido}} + C_{\infty \text{liquido}} V_{\text{liquido}} \quad (2)$$

$$C_{\infty \text{solido}} = K_{eq} C_{\infty \text{liquido}} \quad (3)$$

Si definimos como α al siguiente cociente:

$$\alpha = \frac{V_{\text{liquido}}}{K_{eq} V_{\text{solido}}} \quad (4)$$

y se reemplazan las concentraciones por el cociente entre masas y sus correspondientes volúmenes se llega a la siguiente expresión:

$$\frac{M_{\infty \text{liquido}}}{M_{0 \text{solido}}} = \frac{1}{1 + \frac{1}{\alpha}} \quad (5)$$

Teniendo en cuenta que el cociente de volúmenes $V_{\text{liquido}}/V_{\text{solido}}$ toma un valor de 8,88 para nuestro sistema, la expresión para α será:

$$\alpha = \frac{8,88}{K_{eq}} \quad (6)$$

De acuerdo a los datos experimentales para tiempos prolongados el cociente de masas $M_{\infty\text{liquido}} / M_{0\text{solido}}$ alcanza un valor igual a 0,15; en consecuencia, por el reemplazo de la expresión para α (6) en la ecuación (5), se obtiene un valor para la $K_{eq} = 50,26$. De este modo, $\alpha = 0,17$.

Según el modelo de difusión hacia volumen finito de líquido, cuya concentración permanece constante, Crank propone como solución a la ecuación (1) de procesos difusivos la siguiente expresión:

$$\frac{M_{0\text{solido}}}{M_{\infty\text{liquido}}} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(\alpha+1)e^{-Dq_n^2t/R^2}}{9+9\alpha+q_n^2\alpha^2} \quad (7)$$

donde, t es el tiempo de liberación y los q_n son las raíces no nulas positivas de:

$$\tan q_n = \frac{3q_n}{3 + \alpha q_n^2} \quad (8)$$

Para obtener los valores del tiempo adimensional a partir de los datos experimentales del cociente $\frac{M_{0\text{solido}}}{M_{\infty\text{liquido}}}$ para el sistema de Dox-PEC 55 fue necesario interpolar entre las curvas

de 30 % y 0 % (Graficas de liberación teórica según el modelo de Crank para un proceso difusivo –ver materiales y métodos), dado que la proporción de masa liberada a tiempo infinito en nuestro caso es de 15 %. Una vez recolectados de esta manera los tiempos adimensionales correspondientes a cada valor experimental de cociente $\frac{M_{0\text{solido}}}{M_{\infty\text{liquido}}}$ y, por consecuencia, igual

numero de valores de coeficientes de difusión (D), se procedió a hacer un promedio de los valores para D hallados. De ésta manera, $D = 9,9633 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Una vez hallado el coeficiente de difusión promedio, para cada tiempo experimental se podrá calcular un tiempo adimensional, que para la curva a 15 % de Crank se corresponderá con un valor teórico del cociente $\frac{M_{0\text{solido}}}{M_{\infty\text{liquido}}}$.

Estos valores dieron origen a la curva teórica de liberación de Dox desde la matriz de PEC 55 en buffer MOPS (pH=7,4) a 25 °C (Figura 9).

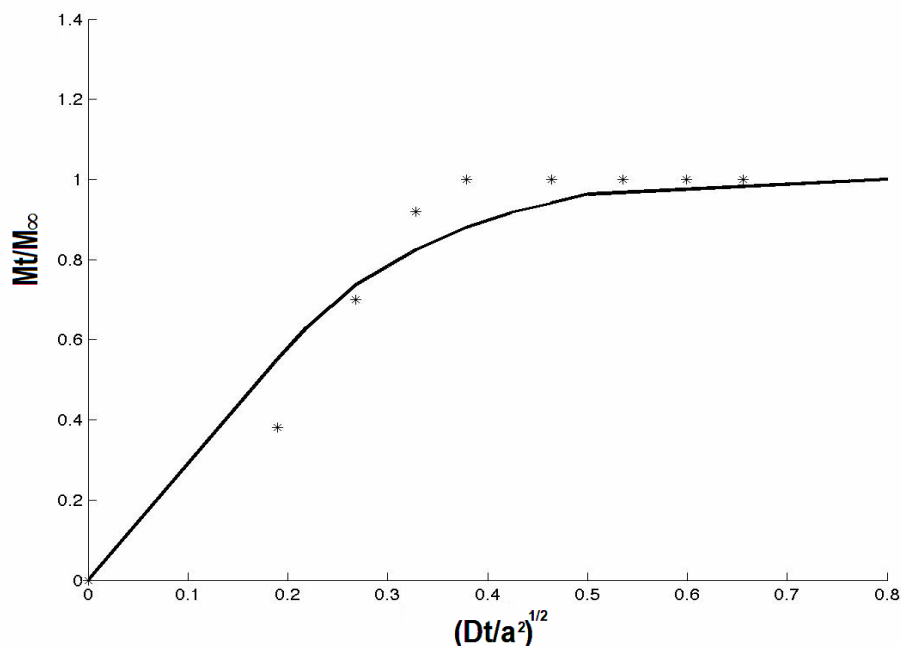


Figura 9: Curva teórica (-) según el modelo matemático de difusión desde una matriz sólida hacia un volumen finito de líquido agitado cuya concentración no cambia y curva experimental (*) para la liberación de Dox desde una matriz de PEC 55 en buffer MOPS (pH=7,4) a 25C.

Como puede observarse el modelo teórico basado en la solución analítica de las ecuaciones a derivadas parciales planteadas en la Eq. (1) utilizando coordenadas esféricas permitió predecir la masa de droga liberada al medio en función del tiempo mediante la Eq. (7). El gráfico 9 muestra que existe una buena correlación entre los valores predecidos por el modelo y los valores obtenidos experimentalmente. Asimismo, mediante la aplicación del modelo se pudo determinar el coeficiente de difusión de Dox en medio líquido. Este valor es un dato clave para modelar otros sistemas o estudiar el mecanismo de liberación de Dox si se sumergen distintas concentraciones iniciales de droga o si se cambia la geometría de la matriz esférica a una forma cilíndrica cuales serían los tiempos de liberación, etc. La ventaja de utilizar modelos de predicción (previamente validados) permite reducir la cantidad de experimentos o ensayos a realizar en laboratorio. Este modelo se ha aplicado a un gran número de sistemas. [Peppas y cols., 2010] Así, el modelamiento permitiría determinar de una manera sistemática la concentración de Dox a emplear para los diferentes tipos de tratamientos oncológicos.

Estudios de almacenamiento

La liberación de Dox a partir de las esferas de hidrogel de PEC 55 almacenadas por un año a 5 °C fue de un 11 % a las 3 horas de incubación bajo las mismas condiciones experimentales que fueron ensayadas previamente. Este resultado indica la presencia de una estructura dinámica en la matriz, y el efecto positivo del proceso de maduración del gel.

Ensayos de liberación en condiciones simuladas

Debido a que PEC 55 fue la seleccionada como posible matriz para un transporte de Dox por vía oral se realizaron estudios de liberación bajo las condiciones simuladas del sistema gastro-intestinal para la PEC 35 y PEC 55, debido a que el cambio en las condiciones ambientales de liberación podría afectar a estos biopolímeros de manera diferente. De esta manera, se compraron los comportamientos de ambas matrices en el proceso de liberación frente a un medio de simulación a pH estomacal (buffer Clark & Lubs pH=2,0) durante 150

minutos (Figura. 10), seguido de un medio alcalino para simulación de la porción intestinal del sistema digestivo (buffer fosfato pH= 7,4). En estas condiciones se observó para la PEC 55 a la hora, una liberación total máxima de aproximadamente un 33% de la carga inicial. (Figura 11)

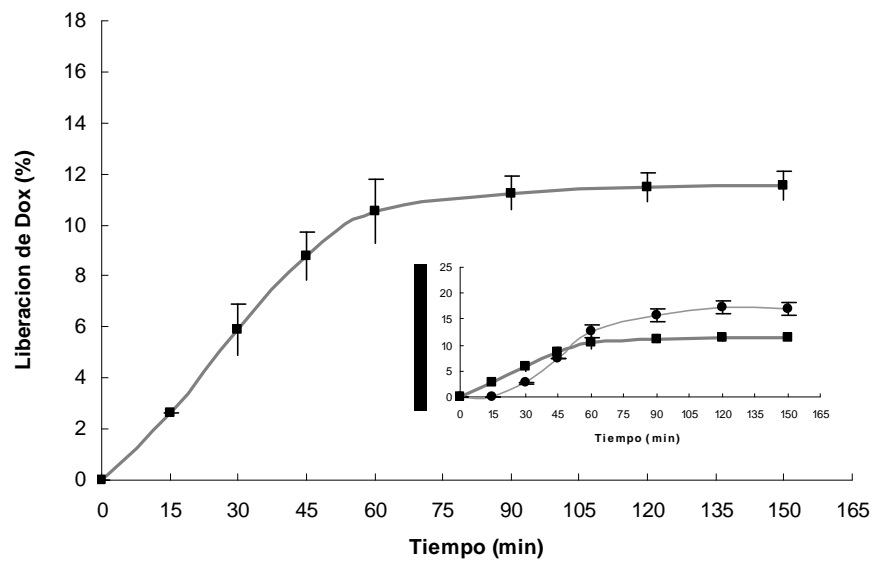


Figura 10: Perfil de liberación a 37 C en Buffer Clark & Lubs (pH=2,0) Dox desde una matriz compuesta por PEC 35 (●) y PEC 55 (■).

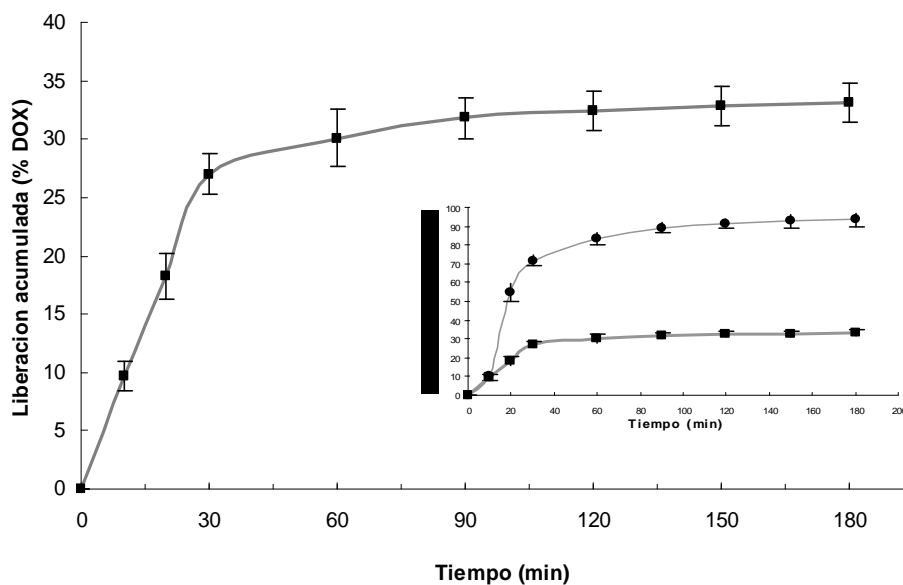


Figura 11: Perfil de liberación a 37 C en Buffer Fosfato (pH=7,4) para Dox desde una matriz compuesta por PEC 35 (●) y PEC 55 (■).

Por lo tanto, se confirma la selección de la PEC 55 como posible matriz, debido a sus propiedades de conservar bajo las condiciones gastrointestinales simuladas, un porcentaje de carga de la droga apreciable y presentar una liberación controlada de Dox para el tratamiento de tumores sólidos de colon.

CONCLUSIONES

Los estudios de selección de biopolímeros en presencia de Dox permitieron establecer que las carrageninas, las pectinas y el alginato poseen mayor interacción con la droga modelo. De acuerdo a los resultados obtenidos fueron seleccionadas las pectinas como las posibles matrices transportadoras, las cuales presentaron de acuerdo a su grado de esterificación una correlación inversa a sus capacidades de gelificar en presencia de Ca^{+2} . Este resultado acotó el estudio a las de bajo y medio grado de metoxilación: PEC 33, 35 y 55 respectivamente. Debido a las propiedades de resistencia mecánica que presentaron las partículas maduras y a los ensayos cinéticos fue descartada la PEC 33. A su vez, las PEC 35 y PEC 55 presentaron un alto grado de encapsulamiento e inversamente proporcional a su grado de metoxilación. Por otro lado, la liberación de Dox encapsulada en una matriz de PEC 35 fue 5 veces más rápida comparada con la liberación producida desde la matriz de PEC 55, lo que sugiere que el efecto de la esterificación de los grupos carboxilo afecta la liberación de drogas que poseen grupos hidrofóbicos con capacidad de interactuar con otras moléculas. Los estudios de espectroscopía de IR permitieron establecer algunas de las interacciones más intensas a nivel molecular entre la droga y la matriz las cuales correspondieron a los grupos carbonilo y a los anillos aromáticos de la Dox probablemente con las zonas hidrofóbicas de la pectina.

Por otro lado, la interacción hidrofóbica entre la PEC 55 y la Dox debiera ser mayor si se considera que posee un 20 % más de grupos metoxilo respecto de la PEC 35. Pero el grado de esterificación podría estar impactando negativamente sobre la estructura de las partículas producidas por gelación ionotrópica, reduciendo la estabilidad del gel. En nuestro caso no se observaron diferencias entre ambos tipos de partículas en cuanto a la estabilidad del gel formado en el tiempo de experimentación. Sin embargo, debería considerarse una solución de compromiso entre la gelación ionotrópica (concentración de iones Ca^{+2}) y el grado de esterificación de las pectinas para poder obtener microesferas con mayores capacidades de carga y a la vez una buena estabilidad. La PEC 55 ha presentado un 66 % de encapsulación de Dox y una excelente estabilidad luego de un año de almacenamiento.

Los estudios reológicos del complejo de PEC 55-Dox permitieron establecer la existencia de interacciones matriz-Dox, así como el comportamiento del fluido del sistema. Estas interacciones matriz-Dox fueron confirmadas por los estudios espectroscópicos determinándose la mayor intensidad. Las informaciones obtenidas sobre el sistema son relevantes para comprender y predecir el comportamiento del mismo (Dox / matriz transportadora), y relacionarlo al comportamiento de la formulación bajo condiciones fisiológicas. A su vez los estudios de modelamiento matemático podrían permitir el desarrollo de sistemas de liberación controlada de Dox adecuada al tipo de tumor y a su localización.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los biogeles formados por PEC 55 serían excelentes candidatos para un desarrollo de encapsulación de Dox en una matriz de hidrogel. Se propone su utilización en sistemas híbridos (matrices bio-inorgánicas que confieran mayor rigidez y homogeneidad de morfologías y tamaños y porosidad nanoestructurada) para el desarrollo de sistemas nano-microparticulados que permitan desarrollar transportadores para la carga y liberación de Dox en búsqueda de mejorar su vehiculización en sistemas *in vivo*.

REFERENCIAS

- Bockki, M., Jongbin, L., Sanghoon K., Kwang-Geun, L., SungHo, L., & Suyong, L., (2011). Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. *Bioresource Technology*, 102, 3855-3860.
- Bouhadir Kamal H., Alsberg Eben, Mooney David J. (2001) Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents. *Biomaterials*, Volume 22, Issue 19, 1 Pages 2625-2633
- Crank J., 1975. *The Mathematics of Diffusion*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford.
- Dimitrios Missirlis y cols.. Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences* 29 (2006) 120-129
- Fraeye, I., Doungla, E., Duvetter, T., Moldenaers, P., Van Loey, A., & Hendrickx, M., (2009). Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin-calcium gels. *Food Hydrocolloids*, 23, 2069-2077.
- Grassi Mario, Lamberti Gaetano, Cascone Sara, Grassi Gabriele. (2011) Mathematical modeling of simultaneous drug release and in vivo absorption *International Journal of Pharmaceutics*, Vol 418, Issue 1, Pages 130-141
- Husain N., Agbaria R.A., Warner I.M. (1993). Spectroscopic analysis of the binding of doxorubicin to human α -1 acid glycoprotein. *Journal of Physical Chemistry*, 97, 10857-10861.
- Jianing Qi, Ping Yao, Fen He, Chuliang Yu, Chong Huang (2010) Nanoparticles with dextran/chitosan shell and BSA/chitosan core-Doxorubicine loading and delivery *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 393, Issues 1-2, Pages 177-185
- Karukstisu K.K., Thompson E.H.Z., Whiles J.A., Rosenfeld R.J. (1998). Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophysical Chemistry* 73, 249-263.
- Kayal S., & Ramanujan R.V. (2010) Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, 30, 484-490.
- L.L. Lao, S.S. Venkatraman, N. A. Peppas (2008) *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol 70, Issue 3, November, Pages 796-803. Modelin of drug release from biodegradable polymer blends.
- Nielsen O.S., Reichardt P., Christensen T.B., Pink D., Daugaard S., Hermans C., Marreault, van Glabbe M., & Blaye J., Phase I. (2006) European Organisation for Research and Treatment of Cancer study determining safety of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in combination with ifosfamide in previously untreated adult patients with advanced or metastatic soft tissue sarcomas. *European Journal of Cancer*, 42, 2303 - 2309.
- Peng C., Zhao Q., & Gao C. (2010) Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO₃ and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO₃ microparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 353, 132-139.
- Plaschka, I. G., Braudo, E. E., & Tolstoguzov, V. B. (1978). Circular dichroism studies of pectin solutions. *Carbohydrate Research*, 60, 1-8.
- Polakovic Milan, Gornjeb Tatiana, Greb Ruxandra, Dellacherie Edith. (1999) Lidocaine loaded biodegradable nanospheres II. Modelling of drug release. *Journal of Controlled Release* 60 169-177
- Purcell, J.M., & Fishman, M.L. (1987). Dissociation of dissolved pectins: Fourier - Transform Infrared Spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 159, 185-190.
- Vrignaud S., Anton N., Gayet P., Benoit J.P., & Saulnier P. (2010). Reverse micelle-loaded lipid nanocarriers: A novel drug delivery system for the sustained release of doxorubicin hydrochloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 79, 197-204.
- von Maltzahn G., Park J.H., Lin K.Y., Singh N., Schwöppe C., Mesters R., Berdel W.E., Ruoslahti E., Sailor M.J., & Bhatia S.N. (2011) Nanoparticles that communicate in vivo to amplify tumour targeting. *Nature Materials*, 10, 545-552.

William B. Liechty,¹ David R. Kryscio,¹ Brandon V. Slaughter,² and Nicholas A. Peppas (2010)
Polymers for Drug Delivery Systems. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2.1:149-173
Xiao-Hai Tang y cols. (2010) Synthesis, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of a
novel pectin–adriamycin conjugate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18 1599–1609.

CAPITULO 3

"Síntesis y comportamientos de micropartículas híbridas (MPh) para Doxorubicina"

***Templado con Biopolímeros
Selección del Método de Síntesis
Optimización de las condiciones de Síntesis y Carga
Caracterización Físicoquímica y Biológica***

INTRODUCCION

MATERIALES Y METODOS

- 1.** Preparación de las soluciones reactivo
- 2.** Formulación de micropartículas:
 - 2.1** Cristalización coloidal
 - 2.2** Condiciones experimentales de síntesis con CO₂ SC
- 3.** Caracterización de las micropartículas por técnicas de espectroscopía y microscopía
 - 3.1.** Difracción de Rayos X
 - 3.2.** Microscopía confocal
 - 3.3.** Microscopía Óptica y de fluorescencia
 - 3.4.** Espectroscopía-Microscopía Raman
 - 3.5.** Espectroscopía IR
 - 3. 6.** Microscopía electrónica de barrido
 - 3. 7.** Citometría de Flujo
 - 3.8.** Detección electroquímica de Ca⁺²
- 4.** Incorporación de la droga anticancerígena modelo: Doxorubicina
- 5.** Cinéticas de liberación de los sistemas seleccionados
- 6.** Estudios *in vitro*: citotoxicidad

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

Mejoramiento de Sistemas biopolímero-droga estudiados: Síntesis de micropartículas híbridas (MPh)

INTRODUCCION

La síntesis de materiales híbridos ha recibido especial atención en los últimos tiempos en los campos de la medicina relacionados a la reparación y/o reemplazo de hueso en el uso de las llamadas "cirugías con grado mínimo de invasión" (*MIS*). El carbonato de calcio es uno de los minerales más abundantes en la naturaleza debido a que es un material importante en la estructura en organismos vivos (caparazones de moluscos por ejemplo), el cual se genera por un proceso de biomineralización. El compuesto formado puede presentarse principalmente en seis polimorfismos diferentes, y sus combinaciones. El polimorfismo más atractivo para este sólido en función de sus aplicaciones en biomedicina es el llamado vaterita, red cristalina que presenta ventajas para desarrollar nano- o micro-partículas debido a una mayor homogeneidad en la distribución de tamaño y geometría esférica.

Sin embargo, las técnicas comunes usadas en la industria farmacéutica para encapsular moléculas activas, como el empleo de solvente en métodos de emulsificación, la separación de fases de polímeros, métodos de secado (*e.g.* spray dryer), son no siempre convenientes para formular partículas dentro de las exigencias farmacológicas [Qun Zhang y cols., 2010] como ser la estabilidad de las moléculas activas, la producción y la eficacia del fármaco en la encapsulación, la reproducibilidad de la calidad de las microesferas y del perfil de liberación de la droga, y/o el bajo el nivel residual de solvente orgánico en las micropartículas impuesto por regulaciones de las Farmacopeas.

La búsqueda de nuevos métodos de encapsulación que ofrezcan un elevado rendimiento de carga, que no utilicen solventes orgánicos y por sobre todo que no afecten la estructura de las sustancias activas, han motivado el desarrollo de métodos alternativos, como el uso de dióxido de carbono comprimido como solvente mediante la técnica de fluidos supercríticos. Debido a que el dióxido de carbono es atóxico, no inflamable, abundante, reciclable, ecológico y posee capacidad de solvente cuando está cerca de su punto crítico ($T_c=31.1$ °C. y la $P_c=73.8$ bars), hacen del CO₂ comprimido un solvente atractivo que ofrece una alternativa "verde" a los solventes tradicionales orgánicos empleados en muchos procesos como la extracción [Martos C. y cols., 2010], separación [Puppi D. y cols., 2010], fraccionamiento [Tewes y cols., 2005], medios de reacción [Caiyu Peng y cols., 2010], o fase para microemulsiones de emulsiones [Candi y cols., 2007].

Teniendo en cuenta las ventajas de la utilización de biopolímeros naturales para el transporte de drogas, se intentará desarrollar micropartículas híbridas (MPh) mediante síntesis química y en condiciones supercríticas [Boury y cols., 2004]. Las MPh se desarrollaran a base de CaCO₃ como fuente inorgánica y se recurrirá a los biopolímeros como templado. Los

biopolímeros a emplear serán aquellos que hayan presentado buenas características de interacción a Dox y puedan adaptarse a los procesos de síntesis.

Se compararán las técnicas de síntesis química y supercríticas, y se intentará optimizarlos mediante el estudio de diferentes variables como el análisis del tipo de red de cristalización para cada sistema, buscando sea la vaterita la que se presente en mayor porcentaje, para asegurar la homogeneidad en cuanto a tamaño, morfología y distribución del biopolímero en la partícula.

MATERIALES Y METODOS

Las MPH porosas formadas por CaCO_3 y diferentes biopolímeros conteniendo a Dox como droga modelo fueron sintetizadas mediante el empleo de compuestos CaCl_2 , Glicina, NaCl , Na_2CO_3 , ácido hialurónico (Sigma-Aldrich), Lambda-Carragenina, pectinas de diferentes grados de metoxilación: 74%, 55% y 33%, Kapa y Iota-Carrageninas. Todas las soluciones fueron realizadas con agua miliQ.

Formulación de micropartículas: Cristalización coloidal

La síntesis de microesferas fue llevada a cabo en tubos de ensayo de vidrio. Una solución acuosa de CaCl_2 (3,2 %, p/v) contenido en un buffer Glicina- NaCl (1,25M, $\text{pH}=10,0$) fue preparada y congelada hasta su utilización. El pH de la solución fue ajustado al valor asignado con un pH -metro empleando soluciones concentradas de NaOH o HCl . Las soluciones de Na_2CO_3 (3,2 %, p/v) fueron preparadas en agua y utilizadas inmediatamente.

En un experimento típico, 9,0 ml de una solución de Na_2CO_3 fueron mezclados con 2,0 ml de una solución de biopolímero (1,0 %, p/v) bajo agitación magnética durante un minuto en un baño de hielo. Luego, 9,0 ml de una solución de CaCl_2 (3,2 %, p/v) en buffer Glicina ($\text{pH}=10,0$) fueron agregados y mezclados bajo alta velocidad de agitación (1.000 rpm) durante 5 min a 0 °C (baño de hielo). Las concentraciones iniciales de cada especie en la mezcla de reacción fueron las siguientes: 1,6 % (p/v) para los iones inorgánicos (Ca^{2+} y CO_3^{2-}) y 0,1 % (p/v) para cada biopolímero. Cada producto precipitado de CaCO_3 – biopolímero fue colectado y centrifugado en frascos plásticos cónicos de 50 mL (luego de completar el volumen de reacción a 30,0 ml antes de cada centrifugación), y lavados con agua miliQ.

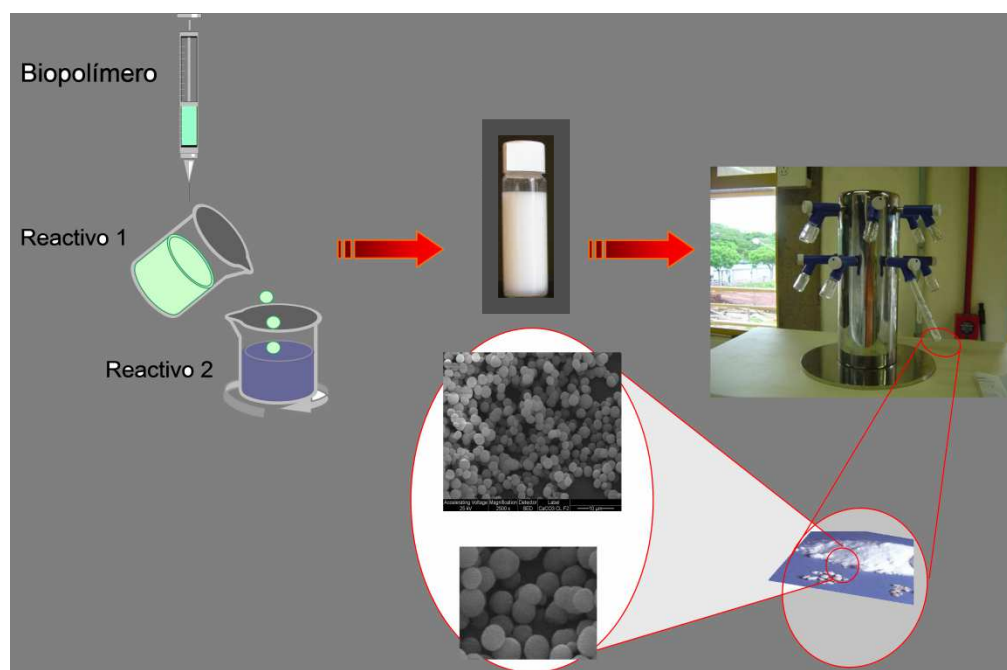


Figura 1: Esquema de síntesis de partículas híbridas vía química. Biopolímeros utilizados: carragenina *K*, *L*, *I* y pectinas 33, 74 y 55 %. Reactivo 1: Na_2CO_3 (3,2 %, p/v), reactivo 2: CaCl_2 (3,2 %, p/v).

Formulación de micropartículas: síntesis en condiciones supercríticas

Para la preparación de MP de carbonato de calcio a partir de una solución de CaCl_2 y CO_2 en condiciones supercríticas (síntesis en condiciones SC) se utilizó glicina para preparación de buffers (PM 75,06 g/mol, Sigma); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM 147,01 g/mol, Sigma); ácido hialurónico (HA, PM 776,65 g/mol, Fluka-Sigma); carragenina lambda, pectinas de diferentes grados de metoxilación: 74 %, 55 % y 33 % y Doxorubicina (Dox, Sigma–Aldrich) y carrageninas *Kapa* y *Iota* (compuestos Satiagel). Todas las soluciones fueron realizadas con agua miliQ.

Preparación de las soluciones reactivo

Buffer glicina (62,5 mM): se mezclaron 62.5 ml de solución de glicina 1 M (preparada a partir de 7.5 g glicina y 5.84 g NaCl en 100 ml de agua MiliQ) con 37,5 ml de solución de NaOH 1,0 N (preparada a partir de 4,0 g NaOH en 100 ml de agua MiliQ). Se ajustó el pH con NaOH (2,0 N) o HCl (6,0 N) a pH 10.

La solución de CaCl_2 : se disolvió 1,6 g de CaCl_2 en 100 ml de buffer glicina 62,5 mM a pH=10, para llegar a una solución 1,6 % (p/v) de CaCl_2 . Se adicionó 0,1 g el ácido hialurónico (solución de 0,1 % de HA, p/v) y se agitó hasta disolución completa durante 2 horas aproximadamente.

Las soluciones de cada biopolímero se prepararon en una concentración de 0,1 % (p/v) en solución de CaCl_2 en buffer glicina-NaCl a 35 °C, y luego se filtraron con membranas de 0,45 μm para ser usadas inmediatamente.

Condiciones experimentales de síntesis con CO_2 supercrítico

Las síntesis fueron llevadas a cabo en una planta piloto (Figura 2) para reacciones con CO_2 en condiciones supercríticas diseñada por la empresa SEPAREX[®] (FIGURA 3) instalada en la Unidad 646 del INSERM (Instituto de Investigación Ingeniería de Vectorización de Partículas, Angers, Francia) [Boury y cols., Patente 424489, 2004] Las condiciones experimentales seleccionadas para el desarrollo de MPh fueron las mismas que para el método de síntesis química.

Se procedió a una síntesis *in situ* de las MPh de las micropartículas porosas de CaCO_3 en condiciones supercríticas. En estas condiciones experimentales, la formación de partículas se genera por la presencia de una emulsión de agua en dióxido de carbono con CO_2 en sus condiciones supercríticas [Beuvier y cols., 2011]

En un experimento típico, 25.0 ml de solución de cada biopolímero (0,1 %, p/v) en presencia de CaCl_2 y buffer glicina-NaCl son inyectados (10,0 ml/min) con una bomba de alta velocidad HPLC en un autoclave a 40 °C y 200 Bar, condiciones por encima del punto crítico del CO_2 . La reacción es llevada a cabo durante 5 minutos con una elevada agitación mecánica (1.200 rpm). Al finalizar la síntesis, las MPh son recogidas por despresurización del CO_2 excedente. El sólido recuperado es concentrado por centrifugación en tubos plásticos cónicos de 50 ml (tipo Falcón, completando con agua a 30 ml antes de cada centrifugación), y posteriormente lavados con agua de miliQ. A continuación, las muestras son congeladas con N_2 líquido hasta su liofilización. Las muestras se almacenan en un desecador al vacío hasta su caracterización.

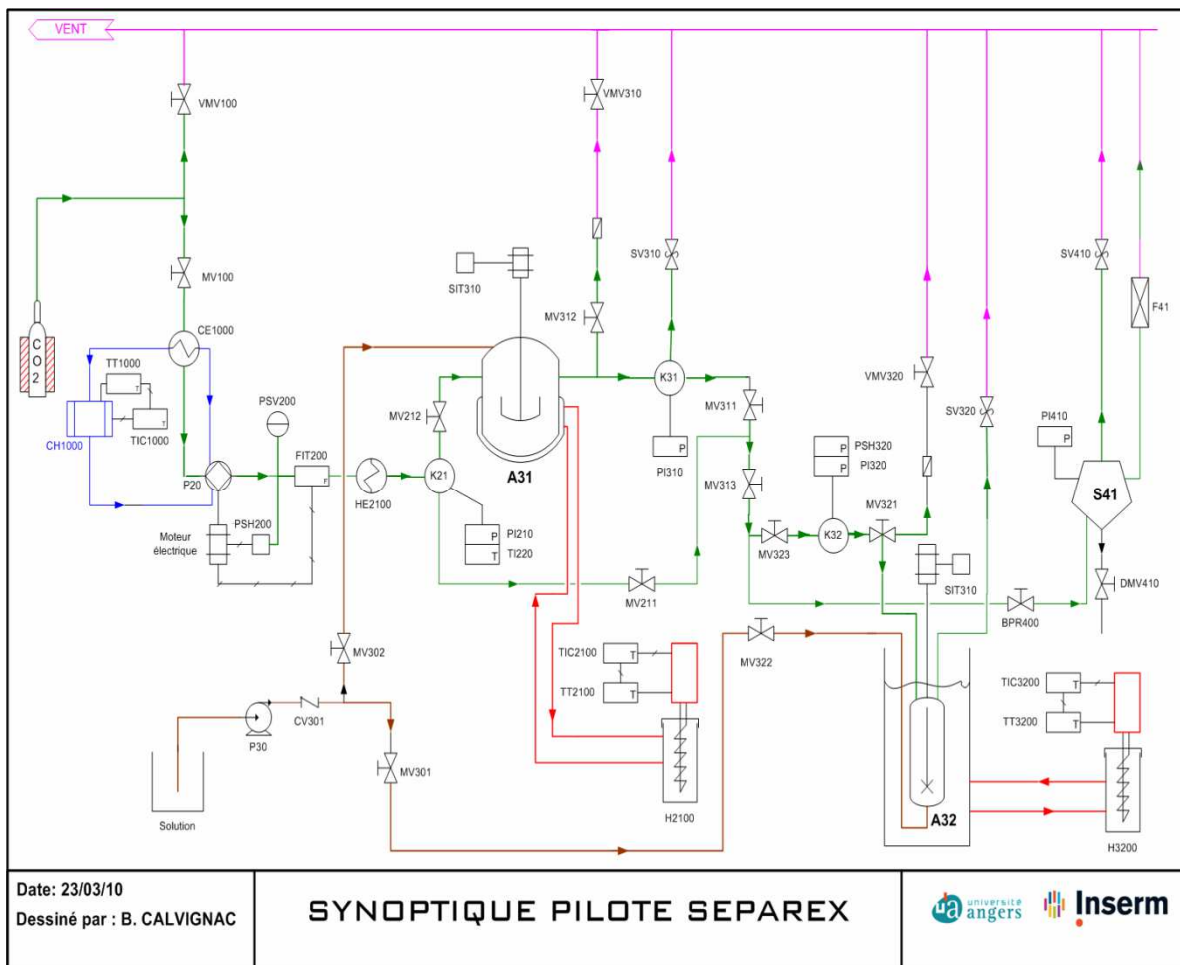


Figura 2: Planta piloto SEPAREX®. Imagen superior: Fotografía de la Planta piloto montada en los Laboratorios del INSERM, U646, utilizada para la síntesis de las MP y MPH realizadas en este trabajo de tesis. Imagen inferior: Esquema de la planta piloto SEPAREX®: sistema de autoclaves en paralelo y cañerías de alimentación de CO₂ termostatzado para la síntesis de MP de CaCO₃ en condiciones supercríticas. Nótese que se ha adosado un sistema de agitación monitoreado (ST) y una bomba de inyección de alta presión (tipo HPLC) a las autoclaves donde se realizaran las síntesis. Nomenclatura de válvulas (MV), autoclaves (A) y baños termostáticos (H).

Marcación fluorescente de los biopolímeros por síntesis química

La síntesis se llevó a cabo por el mediante una reacción con EDAC (N-etil-N9-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) para introducir grupos amino reactivos con el isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para ello, se prepararon soluciones acuosas de cada polisacárido (1,0 % p/v) y se las mezcló con ED (20 YI). A continuación, se agregaron 40,0 mg de EDAC. La mezcla de reacción fue agitada durante 2 horas a temperatura ambiente. Para detener la reacción se constato la finalización de la misma mediante el Test de Ninhidrina [Kaiser y cols., 1970]. Una vez obtenido un resultado positivo la muestra fue dializada contra agua destilada y liofilizada.

El polisacárido fluorescente (20,0 mg) fue disuelto en 5,0 ml de buffer Na₂CO₃ (0.1 M, pH 9,2) y mezclado con 200 ml de una solución de FITC. La solución resultante fue dejada en oscuridad y agitada a 25 °C por 1 hora. El exceso de FTIC fue separado del polisacárido conjugado mediante cromatografía en geles de exclusión (Sephadex G-15, equilibrado con agua miliQ, pH= 7,0). Las fracciones correspondientes al polisacárido fluorescente fueron recogidas y liofilizadas.

Caracterización de las micropartículas por técnicas de espectroscopia y microscopía

Difracción de Rayos X

Los diagramas de DRX se realizaron en un equipo Panatycal – Modo óptico paralelo, hendiduras de ½°, paso de 0,05°, duración de la adquisición de 1 h para cada diagrama y ángulos barridos de 10 a 120° (Facultad de Física de la Universidad de Les Mans, Francia).

Microscopía confocal

Las imágenes de fluorescencia en 2D y 3D se obtuvieron por barrido de los distintos planos focales de las micropartículas híbridas con los diferentes biopolímeros marcados fueron tomadas con un Microscopio confocal Zeiss modelo LSM 510 (Centro de Investigaciones Biomédicas, UCA, Argentina).

Microscopía óptica y de fluorescencia

Ambos tipos de observaciones se llevaron a cabo con un Microscopio Óptico con fuente de UV adosada y filtros de fluorescencia marca Leica, axial como también haciendo uso del microscopio aportado por la beamline SMIS (Soleil, *French National Synchrotron Facility*, Francia).

Espectroscopia-Microscopía Raman

Los espectros Raman se obtuvieron luego de enfocar la muestra en el lugar deseado con la ayuda de un Microscopio óptico Nikon adosado al equipo de espectroscopia Raman en la región 3500-100 cm⁻¹, empleando el accesorio Raman FRA 106 de un espectrofotómetro FTIR Bruker 66 (Billerica MA, USA). Las medias fueron realizadas con un objetivo X50 LF (a una distancia focal de 12 mm), y una radiación a $\lambda_{\text{Laser}} = 514\text{nm}$ proveniente de un láser de Nd-YAG. Perkin Elmer.

Espectroscopia IR

Los estudios de FTIR fueron realizados en un FTIR Jasco (modelo 670 Japón). Cada compuesto fue molido en mortero y luego mezclado con Bromuro de Potasio de grado FTIR con

la finalidad de hacer una pastilla (KBr) y con una corrección de fondo de 256 cm^{-1} como número de exploración, contra una fuente de cerámica de alta energía y detector DLATGS.

A su vez, se realizaron estudios de IR con resolución espacial sobre las muestras híbridas en el haz de luz SMIS (*Soleil, French National Synchrotron Facility*, Francia).

Microscopia electrónica de barrido

Se empleó un microscopio Philips modelo SEM 505 (Holanda). Las muestras se prepararon con una cobertura delgada de Au por el método de depósito (*sputtering*) en un metalizador Balzers SCD 030 hasta un espesor que oscila entre 150 y 200 Å. Su exploración se llevó a cabo en un voltaje de 25 kV y se registro en forma de imágenes digitales mediante el digitalizador de imagen *Soft Imaging System ADDA II (SIS)*.

Citometría de Flujo

Las suspensiones de partículas con marca fluorescente y sin ella fueron medias en un citómetro FACS Vantage de Beckton Dickinson (Centro de Investigaciones Biomédicas, UCA, Argentina) para obtener perfiles de fluorescencia.

Incorporación de la droga anticancerígena modelo: Doxorubicina

Se ensayaron tres métodos, los cuales fueron realizados por duplicado, a saber:

a- *in situ*: 100 µl de una solución de Dox (4,5 mg/ml) preparada en HCl 1,0 mM y NaCl en concentraciones fisiológicas (154 mM) fueron disueltos homogéneamente en 2,0 ml de solución de cada biopolímero al 1,0 %, p/v. Se dejó en contacto la droga con cada biopolímero por el término de 12 hs a 4°C, luego se utilizó a cada solución para la síntesis de MPh según el protocolo previamente descrito.

b- *por absorción/adsorción*: se prepararon suspensiones 0,1 g/ml de MPh de los distintos tipos de biopolímeros seleccionados. Un volumen de 1,0 ml de cada una de estas soluciones fue mezclado con 1,0 ml de una solución de Dox (dilución 1:2 de la solución 4.5 mg/ml empleada en el método *in situ* con buffer MES o buffer citrato de pH= 6,0. Se dejaron incubando todos los sistemas y sus respectivos blancos durante 12 horas a 4 °C con agitación suave.

c- *por cobertura*: soluciones de cada biopolímero conteniendo Dox (ver método *in situ*) se emplearon para realizar una incubación con las MPh ya preparadas y liofilizadas. Para ello se pesó una cantidad de 100,0 mg de cada muestra y fue suspendida en 1,0 ml de cada solución. Todos los sistemas fueron incubados por 24 hs bajo agitación suave a 4 °C.

Estudios de liberación en medios fisiológicos

Se pesaron 100.0 mg de MPh deshidratadas de cada biopolímero a estudiar (PEC 33 y CAR λ) conteniendo Dox por el método carga seleccionado (método de absorción/adsorción) en una balanza analítica (*Adventurer*, OHAUS) de alta precisión (0,01 mg). Las partículas fueron

colocadas en un minireactor (Reacti-road flask) de 4,0 ml de capacidad con 2,0 ml de solución buffer (PBS, pH= 7,4). La cinética de liberación de Dox se realizó a 37 °C bajo suave agitación (40 rpm). Para intervalos dados, las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 9.500 xg y se extrajeron muestras de 300 µl. El volumen extraído se reemplazó por buffer. La concentración de Dox fue determinada por fluorescencia como fuera descrito previamente.

Estudios in vitro: Citotoxicidad

Cultivos celulares de fibroblastos NIH-3T3 y astrocitos primarios de ratas

Se obtuvieron astrocitos purificados de ratas recién nacidas por el método de disociación dinámica de cultivos de corteza cerebral [McCarthy y cols., 1980]. Las células fueron cultivadas en DMEM como medio de cultivo (Dulbecco modified Eagle medium) suplementado con glucosa y L-glutamine (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) conteniendo suero de fetal bovino al 10 % (FCS) (BioWhittaker) y solución de antibiótico al 1,0 % (Sigma, el Santo-Quentin Fallavier, Francia) bajo atmósfera controlada (5 % de CO₂) a 37 °C. Las células fibroblásticas NIH-3T3 (CRL-1658™) fueron obtenidas de la Colección de Cultivos Americana (Manassas, VA). Se sembraron 5.000 células por celda (400 µl, 1,9 cm²) sobre una caja de 24 celdas y fueron crecidas en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor y antibióticos a 37 °C bajo atmósfera controlada al 5 % en CO₂.

Ensayos de supervivencia celular: MTT

El ensayo se fundamenta en la captación de un colorante atóxico, MTT (bromuro de 3-4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolium tiazol azul), por cultivos celulares conteniendo células viables durante un intervalo de tiempo (4 horas generalmente). El número de células viables es directamente proporcional a la reducción en la concentración de colorante MTT [Jordan y cols., 1992].

El procedimiento desarrollado fue el siguiente: el suero con medio para astrositos en monocapa o células fibroblásticas NIH-3T3 crecidas por 48 hs fue reemplazado por medio conteniendo 50 % de medio DMEM y 50 % de medio Ham F12 con antibióticos, y complemento de N1 (Sigma). A continuación, se adicionó suero deplecionado (controlado durante 24 horas) se expuso por 96 hs a partículas de poliestireno (5 µm, Sigma), MPh de CAR λ ó MPh de PEC 33 en el intervalo de concentraciones de 0 a 150 µg/mL. Después de tres lavados con buffer PBS (pH= 7,4), se procedió a determinar la supervivencia celular (expresada en porcentajes respecto de las células sin tratar) usando el método colorimétrico basado en la detección de MTT previamente descrito (Jordan, 1992). El ensayo fue desarrollado por un lapso de 4 hs; y a continuación se determinó la densidad óptica a 570 nm en función de la concentración del colorante.

Estadísticas

Dos o tres experimentos independientes se realizaron como mínimo por duplicado (N=2) en todos los casos. En el caso de los estudios con cultivos celulares, los experimentos independientes fueron llevados a cabo por sextuplicado (N=6) para cada caso. Los datos de estos experimentos fueron analizados usando un Test-t de Student. La significancia estadística de los valores obtenidos experimentalmente fue definida con $p < 0.05$. Los datos mostrados en los gráficos se representaron como promedios con su desviación estándar asociada.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Las micropartículas de CaCO_3 fueron sintetizadas de acuerdo a lo detallado en la Figura 1. La primera caracterización se realizó inmediatamente después de finalizada la síntesis, antes de proceder a su congelamiento con Nitrógeno líquido, mediante microscopía óptica (Figura 3). Las imágenes ponen en evidencia la presencia de un sistema homogéneo en cuanto a morfología y tamaño: se observaron partículas de $5\ \mu\text{m}$ como tamaño promedio y morfología esférica.

A su vez, se realizaron microscopías SEM de las mismas, observándose un sistema que se condice con lo observado en el microscopio óptico.

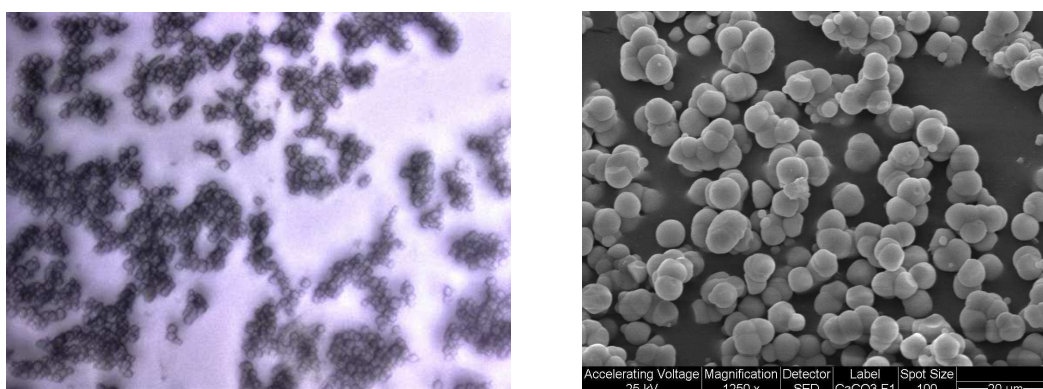


Figura 3: Microscopías de partículas de CaCO_3 : óptica (izq), SEM (der)

Posteriormente, se intentó incluir durante la síntesis de las micropartículas a los biopolímeros que pudieran ser utilizados para el transporte de drogas con un doble objetivo: mejorar la estabilidad del sistema en suspensión, así como permitir el transporte de la droga anticancerígena modelo seleccionada (Dox).

Debido que la Dox poseía una elevada interacción con pectinas y carrageninas (véase Capítulo 2), se optó por usar estos dos tipos de biopolímeros para ensayar la incorporación de los mismos a los sistemas inorgánicos en reemplazo del ácido hialurónico [Boury y cols., Patente 424489, 2004].

Los protocolos de incorporación de estos biopolímeros que se emplearon, fueron modificados respecto de los existentes en la bibliografía [Qun y cols, 2010; Caiyu Peng y cols., 2010; Martos y cols., 2010]. En particular, las pectinas requirieron ser incorporadas en un sistema de reacción a $0\ ^\circ\text{C}$ para favorecer el proceso de entrecruzamiento. En el caso de las carrageninas, sufrían gelación a estas temperaturas, por lo que fue necesario ajustar las variables ambientales: fueron adicionadas a temperatura ambiente a soluciones mantenidas a $4\ ^\circ\text{C}$. El pH de reacción y el sistema buffer utilizado siguen las especificaciones para las condiciones de síntesis con CO_2 supercrítico [Boury y cols., Patente 424489, 2004], no así las concentraciones de biopolímero ni las temperaturas de síntesis.

La microscopía óptica permitió observar la morfología de las partículas sintetizadas en presencia de biopolímeros y discriminar en cuanto a morfología y homogeneidad aquellos polímeros factibles de ser utilizados como templados del proceso de síntesis. Las dimensiones promedio de las partículas fueron de $5\ \mu\text{m}$ dependiendo del biopolímero utilizado.

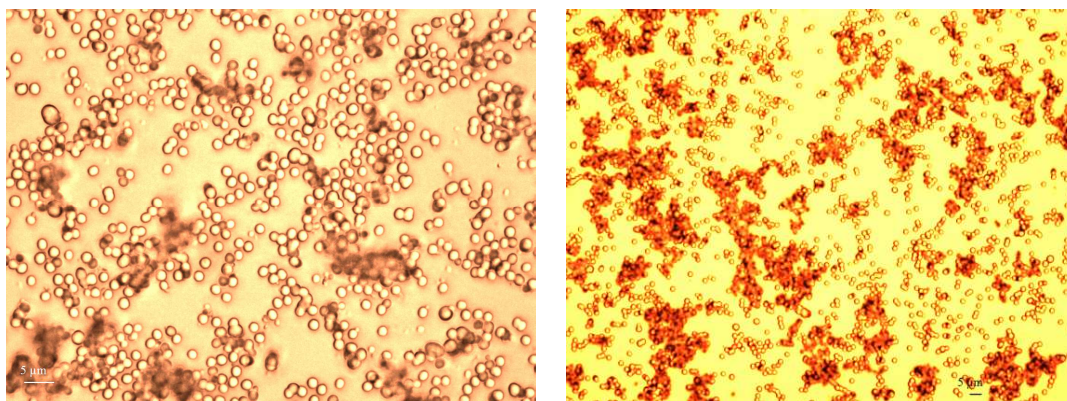


Figura 4: Microscopías ópticas de MPh sintetizadas a partir de PEC (izq.) y CAR (der.).

Luego de realizar la síntesis de las partículas, la presencia de los biopolímeros en las MP fue determinada mediante la derivatización de los biopolímeros con una sonda fluorescente (FTIC). Una vez marcado el biopolímero, se desarrollaron los mismos protocolos de síntesis mencionados con anterioridad. Los estudios de microscopía de fluorescencia revelaron la presencia de los biopolímeros incorporados a las matrices inorgánicas de los sistemas híbridos (Figura 5).

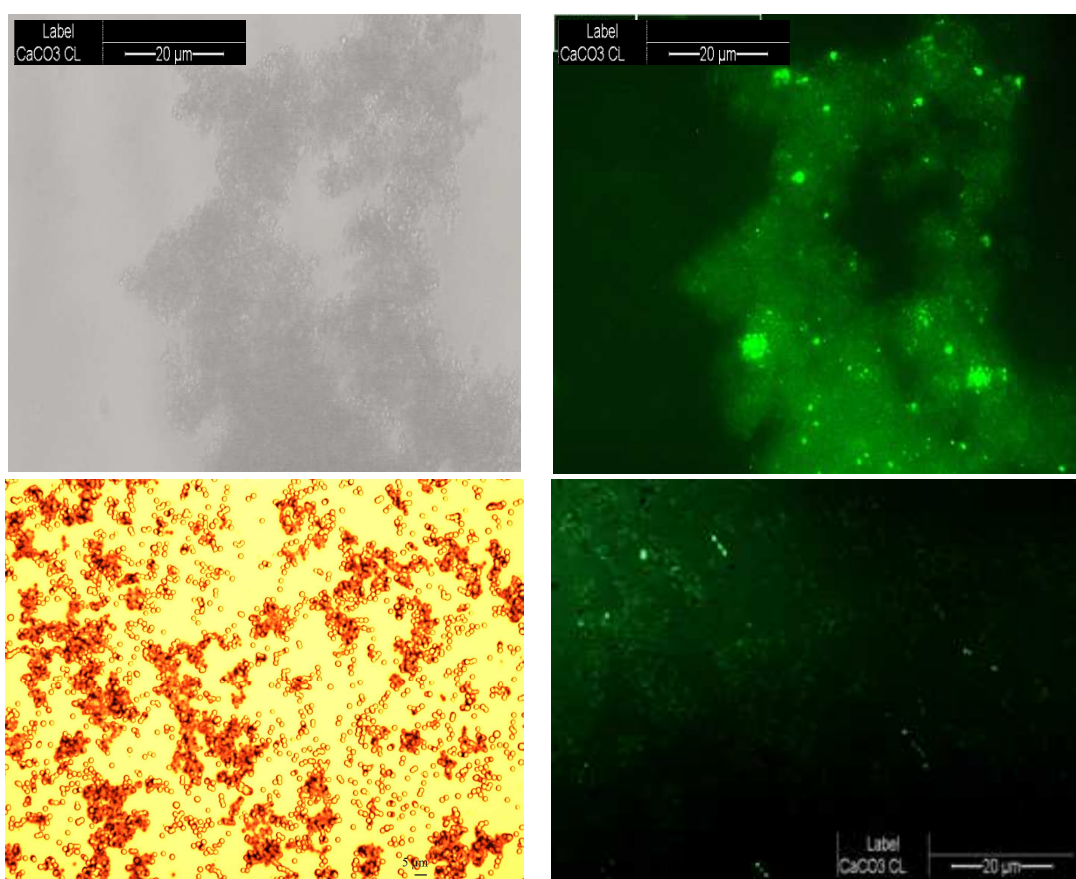


Figura 5: Microscopías ópticas (izq.) y de fluorescencia (der.) de MPh conteniendo CAR L.

A su vez, se realizaron estudios de citometría de flujo para confirmar la presencia de los biopolímeros con marca fluorescente en las MPh. Los resultados obtenidos mediante la microscopía de fluorescencia se validaron por esta técnica al hacerse posible la observación de una marca fluorescente puntual, a diferencia de la anterior.

En los gráficos obtenidos por esta técnica la ventana 1 representa en cada uno de ellos (Figura 6 a.) un grupo de partículas dentro del total de la muestra con mayores tamaños y mas dispersión entre los mismos, mientras que la ventana 2 (Figura 6 b.) se encuentra más cercana a los menores tamaños encontrados y presenta una mayor densidad dentro de un área mucho mas pequeña (baja dispersión entre los tamaños de partículas que allí se encuentran).

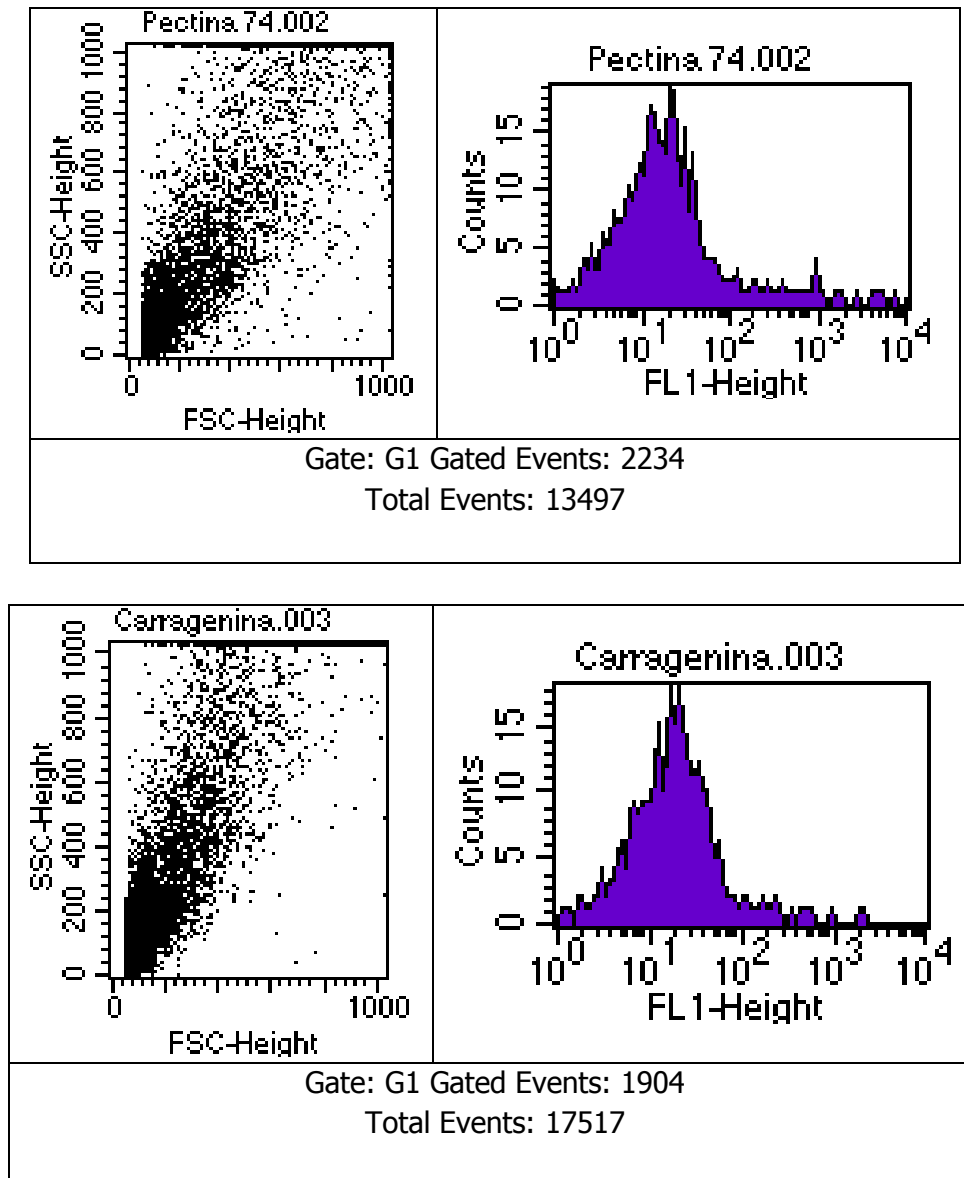


Figura 6 a.: Distribución de tamaños y carga fluorescente (CAR y PEC) para la ventana numero 1 (*Gate 1*) definida como el área comprendida entre 400 a 800 *FSC-Height* y 300 a 900 *SSC-Height*.

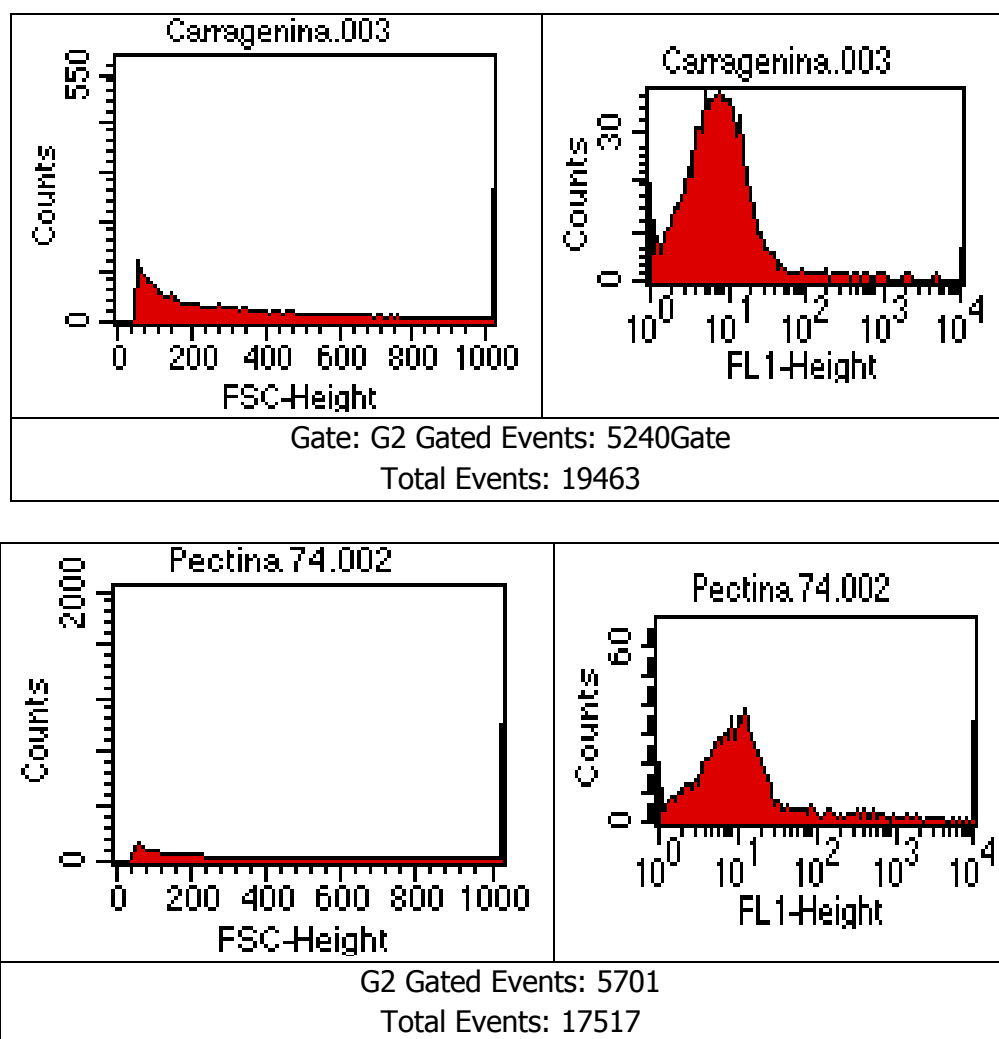


Figura 6 b: Distribución de tamaños y carga fluorescente (CAR y PEC) para la ventana numero 2 (*Gate 2*) definida como el área comprendida entre 100 a 300 *FSC-Height* y 50 a 300 *SSC-Height*.

Como puede observarse en los gráficos 6a y 6b, la presencia de la marca fluorescente se evidencia en todos los sistemas. Los valores de intensidad de fluorescencia y número de cuentas observadas para cada polímero en estas dos regiones, denota el grado de homogeneidad de las muestras; comparativamente se encuentra que la carragenina presenta un menor tamaño, mayor carga fluorescente y menor dispersión.

Para ambos polímeros se puede concluir que los mismos se encuentran formado parte de los sistemas sintetizados propuestos híbridos.

Por otro lado, en el intento de dilucidar la localización de los biopolímeros en las matrices híbridas sintetizadas, se recurrió a la técnica de microscopía confocal. La microscopía confocal permitió discriminar la presencia de biopolímero en la superficie de la MPh mediante la detección de un halo de fluorescencia en sólo en las periferias de las MPh, o bien una esfera con presencia de fluorescencia en su totalidad cuando se tratase de la existencia interna y externa del biopolímero en la matriz.

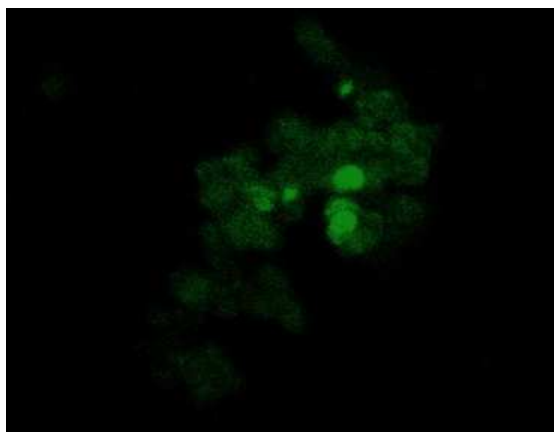


Figura 7: Microscopia Confocal de MPh de carragenina.

Los resultados observados en las imágenes de microscopía confocal, como en las de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia permiten confirmar la presencia interna y superficial de los biopolímeros en las matrices híbridas sintetizadas.

Validada la presencia de los biopolímeros en los sistemas microparticulados, se recurrió a técnicas espectroscópicas para determinar las posibles interacciones de los biopolímeros al incorporarse al sistema híbrido y su interferencia en la cristalización de la matriz inorgánica de CaCO_3 . Para ello, se obtuvieron espectros de FTIR (Figura 8) y Raman (datos no mostrados) para cada biopolímero: seis polímeros estudiados: pectinas (33, 55 y 74 % de grado de metoxilación) y carrageninas (*K*, *I* y *L*) y el ácido hialurónico empleado como biopolímero control [Boury y cols., Patente 424489, 2004].

Los estudios espectroscópicos obtenidos en las MPhs han permitido detectar la presencia de los biopolímeros en los sistemas híbridos, confirmando de esta manera las observaciones de microscopía confocal.

En los estudios espectroscópicos de IR (Figura 8) no se observan grandes variaciones de los modos vibracionales para cada polímero analizado, lo que indicaría que la interacciones entre las estructuras cristalinas de CaCO_3 y los polímeros, de un mismo origen y con similar composición química, son similares en cada uno de ellos.

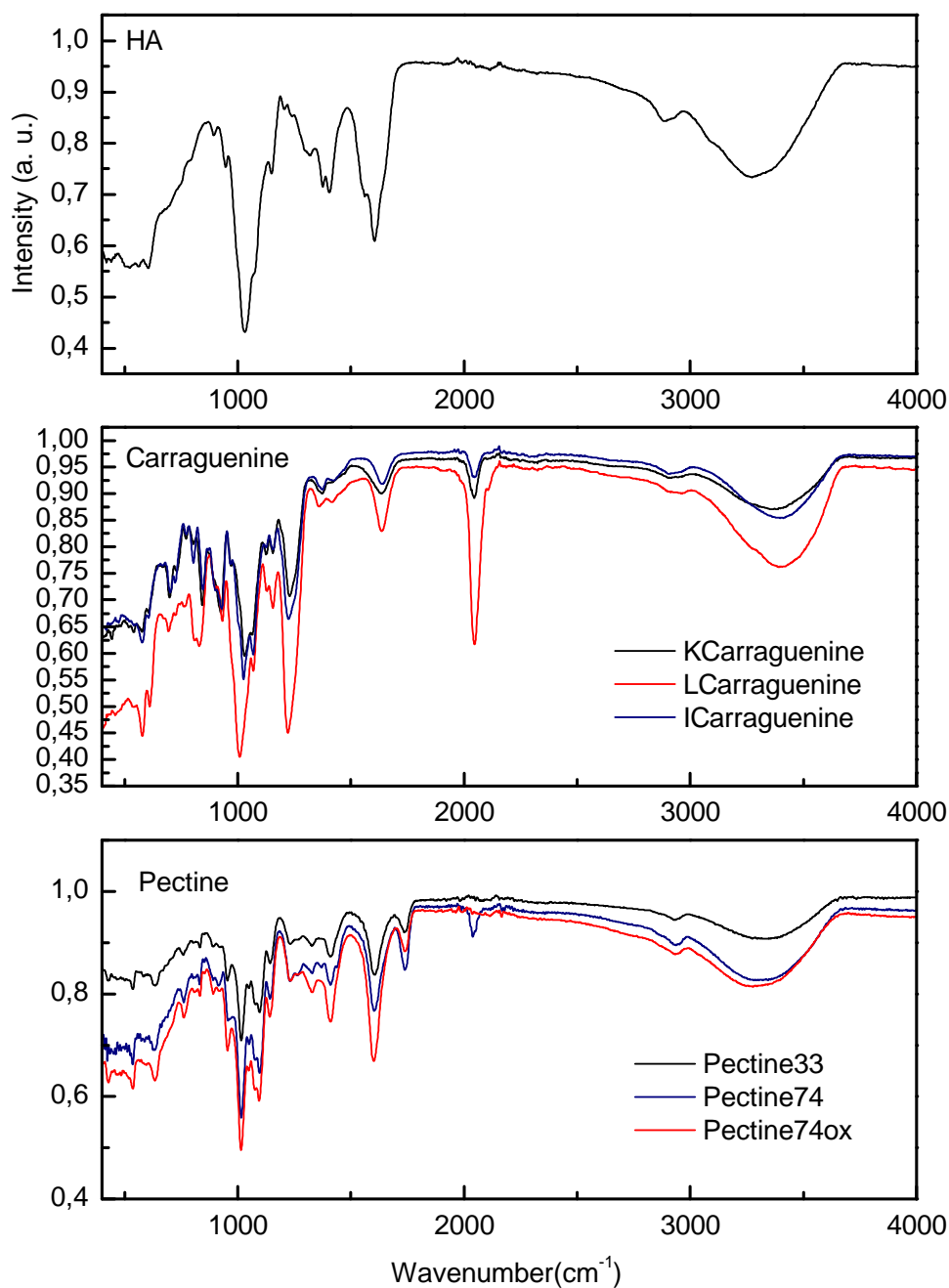


Figura 8: Espectros FTIR para los biopolímeros ensayados: tres tipos diferentes de pectinas, tres tipos diferentes de carrageninas y el polímero control.

Posteriormente, se estudiaron los efectos de los procesos de lavado y secado en la cristalización del CaCO_3 en presencia de diferentes pectinas y diferentes carrageninas por XRD, espectroscopias IR y Raman. Se empleó como biopolímero control al ácido hialurónico según patente Boury y cols., Patente 424489, 2004], (Figuras 9 y 11).

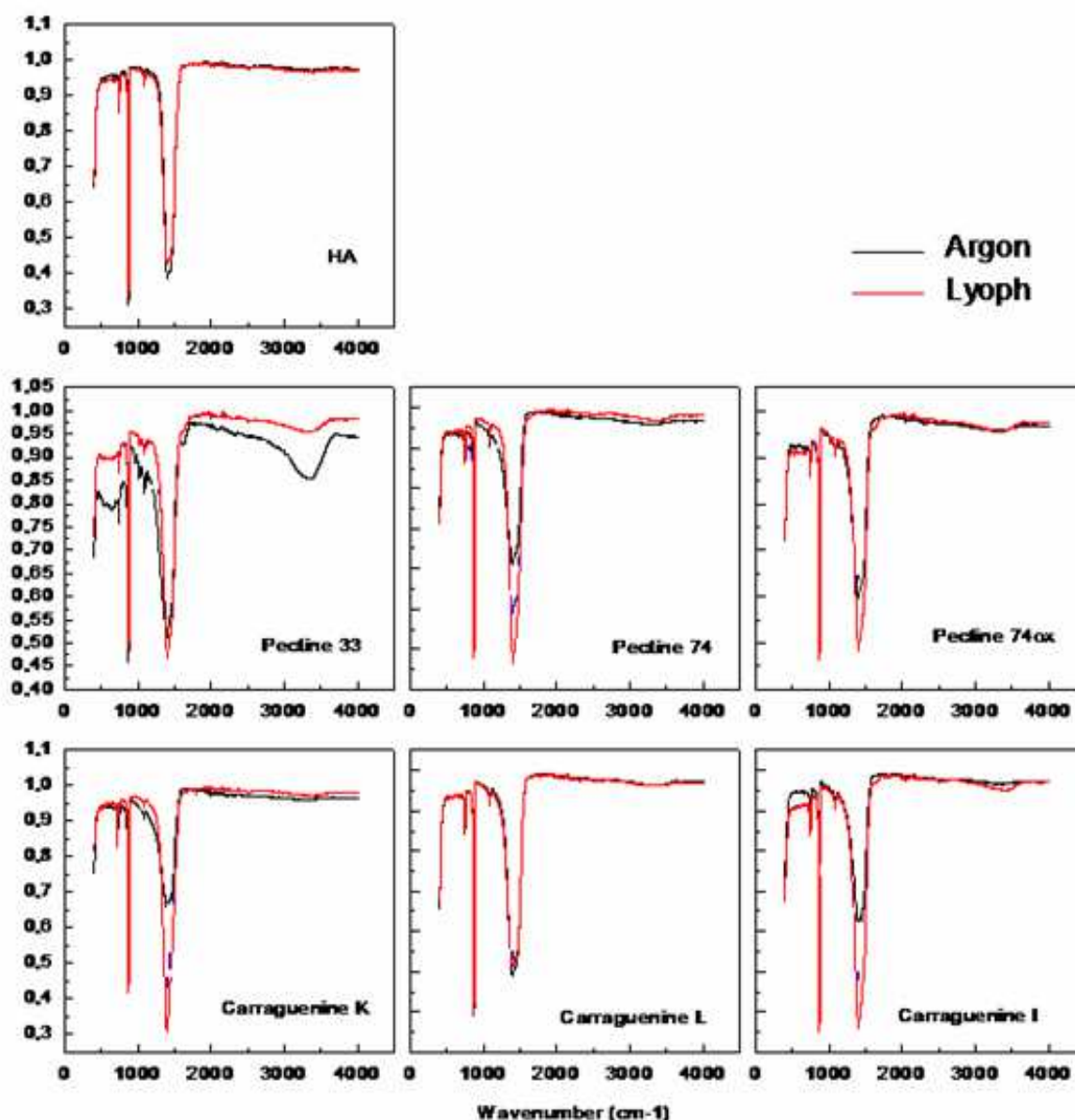


Figura 9: Espectros de FTIR para las MPh compuestas por cada uno de los 6 biopolímeros ensayados y el polímero control. Compararon de los espectros obtenidos luego de aplicar diferentes procesos de secado: corriente de Argón o Liofilización. Aclaración: PEC 74ox=PEC 55

Los espectros de la figura 9 sugieren que no se han producido cambios estructurales mediados por los procesos de secado en ninguno de los biopolímeros ensayados.

Por otro lado, se ensayó la eficiencia de diferentes métodos de secado, donde la liofilización mostró ser el más adecuado.

Los análisis de difracción de rayos X fueron realizados con vaterita por ser la red de cristalina mas estable para el CaCO_3 como control de los sistemas desarrollados (Figura 10). Este tipo de análisis se utilizó para observar el efecto de templado de cada biopolímero siguiendo los procesos de lavado y secado ensayados. Así se obtuvieron distintos porcentajes de vaterita como de calcita.

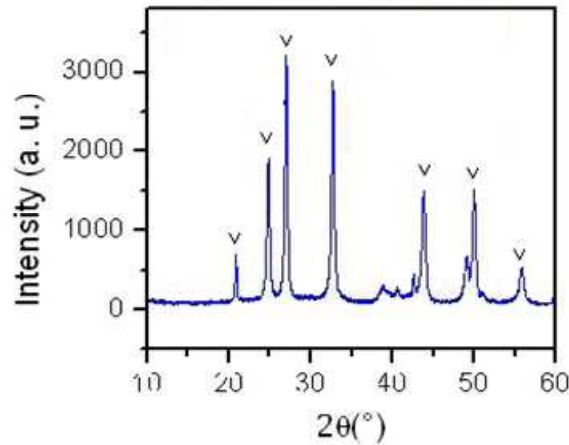


Figura 10: Espectro XDR para el CaCO₃ como vaterita.

En una segunda etapa se realizó el proceso de síntesis mediante el empleo de CO₂ en condiciones supercríticas para los sistemas híbridos. Los gráficos aquí presentados contienen los resultados de la síntesis vía química y la síntesis alternativa por fluidos supercríticos. (Figura 11, 12 y 14)

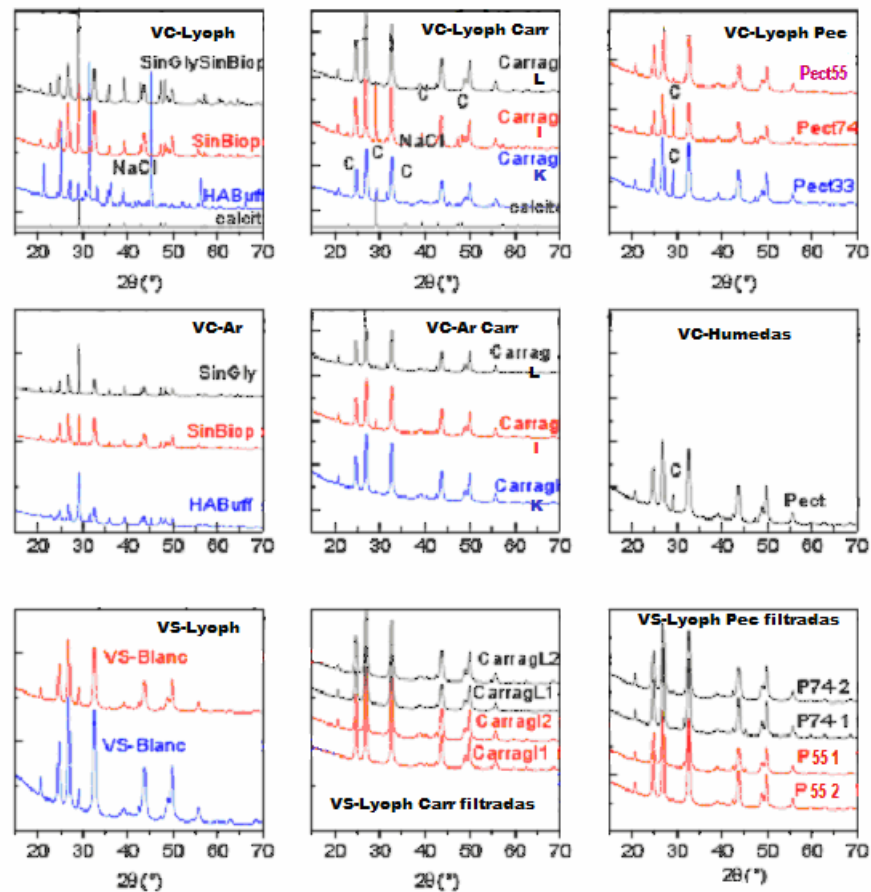


Figura 11: Espectros XRD para las MPH de diferentes biopolímeros y diferentes métodos de secado. Los 6 primeros gráficos corresponden a síntesis vía química (VC) y los tres últimos correspondientes a la vía por fluidos supercríticos (VS) En el primer gráfico (arriba y a la izq. se presentan los controles) Notación: Lyoph: Proceso de secado por liofilización; Ar: proceso de

secado por corriente de Argón. Nótese que para la síntesis por vía supercrítica no se utilizaron PEC ni CAR K. (Redes de cristalización: V=vaterita, C=calcita, A=aragonita)

En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos luego de los análisis espectroscópicos de todos los sistemas estudiados y bajo las diferentes condiciones empleadas durante la síntesis química. Los análisis de XRD muestran una relación aproximada de 70/30 % de vaterita/calcita en ausencia de biopolímeros, y un incremento del porcentaje de vaterita de hasta un 95% para el caso de carrageninas por integración de las bandas a 24,8 °C y 29,3 °C para vaterita y para calcita respectivamente [Dickinson y cols., 2001]

Síntesis Vía Química	Lavado	Buffer	H2O MiliQ	
	Secado	Argón	Argón	Lioph
Pectinas	33		>90 V	
	55	>90 V	>90 V	>90 V
	74		90V/10C	
Carrageninas	K		>90 V	>90 V
	I	>90 C	85V/15C	85V/15C
	λ		50V/50C	>95 V

Tabla 1: Porcentajes de las distintas redes de cristalización halladas para los sistemas estudiados bajo las diferentes condiciones de secado y lavado durante la síntesis química. Abreviaturas: V, vaterita; C, calcita.

Se debe destacar que en ausencia de biopolímeros, el sistema inorgánico sólo alcanza un 71 % de vaterita mientras que el 29 % restante corresponde a calcita. Si se realiza la reacción sin buffer (glicina) y sin biopolímeros se obtiene un 51 % de vaterita y un 49 % de calcita. Por último, en presencia de biopolímeros se alcanzaron porcentajes mayores al 90 %, en particular en el caso de las carrageninas, hasta un 95 % de vaterita y solo un 5 % de calcita. Este resultado es de relevancia debido a que la adición de carrageninas permite alcanzar una cristalización más homogénea, que dará lugar a un sistema de menor dispersión tanto en tamaño como forma y con mayor estabilidad.

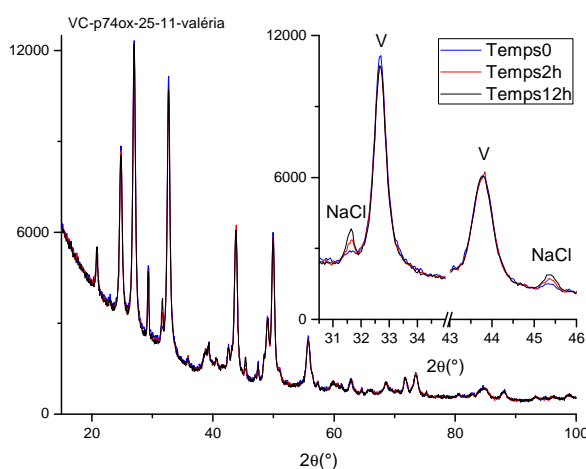


Figura 12: Detalle de un espectro XDR. MPH de PEC y su estabilidad en el tiempo.

En el caso de Pectinas al efectuar el lavado de buffer se encontró la formación de NaCl cristalizado (Figura 12), a consecuencia de la insuficiencia de un lavado con buffer en vez de agua miliQ.

Todos los espectros mostraron similares resultados: las pectinas son las más estables frente a los distintos tipos de métodos de lavado y secado. (Porcentajes de C=calcita y V=vaterita) Sin embargo, frente a métodos de liofilización (previo congelado rápido con N₂ líquido) no se encuentran diferencias significativas en los porcentajes de vaterita hallados.

Para el desarrollo de las MPH bajo condiciones supercríticas, la elección de las mejores condiciones de síntesis y post-tratamiento fue basada en los resultados previamente observados. Por ello, se procedió a utilizar un proceso de doble lavado con agua MiliQ y un secado inmediato con N_{2(l)} y posterior liofilización (Figura 13).

Las espectroscopías Raman y FTIR arrojaron resultados similares a los obtenidos para las partículas híbridas sintetizadas químicamente, lo que confirmó la presencia de los biopolímeros también en estos sistemas (datos no mostrados).

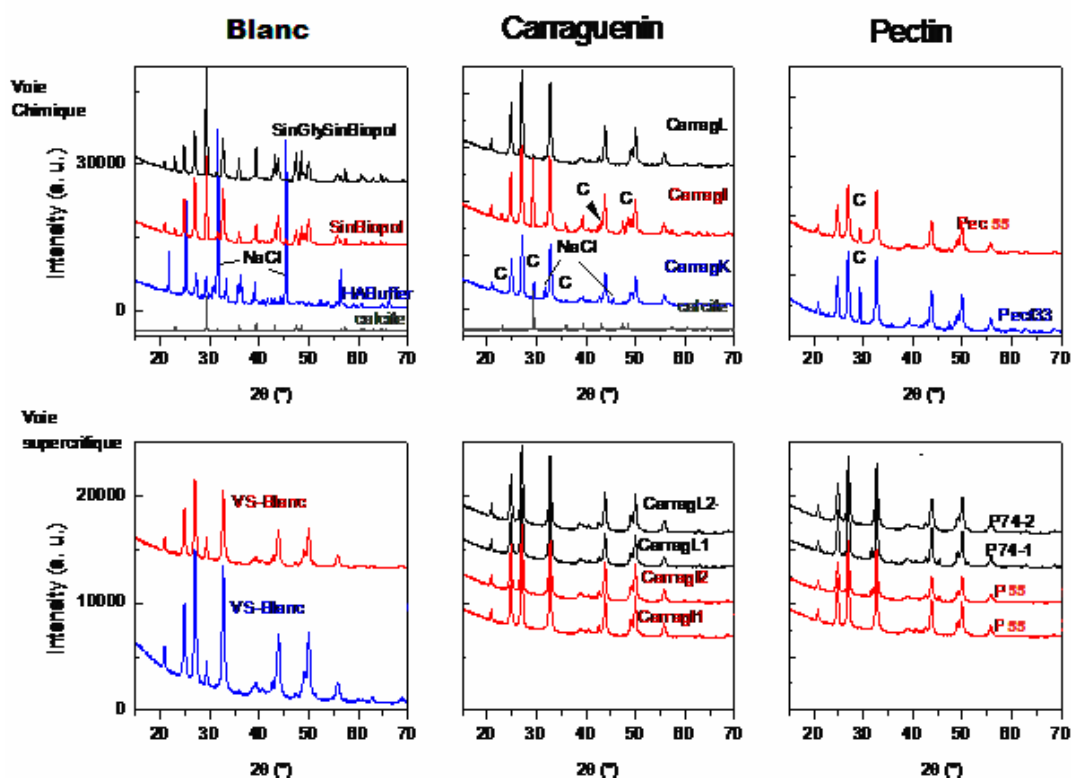


Figura 13: Espectros correspondientes a las mejores condiciones de lavado y secado (agua miliQ y liofilización respectivamente) de procesos de síntesis vía química (gráficos superiores) y vía condiciones SC (gráficos inferiores).

La síntesis condiciones SC con CO₂ sin glicina y sin biopolímero, es decir una solución de NaOH (pH= 10) fue empleada para reemplazar el buffer y determinar la relevancia del buffer separadamente de la presencia del biopolímero. Para este tipo de condiciones se encontró que sin el buffer y sin el biopolímero no se recuperaron MP luego del proceso de síntesis (contrariamente a lo que ocurría en el caso de la síntesis vía química en donde se recuperaban

partículas aunque con alto grado de calcita). Posteriormente, se ensayó la síntesis de MP en ausencia del buffer pero incluyendo al biopolímero, donde se encontró recuperación de partículas pero con bajo porcentaje de vaterita (Figura 11). Como puede observarse en las figuras 11 y 13, los espectros para los sistemas de CAR K y PEC 33 no se incluyeron en la Vía Supercrítica. Esto se debe a que estos polímeros presentan un grado de gelificación mayor al resto de los biopolímeros empleados, lo que representa una restricción a su uso en las síntesis bajo estas nuevas condiciones dado que los mismos presentan una elevada viscosidad al ponerse en contacto con las soluciones de CaCl_2 /buffer Glicina-NaCl.

A su vez, el resto de los sistemas debieron ser filtrados para obtener un sistema de síntesis más homogéneos para obtener condiciones de reacción reproducibles.

Como resultado de las espectroscopias XRD (Figura 13) se puede concluir que las muestras de pectinas como las de carrageninas empleadas para la síntesis de MP en condiciones supercríticas no presentan restos de calcita, siendo vaterita la única forma de cristalización encontrada. Sin embargo, en los blancos de HA se detectó un porcentaje promedio de 93.5 % de vaterita y 6.5 % de calcita. Como se mencionara anteriormente las cuantificaciones fueron realizadas por integración de los picos a $24,8^\circ\text{C}$ para la vaterita y a $29,3^\circ$ para la calcita según fuera descrito previamente [Dinckinson y cols., 2001]

La estabilidad de las MPHs en buffers a pH fisiológico se consideró dependiente de la concentración de ion Ca^{+2} en solución, cuya concentración fue determinada mediante el empleo de un electrodo ión-selectivo para Ca^{+2} . En todos los casos las MPH ensayadas mostraron gran estabilidad en soluciones buffer a pH fisiológico (Figuras 14 y 15).

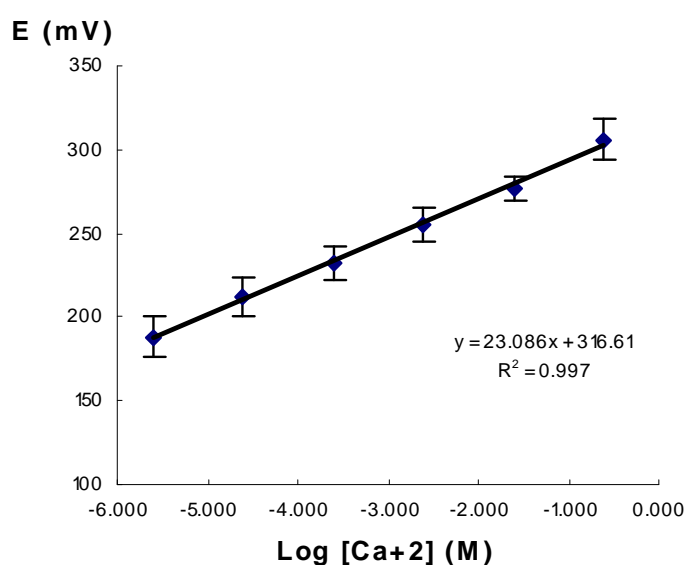


Figura 14: Respuesta a la concentración de Ca^{+2} del electrodo selectivo (mV).

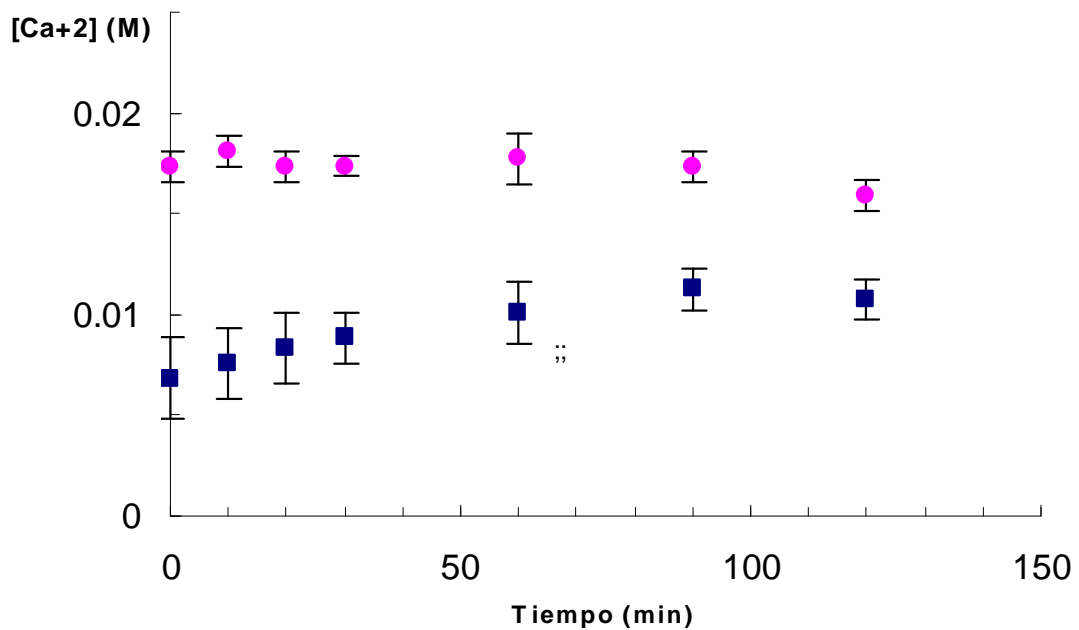
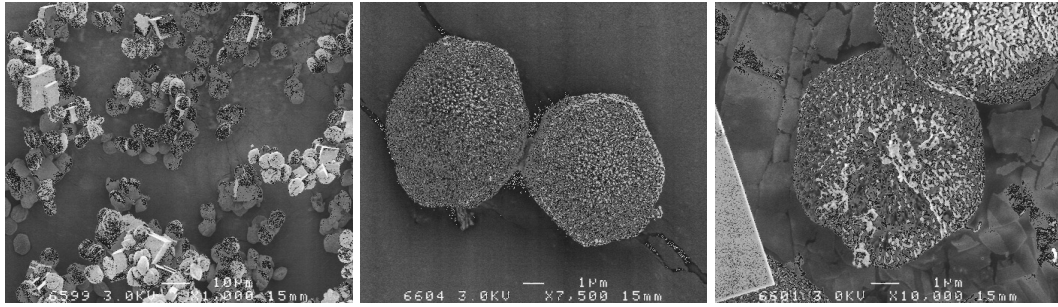


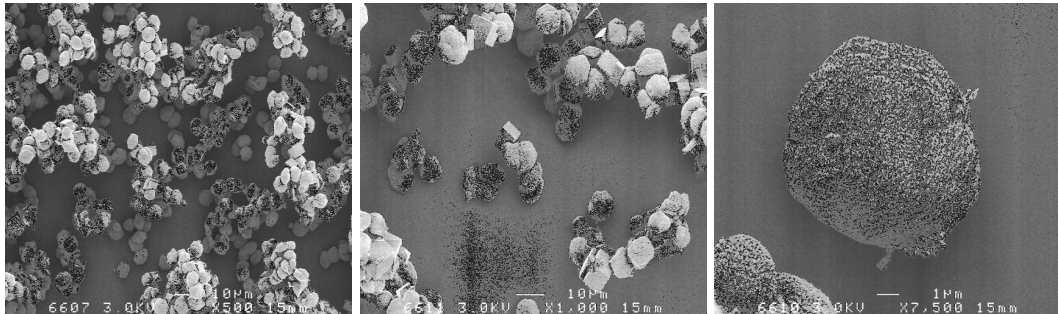
Figura 15: Grafico de estabilidad para las partículas inorgánicas (■) y las biopoliméricas (●) en suspensiones acuosas a pH= 7,0 medida en función de la concentración molar de Ca^{+2} .

Imágenes de SEM revelaron que los diferentes tipos de MPh fueron aproximadamente esféricas y con un diámetro promedio de $2 \mu m$ en el caso de las carrageninas, comparado con $5 \mu m$ para el caso de las partículas de $CaCO_3$. Las MPh de pectina fueron de mayor tamaño y presentaron una distribución de tamaños bimodal. Entre las pectinas estudiadas (PEC 33, 55 y 74) la PEC 33 mostró una distribución de tamaños y formas con dispersiones menores al igual que las CAR L y I respecto de la CAR K. A su vez, la CAR L fue la que presentó una menor dispersión de todos los sistemas analizados y el menor tamaño también: $2 \mu m$ promedio frente a $5 \mu m$ que mostró la PEC 33 (Figura 16).

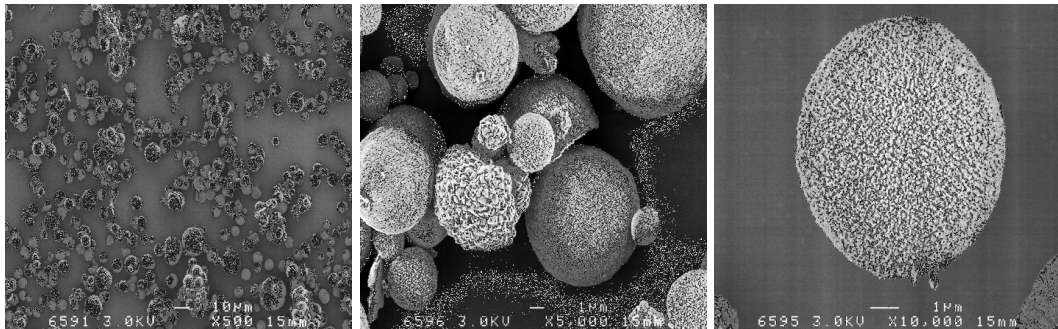
a.



b.



c.



d.

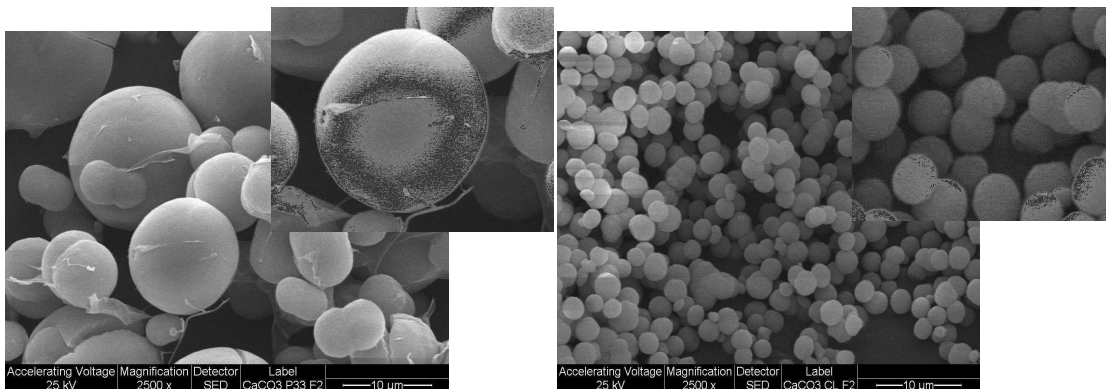


Figura 16. Imágenes SEM para diferentes MP de CaCO₃ sintetizadas por vía química: **a.** MP CaCO₃ sin buffer y sin biopolímeros; **b.** MP de CaCO₃ sin biopolímeros; **c.** MPH de CaCO₃ y biopolímeros. **d.** Optimización de la síntesis para PEC 33 (izq.) y CAR λ (der.).

Ensayos de carga

Se realizaron ensayos de carga empujando Dox como fármaco modelo por tres métodos diferentes, los cuales sistemas fueron incubados por 24 hs bajo agitación suave a 4 °C.

a. *in situ*: una solución de Dox fue disuelta homogéneamente en la solución de cada biopolímero a ser agregada para la síntesis de las MPh. El proceso de síntesis luego fue llevada a cabo según el protocolo antes descrito de acuerdo a cada metodología. En este caso, no se obtuvieron buenos resultados por la pérdida de estabilidad de Dox debido a que los valores de Dox al finalizar la reacción de síntesis de las MPh fue despreciable (datos no mostrados)

b. *Por absorción/adsorción*: en este caso se prepararon suspensiones de MPh para cada biopolímero y se lo mezclo con una solución de Dox de pH=6,0 en buffer MES o en buffer citrato de igual pH). Para ambos sistemas se encontró una alta carga de la Dox en las MPh. Se realizaron estudios de microscopía óptica de fluorescencia luego de realizar un doble lavado con solución fisiológica de las partículas cargadas con centrifugaciones intermedias por 15 minutos a 5 °C. (figura 19). Además se realizaron microscopias SEM (Figura 20) para evaluar la integridad de las partículas luego de la incubación por 24 hs en esas condiciones.

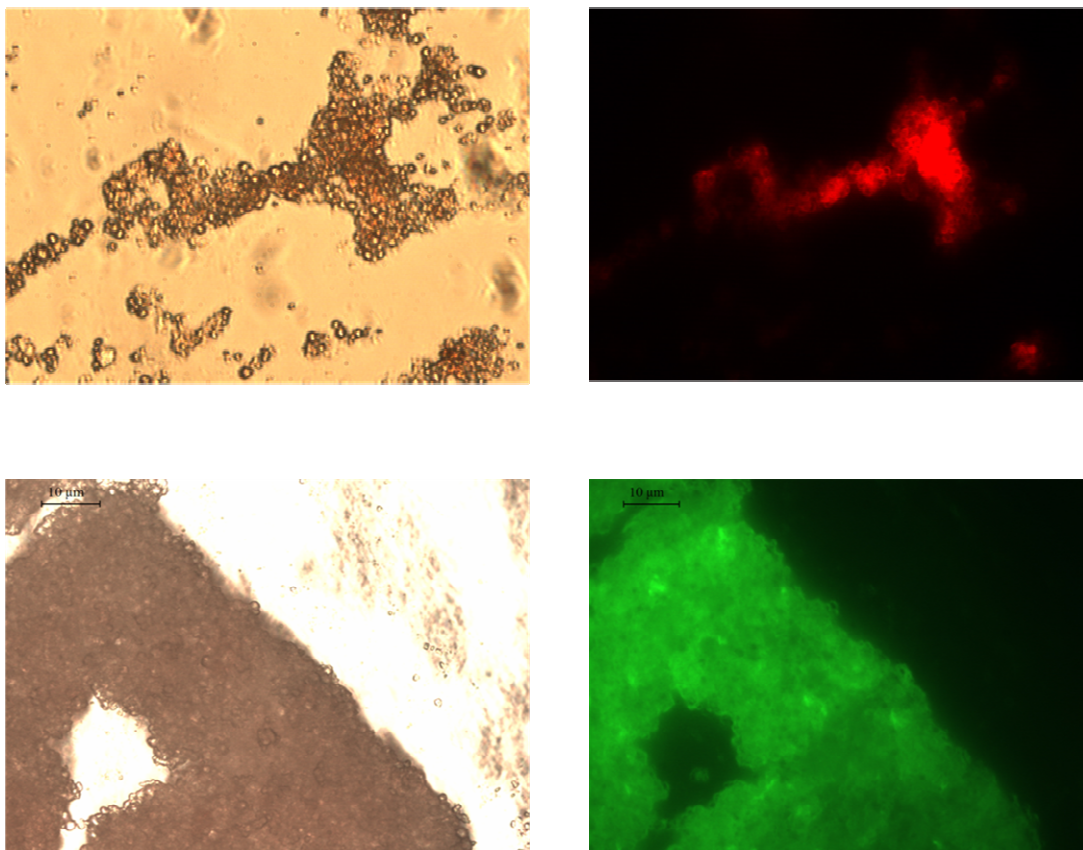


Figura 17. Microscopía óptica y de fluorescencia para MPh sintetizadas a partir de carbonato de calcio y CAR L (imágenes superiores) o PEC 33 (imágenes inferiores) cargadas con Dox por el método de absorción/adsorción. .

c. *Por cobertura*: soluciones de cada biopolímero conteniendo Dox incorporada se emplearon para realizar una incubación durante 12 horas de suspensiones de MPh preparadas como en el método por absorción/adsorción. En este caso, se observó la preferencia de la droga por el polímero en solución frente al polímero incorporado en las MPh, dado que porcentajes mayores al 90 % de la droga unida a cada biopolímero se encontraron en el excedente utilizado para el recubrimiento.

Debido los resultados positivos para los procesos de carga del fármaco por absorción/adsorción (rendimientos de hasta el 95 % carga) para ambas metodologías de síntesis sumado a los resultados poco satisfactorios para los procesos de carga *in situ* en ambos casos, se decide continuar con la síntesis química para encapsular a la droga por procesos de absorción/adsorción.

En la figura 17 se presentan las imágenes de microscopía óptica y de fluorescencia para los sistemas obtenidos por el método de carga por absorción/adsorción, y para las micropartículas híbridas sintetizadas a partir de la CAR L y PEC 33, los dos polímeros más promisorios de acuerdo a los ensayos anteriores de espectroscopias y análisis por microscopía SEM (Figura 16).

En las microscopías SEM para los sistemas de carga de droga por absorción/adsorción, se pueden observar diferencias significativas en cuanto a la estabilidad que presentaron las partículas durante el proceso de incubación a pH= 6,0 y bajo agitación magnética suave (Figura 18). En conclusión, el sistema de MPh empleando Carr L presenta mayor homogeneidad y conservación de la morfología luego del proceso de carga comparado con los restantes.

Obsérvese que las condiciones estructurales finales para ambos tipos de partículas en presencia de iones quelantes no son favorables para la integridad de las mismas. De acuerdo a estos resultados se prosigue el método de carga para experiencias posteriores con el buffer de naturaleza orgánica (MES).

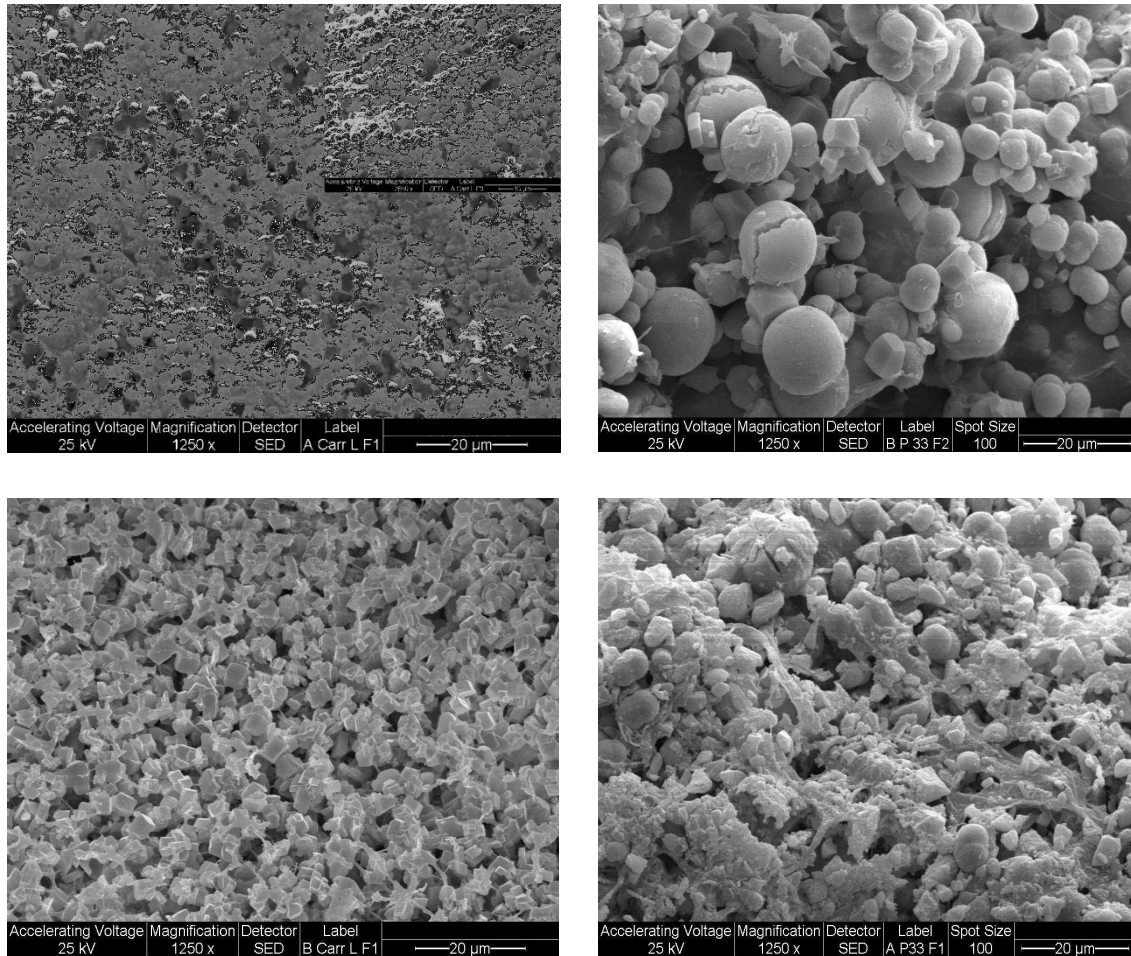


Figura 18: Microscopías SEM para sistemas de MPH conteniendo Dox liofilizados. Todas las imágenes han sido tomadas con la misma amplificación (1250X). Arriba: CAR L y PEC 33 (izq. y der. respectivamente) cargadas en buffer MES. Abajo: CARR L y PEC 33 (izq. Y der. Respectivamente) cargadas en buffer citrato.

Análisis mediante luz de sincrotrón: detección de biopolímeros y Dox

Para determinar la distribución de los biopolímeros seleccionados (CAR L y PEC 33) en el seno de las micropartículas se procedió al corte en capas (100 nm de espesor) de las partículas híbridas previa inmovilización en una resina Epon. Posteriormente, las muestras fueron observadas con luz de sincrotrón en la región del infrarrojo. Esta metodología nos permitió recolectar datos con resolución espacial para poder determinar mediante los espectros (realizados con 92 escaneos) para cada posición señalada la composición del sistema (Figuras 19: 1a, 1b, 2a y 2b). Los datos fueron obtenidos mediante un barrido espacial: se obtuvieron espectros para partículas cortadas formando capas inmovilizadas y espectros para posición en campo sin MPH, es decir sobre la resina, para una misma lamina. Los picos señalados corresponden a grupos funcionales pertenecientes a cada biopolímero.

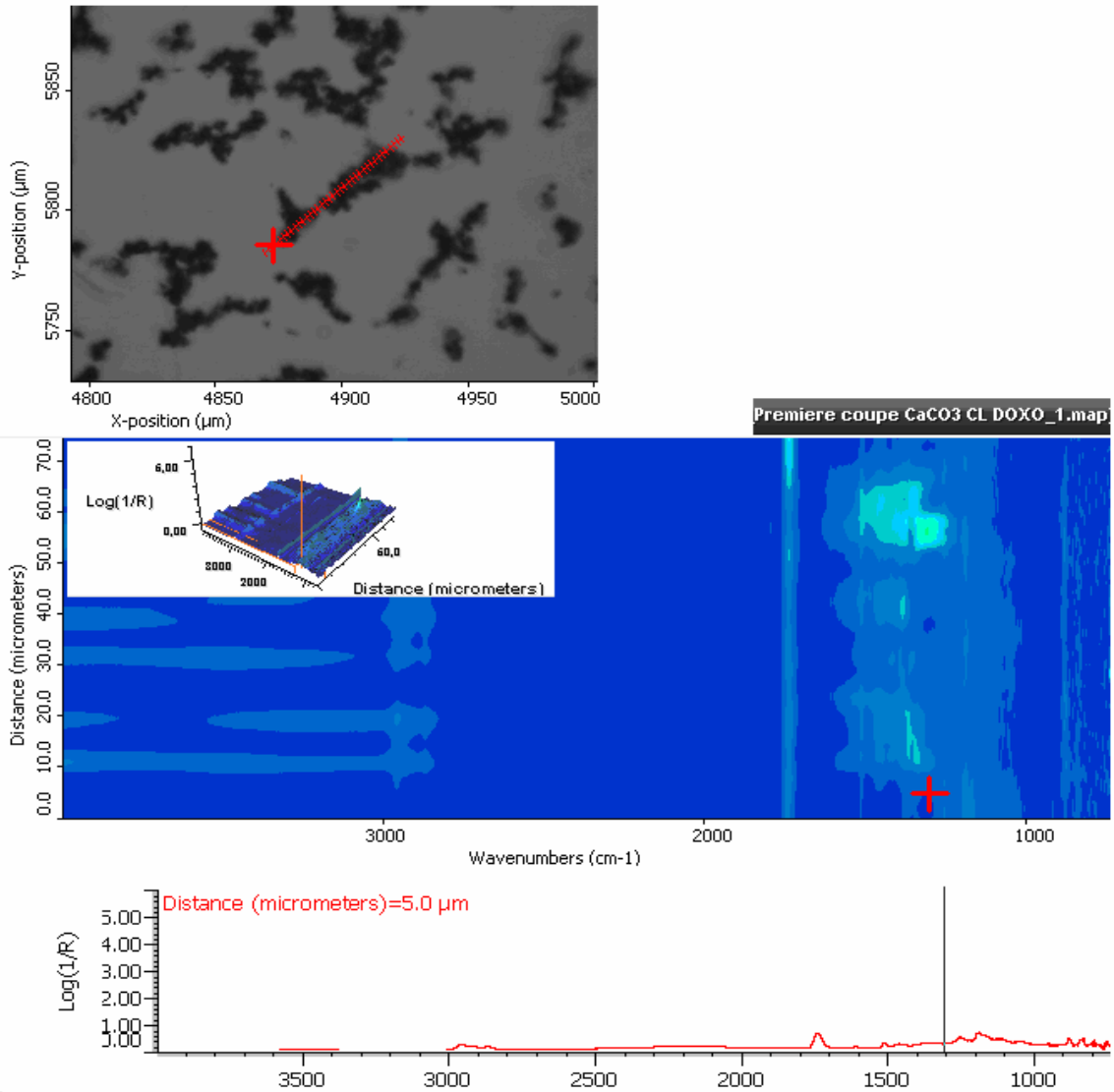


Figura 19 1.a: Fotografía (imagen superior izquierda) de un corte en lámina de MPH con **CAR L** fijadas en matriz Epon para una zona **sin MPH** (determinada por la posición de la cruz sobre la fotografía). Espectro vibracional IR (imágenes inferiores) indicando la posición del grupo funcional biopolimérico observado espacialmente.

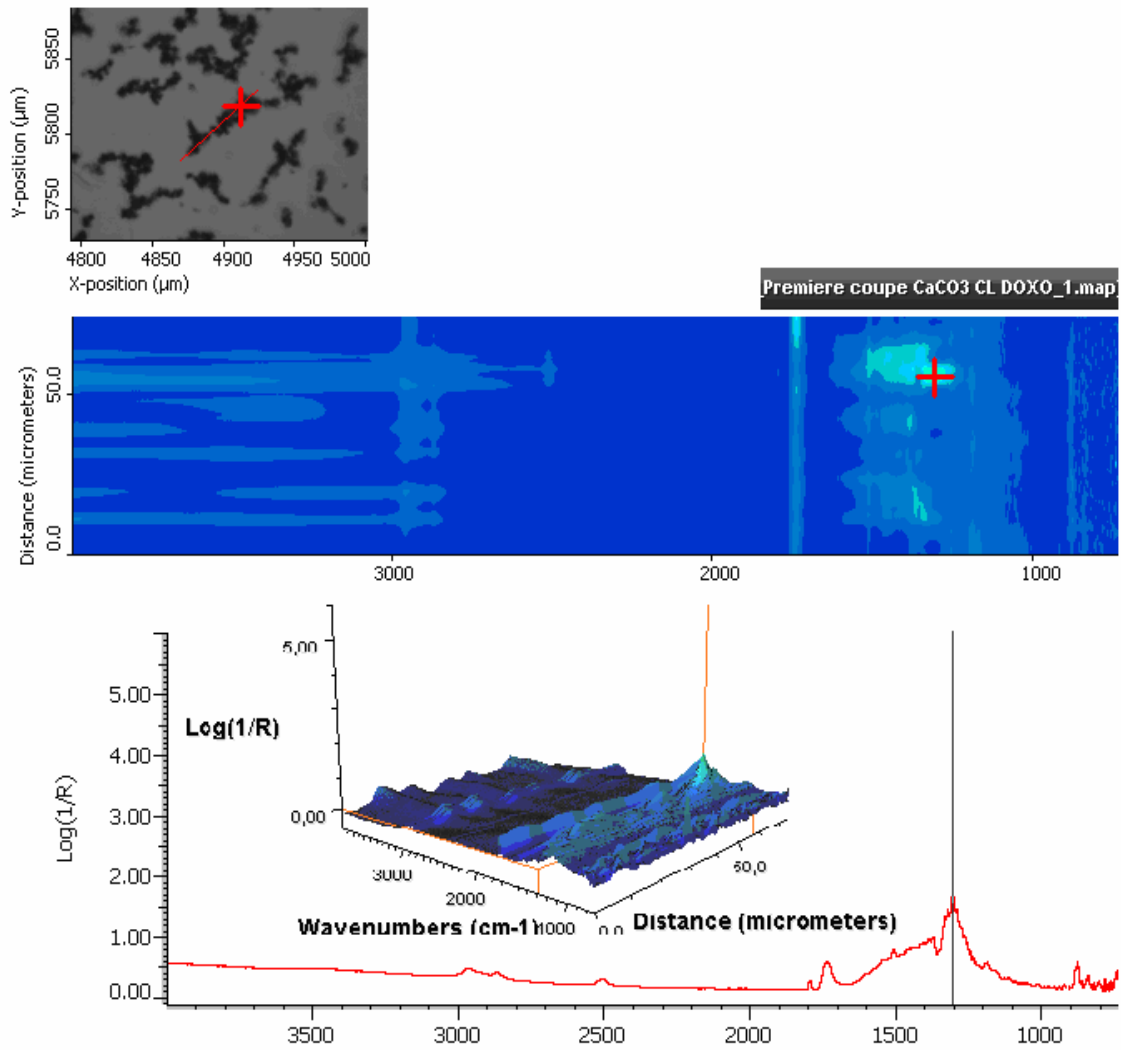


Figura 19 1.b: Fotografía (imagen superior izquierda) de un corte en lámina de MPh con **CAR L** fijadas en matriz Epon para una zona **con MPh** (determinada por la posición de la cruz sobre la fotografía). Espectro vibracional IR (imágenes inferiores) indicando la posición del grupo funcional biopolimérico observado espacialmente.

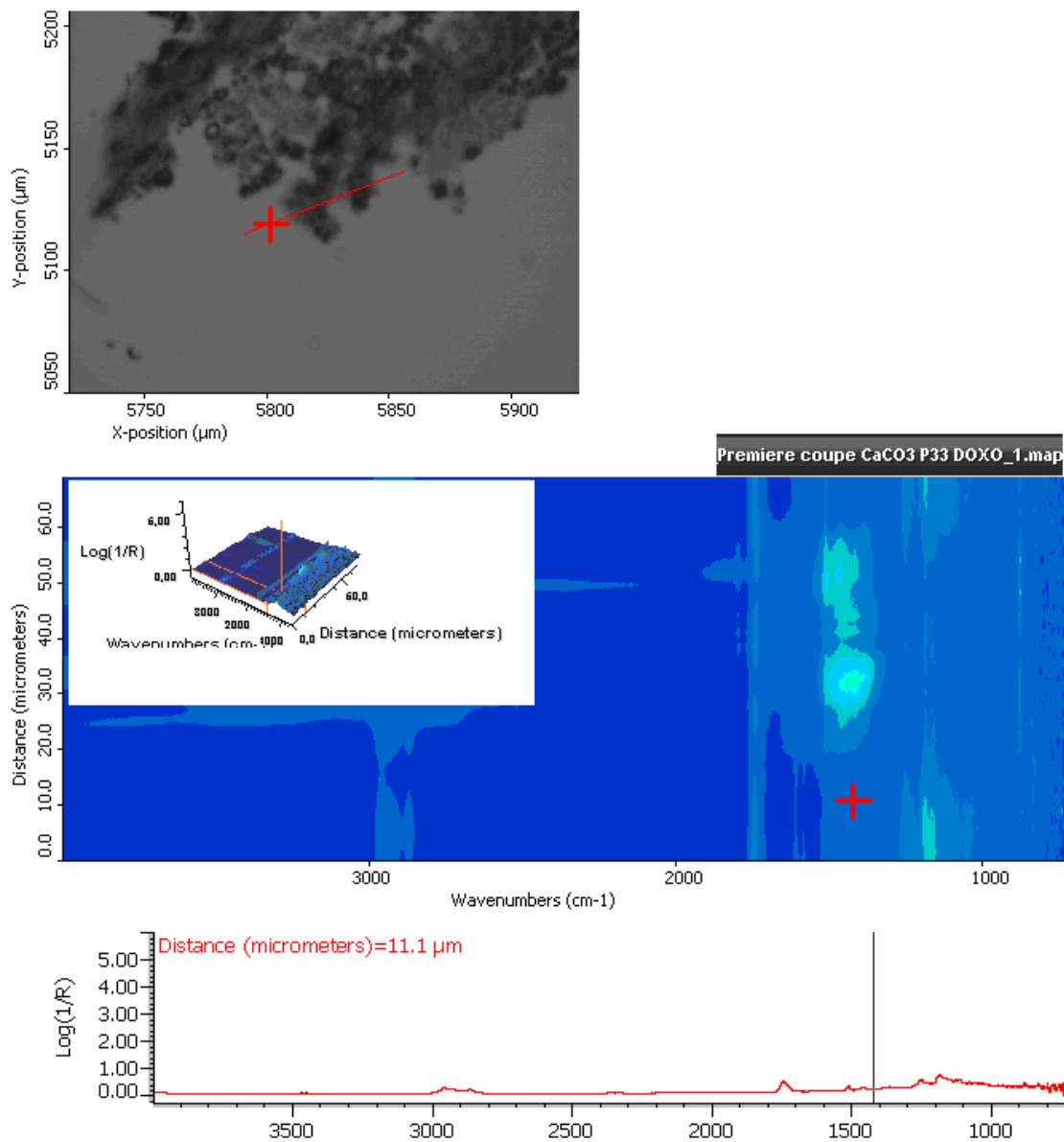


Figura 19 2.a: Fotografía (imagen superior izquierda) de un corte en lámina de MPh con **PEC 33** fijadas en matriz Epon para una zona **sin MPh** (determinada por la posición de la cruz sobre la fotografía). Espectro vibracional IR (imágenes inferiores) indicando la posición del grupo funcional biopolimérico observado espacialmente.

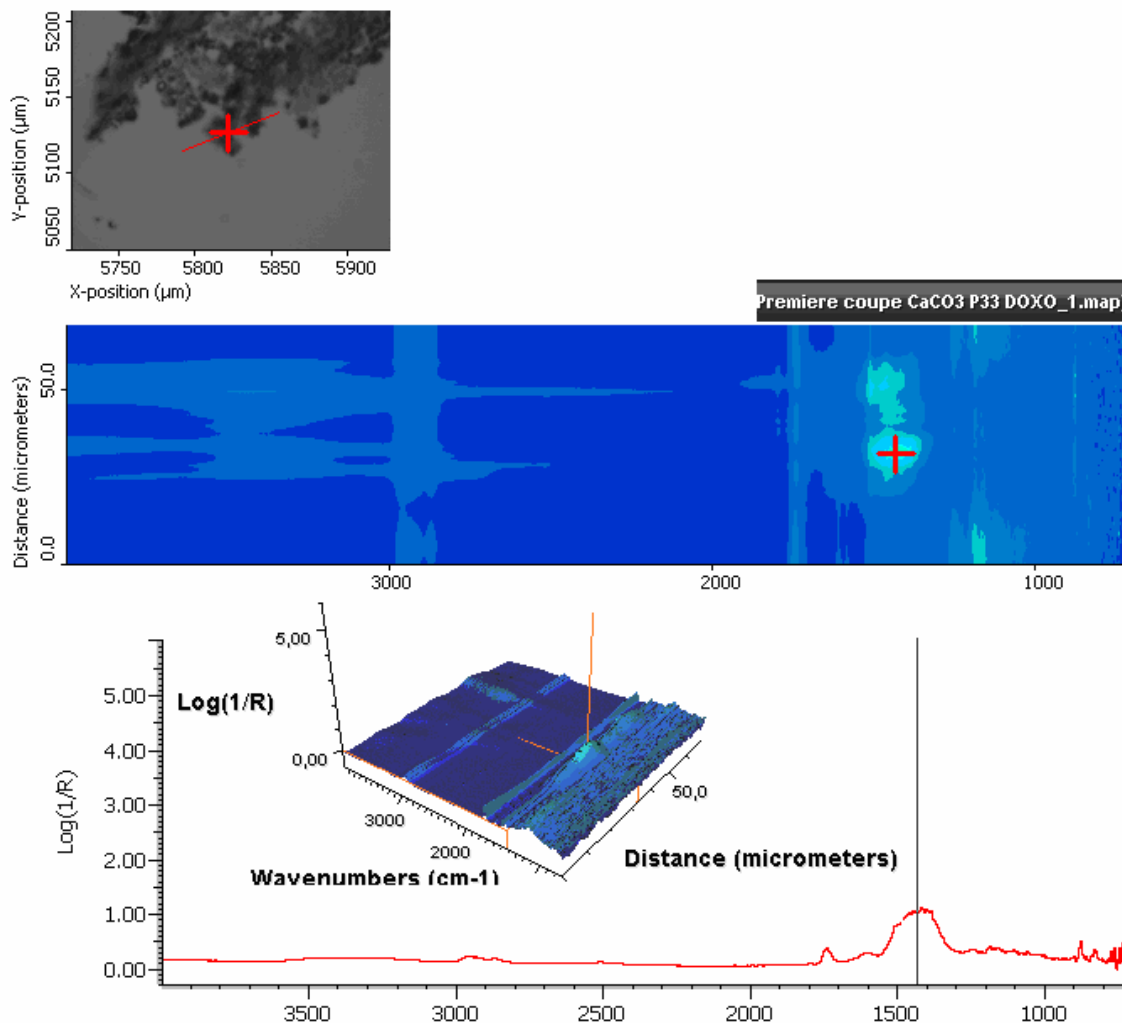


Figura 19 2.b: Fotografía (imagen superior izquierda) de un corte en lámina de MPH con **PEC 33** fijadas en matriz Epon para una zona **con MPH** (determinada por la posición de la cruz sobre la fotografía). Espectro vibracional IR (imágenes inferiores) indicando la posición del grupo funcional biopolimérico observado espacialmente.

Por lo que se ha podido comprobar espacialmente la presencia de los biopolímeros en el interior de las partículas así como de la Dox (ver fotografías de fluorescencia, obtenidas con la misma línea de trabajo, para las muestras previamente analizadas por IR) Figura 20.

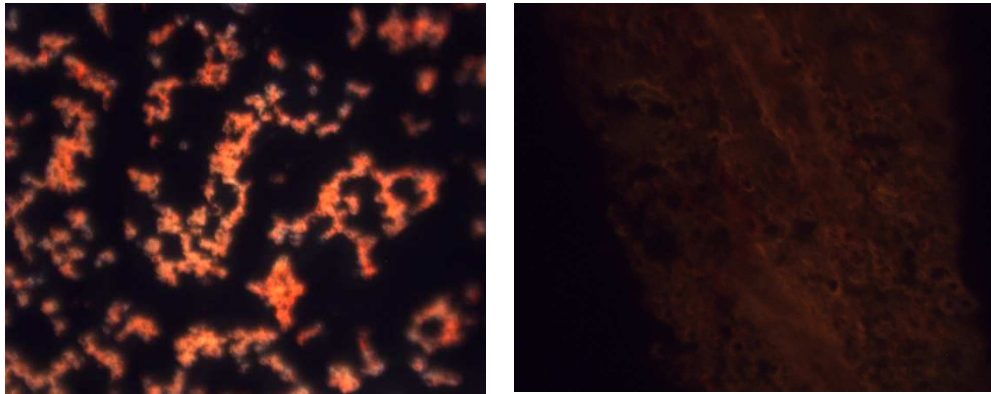


Figura 20: Imágenes de fluorescencia para láminas de MPh fijadas en resina Epon: CAR L (izq.), PEC 33 (der.).

Ensayos de liberación

Se realizaron ensayos de liberación en medios simulados para el recorrido en el tracto gastrointestinal. Los resultados obtenidos para partículas pre-tratadas en medio ácido (pH= 2.0) se muestran en la Figura 21, donde quedan expresados los porcentajes de Dox liberada luego de 48 días.

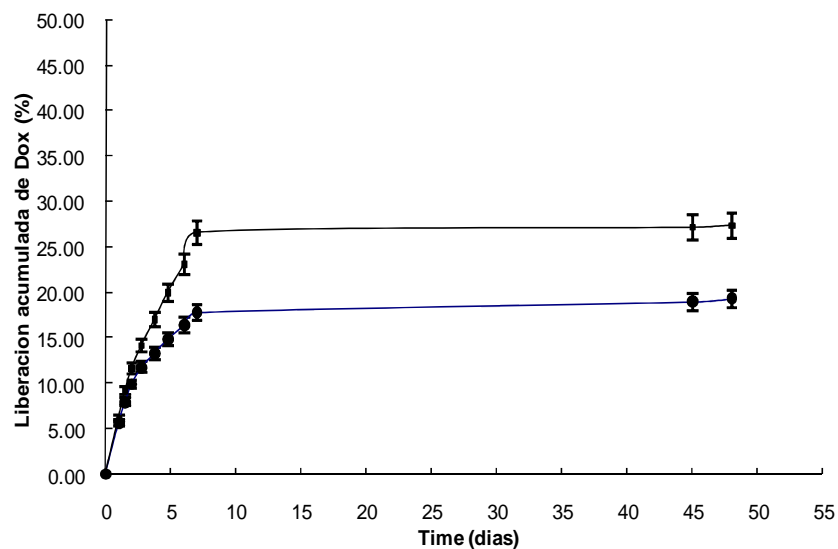


Figura 21: Ensayos de liberación de Dox en buffer PBS estéril a 37 °C bajo suave agitación (40 rpm) para CAR L (curva superior) y PEC 33 (curva inferior).

La carga inicial para la CAR L fue de 208.4 µg de Dox (92% de eficiencia de carga), mientras que para la PEC 33 fue de 154.4 µg de Dox (69% de eficiencia de carga). Las liberaciones totales para 48 días fueron de 27.4 y 19.4% respectivamente.

Estudios in vitro: Citotoxicidad

Se realizaron estudios de supervivencia/muerte celular mediante el uso de líneas fibroblásticas NHI-3T3 y en líneas celulares primarias de astrocitos de rata. Como blanco se utilizaron partículas de poliestireno esféricas de 5 μm de diámetro. Se ensayaron diferentes concentraciones de MPh de PEC 33 y CAR λ . Una vez recolectados los datos para ambos tipos celulares (Figuras 22 y 23) se concluyó mediante el análisis con un Tes-t de Student ($p < 0,5$) sobre la no existencia de diferencias significativas entre las muestras de MPh (tanto de PEC 33 como de CAR λ) con respecto a los valores de muerte celular que arrojaron las partículas blanco.

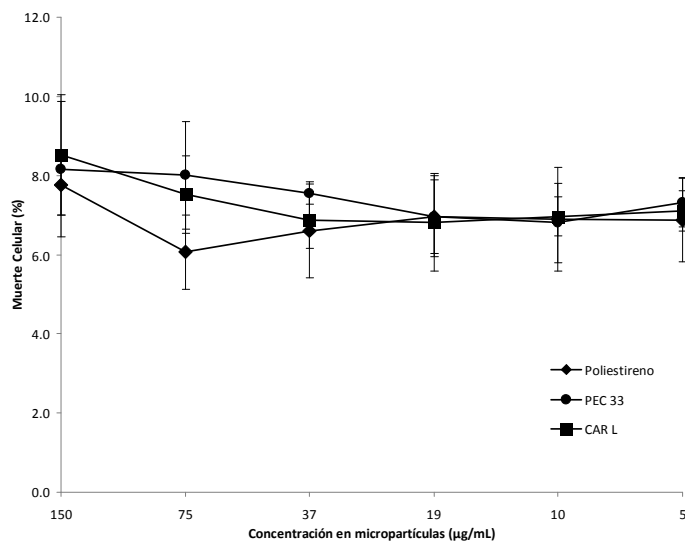


Figura 22: Muerte celular para línea de astrocitos de ratas en presencia de MPh conteniendo CAR λ y PEC 33.

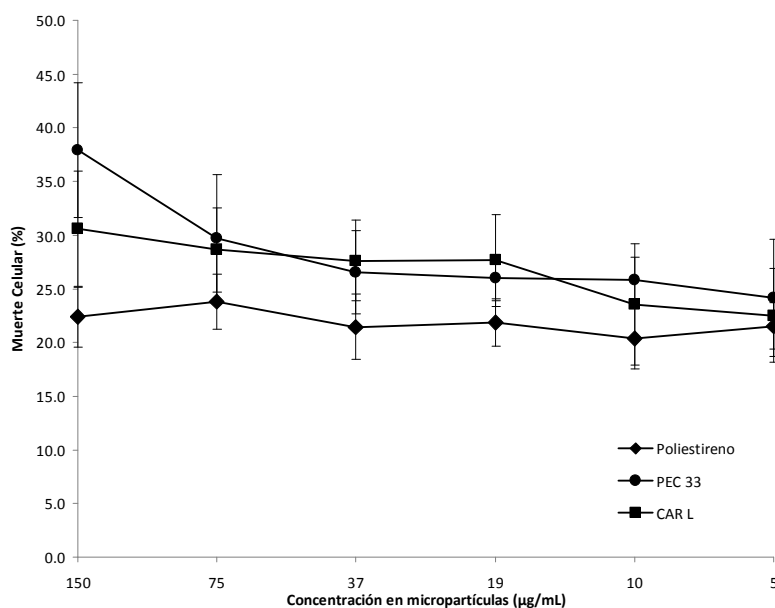


Figura 23: Muerte celular en líneas fibroblásticas NHI-3T3 incubadas con MPh conteniendo CAR λ y PEC 33.

CONCLUSIONES

La síntesis de micropartículas de carbonato de calcio depende de las propiedades fisicoquímicas de su entorno y de los componentes de la reacción, los cuales juegan un papel crucial en la cristalización coloidal. Sin embargo, en las condiciones experimentales desarrolladas en el presente trabajo, el biopolímero cumple el rol de templado para la síntesis de MP en soluciones acuosas y en condiciones fisiológicas. Las espectroscopías vibracionales (IR y Raman) y de rayos X muestran que tanto pectinas como carrageninas presentan sistemas estables con un alto porcentaje de vaterita en las estructuras cristalinas de CaCO_3 . Estos resultados fueron obtenidos en los sistemas secados bajo corriente de argón como para los sistemas liofilizados. La espectroscopía de fluorescencia y la microscopía confocal muestran la presencia de los biopolímeros en la matriz porosa inorgánica, y los estudios de SEM ponen de manifiesto la baja dispersión encontrada para los sistemas de carrageninas (*I* y *L*) y PEC 33. Las partículas sintetizadas más pequeñas se presentaron en los sistemas de reacción con las carrageninas, comprados a las MPs de CaCO_3 . Los sistemas fueron aptos para incorporar a la molécula de Dox, detectada mediante la técnica de microscopía de fluorescencia. La caracterización de las MPh fue realizada mediante análisis de estructura química y física, morfología, tamaño y estabilidad a pH fisiológico. Se realizó la marcación de polímeros con sondas moleculares fluorescentes para determinar su presencia en las partículas híbridas mediante microscopía de fluorescencia. El análisis estructural de las mismas fue realizado con espectroscopías vibracionales (FTIR y Raman). A su vez, las espectroscopías permitieron revelar la presencia de estructuras cristalinas como la vaterita y la calcita. La estructura física fue determinada por XRD y la morfología de las MPh incluyendo el tamaño, la forma y propiedades superficiales, fueron examinadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

En base a los resultados presentados se concluye que no existe interferencia de los biopolímeros seleccionados en la obtención de micropartículas híbridas mediante vía química, o mediante el uso de una emulsión de agua en CO_2 en condiciones supercríticas, sino que se observa el mejoramiento de éste último método frente al patentado originalmente con el ácido hialurónico [Boury y cols., Patente 424489, 2004]

Por otro lado, no se observan diferencias entre los biopolímeros ensayados en cuanto a su acción de templado durante la síntesis bajo ambas condiciones de síntesis, debido a que ambos alcanzan imprimir sobre la precipitación del CaCO_3 un medio propicio para su cristalización completa en la red vaterita. Sin embargo, al comparar las formulaciones con buffer glicina pero sin biopolímero entre la vía química y la de condiciones SC se observa que la utilización de una solución buffer de glicina es primordial para la síntesis de MP con CO_2 supercrítico. Esto podría ser explicado por el proceso de acidificación que sufre la solución dentro del autoclave durante la síntesis, dada la solubilización del CO_2 generador de las especies H^+ , HCO_3^- y CO_3^{2-} en solución, hecho que impediría la precipitación del CaCO_3 .

En relación a los proceso de carga, la metodología de carga de Dox *in situ* no resultaron satisfactorios para ninguna de las dos metodologías ensayadas de síntesis. Así, la síntesis química se muestra ventajosa frente a la síntesis alternativa SC para el sistema MPh-Dox. por otro lado, la técnica de absorción permitió obtener altos porcentajes de carga de Dox (mayor al

90% en el caso de la CAR L), liberaciones prolongadas en el tiempo con concentraciones controladas bajo condiciones simuladas para el tracto gastro-intestinal, junto a ensayos positivos de biocompatibilidad, hacen que las partículas desarrolladas pudieran emplearse para estudios como potenciales matrices portadoras de moléculas específicas hacia la zona dañada en terapias de anticáncer, y/o aumentar la eficacia en la reparación tisular en los procesos de diferenciación de tejido si se tiene en cuenta la liberación de iones Ca^{+2} en la zona dañada.

REFERENCIAS

- Beuvier T., Calvignac B., Delcroix G., Tran K., Kodjikian S., Delorme N., Bardeau JF, Gibauda A. y Boury F. (2011) *J. Mater. Chem.*, 21, 9757
- Boury F., Benoit P., Thomas O. and Tewes F. 2004. Patent: Method for preparing particles from an emulsion in supercritical or liquid CO₂. Stites & Harbison PLLC. IPC8 Class: AA61K914FI, USPC Class: 424489.
- Candy Lin *et al.* (2007) Producing Nanoparticles Using Precipitation with Compressed Antisolvent. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 3580-3589
- Caiyu Peng C., Zhao Q., & Gao C. (2010) Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO₃ and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO₃ microparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 353, 132–139.
- Diaz-Dosque Mario y cols. (2008) Use of biopolymers as oriented supports for the stabilization of different polymorphs of biomineralized calcium carbonate with complex shape. *Journal of Crystal Growth* 310, 5331–5340
- Dickinson S.R., McGrath K. M. (2001). *Analyst*. 126, 1118.
- Jordan J.P., Hand C.M., Markowitz R. S., Black P. (1992) *Journal of Neurooncology* 14, 19.
- Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I. (1970) *Analytical Biochemistry* 34 595.
- Martos C. y cols. (2010) Effect of precipitation procedure and detection technique on particle size distribution of CaCO₃. *Journal of Crystal Growth* 312 (2010) 2756–2763
- McCarthy K.D., de Vellis J. (1980) *Journal of Cell Biology* 85, 890.
- Qun Zhang y cols. (2010) Control of morphologies and polymorphs of CaCO₃ via multi-additives system, *Materials Chemistry and Physics* 122 (2010) 156–163
- Puppi D. y cols. (2010) Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* 35 403–440
- Tewes F, Boury F. (2005) Formation and rheological properties of the supercritical CO₂-water pure interface. *J Phys Chem B*. Mar 10;109(9):3990-7.

CONCLUSIONES

La administración de fármacos de alta toxicidad en dosis terapéuticas sigue siendo un desafío de la farmacología, y los métodos más aceptados para su desarrollo involucran diferentes modelos de liberación controlada de moléculas. Según este criterio, fueron estudiadas matrices biopoliméricas naturales, biopoliméricas mixtas, e híbridas con el fin de explorar una nueva estrategia de liberación controlada de moléculas.

En una primera aproximación se empleó Rojo Congo como molécula modelo para desarrollar los estudios de interacción con diferentes sistemas matriciales biopoliméricos, encapsularla mediante síntesis por gelación iónica, caracterizarla, y estudiar su liberación en condiciones fisiológicas simuladas. Ensayados diversos biopolímeros, se obtuvieron los mejores resultados con microesferas compuestas por coacervados formados por alginato y goma guar carboximetilada. El biogel desarrollado fue resistente a condiciones ambientales ácidas similares a las estomacales, mientras que en medio alcalino la disgregación de las partículas se producía en breves periodos. Por otro lado, la presencia de CMGG estabilizó al gel de ALG permitiendo procesos de rehidratación luego de secado por liofilización. Experimentos de liberación controlada desarrollados *in vitro* evidenciaron una liberación más lenta de RC de la matriz de ALG-CMGG comparado a microesferas de ALG (menor al 50 %) en más de 8 horas. Análisis de viscosimetría y espectroscopía vibracional revelaron la interacción entre la mezcla biopolimérica ALG-CMGG con RC debido a la presencia de los grupos aromáticos de RC que interactúan con zonas hidrofóbicas de los biopolímeros, revelando la utilidad de estas técnicas en el estudio de interacciones biopolímeros-molécula cargo.

Basados en los resultados precedentes, se procedió a realizar estudios de interacción entre biopolímeros y Doxorrubicina, droga de alta toxicidad muy empleada en diversos tratamientos de cáncer. El proceso de selección permitió considerar como potenciales matrices a alginatos, carrageninas, pectinas, gomas y gelatina: entre ellas las pectinas, seguidas de las carrageninas, presentaron mayor interacción con el fármaco seleccionado. La matriz seleccionada en base al mejor comportamiento carga/liberación, la PEC 55, mostró mediante estudios de espectroscopia IR algunas de las interacciones más intensas a nivel molecular entre la droga y la matriz, las cuales correspondieron a los grupos carbonilo y a los anillos aromáticos de Dox probablemente con las zonas hidrofóbicas de pectina. A su vez, se observó una excelente estabilidad luego de un año de almacenamiento. Los estudios reológicos del complejo de PEC 55-Dox permitieron establecer la existencia de interacciones matriz-Dox, así como el comportamiento del fluido del sistema. Estos datos sobre el sistema son relevantes para comprender y predecir el comportamiento del mismo (Dox / matriz transportadora), y relacionarlo al comportamiento de la formulación bajo condiciones fisiológicas. Los estudios de modelamiento matemático podrían permitir el desarrollo de sistemas de liberación controlada de Dox adecuada al tipo de tumor y a su localización.

Los biopolímeros que presentaron mayor interacción con Dox (pectinas y carrageninas) posteriormente fueron considerados como base para el desarrollo de sistemas híbridos biopoliméricos-inorgánicos debido a la posibilidad de reducir el tamaño de partícula y controlar la porosidad de la misma con el objeto de manipular la cinética de liberación de Doxorubicina aún en condiciones alcalinas de disgregación de las partículas.

Las técnicas de síntesis aplicadas en fluidos supercríticos y por vía química para la producción de partículas de CaCO_3 fueron utilizadas para la síntesis de sistemas híbridos con pectinas y carrageninas. Estos biopolímeros actuaron como templados de los procesos de síntesis de MP, confiriendo a las micropartículas híbridas las condiciones propicias para la cristalización en la red más estable del CaCO_3 , la vaterita, en más de un 95% del sólido recuperado, resultado que superó a los reportados en la literatura para polímeros empleados como control como el ácido hialurónico. A su vez las MPH presentaron un rendimiento de carga con Dox de hasta 90% y cinéticas de liberación de primer orden con niveles de 20 a 30 % de la carga inicial para periodos de 45 días. Así mismo, se demostró biocompatibilidad del sistema desarrollado.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han permitido establecer una estrategia de selección de materiales basadas en las interacciones a nivel macroscópicos y microscópicos (molecular) entre las matrices biopoliméricas y la molécula carga, particularmente útil para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos. Por otro lado, los estudios con biopolímeros han demostrado ser relevantes para la síntesis de sistemas híbridos novedales para el transporte y liberación de Doxorubicina como una nueva alternativa del uso de biomateriales en el área de liberación controlada de moléculas anticancerígenas en biomedicina.

Las proyecciones del presente trabajo permiten considerar el desarrollo de novedales sistemas híbridos basados en biopolímeros como un nuevo campo de exploración e impulso de micro- y nanobiotecnologías, específicamente con un gran potencial en el área de liberación controlada de moléculas.

APENDICE 1

1

Control release applications in food technology

Valeria E. Bosio¹, Germán E. Islan¹, Yanina E. Martínez¹, Guillermo R. Castro^{1,2*}

¹Nanobiomaterials Laboratory, CINDEFI (CONICET, CCT La Plata) – Universidad Nacional de La Plata, Argentina. ²Dept of Biomedical Engineering, Tufts University, USA.

*Corresponding author: Guillermo R. Castro CINDEFI - Universidad Nacional de La Plata
Calle 50 y 115. C.P. 1900 La Plata, Argentina Phone/fax: ++54-221.483.37.94 ext 132/103
E-mail: grcastro@gmail.com

1. INTRODUCTION

The wide scale and extensive use of bioactive molecules has brought many advantages in several fields, such as agriculture, health, chemical and food industries. However, there are increasing concerns about further escalation of the use of bioactive molecular species in view of the associated problems, e.g. environmental pollution in agriculture, toxicological effects in health and foods, accompanying their use. The development and application of controlled release technologies has held out the promise of solving some of these problems by reducing molecular doses, keeping the compound concentration at defined levels, and physically isolate chemical reactive or unstable molecules. Food additives such as sweeteners, flavoring compounds, lipids, acidulants, proteins, gases (e.g. carbon dioxide in candies), and preservatives are regularly used in the food industry. Also, molecular controlled release will provide new health benefits for the development of fortified and/or special purpose foods by supplementing with unstable vitamins, cofactors, and complex minerals; improving packaging quality and canned food storage, enhance sensorial effects (flavor, color), adding new physiological properties (e.g. probiotics and prebiotics), etc... In same trend, the idea of chemoprevention by supplementing bioactive molecules in foods by nanotechnology developments was recently discussed (Siddiqui and Mukhtar, 2010; Nair *et al.*, 2010).

According to FAO (Food and Agriculture Organization), one third of the world population is having some food-related illnesses. Over weighted and obese people is around 1.5 billions, meanwhile about 1 billion is undernourished and 9 million people is dying of hunger per year. In addition, we are starting with a food shortage at world scale. Even the scenario is not promising, in 2025 the

2 *Advances in Bioprocesses in Food Industries*

world population will increase in 2 billion people more, and it will required to increase the food production from 5.17 to 10.6 billions of Kcal/J. Half of the additional food production will be provided by improving the current production technologies. However, Biotechnology will play a major role in the development of new food production techniques to cover the food production gap. The main concept of the Biotechnology approach is not only increase food production but also to supplement the current food production with new molecules, adding novel beneficial and/or nutritional properties. For example, the addition of antioxidants, like resveratrol, or other molecules which are also no synthesized by mammals such as omega 3 fatty acids or vitamins like the B complex and C. In order to supplement foods two major strategies were developed under the Biotechnology umbrella: by genetic modifications of food, generally named as “GM foods” or by supplementing the food with the desire molecule in order to obtain to foods with enhanced or novel properties, named as functionalized foods. The first strategy involves changes at DNA level by genetic engineering techniques. Typical examples of GM foods are transgenic plants such as soybean, canola oil, corn among others, and also animals able to produce novel compounds such as recombinant human insulin in cow milk or the expression of roundworm omega 3 fatty acid DNA in pig by genetic modifications. However, GM foods or food derivatives are under controversial discussions over the world regarding safety, ecological issues, and intellectual property.

On the other side, the concepts of molecular interactions at atomic level is providing a new approach of an area of knowledge defined as Nanosciences, in where the basis and understanding of the molecular behavior will introduce new concepts in the food industry by changing the food structure, functional properties at macroscopic scale. The manipulation and design of materials from 1 to 100 nm (according to the National Science Foundation), but also scaled to 500 nm is broadly defined as Nanotechnology. The Nanotechnology arena is promising a revolution in all aspects of life, changing energy, manufacturing, medicine and so. The projection for the nanotechnology market by 2014 is estimated in US\$ 2.6 trillion (Michelson, 2008). At present time, more than 600 nanotechnology products are in the market as consumer goods, and many in the food area (Anonymous, 2010). In general, the food “building blocks” in nature are colloidal, and as a result of cellular activities and/or molecular self-assembly to produce organized structures and interfaces. The ability of manipulate the self assembly techniques and organize the food structure and quality is a significant contribution for the development of novel foods. The major benefits of nanotechnology applied to the food industry include improvement of animal and human welfare, product quality, enhance crops productivity and quality, and diminish environment damage. In recent years, the main studies of nanotechnology in the food industry are focus to the fields of delivery and packaging (Bagchi *et al.*, 2010). However, since the properties of carriers and their interaction with the cargo at nanoscale differ from the bulk one, it will require exhaustive analysis for the short- and long-term effect at physiology levels. The toxicology for this area have a need to develop reliable analytical methods, new type of reference materials, standardized protocols and validations systems in order to determine the food safety and importantly get the public confidence.

2. CONTROLLED RELEASE

In the last ten years, the concept of healthy foods were increased in the population and the scientific community. The main interests were focused on foods to prevent the development of some pathologies like flu, cancer, heart diseases, and others. Generically, healthy foods could have one or more than the following components: high levels of proteins from milk and vegetables; low to medium calories content; high content of dietary fibers; low levels of sodium salts, sweeteners and trans-fat content, and some bioactive components (Palzer, 2009). In order to get more complete foods in terms of nutrition and quality, it is required to tailor the foods with specific and non-natural functions and properties, defined as functionalized foods.

Functionalized foods has the advantage of specific tailoring the food with one or more desired molecules to cover some specific needs. This procedure requires to previously adjust the food microenvironment in order to avoid physicochemical incompatibilities, and to establish a molecule release kinetic, following the findings made early in the drug delivery area. Functionalized foods are defined over the basis of three statements: nutritional concept to support life, attractive flavor, and must show some physiological function to prevent, help or assist the recovery from some pathology. Under these requirements, it can be distinguished two types of functionalized foods: fortified foods, means supplementing with some molecules to prevent food deficiencies (*e.g.* minerals, vitamins, antioxidants); and special purpose which are designed to help the specific recovery of illnesses (*e.g.* anemia), to enhance physical performances (*e.g.* athletes).

Among the most common strategies for the development of functionalized foods are molecule encapsulation or entrapment. The process requires the loading of molecule into an specific matrix designed to be compatible with both food and molecule properties, and also with the physiological processes involved. Most of the matrixes commonly used in the food industries are gels, which are required to be biocompatible, and with absence of side effects (gels and their single molecules), and able to perform under physiological conditions a established kinetic release of the cargo at specific location (*e.g.* stomach, small intestine, etc...). Also, the cargo must be in the concentration range of physiological conditions.

Controlled release devices involves two main physical systems:

- A reservoir device, in where the cargo molecule is in a closed physical space restricted by the matrix, which is rate-controlling the release. In microspheres type, the molecule is confined to the center of the device. Typical examples are bubble gums filled with syrups.
- A matrix type device, in where the molecule cargo is uniformly distributed throughout the matrix. The kinetic of cargo release depends on composition and physicochemical properties of the matrix and the cargo, their interactions, and geometry of the system.

On the other side, controlled release systems involves four different main mechanisms like swelling, biodegradation, diffusion and osmotic pressure. In general and under physiological conditions, a combination of simultaneous mechanisms are implicated of the molecule release from the matrix.

4 *Advances in Bioprocesses in Food Industries*

Two types of cargo-matrix interaction can be differentiated: covalent modification of the molecule cargo attached to the gel matrix; and the second one implied non-covalent interactions among cargo and matrix. In the covalent modification, the procedure could be performed by chemical reaction with the only consideration of making the chemical modification in a functional group that can be attacked later under physiological conditions and disrupted by the native enzymes and/or normal microbial flora of the organism. Another alternative for covalent modification is by using a biocatalyst, the major advantage is the natural modification of the molecule, and the mild reaction conditions. However, in both cases, the development of a downstream processing is a must, and the production costs sometimes are raising making the process economically impracticable.

On the other side, non-covalent interactions between the cargo molecule and the matrix could be complex to predict. Those interactions could imply more of one region and/or chemical groups of the molecules involved. In such cases, spectroscopic tools (e.g. FTIR, RMN, and others) are indispensable to determine the type of functional groups involved in the interactions, and modifying the functional groups accordingly. From the mechanistic point of view, the key steps of cargo release non-covalently linked to the matrix are: diffusion of the cargo throughout the matrix to the interface, dissolution and partitioning of the molecule between the matrix and medium, and finally the transport away the molecule out of matrix to the environment. In covalent linked cargo to the matrix, an additional enzymatic and/or chemical hydrolysis step must be considered. In the non-covalent attachment to the matrix, the limiting step for cargo release is the diffusion across the matrix. However, in the cargo covalently linked to the matrix case, the limiting step is more complex, because cargo diffusion depends not only how the matrix is designed and composed (including or not biocatalysts or another activating compound) but also the microenvironment conditions (e.g. degradation, erodability, etc...). Several empirical and theoretical models were developed in that respect (Lian *et al.*, 2004; Lin and Metters, 2006; Guillard *et al.*, 2009; Revuelta *et al.*, 2010).

In the controlled release arena, two major physical platforms were developed: liposomal, a dynamical structures made on phospholipid bilayers developed during the early sixties; and capsules, considered as static structures, produced by polymerization of molecules from several origins (e.g. celluloses, alginates, etc...).

From structural point of view, liposomes has the advantage of having a both types of environments. An hydrophobic area, inside the phospholipid bilayer, and a hydrophilic interior (water core). Traditionally have been used to stabilize and transport food flavors and nutrients in food industries. Examples of liposome technology in foods are the cheese and sweeteners industries. In the fortified foods area, encapsulation of calcium lactate in lecithin liposomes added to soy milk are providing a product with the same level of calcium compared to the regular milk (Hirotsuka *et al.*, 1984). In the case of antioxidants application of liposome technology was successful on omega 3 and 6 fatty acid, which has provided to be efficient preventing air oxidation and additionally avoiding bad smell and taste Augustin and Sanguansri, 2003). Another example is the co-encapsulation of hydrophobic (poor soluble) vitamin E with ascorbic acid (hydrophilic molecule) in liposomes has revealed as

Control release applications in food technology 5

synergistic antioxidant activity (Reineccius, 1995). Using the same concept, hydrophobic vitamins like A or D, and calcium could provide an enhanced adsorption at intestine level. Another recent application of liposome technology was to development films for food protection against microbial spoilage and contamination (Taylor et al., 2005). However, the main drawback of the liposomal technology are the dynamic nature of the system, making their structure sensitive to the environmental conditions, and consequently unstable for long term storage.

Regarding to the gel matrices, two major options can be chosen: chemically or biologically synthesized polymers. The main characteristics of both types polymer synthesis and major properties are listed on table 1. It should be noted the advantages of tailoring biopolymers is not only to modify the interaction among the molecule cargo and the gel matrix but also to change the molecule release kinetics by modifying the polymer crosslinking and pore diameter. Many chemically synthesized gels are used at industrial scale such as polyesteramides, polypropylenes, polystyrenes and PolyVinil Alcohols (PVA) among others (Coles *et al.*, 2003). Generally, chemically synthesized polymers are used as films for food packing, and sometimes these films are doped with active molecules such as enzymes, antibiotics, or quality markers (pH- and/or temperature-indicators) etc.... (Lonnerdal, 2003; Piñuel *et al.*, 2010).

Table 1. Characteristics of chemically and bio-based polymers

	Polymer synthesis	
	Chemical	Biochemical
Synthesis media	Organic	Aqueous
Catalysts	Inorganic (toxic)	Biocatalyst (non-toxic)
Synthesis	Unspecific	Highly specific (chiral centers)
Exp. synthesis conditions	Extreme	Mild
Polymer stereo-specificity	Low	High
Tailoring	None	Yes
Average MW	Variable	Restricted range
Polydispersity	Medium to high	Low
Biological activity	Unspecific	Highly specific
Scale up	Extremely expensive	Expensive
Downstream processing	Very expensive	Expensive
Degradation products	Could be toxic	None (biocompatible)
Wastes	Requires specific treatments	Environmentally friendly

(*Modified from Kaplan, 1988)

6 Advances in Bioprocesses in Food Industries

Bio-based polymers can be classified in three types: large molecules extracted from biomass (e.g. starches, celluloses), polymers synthesized *in-vitro* by chemo-enzymatic techniques using natural monomers (e.g. Poly-Lactic-Glycolic Acid or PLGA), and bio-based polymers produced directly by natural or genetically manipulated life forms (e.g. microbial polyesters like Poly-Hidroxy Alkanoates or PHAs; beta glucans; or proteins like silks) (Castro *et al.*, 2006, and 2007; Wang *et al.*, 2007; Andreeßen and Steinbüchel, 2010).

The high relevance of biodegradable polymers can be estimated considering the world production of about 100.000 Tons yearly, and about 40 % is used for packaging only. Also, the consumption of biodegradable polymers in US, EU and Asia is forecast to grow at an average annual rate of about 13 % over up to 2014.

Two main types matrixes are the most common structures in food technology for controlled release: films and microspheres.

In packaging, the main applications are films. Films are used to make a physical barrier to sustain food freshness, preventing dehydration, and as a barrier keeping food flavor and aromas, avoid oxygen permeation effects (food oxidation), also as antimicrobial barrier (Mastromatteo *et al.*, 2010). Active films made from starchy polymers, dextrans, gellans, whey proteins, cellulose and their derivatives, and synthetic polymers are broadly used in food packaging to extend the shelf-life properties were reported (Kester *et al.*, 1986). Different procedures were used to develop active films against microbes. For example polythene films were soaked, sprayed and coating with bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* 32Y against *Leisteria monocytogenes* in meats. The film coating procedure with bacteriocin was selected because of the reduction of one log *Leisteria* cell concentration in the tested food were found (Mauriello *et al.*, 2004). Another strategy was recently developed in food packaging by controlled release of lysozyme incorporated in the biopolymer. Lysozyme was included into a biomatrix of cellulose acetate films and its kinetic release was modulated by changing the biopolymer content in the film from 5 to 15 % during the casting (Gemili *et al.*, 2009). Another strategy named molecular inclusion, is to make a complex between molecule cargo and polymeric compound following the complex addition to the matrix. Enrofloxacin, a quinolone antibiotic with antibacterial activity against a broad spectrum of Gram-negative and Gram-positive bacteria, into PVA films. In order to modulate the releasing rate of enrofloxacin from the PVA films, it was required to modify the gel matrix composition, not by changing the polymer concentration as in the case of cellulose acetate mentioned before, the control release was made by making a complex between the cargo, enrofloxacin, and a biopolymer. First, a screening procedure using different biopolymers with enrofloxacin was performed. High methylated pectin was selected based on the high interaction biopolymer-quinolone. Further, the complex enrofloxacin-pectin was loaded during the PVA casting procedure. The results displayed in Table 2 are showing a release decrease of about 7 times in enrofloxacin-pectin complex compared with uncomplexed enrofloxacin release from the PVA film (Martinez *et al.*, 2010, unpublished results).

The second alternative for supplementing foods is by the development of micro- and more recently

Table 2. Kinetic of enrofloxacin release from PVA and PVA/pectin gels

Time (min)	Enrofloxacin release (%)		Ratio PVA/PVA-Pectin
	PVA-Pectin	PVA	
0	0.00	0.00	0
15	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.95
30	0.90 ± 0.25	3.77 ± 0.89	4.19
45	1.65 ± 0.31	10.86 ± 1.04	6.58
60	2.95 ± 0.40	22.49 ± 0.51	7.62
90	4.52 ± 0.59	38.06 ± 1.59	8.42
150	7.46 ± 2.04	58.09 ± 4.10	7.79
210	10.43 ± 2.41	75.44 ± 8.23	7.23
270	13.89 ± 2.75	100.00 ± 3.73	7.20

Note: PVA cryogels 15% (MW 13 Kda.) with or without 1 % pectin containing 5µg/ml enrofloxacin. Release was performed in acetate buffer (100 mM, pH= 5.5) at 37 °C.

nano-particles containing specific molecular cargo. It is well-know that the role of active molecules on the physiology depends on the choice of food matrix, the chosen encapsulation and delivery system (Loveday and Singh, 2008; Folmer *et al.*, 2009). Microencapsulation is an old technology used to preserve flavors in foods since the 30's (Karel, 1990). Many examples are available in the literature regarding the concept of modeling and molecular encapsulation on microspheres mostly developed in the pharmaceutical industries reviewed in previous works (Saltzman 2001; Grassi *et al.*, 2007). The major drawback of controlled and sustained release is how to control manage the kinetic of cargo release. Different strategies were developed to address this problem. For example, resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, is a powerful antioxidant with very restricted use at industrial scale because of short biological half-life in presence of oxygen and/or light, and poorly soluble in water. Chitosan, a biocompatible and biodegradable polymer obtained mainly from the exoskeleton of crustaceans is currently used at many industrial levels. Resveratrol was microencapsulated in chitosan particles. However, in order to establish an appropriate kinetic and sustained release, it was necessary to stabilize the gel by crosslinking the matrix. The common chemical crosslinker are very toxic (e.g. glutaraldehyde, glyoxal, formaldehyde), and requires a further expensive downstream processing. Alternatively, a "bio-crosslinker", vanillin, was successfully employed getting up to about 93.7 % resveratrol encapsulation and release pH-controlled (Peng *et al.*, 2010).

In general, molecule release in foods is determined by the superposition of different mechanisms such as diffusion, erosion, enzymatic degradation. The molecular diffusion obey the Fick's laws, and can be controlled inside the matrix by changing the type of matrix, modifying the interaction

8 Advances in Bioprocesses in Food Industries

among cargo and matrix, and also by changing the matrix pore diameter (mean free path) by modifying chemical composition, crosslinking conditions, etc...In the case of enzymatic degradation, it is very complex to determine *a priori*, because the enzyme compositions and activity in digestive system depends on many parameters: from intrinsic parameters of food type (composition, degradability, etc...), to extrinsic parameters (related to the digestive system: water activity, location, microbial activities, etc...). However, the third mechanisms, carrier erodability, can be more predictable. Mainly, there are two types of erodable matrix processes: heterogeneous, in where the surface of the microcapsule is disintegrating from the surface to the core (“layer by layer”); and homogeneous, in where the matrix is disintegrated all together. In aqueous environments, heterogeneous disintegration is associated with hydrophobic-type biopolymers, meanwhile homogenous degradation is associated with hydrophilic matrixes. Because of heterogeneous erodability depends on polymer properties and topology, morphology of the capsule, and is independent of the physicochemical properties of the cargo is more predictable than the homogenous one. For example, encapsulation of ciprofloxacin, a poor soluble quinolone antibiotic, in hydrophilic biopolymer such as alginate is made by ionic gelation using divalent cations (like calcium, zinc, etc...) as crosslinker. The advantage of ciprofloxacin encapsulation is to avoid complex formation with multivalent cations resulting in ionic and water soluble complexes which are reducing the antibiotic bioavailability and interfering with the food uptake (Kato *et al.*, 2002). In oral delivery of encapsulated ciprofloxacin, the microcapsule is exposed along the digestive system to a different ionic environments (e.g. sodium, potassium, etc...). The presence of monovalent ions will contribute to the matrix erosion by disrupting the matrix network. This homogeneous matrix degradation will be governed mostly on ions diffusional mechanisms. The effect of ionic strength, as sodium chloride, on ciprofloxacin release from alginate microspheres is showed in Figure 1. The alginate degradation rate is approximately two times faster when the ionic concentration goes from 10 to 160 mM. In this kind of system, there are no diffusion of the cargo molecule is observed, and the release is concomitantly with the swollen molecules of the gel matrix. The interaction amongst the cargo molecule and the single released components of the gel matrix will determine the cargo biological activity in the body.

Another potential strategy to control the molecule release kinetic is by the particle coating technique. In this case the particle contains a core in where the cargo molecule is dispersed along with a polymeric matrix, followed by a crosslinking procedure (e.g. gelation), and later by coating. Coated particles adjust to an heterogeneous model, in where the cargo release can be determined by quantity of shells, and the matrix content. Example of microsphere coating technique is showed in Figure 2. Congo red dye was encapsulated in microsphere coacervate composed of arabic gum and alginate, and coated or not with emulsan. Kinetic release of Congo Red was studied by incubating the microspheres with and without coating under digestive conditions *in-vitro* using pH 1.2 for half an hour (stomach condition), and following to pH 7.4 (intestine conditions). In both cases, coated and uncoated microspheres did not show any changes under acidic conditions. Meanwhile, when the pH was switched to 7.4, the uncoated microspheres integrity was compromised showing a weight reduction in a half in 90 minutes. On the other side, coated microspheres weight was reduced only

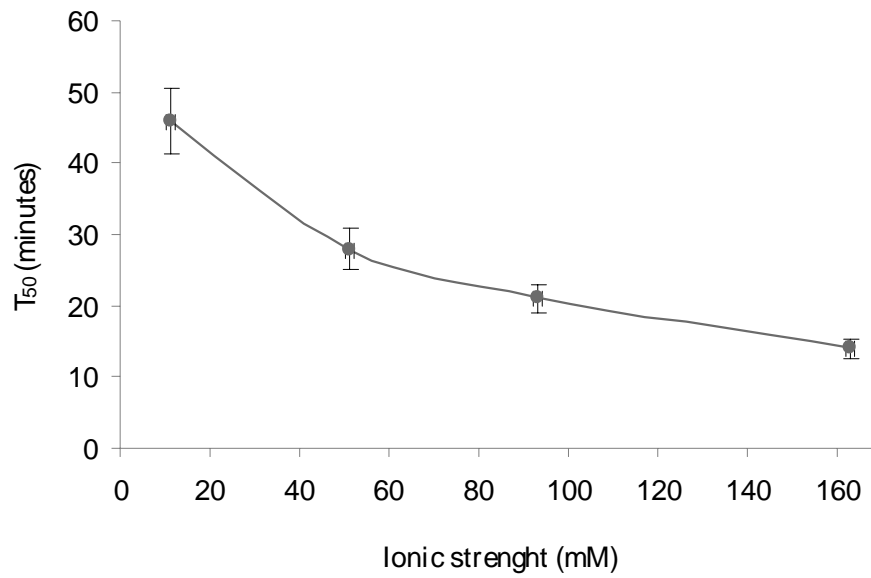


Fig. 1: Effect of ionic strength on ciprofloxacin release from alginate microspheres in 10 mM phosphate buffer (pH=7.4).




Fig. 2: Effect of coating on *in vitro* release of Congo Red encapsulated on arabic gum-alginate (blue) and guar gum-alginate coated with emulsan (red) under conditions. The pH was adjusted to 1.2 from 0 to 30 minutes, and from 30 to 150 minutes was adjusted to pH 6.8.

10 *Advances in Bioprocesses in Food Industries*

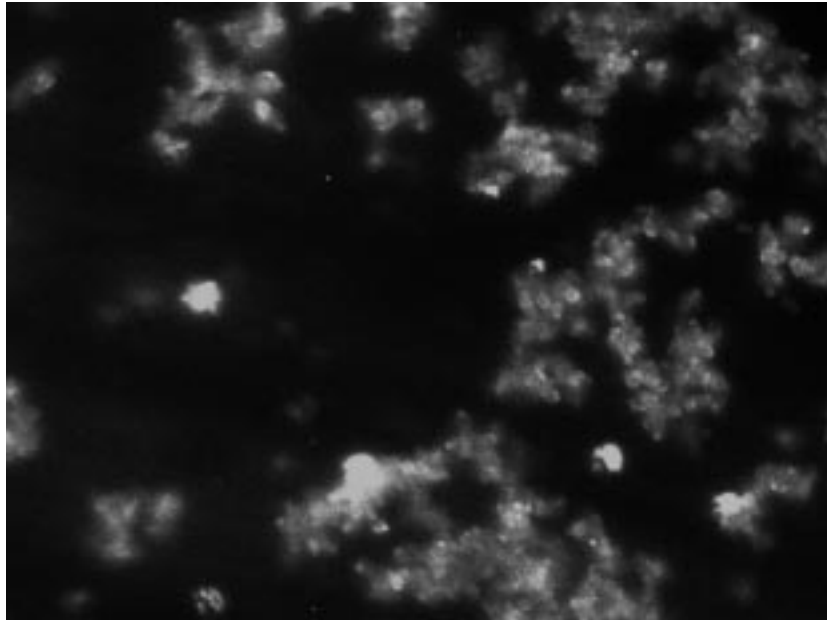


Fig. 3A. Optical microscopy of alginate microspheres coated with fluorescent emulsan

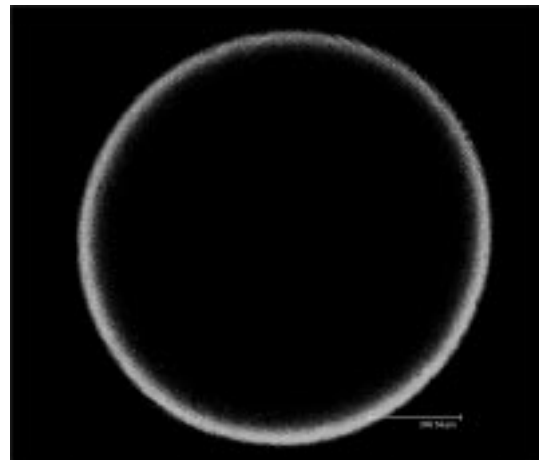
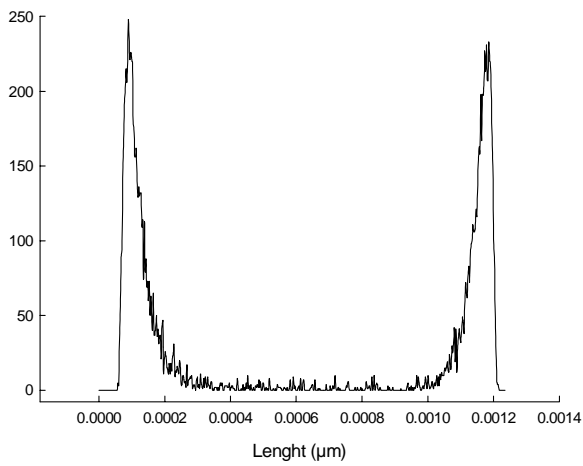


Fig. 3B: Confocal microscopy of alginate microsphere coated with fluorescein derivatized emulsan. Relative fluorescence intensity peaks indicates the presence of emulsan covering the alginate gel microsphere surface

approximately one fifth in the same period of time. Fluorescent derivatization of the coating biopolymer, and confocal microscopy analysis confirmed the presence of the coating agent covering the surface of the entire microsphere containing the cargo. These results established the relevance of the coating technique in the molecule delivery. Additionally, by controlling particle main properties and chemically altering the microsphere surface, it will possible to target specific location of the body that will enhance the desired physiological activity of the cargo.

3. CONCLUSIONS

The fast growth population impose to the world a big challenges in many areas of human life and requires to take urgent measures in many areas. Food quality, safety and nutrition are a major concern since malnutrition impair physical, social and cognitive activities, with strong consequences in our societies. Efficient functionalized foods as fortified and special purposes foods with the development of new technologies will sustain population growth and alleviate malnutrition and famines. However, there are remaining technical challenges to be solved like the increase additives stability against oxygen, light and other detrimental factors; targeting specific location delivery in the digestive system by the development of smart encapsulation models; making long-lasting flavor and taste issues; enhance storage capabilities by developments of new and more complex packaging systems.

Smart packaging and controlled release will play a major role based on biotechnology and nanotechnology tools for the development of foods with improved quality and storage time.

References

-
- Augustin M A, Sanguansri L, (2003).** Polyunsaturated fatty acids: delivery, innovation and incorporation in foods, *Food Australia*, **55**: 294-296.
- Andreeßen B, Steinbüchel A, (2010).** Biosynthesis and Biodegradation of 3-Hydroxypropionate-Containing Polyesters, *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 4919-4925.
- Anonymous, (2010).** The project of emerging technologies, Available from: http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/browse/categories/food_beverage/
- Bagchi D, Lau F C, Ghosh D K, (2010).** Biotechnology in functional foods and nutraceuticals, CRC Press, Boca Raton.
- Castro G R, Bora E, Panilaitis B, Kaplan D L, (2006).** Emulsan coated alginate microspheres as a new vehicle for protein delivery, Chapter 1. In: Degradable Polymers and Materials, Khemani K. and Scholz C. (Editors),. *American Chemical Society Symposium Series*, **939**: 14-29.
- Castro G R, Panilaitis B, Bora E, Kaplan D L, (2007).** Control release of biopolymers to enhance immune response, *Molecular Pharmaceutics*, **4**: 33-46.
- Castro G R, Panilaitis B, Kaplan D L, (2008).** Emulsan, a tailorable biopolymer for controlled release,.

12 Advances in Bioprocesses in Food Industries

Bioresource Technology, **99**: 4566-4571.

Chiellini E, (2008). Environmentally compatible food packaging, CRC, Boca Raton, USA.

Coles R, McDowell D, Kirwan M J, (2003). Food Packaging Technology, Blackwell, Oxford, UK.

Folmer B M, Baron D, Hughes E, Miguet L, Sanchez B, Heudi O, Rouvet M, Sagalowicz L, Callier P, Michel M, Williamson G, (2009). Monocomponent hexa—and dodecaethylen glycol succinyl-tocopherol esters: self-assembly structures, cellular uptake and sensitivity to enzyme hydrolysis, *Biochemical Pharmacology*, **78**: 1464-1474.

Gemili S, Ahmet Yemenicioglu A, Altinkaya S A, (2009). Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme, *Journal of Food Engineering*, **90**: 453-462.

Grassi M, Grassi G, Lapasin R, Colombo I, (2007). Understanding drug release and adsorption mechanisms, CRC Press, Boca Raton.

Guillard V, Issoufov V, Redl A, Gontard N, (2009). Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10**: 108-115.

Kaplan D L, (1998). Biopolymers from Renewable Resources, New York, Springer.

Karel, M, (1990). Encapsulation and controlled release of food components, in *Biotechnology and Food Process Engineering*, Schwartzberg, H G. and Rao, M A, Eds., Marcel Dekker, New York.

Kato R, Ueno K, Imano H, Kawai M, Kuwahara S, Tsuchishita Y, Yonezawa E, Tanaka K, (2002). Impairment of ciprofloxacin absorption by calcium polycarbophil, *Journal of Clinical Pharmacology*, **42**: 806-811.

Kester A U, Fennema J J, Py O R, (1986). Edible films and coatings: a review, *Food Technology*, **40**: 47-59.

Lian G, Malone M E, Homan J E, Norton I T, (2004). A mathematical model of volatile release in mouth from the dispersion of gelled emulsion particles, *Journal of Controlled Release*, **98**:139-155.

Lin C C, Metters A T, (2006). Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**: 1379-1408.

Loveday S M, Singh H, (2008). Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods, *Trends Food Science Technology*, **19**: 657-668.

Mastromatteo M, Mastromatteo M, Conte A, Del Nobile M A, (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications, *Trends in Food Science & Technology*, In Press.

Mauriello G, Ercolini D, La Storia A, Casaburi A, Villani F, (2004). Development of polythene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y, *Journal of Applied Microbiology*, **97**: 314-322.

Michelson E S, (2008). Globalization at the nano frontier: The future of nanotechnology policy in the United States, China and India, *Technology in Society*, **30**: 405-410.

Control release applications in food technology 13

- Nair H B, Sung B, Yadav V R, Kannappan R, Chaturvedi M M, Aggarwal B B, (2010).** Delivery of antiinflammatory nutraceuticals by nanoparticles for the prevention and treatment of cancer, *Biochemical Pharmacology* in press (doi:10.1016/j.bcp.2010.07.021).
- Palzer S, (2009).** Food structures for nutrition, health and wellness, *Trends Food Science Technology*, **20**:194-200.
- Peng H, Xiong H, Li J, Xie M, Liu Y, Bai C, Chen L, (2010).** Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol, *Food Chemistry*, **121**: 23-28.
- Piñuel L, Martinez Y E, Breccia J D, Castro G R, (2010).** Pectin-PVA cryogels doped with pH indicators for its application in food packaging, *International Congress of Bioprocess on Food Industry*, October 5-8, Curitiba, Brazil.
- Platt D K, (2006).** Biodegradable Polymers Market Report, Shawbury, UK, Rapra Technology Ltd.
- Reineccius G A, (1995).** Liposomes for controlled release in the food industries, In Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients, *ACS Symposium Series*, **590**:113-131.
- Revuelta M V, Fernández Van Raap M B, Mendoza Zélis P, Sánchez F H, Castro G R, (2010).** Ascorbic acid encapsulation in hydrophobic silica xerogel, *Food Technology and Biotechnology*, Submitted.
- Saltzman W M, (2001).** Drug delivery, Engineering principles for drug delivery, Oxford University Press.
- Siddiqui I A, Mukhtar H, (2010).** Nanochemoprevention by bioactive food components: a perspective, *Pharmaceutical Research*, **27**:1054-1060.
- Taylor T M, Davidson P M, Bruce B D, Weiss J, (2005).** Liposomal nanocapsules in food science and agriculture, *Critical Reviews on Food Science Nutrition*, **45**: 587-605
- Wang X, Esther Wenk E, Hu X, Castro G R, Meinel L, Wang X, Li C, Merkle H, Kaplan D L, (2007).** Silk coatings on PLGA and alginate microspheres for protein delivery, *Biomaterials*, **28**: 4161-4169.

APENDICE 2

Congo red as molecular probe to study interactions between biopolymeric gel microspheres and drugs

Bosio Valeria E.⁽¹⁾, Basu Sresee⁽²⁾, Chacon Villalba M. Elizabeth⁽³⁾, Güida Jorge A.^(3, 4, 5), Mukherjee Arup⁽²⁾, Castro Guillermo R.^(1, 6)

- 1.- CINDEFI, Universidad Nacional de La Plata- CONICET (CCT La Plata), Argentina.
- 2.- Department of Chemical Technology, Calcutta University, 92, A.P.C. Road, Kolkata - 700009. India.
- 3.- CEQUINOR, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, CC 962, 1900, La Plata, Argentina
- 4.- Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, 1900 La Plata, Argentina.
- 5.- Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Luján, Argentina.
- 6.- Department of Biomedical Engineering, School of Engineering, Tufts University. 4 Colby Street, Medford, MA 02155, USA.

Corresponding authors: Prof. Arup Mukherjee. E-mail: arupm1234@gmail.com
Prof. Guillermo R. Castro. Email: grcastro@gmail.com

Abstract

Congo Red (CR) was used as molecule model for controlled release studies biopolymers. Derivative carboxymethyl guar gum (CMGG) was synthesized in order to improve aqueous solubility and reduce surface tension and confirmed by FTIR spectroscopy, and elemental analysis. Surface tension of CMGG is reduced in about 50 % compared with the native polymer. Viscosity decrease from 30,000 cps of guar gum to 350-400 cps for CMGG indicating pseudoplastic fluid behavior. Congo red encapsulated on 68 % alginate and 32 % CMGG microsphere blends were found the best. Vibrational spectroscopies revealed interaction among CR and the biopolymer matrix attributed to the aromatic motif of the dye with apolar regions of alginate. Controlled release of CR at 37 °C from the microspheres at pH= 1.2 showed no release in 25 minutes, but 62 % of CR was detected in the supernatant when the pH was raised to 7.4 after 8 hours incubation.

Keywords: Congo red, controlled release, gel microspheres, guar gum, alginate, coacervates

1.- Introduction

Starting in 1960's rapid developments in molecular biology tools, spectroscopy and in silico molecular modeling have greatly supported in understanding relevant molecular interactions in different fields. Principle applications in understandings the molecular interactions lie in food, cosmetics, pharmaceuticals and new material areas. In pharmaceutical industry to be particular, molecular interactions were used to determine active components in complex molecular mixtures modify and redesign new drugs for cell and tissue specificity and to adjust the drug dose size for improved therapeutics. The global market for drug delivery technology is worth in excess of U\$ 25 billion in sales, with a predicted annual growth of 15 % for the years ahead.

The major portion of drug delivery market is dominated by oral forms of drugs by 52 % of the total. Additionally, new trends in drug delivery involves nano- and micro-based controlled release devices that offers tremendous advantages over the current forms of drug delivery such as enhanced solubility, commendable bio-availability, better targeting and controlled delivery, and the "nano" market is expected to garner US\$ 700-800 billion revenues by 2015 (Findlay, 2010) [1].

In the last decades, biopolymers have increased attention both in the academy and industry. Remarkable properties such like structural diversity and specific biological properties span over a range of molecular dimensions were unearthed. Additionally, mild synthesis, tailorability, biodegradability, and convenient rheological modulations made biopolymers very attractive tools for a myriad of applications (Panilaitis *et al.*, 2007; Bosio *et al.*, 2011) [2, 3]. Ultrapure alginates (ALG) produced under GMP/ISO 9000 guidelines are one of most common biopolymer gels currently used in food and pharmaceutical industries. ALGs are linear biopolymers composed of β -mannuronic acid (M units) and α -guluronic acid (G units) linked by 1-4 bonds, purified from seaweeds and some bacteria. ALG hydrogels are formed by cross-linking in presence of divalent cations (*e.g.* calcium, zinc), which cooperatively interact with different chains forming ionic bridges between different polymer chains and named as "egg boxes". ALG gels has been used as a matrix for entrapment of many molecules and cells, and also in tissue engineering applications (Dornish *et al.*, 2001; Ferreira Almeida and Almeida, 2004; George and Abraham, 2007) [4-6]. However, ALG gels are showing some drawbacks such as the high hydrophilicity and erodability at alkaline pH, poor mechanical strength, and gel instability in freeze-thaw cycles which are preventing an extensive use. For example, calcium alginate gels are well-known to be unable to control delivery of hydrophobic molecules (Ferreira Almeida and Almeida, 2004) [5]. Some alternative strategies have been developed to improve alginate gel qualities, from chemical modification to a chemically link with a wide range of molecules like polyols, chitosan, to sorbitan esters, amongst others (George and Abraham, 2007; Xu *et al.*, 2007) [6, 7]. Additionally, biopolymeric gel blends are becoming a new alternatives in the recent years, because are easy to make and no special post-mixture procedures are required. Also, they have the advantage of the resulting blend can show different novel properties compared to the individual biopolymer components (Bajpai *et al.*, 2006; Pongjanyakul and Puttipatkhachorn, 2007) [8, 9].

A very attractive molecule to produce polymer blends is guar gum (GG), a biopolymer synthesized in the endosperm of *Cyamopsis tetragonolobus*, a seed legume commonly found in the north of India and Pakistan. Chemically, GG is a galactomannan composed by a linear chain of β 1,4-D-mannopyranoses to which D-galactopyranoses residues are α 1,6-linked at every second mannosyl residue forming short side-branches (2:1 ratio) with a molecular weight of about 220 kDa. Among the relevant properties of GG, it can be mentioned the thixotropy (the decrease in viscosity over time at a constant shear rate) above 1.0 % concentration, the ability to retard ice crystal growth non-specifically by slowing mass transfer across the solid/liquid interface, good stability during several freezing-thawing cycles and water swelling activities pH-dependently. Additionally, guar gum has approximately 8 times the water-thickening potency of corn starch, and can be used in multi-phase formulations as an emulsifier preventing oil droplets from coalescing, and/or as a stabilizer in order to prevent molecular aggregation and particles from settling, and it can form gels in presence of calcium ions (Chaplin, 2006) [10]. GG is commonly used in cosmetics and foods as a thickener in USA and EU (additive code E412). In

foods, GG is an additive in the dairy industry (yogurts, kefir, and liquid cheese products), also to prevent ice crystal formation on sauces and dressing, meats, baked goods, ice creams, and in dry foods (soups, deserts, etc...). However, GG presents some problems to be handled, like low hydrophilicity and concomitantly slightly solubility in aqueous solutions (approximately at 1 mg/ml). A typical strategy to improve these properties is a derivatization procedure in order to introduce polar groups in the main structure of polymer. Two main choices can be used to derivatize biopolymers: enzymatic or chemical procedures. The enzymatic techniques involves point-to-point strategy by the use biocatalysts able to work in a water restricted environments which is a very regio- and stereo-selective technique (Baigorí *et al.*, 1996) [11]. However, in order to increase the solubility of GG, more extensive biopolymer modification is required which implies that chemical techniques are more suitable, and generally are more feasible to use at industrial scale. One possibility is the carboxymethylation of GG, a procedure in where the H atom of hydroxyl groups of D-galactose and D-mannose are partially substituted by -RCOOH. Consequently, the Carboxy Methyl Guar Gum (CMGG) derivative became very soluble in water and making clear and low viscosity solutions. Besides, CMGG is not able to form gels in presence of multivalent ions in aqueous solutions.

Previous studies about ALG-GG blends chemically modified or not made for different purposes were reported (Roy *et al.*, 2005; Bajpai *et al.*, 2006; George and Abraham, 2007; Sangeetha and Abraham, 2008) [6, 8, 12, 13]. A successful purification of Jacalin, a lectin, using ALG-CMGG in a fluidized bed technique was described (Roy *et al.*, 2005) [12]. Another report described the swelling and degradation of ALG-CMGG cross-linked with barium at different pHs and pretreatments (Bajpai *et al.*, 2006) [8]. Furthermore, encapsulation of BSA (bovine serum albumin) in ALG-GG cross-linked with glutaraldehyde was reported highly efficient (100%), and BSA release from the gel matrix was pH-dependent, and unsusceptible to freeze and thawing procedures (George and Abraham, 2007) [6]. In another interesting work of the same research group, crosslinked subtilisin crystal aggregates were entrapped in a 3:1 in ALG-GG gel matrix and found to be resistant to low pHs and potentially useful for oral delivery to the intestine (Sangeetha and Abraham, 2008) [13]. Additionally, alginate and GG has been reported both individually to reduce serum cholesterol, and to have positive effects on blood glucose (Shahzadi *et al.*, 2007; Paxman *et al.*, 2008) [14, 15].

Congo Red (CR) is an anionic secondary diazo dye with planar structure, soluble in many solvents, but yields red colloidal solutions in aqueous media by self assembly mechanism. The postulated mechanism for CR aggregation is by hydrophobic interaction involving the π - π bonds of the aromatic rings making planar structures (Skowronek *et al.*, 1998) [16]. Analogous mechanism was described in chemotherapeutic molecules containing aromatic motifs such us quinolones (*e.g.* ciprofloxacin, enrofloxacin) and anthracyclines (*e.g.* daunomicin, doxorubicin) (Skowronek *et al.*, 1998; Inglesby *et al.*, 2002) [16, 17]. Recently, CR was used to detect fibril proteins enriched in β sheet conformation useful in hystological studies of some neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's, Creutzfeldt-Jacob's, Huntington's and Parkinson's diseases (Frid *et al.*, 2007) [18]. Also, CR was used to bind and detect many enzymes (mannanases, dehydrogenases, celulases, etc...) which mechanisms are probably related in some extend to the presence of β -sheet conformation in their protein structures.

On the other side, bioactive molecules containing aromatic rings such as some polyketides like tetracycline and anthracyclines and quinolones represents highly used compounds in medicine because of antibacterial, and/or antitumor, and/or antiviral activities. However, most of

them display undesirable secondary toxic effects in non-targeted organs (e.g. heart, liver, kidneys, stomach, blood and stem cell lines, etc...) and unwanted physiological consequences during long-term treatments such as chemotherapies and/or recurrent pathologies which are restricting an extensive use. All of the mentioned drugs are sharing a common structure of at least one aromatic ring, and similar stacking phenomenon of CR made by the aromatic π - π interaction. The hydrophobic interaction and aggregation processes among molecules of antibiotic represent a serious problem for drug availability and disponibility in the body, and a challenge for the development of new and alternative drug delivery systems. Biopolymer blends can offer novel options in this field.

The aim of the present work is related to examine alginate-guar gum hydrogel blend microspheres containing CR as molecular cargo as a typical model for oral delivery of aromatic antibiotics. A carboxymethyl derivative of GG (CMGG) was synthesized and characterized by centesimal composition, derivatization degree, viscosity, surface tension studies, and FTIR. ALG-CMGG gel microsphere blends were optimized by controlled release kinetic and swelling studies *in-vitro*, and under different experimental conditions. The studies were complemented by optical and scanning electronic microscopy (OM and SEM), and the interactions between the hydrogel components were analyzed by viscosimetry and correlated with FTIR and Raman spectroscopies

2.- Materials and methods

2.1.- Materials

Congo Red (CR), the sodium salt of benzidinediazo-bis-1-naphthylamine-4-sulfonic acid ($C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$, MW: 696.66 g/mol, purity > 99%), was purchased from Merck (AG. Darmstadt). Low viscosity sodium alginate (ALG) (average M_n 1.0×10^5 Da) was obtained from Biochem (SA). All other reagents used were of analytical grade purchased from Sigma (St. Louis, MO) or Merck (Darmstadt), and Guar Gum (GG, average M_n $2.20 \pm 0.20 \times 10^5$ Da) was provided by Hindustan Gums & Chemicals (India).

CR stock solutions (1.0 g/l) and its dilutions were made in miliQ water and/or proper buffers. Calibration curve of CR was made in an UV-Vis Spectrophotometer (Beckman, USA) at λ_{max} 497 nm

2.2.- Synthesis of Carboxy Methyl Guar-gum (CMGG)

50.0 g of Guar Gum was taken in a three neck round bottom flask fitted with a condenser, a tube for nitrogen purging and a mechanical stirring. Isopropanol (100 ml) was added in the reaction mixture while stirring at 5.0 ml/min. 30 Minutes of soaking time was allowed, 30.0 ml of 0.25 % w/v aqueous sodium hydroxide solution was added through the condenser and the mixture was stirred for 10 mints more at room temperature. A dropping funnel was then attached through a fork and 17.0 g of chloroacetic acid in 100 ml of water neutralized to pH 7.0 ± 0.2 (1.0 % w/v NaOH) was added drop wise to this reaction mixture under nitrogen purging. The addition time altogether was 1 hour. Stirring was continued further for three hours and the reaction temperature was raised to 55 °C. The reaction mixture was then cooled and a light yellow solid separated by filtration through a Buckner funnel. The precipitate was washed twice with 80 % (v/v) isopropanol in water, and 50 % ethanol-water solution, and dried in a vacuum desiccator. The yield obtained was 43.0 g.

CMGG was further purified for analysis. Typically, 1.0 gm of CMGG was suspended in 5.0 ml of isopropanol and 15 ml of concentrated hydrochloric acid for 10 min; followed by washing

with water until free from chloride. The scheme of CMGG synthesis is displayed in Figure 1.

2.3.- Biopolymer formulations, microsphere formation

Different ratios of ALG:CMGG hydrogel blends (from 100:0 to 68.5: 31.5) were tested to determine optimal conditions for CR entrapment, microsphere stability.

Hydrogel microspheres were prepared by extrusion of the mixture through a 100 μm syringe attached to a pump (Watson-Marlow, UK). ALG (3.5%) and GG (0.5%) solution with or without CR (0.4 %) were dropped into a solution containing 50 mM CaCl_2 (0 $^\circ\text{C}$) under continuous stirring in order to avoid coalescence of gel beads. Microspheres were aged in calcium chloride solution for 48 h, followed by filtration on paper (Whatman #1). Filtered microspheres were kept in solution containing 50 mM CaCl_2 and 10 μM NaN_3 at 5 $^\circ\text{C}$. Alternatively, microspheres were lyophilized and/or air-dried at room temperature and then stored as it was mentioned before.

2.4.- Determination of degree of substitution in CMGG

The degree of surface functionalization on Guar Gum (GG) structure was confirmed by standard alkali titration. A weighed half from 1.0 g of CMGG sample was dissolved in excess of 100mM sodium hydroxide and stirred over a magnetic stirrer for 20 min. The unreacted excess of sodium hydroxide was back titrated against standard 100mM hydrochloric acid solution using methyl orange as indicator. A titration blank was simultaneously carried out without a CMGG sample. The other half portion of CMGG was dried in an oven at 102 $^\circ\text{C}$ to constant weight. This weight was taken as equal to the sample weight in alkali titration. The degree of GG substitution was estimated as follows:

$$\text{DS} = \frac{T M_1 (V_0 - V_1)}{W - [M_2 \cdot T (V_0 - V_1)]} = \frac{T \cdot 162 (V_0 - V_1)}{W - [58 T (V_0 - V_1)]} \quad (\text{I})$$

Where W is the weight of CMGG taken for test (calculated on dry material basis); V_0 , the volume of hydrochloric acid consumed in blank titration without CMGG sample; V_1 , the volume of the hydrochloric acid in titration of the test sample, T, the titer of the 100mM hydrochloric acid solution; M_1 , the molecular weight of the unsubstituted monomer unit (162); M_2 , the molecular weight of the substituting unit (58).

2.5.- Percentage Composition (C,H,N,S) Analysis

Percentage C,H,N,S analysis was carried out by combustion technique in the CHNS analyzer (model CHNS -932, M/s Leco corporation, U.S.A.) to find for presence of C,H,N. and S in general. Samples weighed in semi micro balance Paul Bunge (model 23, Hamburg, Germany) were taken in a tin cup and were completely combusted in a stream of oxygen from cylinder. Evolving element oxides were monitored in instrument IR devise and compared against standard supplied samples of acetophenon, and cystene supplied by Leco corporation. The results were collected in Table 1.

2.6.- Surface tension Studies

Surface tension lowering in water due to guar-gum and its derivative were studied as this center in one of the principle application area for guar gum compounds. GG and CMGG solutions (0.1

%) w/v) at defined pH in distilled water (carbon dioxide free) was used for determination of surface tension lowering of water in Dynamic Contact Angle Meter and Tensiometer (DCAT, Data Physics, Germany). The results were tabulated in Table 2:

2.7.- Viscosity studies

Analysis of GG and CMGG (2.0 % w/v) in aqueous solution were prepared in HPLC grade water and were degassed under vacuum. Viscosities of both solutions were measured using number LV-2 to LV-4 spindle in a Brookfield viscometer (model LVT, Brookfield, USA). The results were compared against the standard viscosity sample supplied by the manufacturer. The viscosity resultants were recorded at 30 °C and were tabulated in table 2.

In the ALG-CMGG blends, the apparent viscosities were determined by an Ubbelohde viscosimeter (S-100) with or without CR at 37 °C. All the used solutions were of 8.0 ml prepared as mentioned before, and the time of run of was followed by a chronometer. Relative viscosities of each blend were estimated by apparent viscosities of the solutions divided by the apparent viscosity of the solvent.

2.8.- Vibrational analysis: FTIR and Raman spectroscopies

For GG and CMGG, the FTIR studies were carried out in a FTIR Jasco (model 670 Plus, Jasco, Japan). Each compound was pressed into a pellet in FTIR grade Potassium Bromide (KBr, Pike technologies) and scanned with background correction at 256 number scan, against a high energy ceramic source and DLATGS detector. FTIR scans corresponding to GG and CMGG are showed in Figure 2.

Alternatively, infrared spectra of biopolymer formulations diluted in KBr pellets were recorded in the 4000 to 400 cm^{-1} range on a Bruker Equinox 55 FTIR spectrophotometer (Billerica MA, USA). The Raman spectra of the solids, run in the region between 3500 to 100 cm^{-1} , were obtained with a FRA 106 accessory mounted on a Bruker IFS 66 FTIR instrument (Billerica MA, USA), using the 1064 nm excitation line from an Nd-YAG laser. Infrared and Raman spectra were scanned with 4 cm^{-1} resolution.

2.9.- Scanning electron microscopy (SEM)

The surface morphology of freeze- and air-dried microspheres was determined using a scanning electron microscope (Philips SEM 505, Holland). Microspheres were sputtered with gold and scanned at an accelerating voltage of 25 kV.

2.10.- Optical microscopy (OM) of microspheres were performed in swelling characteristics of alginate–CMGG hydrogels

Swelling characteristics of ALG-CMGG microspheres were determined by a method described previously (Chen *et al.*, 2004) [19]. Dried test samples were incubated in 5.0 ml of a solution 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) for 12 h. Later, samples were filtered and blotted with a paper filter to absorb the excess water on the surface. Samples swelling ratios (Q_s) were calculated from the equation:

$$Q_s = \frac{W_s - W_d}{W_d} \quad (1)$$

Where W_s is the weight of the swollen sample and W_d is the weight of the dried test sample.

2.11.- CR Loading

CR entrapment efficiency was determined by dissolving 100 mg of microspheres in 5.0 ml containing 100 mM sodium phosphate buffer (pH= 7.4), and centrifuged at 10,000 xg for 10 minutes (5 °C). CR was spectrophotometrically assayed in the supernatant as previously mentioned. In order to evaluate the loading efficiency, equation 2 was used as follow:

$$\text{Entrapment Efficiency} = \frac{\text{CR concentration in the supernatant}}{\text{Theoretical CR concentration}} \quad (2)$$

2.12.- Time release kinetics

ALG-CMGG microspheres (200 mg) containing 0.4 % CR were incubated in a 5 ml solution containing 20 mM buffer and 154 mM NaCl at 37 °C as follows: Clark and Lubs (pH 1.2), phosphate (pH 6.8, 7.4, 8.0), TES (pH 6.8, 7.4, 8.0) under soft magnetic agitation for specified times.

Samples of 750 μ l were taken from 5.0 ml test vial and the volume was replaced by the respective buffer. Samples were centrifuged (10,000·xg for 5 min at 5 °C). The supernatants were collected and measured spectrophotometrically (497 nm) as mentioned before. All experiments were carried out by duplicate.

2.13.- Microspheres stability and CR release under different pHs

ALG-CMGG gel microspheres containing CR were incubated at pH 1.2 and 37 °C during 25 minutes, washed and transferred to 20 mM phosphate buffer (pH = 7.4). The amount of CR released from the microspheres was followed spectrophotometrically as mentioned before.

3.- Results and Discussions

The anionic derivative CMGG was obtained starting with GG following the scheme of Figure 1. CMGG derivative properties were analyzed by FTIR, elemental analysis and viscosity studies and compared with GG.

FTIR spectra of GG and CMGG showed some minor differences. In GG FTIR spectrum, the 3429 cm^{-1} band is assignment to the O-H stretching mode which is very wide probably because is highly hydrogen-bond. In CMGG, the introduction of an additional carboxylic group increased the hydrogen bonding interaction. Therefore, the band become wider and shift to 3407 cm^{-1} . Moreover, C-H stretching at about 2930 cm^{-1} shifts to lower wavenumber for the introduction of the $-\text{CH}_2-$ group (Figure 2).

Elemental analysis and percentage of C, H, N, and S was carried out by combustion technique and the results were enlisted in Table 1. Additionally, the anionic derivative CMGG was readily soluble in water and more particularly in the sodium hydroxide solution that indicating the presence of RCOO^- groups in alkali medium on the biopolymer surface (results not shown).

Derivatization of GG to the anionic type of product CMGG has significantly reduced the surface tension of water by nearly 50 % (72 dynes/cm to 36.59 dynes/cm, about 42 %) at a concentration level 0.359 g/l. While, GG showed a drop of water surface tension by 10 units (from 72.00 to 62.15 dynes/cm, about 13.7 %) when concentration of guar gum was decreased

to 0.278 g/l (about 22.6 %).

Viscosity analysis of 2.0 % (w/v) aqueous solution of GG was observed to be 30,000 cps as it forms strongly hydrogen bonded thixotropic gel in demineralized water. However, the surface modified variant CMGG evaluated in the same concentration and temperature (30 °C) showed a dramatic decrease of viscosity to 350-400 cps, indicating a pseudoplastic type fluidity.

Blends of ALG-CMGG in the range of 100:0 to 68:32 relative percentages were tested for optimal encapsulation of CR in presence of calcium chloride. Biopolymer blends containing higher percentages of CMGG than 32 % were not able to form stable hydrogels in our experimental conditions, and disregarded for further experiments. On the other side, 100 % ALG hydrogel microspheres are not able to keep gel morphology and constant cargo release kinetic under freeze and thawing procedures (data not shown). Encapsulation of 0.4 % CR was optimal in the 7:1 ALG:CMGG ratio (87.5:22.5 %) in presence of 50 mM calcium chloride. Optical microscopy of microspheres showed sphere-like morphology with a mean diameter of 25 µm and some heterogeneous CR dye distribution in the gel (data not shown). CR aggregation was previously described on 0.3 % saline solution concentrations or higher. CR supramolecular structures are engaged by stacking interactions along the main axis of the molecule tends to form rod-like or ribbon-like micellar structures (Skowronek *et al.*, 1998) [16]. However, micellar structures are time-course dependent (thermodynamically unstable), and their stability is strongly related to physicochemical environmental factors. Considering this fact, gel structure will play a key role in the controlled release of the drug (e.g. CR) among other factors. *In vitro* swelling assays in water showed the incorporation of 135 % w/w in dry ALG-CMGG microspheres without losing gel structure (data not shown). This results could allow to target the large portion of the intestine (colon) with the ALG-CMGG blend for controlled release of CR-like drugs (e.g. doxorubicin), in where water exchange is the main mechanism of the physiological function, and probably the CR-like drug release will be controlled not only by gel structure but also by dissolution of the drug micellar structures and the molecular interactions among the matrix components with the cargo.

SEM analysis of microspheres showed rougher structure of ALG gel microspheres rather than ALG-CMGG blend gel beads which are displaying smoother surfaces in both microscopy magnifications (Figure 3). Also, the difference on image surface morphologies is confirming the presence of CMGG in the alginate gel microspheres.

The relative viscosity in the selected ALG-CMGG blend solutions in presence or absence of CR were analyzed and showed linear responses in both cases. However, incorporation of CR to the ALG-CMGG blend reduces the relative viscosity in about one third (Figure 4). These results are suggesting strong interaction amongst CR and ALG-CMGG solution. FTIR and Raman spectroscopies were used to test the hypothesis of CR and ALG-CMGG interaction.

The formulation containing CR was analyzed simultaneously by infrared and Raman spectroscopies because of complementary information provided by both techniques. FTIR reveals interactions between matrix components while Raman shows interaction between CR and the matrix. CR bands are not observed in infrared spectra because it's low concentration. The interaction between different groups in the formulation is obtained for the comparison of the corresponding Raman spectra of CR recrystallized from water. For the correct interpretation of matrix interactions is important to have good set of assignments. These were based in literature sources (Lin-Vien *et al.*, 1991; Herranen *et al.*, 1995, Sajid, 1997; Smith, 1999;

Bonancêa *et al.*, 2006) [20-24].

New bands were observed in the Raman spectra of the formulation containing CR at 1562, 1321, 1291 (sh), 1265 and 1176 cm^{-1} as consequence of molecular interaction of CR with the matrix. The relative low intensity of the new bands evidenced the anisotropic environment of CR molecules in a complex biopolymeric matrix compared with the reference spectra. New CR band at 1562 cm^{-1} (30 cm^{-1} downshifts) was assigned to phenyl ring, 1321 cm^{-1} (12 cm^{-1} downshift) to naphthyl ring, 1291 cm^{-1} (sh) (6 cm^{-1} upshift) and 1265 cm^{-1} (20 cm^{-1} downshift) were associated to C-C biphenyl groups. Finally, 1176 cm^{-1} was assigned to phenyl N-azo (18 cm^{-1} upshift). According to the origin of the above mentioned bands, the molecular interactions of CR with the matrix can be considered mainly centered in the aromatic groups.

CR bands for $\nu(-\text{N}=\text{N}-)_{\text{azo}}$ modes at 1453 and 1403 cm^{-1} does not shift significantly when the dye is inside the matrix, therefore this group does not interact with the biopolymer blend. The conclusion is also supported by structural considerations of the CR molecule considering the lone pair on nitrogen of azo groups is restricted by steric hindrance made by phenyl groups and naphthyl groups (Ojala *et al.*, 1995) [25].

The main interaction between CR and the matrix is based on the aromatic motifs of CR associated with non-polar sections of the polymer blend determined by spectroscopic analysis. Considering the egg box structure of alginate gels made by ionic gelation, and the low molecular weight and the planar structure of CR, it can be possible to hypothesize that the CR molecule could be located in the free non-ionic space between two molecules of alginate, in where also CMGG is not allowed to fit because of its molecular weight and hydrophilicity. Interaction within cellulose and direct blue 1, another member of linear diazo dyes family containing planar π -electron system, were previously reported. Direct blue 1 adsorption onto cellulose fibrils determined by Raman and UV-Vis spectroscopies was attributed to hydrogen bonding and by hydrophobic interaction between biphenyl groups of the dye and apolar regions of cellulose (Abbot *et al.*, 2004) [26].

CR kinetic release from ALG-CMGG gel microspheres were studied *in-vitro* simulating physiological stomach fluid (pH 1.2) and intestine fluid conditions (pH 7.4) in phosphate buffer. Under stomach fluid simulated conditions (pH 1.2) at 37 °C, no changes on microspheres morphology and CR release to the media were observed in 25 minutes incubation (data not shown). On the contrary, when the pH is increased above 6.0 a CR release from the microspheres to the media was detected. The CR kinetic release is showing hyperbolic behavior at pH 7.4 with 68.2 % CR released in about 8 hours (Figure 5).

Legend to figures

Figure 1. Scheme of derivatization of guar gum by carboxy methylation.

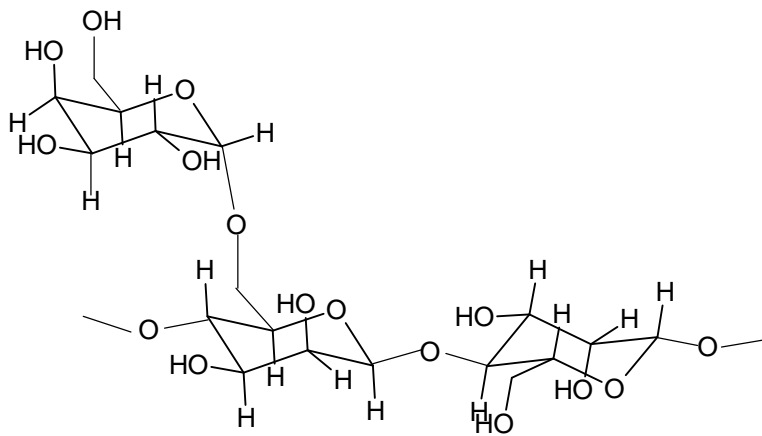
Figure 2. FTIR spectroscopies of guar gum (blue line) and carboxy methyl guar gum (green)

Figure 3. SEM microscopy of ALG (A, B) and ALG-CMGG (C, D) microspheres.

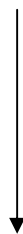
Figure 4. Relative viscosity change of ALG-CMGG blend solution in the absence (●) or presence (■) of CR, and the ratio between both curves (◆).

Figure 5. Time release of CR from ALG (■) and ALG-CMGG (●).

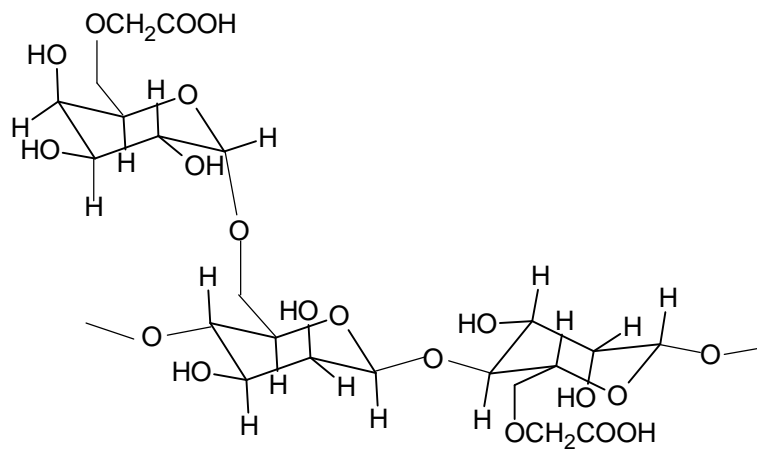
Figure 1



Guar-gum (GG)



Cl-CH₂-COONa (SMCA)
(NaOH (aq), N₂ purging)



Carboxy methyl guar gum (CMGG)

Figure 2.

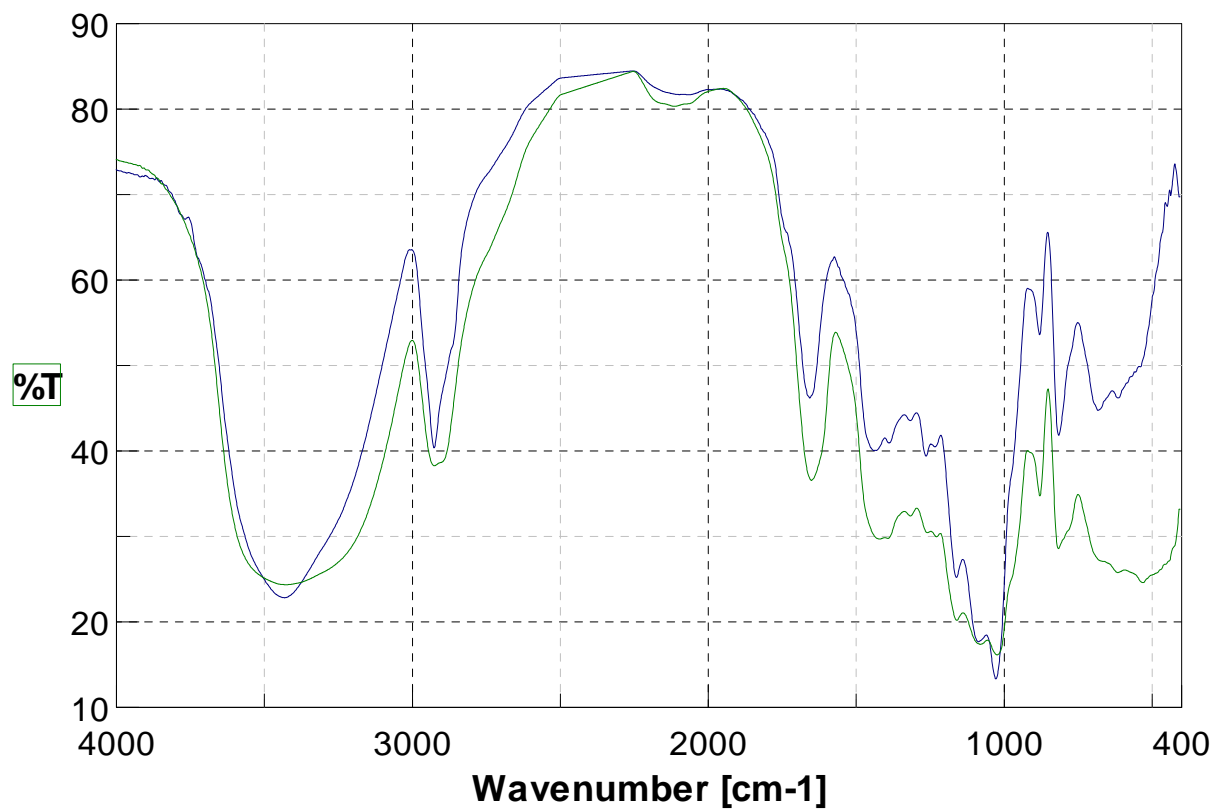


Figure 3. SEM microscopy of ALG (A, B) and ALG-CMGG (C, D) microspheres

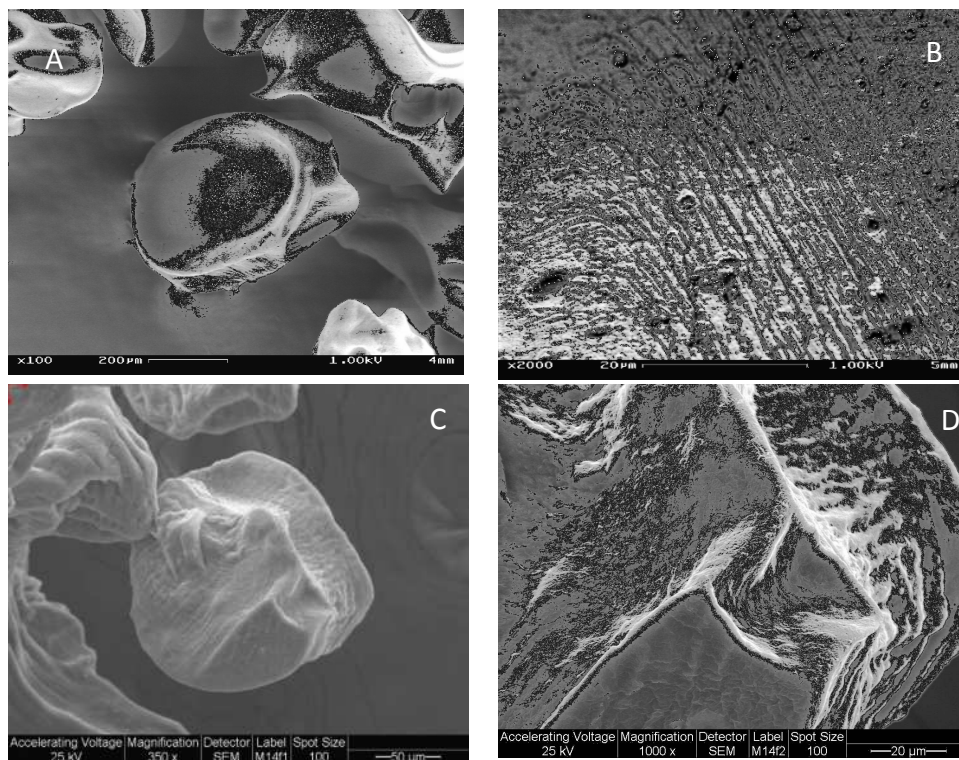


Figure 4.

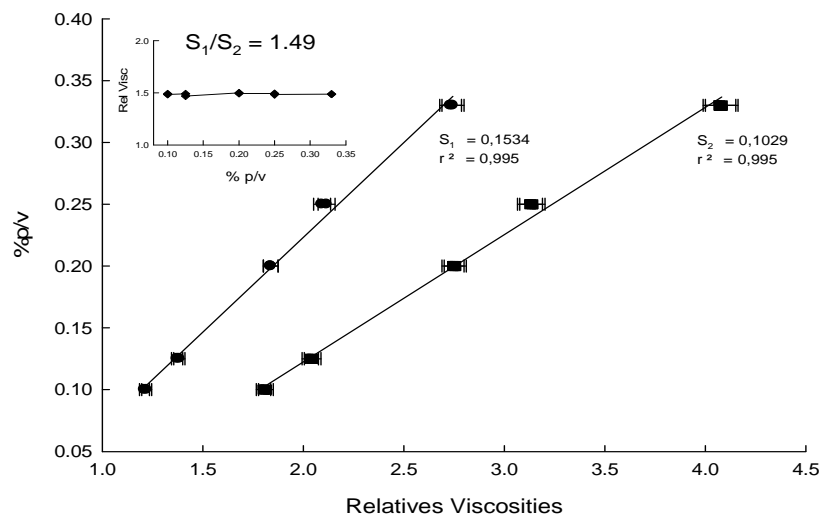


Figure 5.

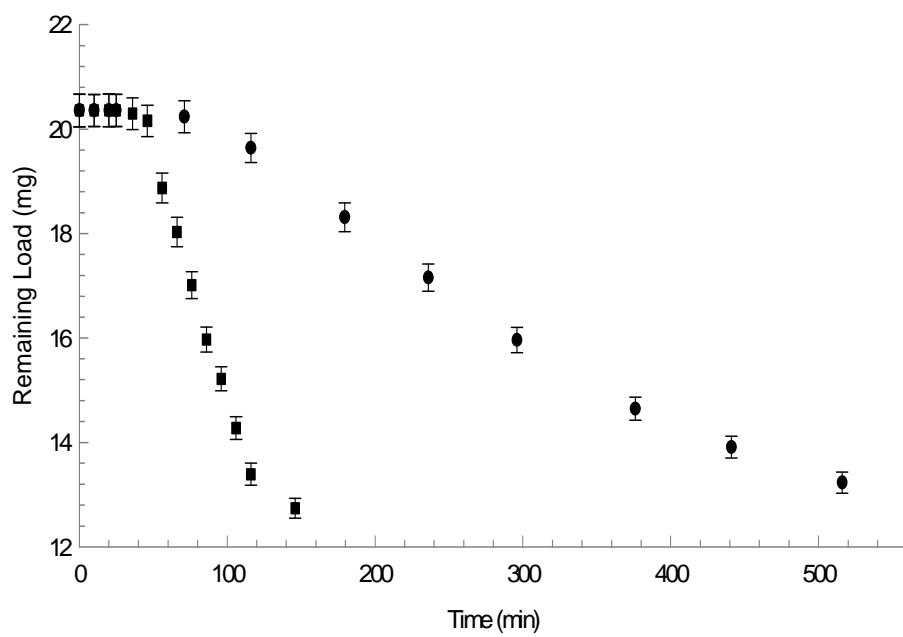


Figure 6.

4.- Conclusions

CMGG derivative bring more soluble biopolymer, easy to handled because of the low viscosity and making clear solutions, relevant properties for large scale use. CMGG stabilize ALG gels and let to perform freeze-dry procedures without losing gel structure allowing to slow release of the CR cargo. Viscosimetric and spectroscopic analysis are revealing the interaction amongst the ALG-CMGG biopolymeric blend with CR based on the presence of aromatic rings of CR. Controlled release experiments developed *in-vitro* are showing an improve slow release of CR from the ALG-CMGG compared to ALG microspheres with less the 50 % in more than 8 hours.

Acknowledgments

Support from CONICET and ANPCyT (BID 1728/OC-AR, PIP-0214, Argentina) to GRC is gratefully acknowledged.

References

1. Findaly SM. Drug discovery technologies, industry research, global. Frost and Sullivan (<http://www.frost.com/prod/>). 2010.
2. Panilaitis B, Castro GR, Solaiman D, Kaplan DL. Biosynthesis of emulsan biopolymers from agro-based feedstocks. *J Appl Microbiol* 2007; 102: 531-7.
3. Bosio VE, Islan GA, Martinez YN, Castro GR. Control release applications in food technology. In: Venkatesar Rao, editor *Advances in Bioprocesses in Food Industries*. Api Asiotech, New Dehli. 2011. p. 1-13.
4. Dornish M, Kaplan D, Skaugud Ø. Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products. ASTM alginate and chitosan standard guides. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 944: 388-97.
5. Ferreira Almeida P, Almeida AJ. Cross-linked alginate-gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol. *J Control Release* 2004; 97: 431-9.
6. George M, Abraham TE. pH sensitive alginate-guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs. *Int J Pharm* 2007; 335: 123-9.
7. Xu Y, Zhan C, Fan L, Wang L, Zheng H. Preparation of dual crosslinked alginate-chitosan blend gel beads and *in vitro* controlled release in oral site-specific drug delivery system. *Int J Pharm* 2007; 336: 329-37.
8. Bajpai SK, Saxena SK, Sharma S. Swelling behavior of barium ions-crosslinked biopolymeric sodium alginate-carboxymethyl guar gum blend beads. *React Funct Polym* 2006; 66: 659-66.
9. Pongjanyakul T, Puttipatkhachorn S. Xanthan-alginate composite gel beads: molecular interaction and *in vitro* characterization. *Int J Pharm* 2007; 331: 61-71.
10. Chaplin M. *Water Structure and Behavior: Guar Gum*. London South Bank University 2006.
11. Baigorí MD, Castro GR, Siñeriz, F. Purification and characterization of an extracellular esterase from *Bacillus subtilis* MIR-16. *Biotechnol Appl Biochem* 1996; 24: 7-11.
12. Roy I, Sardar M, Gupta MN. Cross-linked alginate-guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin. *Biochem Eng J* 2005; 23: 193-8.
13. Sangeetha K, Abraham TE, 2008. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications. *Int J Biol Macromol* 2008; 43: 314-9.
14. Shahzadi N, Butt MS, Sharif MS, Nasir M. Effect of guar gum on the serum lipid profile of

- Sprague Dawley rats. *LWT - Food Scie Technol* 2007; 40: 1198-205.
- 15 Paxman JR, Richardson JC, Dettmar PW, Corfe BM. Alginate reduces the increased uptake of cholesterol and glucose in overweight male subjects: a pilot study. *Nutr Res* 2008; 28: 501-5.
 - 16 Skowronek M, Stopa B, Konieczny L, Rybarska J, Piekarska B, Szneler E, Bakalarski G, Roterman I. Self-assembly of Congo Red - A theoretical and experimental approach to identify its supramolecular organization in water and salt solutions. *Biopolymers* 1998; 46: 267-81.
 - 17 Inglesby MK, Zeronian SH, Elder TJ, 2002. Aggregation of direct dyes investigated by molecular modeling. *Textile Res J* 2002; 72: 231-9.
 - 18 Frid P, Anisimov SV, Popovic N, 2007. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 2007; 53: 135-60.
 - 19 Chen S-C, Wu Y-C, Mi F-L, Lin Y-H, Yu L-C, Sung H-W. A novel pH-sensitive hydrogel composed of *N,O*-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *J Control Release* 2004; 96: 285-300.
 - 20 Lin-Vien D, Colthup NB, Fateley WG, Grasselli JG, 1991. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, New York.
 - 21 Herranen J, Kinnunen J, Mattsson B, Rinne H, Sundholm F, Torell L. Characterisation of poly(ethylene oxide) sulfonic acids. *Solid St Ion* 1995; 80: 201-12.
 - 22 Sajid J, Elhaddaoui A, Turrell S, 1997. Investigation of the binding of congo red to amyloid in Alzheimer's diseased tissue. *J Mol Struct* 1997; 408-9: 181-4.
 - 23 Smith B. *Infrared spectral interpretation*, CRC Press, Boca Raton. 1999.
 - 24 Bonancêa CE, do Nascimento GM, de Souza ML, Temperini MLA, Corio P. Substrate development for surface-enhanced Raman study of photocatalytic degradation processes: congo red over silver modified titanium dioxide films *Appl Cat B* 2006; 69, 34-42.
 - 25 Ojala WH, Ojala CR, Gleason WB. The X-ray crystal structure of the sulfonated azo-dye congo-red, a non-peptidic inhibitor of HIV-1. *Antivir Chem Chemother* 1995; 6, 25-33.
 - 26 Abbott LC, Batchelor SN, Jansen L, Oakes J, Lindsay JR, Moore JN. Spectroscopic studies of direct blue 1 in solution and on cellulose surface: effects of environment on bis-azo dye. *New J Chem* 2004; 28: 815-21.

APENDICE 3

Binding and Encapsulation of Doxorubicin on Smart Pectin Hydrogels for Oral Delivery

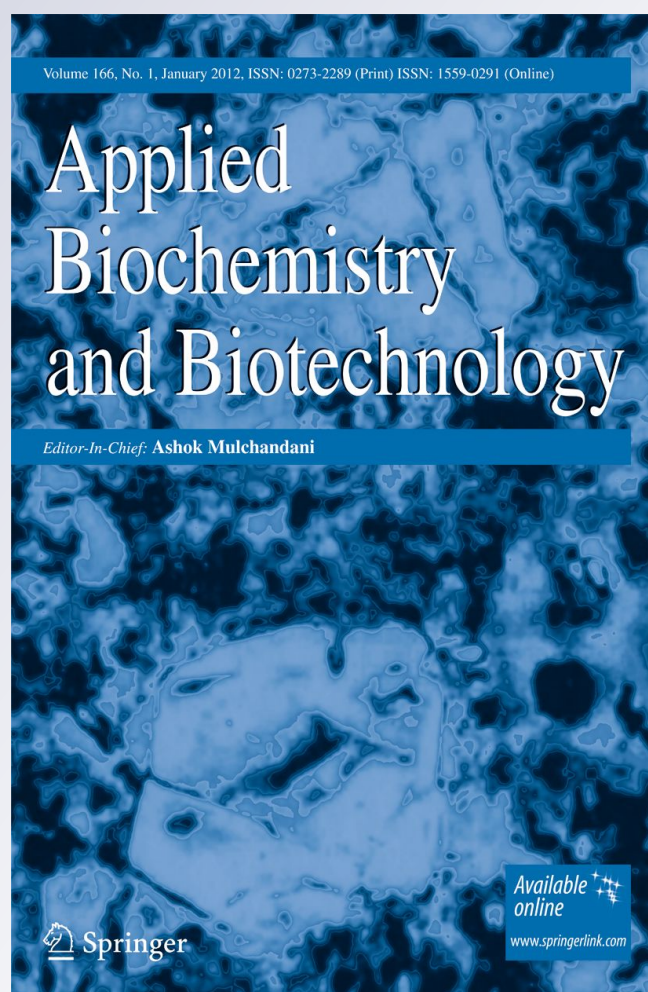
**Valeria E. Bosio, Victoria Machain,
Azucena Gómez López, Ignacio
O. Pérez De Berti, Sergio G. Marchetti,
Magdalena Mechetti & Guillermo**

**Applied Biochemistry and
Biotechnology**

Part A: Enzyme Engineering and
Biotechnology

ISSN 0273-2289

Appl Biochem Biotechnol
DOI 10.1007/s12010-012-9641-8



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Binding and Encapsulation of Doxorubicin on Smart Pectin Hydrogels for Oral Delivery

Valeria E. Bosio · Victoria Machain ·
Azucena Gómez López · Ignacio O. Pérez De Berti ·
Sergio G. Marchetti · Magdalena Mechetti ·
Guillermo R. Castro

Received: 6 November 2011 / Accepted: 23 February 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Pectins (Pec) of 33 to 74 % esterification degree were tested with doxorubicin (Dox), a very high toxic drug widely used in cancer therapies. Pec with 35 and 55 % DE were selected because of the Dox binding higher than Pec microspheres of 35 and 55 % obtained by ionotropic gelation with Ca^{+2} have 88 and 66 % Dox loading capacity. Kinetic Dox release showed more than 80.0 and about 30.0 % free drug from 35 % and 55 % Pec formulations at pH 7.4, and 37 °C after 1-h incubation, respectively. Besides, Dox release decrease to 12 % in 55 % Pec microsphere formulation after 1-year storage at 4 °C. FTIR analysis of Pec–Dox complex showed hipsochromic shifts for the $\nu_{\text{C=O}}$, $\delta_{\text{N-H}}$ and $\nu_{\text{C-C}}$ vibrational modes compared to Dox spectrum suggesting strong interaction between the drug cargo and the matrix. Rheological studies of Pec and Pec–Dox samples flow behavior exhibited a shear-thinning nature. Fifty-five percent of Pec showed higher viscosity than the viscosity for 35 % Pec in all range of temperatures analyzed, and decreased when the temperature is raised. Besides, Pec–Dox complexes have higher viscosity values than those of the corresponding Pec samples, and viscosity curves as function of shear rate for 35 % Pec–Dox are above the curves of 55 % Pec–Dox. In both cases, the results are confirming significant interaction between the cargo and the matrix, which also was established in viscoelastic dynamic analysis.

Keywords Drug delivery · Doxorubicin · Pectin · FTIR · Rheology

V. E. Bosio · V. Machain · G. R. Castro (✉)
CINDEFI (Institute of Applied Biotechnology, UNLP—CONICET CCT La Plata), School of Sciences,
Universidad Nacional de La Plata, Calle 50 # 227, 1900 La Plata, Argentina
e-mail: grcastro@gmail.com

A. G. López · M. Mechetti
Lab. de Física de Fluidos y Electrorreología, Depto. de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología,
Universidad Nacional de Tucumán, Av. Roca 1800, T4001MVB Tucumán, Argentina

I. O. P. De Berti · S. G. Marchetti
CINDECA (CONICET, CCT La Plata), Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 # 257, La Plata 1900,
Argentina

Introduction

New trends in the pharmaceutical technologies are involving biomaterials in drug formulations because of their remarkable properties such as high chemical structure diversity, stereospecific functionalities, biological properties, wide span of molecular weights, and mostly lack of toxic side effects [1]. Particularly, mild synthesis and biodegradability, plus convenient rheological and thickening properties, make biopolymers very attractive molecules useful for a myriad of potential applications. Polymer-based particles synthesis can be summarized in four basic mechanisms: covalent and ionotropic crosslinking, polyelectrolyte complex, and self-assembly of modified polysaccharides [2, 3].

Drug encapsulation offers many advantages, such as: (1) the protection of the drug against *in vivo* degradation, (2) the reduction of potential toxic side effects associated with the drug doses, (3) the increase in patient comfort by avoiding repetitive bolus injection or the use of perfusion pumps, (4) more favorable drug pharmacokinetics, and (5) optional design of drug sustainable release. The main difficulties arise in controlling the molecule release, while also to find a compromise between encapsulation efficiency, drug leakage induced by diffusion and/or by matrix degradation, the biocompatibility and biodegradation of particle components and the formulation processes [4–8]. Drug formulations depend on the choice of suitable carrier showing high encapsulation efficiency, improved bioavailability, desired target, retention time, and environmental factors among other factors. Among them, rheological properties influence each step of the pharmaceutical processing, such as filling, mixing, and gelling. Also, rheological properties (e.g., viscosity) of the matrix affect the formulation behavior in the digestive tract, and the profile release of loaded drugs [4, 9, 10]. However, desired micro- and nano-medicines are generally formulated by hit and trial method but without rationale [11, 12].

Doxorubicin hydrochloride (Dox) is used in the treatment of many solid tumors, such as breast, lung, stomach, or ovarian cancer and sarcoma. Dox inhibits cell growth by DNA intercalation and inhibition of topoisomerase II among other action over cell metabolism. Unfortunately, Dox is highly toxic, by biodistribution to non-targeted tissues causing severe side effects, which are limiting the anthracycline dosage and use. At least two Dox commercial formulations were in the market: liposomal Doxil[®] and albumin-based Abraxane[®], but other formulations are still on different trial phases and reviewed recently [13]. However, many studies are still carried out with Dox, giving rise to various Dox-containing micro-nanoparticles, such as polymeric carriers, inorganic magnetic nanoparticles where Dox is adsorbed onto their surface, or even solid lipid nanoparticles containing Dox as an ion-pair complex [13]. Recent trends in Dox delivery involve the development of environmentally sensitive matrices showing dependence of pH, temperature, or ions [14–16]. Since Dox is a hydrophilic and hydrosoluble molecule, the main challenge is still entrapping Dox with a significant encapsulation rate and yield into such micro- and/or nanoparticulate systems with high shelf-life stability, and establish kinetic release. Therefore, new formulation strategies via Dox encapsulated in particulate drug delivery systems are still required to be developed. Among them, oral delivery has the advantages of being non-invasive, simple to be handled, no specialist required, and special places to be administered which is particularly relevant in immuno-suppressed patients and IV administration impose the risks of secondary infections.

Natural biopolymers are promising candidates for the development of sustainable drug delivery systems [17]. Particularly, food-grade biopolymers like alginate, pectin, guar gum carrageenin has numerous advantages such as they are cheap, biodegradable, renewable, easy to handle, non-toxic, and commercially available in large quantities. Additionally, some

food-grade biopolymers are native environmentally sensitive molecules implying that non-chemical modification and purification is required for pharmaceutical purposes.

The aim of the present work is to examine the interaction of selected biopolymers with Dox as cargo molecule model. Twelve biopolymers as potential matrices for Dox cargo were screened, and the best system was selected to develop a hydrogel microsphere carrier, as a typical model for delivery of aromatic anticancer drugs. Rheological studies and FTIR analysis were used to characterize the matrix. Pec gel microspheres were selected and optimized based on loading capacity and controlled release kinetic. The kinetic analysis was developed under in vitro physiological conditions. Studies of the microspheres were complemented by optical and fluorescence microscopy.

Materials and Methods

Chemicals

Biopolymers used in this work were: low viscosity sodium alginate (Alg) (average M_n 1×10^5 Da) obtained from Biochem (USA); gelatine (Gel) from Parafarm (Argentina); arabic gum (Ag) from Droan (Argentina); guar gum (GG) from Nutrial (Argentina); garrofin gum (GarG) and carrageenin (Carr) from Saporiti (Argentina); pectins (Pec) with 33.0, 35.4, 55.3, and 67.2 % esterification degree (ED), from CPKelco (Argentina), pectin 74 % ED (Pec 74) from Sigma-Aldrich (USA). Doxorubicin (Dox) was a gift from LMK pharmaceuticals (Argentina). Carboxy Methyl Guar Gum (CMGG) was kindly provided by Prof. Arup Mukherjee (University of Calcutta, India). All other reagents used were of analytical grade purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) or Merck (Darmstadt, Germany).

Dox was quantified by spectrofluorimetry (Perkin Elmer LS 50B, Japan) using λ_{exc} 454 nm and λ_{em} 588 nm with appropriate calibration curve [18].

Preparation of Biopolymer Aqueous Solutions

Polymer concentrations between 0.5 % and 2.0 %, were made in MiliQ water quality (Millipore, USA) supplemented with 10 μ M sodium azide and kept at 5 °C up to use (see Table 1).

Determination of the Interaction Dox-Biopolymers

Different 0.5 to 2.0 % biopolymer solutions (375 μ l) were mixed 155 μ M Dox solution (125 μ l) for 15 min and 2 h at 25 °C (Table 1). Later, 1.0 ml of child acetone or ethanol was

Table 1 Biopolymers used in the binding test of Dox

Biopolymers	Concentration (% <i>p/v</i>)
GEL	2.0
ALG	1.5
PEC	1.5
CARR	1.0
GUM	0.5

added to precipitate the biopolymer-cargo molecule complex, and then centrifuged at $10,000\times g$ for 5 min. Dox concentration was measured in supernatant.

For pectins, 2.0 % biopolymer containing 300 μM Dox in 50 mM MOPS buffer (pH=7.0) was incubated at 25 °C under magnetic agitation (500 rpm) for 2 h.

Biopolymer Formulations, Microsphere Formation

Pectin hydrogel microspheres from 33.0 % to 67.2 % DE were tested to determine optimal conditions for microsphere stability and Dox entrapment.

Pectins were dissolved in 50 mM MOPS buffer (pH=7.0) with agitation and mixed with or not a volume of Dox solution.

Hydrogel microspheres were prepared by extrusion through a 100- μm syringe attached to a pump (Watson-Marlow, UK). Pec solutions with or without Dox (300 μM) were dropped into a solution of 100 mM Tris-HCl buffer (pH=8.9) containing 50 mM CaCl_2 at 0 °C under continuous stirring (200 rpm) for 20 min. Microspheres were aged in calcium chloride solution for 1 h, followed by filtration on paper (Whatman no. 1). Dox concentration was assayed in the supernatants. Filtered microspheres were kept in solution containing 50 mM CaCl_2 and 10 μM aN_3 at 5 °C until the assays. Alternatively, microspheres were acetone-air-dried at room temperature over night and then stored as mentioned before.

Dox Loading

Dox entrapment efficiency was determined by dissolving 100 mg of microspheres in 5.0 ml containing 100 mM sodium phosphate buffer (pH=7.4), and centrifuged at $10,000\times g$ for 10 min (5 °C). Dox was spectrofluorometrically assayed in the supernatant as previously mentioned. The loading efficiency was evaluated as follows:

$$\text{Entrapment efficiency} = \frac{\text{Dox concentration in the supernatant}}{\text{Theoretical Dox concentration}} \quad (2)$$

Optical and Fluorescence Microscopy

Optical and fluorescence microscopies were carried out with an UV source leaned and filters (495–505 nm) for fluorescence observation respectively (Leica DM 2500, Germany).

Rheological Measurements

Controlled-stress rheometer (Anton Paar MCR 301) with a 43-mm parallel plate (PP43/GL-SN16497 measurements system) and a P-PTD120-SN80470786 accessory system was used to characterize the rheological properties of Pec solutions. The gap used was 0.7 mm. For steady shear measurements, shear rates ranging from 1 to 1,000 s^{-1} were used and the resulting stress was recorded. All rheological measurements were carried out at 37 °C and the reported curves were mean values of four measurements. Shear stress, shear rate, and apparent viscosity data are obtained directly from the instrument.

Vibrational Analysis: FTIR Spectroscopies

Pec and Pec-Dox formulations were analyzed by FTIR (JASCO FT/IR—4200). Pellets were prepared by mixing the samples at 5.0 % *w/w* with potassium bromide (KBr, Pike

technologies, UK) and scanned with background correction at 256 number scans, against a high-energy ceramic source and DLATGS detector. FTIR scans corresponding to Pec and Pec–Dox were recorded in the 4,000–400 cm^{-1} with 4- cm^{-1} resolution. Also, Dox formulations were analyzed by FTIR at the SMIS beamline (Soleil, French National Synchrotron Facility, France).

Dox Kinetic Release Studies from Pectin Microparticles

Dehydrated spheres, 200.0 mg, were weighted in an analytical scale (Adventurer OHAUS) of high precision (0.1 mg) and were placed in a Reacti-road flask of 4 ml of capacity, with 1.0 ml of buffer solution. The kinetic of Dox's release was ran at 37 °C and at 500 rpm. To certain intervals, samples of 300 μl were withdraw and replaced with an equal volume of fresh buffer. Dox concentration was determined by fluorescence.

Storage Effect in Dox Stability and Release

Dox kinetic release experiments were performed in microparticles shelf-preserved at 4 °C for 6 months.

Statistics

Two or three independent experiments were conducted with a minimum of duplicates ($N=2$) for each data point. In the case of pectins screening assay, four independent experiments were conducted with duplicates ($N=2$) for each data point. Data for these measurements were analyzed using a Student's t test. Statistically significant values were defined as $p<0.05$. Data in the graphs represent the mean \pm standard deviation.

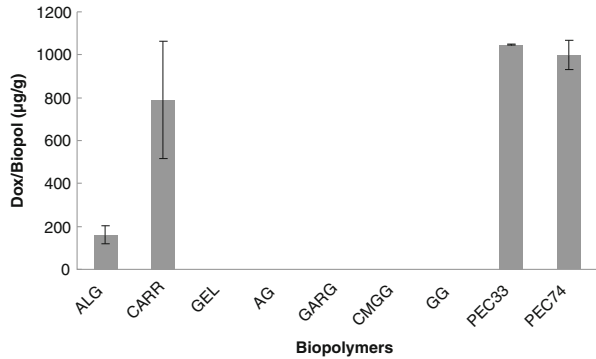
Results and Discussion

Screening for Biopolymer-Dox Binding

Nine biopolymers with different chemical structure were challenged to Dox. Only three biopolymers presented binding with Dox after 15-min incubation (data not shown), but the number increases to four biopolymers with Dox after 2-h incubation: two pectins of 33.0 % and 74 % ED displayed high interaction, Carr showed intermediate and Alg a low interaction with the Dox molecule (Fig. 1). The Dox binding of 37.9, 39.0, and 46.8, 49.0 % were found for 33 and 74 Pecs during 15 and 120 min, respectively. For Carr and Alg, the Dox binding were 20.0, 0.0 and 24.6, 20.0 % in 15 and 120 min, respectively. The differences in the binding among the polymer–Dox interaction within the incubation time are suggesting a kinetic-driven process. After 15 min, the binding process probably is still in a transient equilibrium, where the interaction is more energetically that kinetically favorable in our experimental conditions.

Pectins were selected for further binding studies, and the interaction between Pecs with different ED and Dox was screened (Fig. 2). However, the results of the interaction between Pec and Dox were not obvious visually, and also under Student t test, no significant differences at 95 % confidence were found.

Fig. 1 Precipitation of Dox-biopolymer complexes after 2-h incubation



Gelation Conditions and Release Kinetic Studies

Iontropic gelation of pectins showed Dox encapsulation higher than 50 % for Pecs with 35 and higher ED (data not shown). Particularly, 35 and 55 Pecs showed 88 and 66 % Dox encapsulation, respectively.

In order to maximize the Dox encapsulation in the Pec matrixes, buffers at different pHs and water-miscible organic solvents were used in the gelling solution. However, no significant differences were observed in all systems tested (data not shown). These results are indicating that the ionization Dox molecule is not relevant for the gel encapsulation or entrapment. In the presence of organic solvents, Pec gelation rate is faster rather than in aqueous medium. Nevertheless, no differences on Dox encapsulation in water and organic solvents were found. These results are suggesting that Dox encapsulation in the tested pectins is not related to the Pec gelation process, meaning Dox physical entrapment, but probably related to some interaction between the drug and the matrix.

On the other side, gelation of Pecs with different ED showed significant differences of Dox encapsulation. Pecs with low ED showed better gelation capacity in presence of Ca^{+2} compared to high ED Pecs. Additionally, pectin microspheres with low and medium ED displayed more resistance to mechanical to shear stress compared to highly methylated ones (data not shown). However, the effect of methyl groups (ED) in the biopolymer could be relevant in the Pec–Dox interaction since they can be associated to hydrophobic properties of pectins, by making hydrophilic/hydrophobic clusters in the Pec molecule. Consequently, Pec hydrophobic patches could increase the interaction with the Dox aromatic ring.

Based on the encapsulation results, 35 and 55 Pecs were selected for further formulation studies.

Fig. 2 Effect of pectin methylation degree in Dox–pectin complex formation

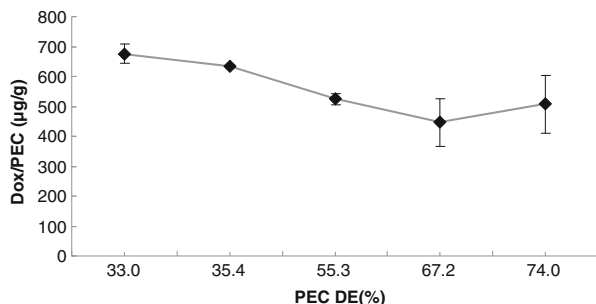
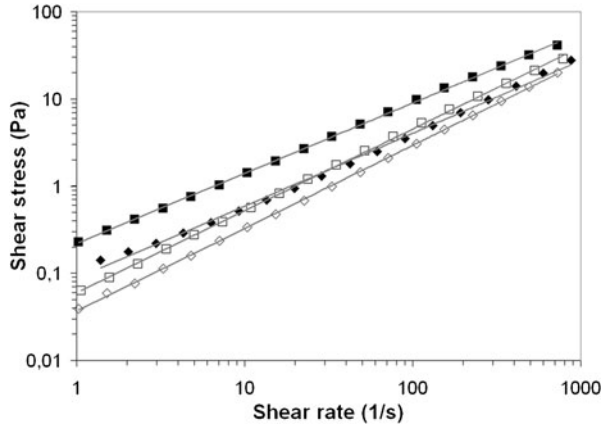


Fig. 3 Flow behavior of pectin and pectin-doxorubicin complex. Shear stress as a function of shear rate. Symbols: 35 % Pec (white square); 35 % Pec-doxorubicin (black square); 55 % Pec (white diamond); 55 % Pec-doxorubicin (black diamond)



Rheological Studies

The apparent viscosity (pascal seconds, Pa s), shear stress (pascal) and shear rate (per second) at different rpm were recorded. The shear rate was increased between 0 and $1,000 \text{ s}^{-1}$ within a period of 175 s for recording the “up” curve then it was reduced from $1,000-0 \text{ s}^{-1}$ for recording the “down curve” in the same period of time to study the time-dependent nature of the samples. A slight thixotropy (the area between the curves was negligible) was detected only for 35 and 55 % Pec-Dox. For these samples, the down curve was used. Natural log curves of shear stress against shear rate have been presented in Fig. 3.

Apparent viscosity was found to decrease with an increase in shear rate indicating a shear thinning behavior. The apparent viscosity was greater for the low-grade pectin and was found to increase almost half decade for the systems containing doxorubicin. For 55 Pec, less resistance to shear flow is observed. These observations were reinforced by the results obtained from dynamic viscoelastic properties of the samples, not shown here. That Pecs with increasing ED which exhibited lower viscosity were in agreement with similar observations reported previously [9, 10]. The apparent viscosity at 1 s^{-1} was approximately 0.06 and 0.04 Pa s for 35 and 55 Pecs, respectively, but those values grows up to 0.22 Pa s for 35 Pec-Dox and 0.102 Pa s for 55 Pec-Dox and has been presented in Fig. 4.

Fig. 4 Flow behavior of pectin and pectin-doxorubicin complex. Apparent viscosity as a function of shear rate. Symbols: 35 % Pec (white square); 35 % Pec-doxorubicin (black square); 55 % Pec (white diamond); 55 % Pec-doxorubicin (black diamond)

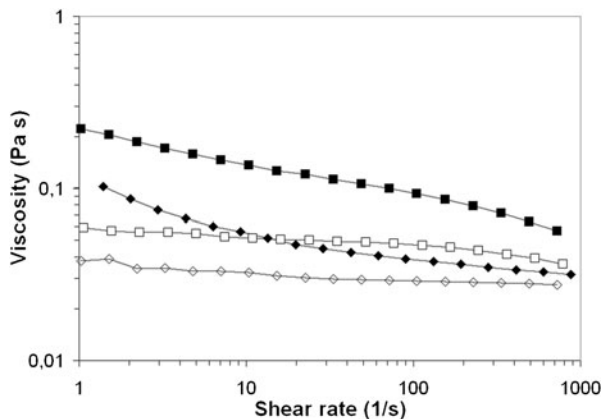


Table 2 Rheological characteristics of pectins with and without doxorubicin

Samples	Flow behavior index	Consistency index K (Pa s)	R^2
Pec 35%	0.939	0.060	0.9997
Pec 55 %	0.952	0.037	0.9998
Pec 35 % + doxorubicin	0.807	0.218	0.9997
Pec 55 % + doxorubicin	0.833	0.087	0.9972

Rheology Model

The shear stress–shear rate data obtained during experimentation was fitted to the power law model to determine the consistency coefficient (K) and flow index (n). The constitutive equation of this model is $\tau = K(\dot{\gamma})^n$, where τ is the shear stress (pascal), $\dot{\gamma}$ the rate of shear (per second), K the consistency index (pascal per second ^{n}) and n the flow behavior index which is a measure of the degree of the non-Newtonian behavior. For shear-thinning fluids, the flow index n lies between zero and unity with values further removed from unity indicating a more pronounced non-Newtonian behavior.

Least square regression analysis was applied in log form and the consistency index, the flow behavior index, and the correlation coefficient (R) were evaluated. They have been reported in Table 2. As can be seen the value of n is less than 1. Thus, the studied substances were found to exhibit shear-thinning behavior. The Pec–Dox samples showed more pronounced shear-thinning characteristics as can be observed in Fig. 4.

From the rheological analysis, 55 Pec was selected as matrix for Dox encapsulation.

Spectroscopies Studies: FTIR Analysis

FTIR analysis confirmed the presence of an interaction between the 55 Pec and Dox (Table 3). Characteristic Dox N-H group peak shifted to a higher value from 1,615 to 1,628 cm^{-1} ($\Delta\nu=13 \text{ cm}^{-1}$). Also, the 1,722 cm^{-1} Dox carbonyl group peak shifted to 1,733 cm^{-1} ($\Delta\nu=11 \text{ cm}^{-1}$).

Table 3 Major FTIR peaks assignments for Dox molecule, 55 % HM pectin, and formulation Dox/HM pectin at pH = 7.4

Wavenumbers (cm^{-1})			$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Assignments
Dox	HM pectin	Formulation		
3,389	–	3,380		δ (N–H)
3,330	–	3,269		δ (H–O)
2,932	2,936	2,929		σ (C–H)
1,722	1,743	1,733	11–10	σ (C–C), ν (–COOCH ₃)
1,615	1,609	1,628	13–19	δ (N–H), ν (–COOH), ν ($\phi = \text{O}$) and phenyl breathing modes
1,408	–	1,459, 1,443	~43	σ (C–C)
–	1,328	1,331		σ (C–O–C)
1,077	1,100	1,099		σ (C–O)

In addition, the carboxyl group of 55 Pec shifted from 1,609 to 1,628 cm^{-1} ($\Delta\nu=19 \text{ cm}^{-1}$). Bands associated to the aromatic Dox motifs shifted from 1,743 to 1,733 cm^{-1} ($\Delta\nu=10 \text{ cm}^{-1}$), suggesting a possibly interaction made by the pectin hydrophobic pockets (highly methylated carboxylates) with the hydrophobic motif of anthracycline: the aromatic ring (Table 3).

Pec–Dox complex showed too an hipsochromic shifts for the $\sigma_{\text{C-C}}$ vibrational mode compared to Dox spectrum.

FTIR studies are strongly suggesting a complex interaction among the cargo and the matrix (Table 3) [19–21].

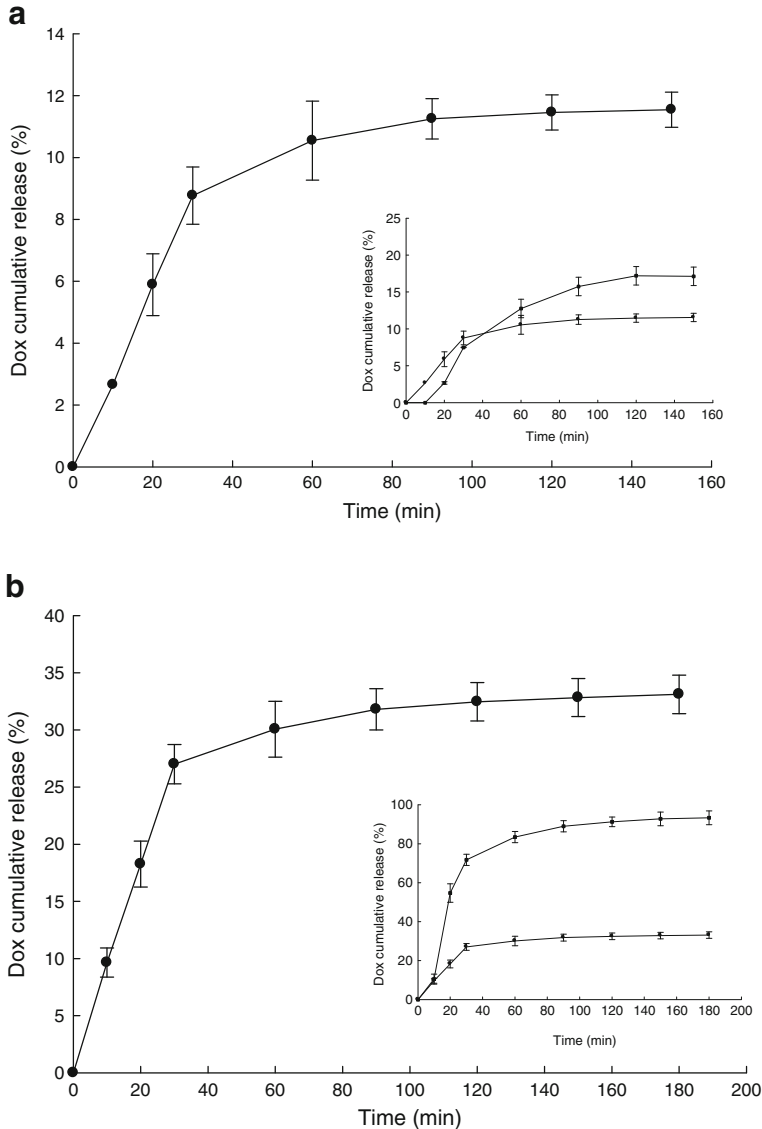


Fig. 5 Dox kinetic release profiles from 35 % and 55 % Pec gel microspheres at pH 2.0 (a) and 7.4 (b) and 37 °C, respectively. Symbols: 35 % Pec (white square) and 55 % Pec (black circle)

Dox Release Studies

Pecs of 35 and 55 % ED released approximately 17.0 and 12.0 % Dox, respectively, after 2-h incubation in buffer at pH 2.0 and 37 °C (Fig. 5a). Later, Dox release plateau was reached (Fig. 5), suggesting that Dox is mostly associated to the external layers in the 35 Pec microspheres. This fact can be explained by the high interaction between calcium ions and pectin chains making high cross-linked gel, in consequence the Dox molecule could be extruded from the inner microsphere layers. On the contrary, 55 % Pec showed lower amount of Dox release in 2 h, and because of high ED (20 %) the ionic interaction of the pectin molecule chain with Ca^{+2} is less strong and the incidence of hydrophobic group potentially is higher than from the 35 % Pec.

Also, the results shown in Fig. 5 are indicating that both 35 and 55 % Pecs microspheres are stable at least for 2 h under our experimental conditions under acidic conditions (pH 2.0).

Under intestinal pH (≈ 7.4), the differences on Dox release from 35 % to 55 % ED Pecs are more drastics: more than 80 % Dox release from microspheres were observed in 35 % ED Pec, meanwhile about 30 % Dox release were observed on 55 % ED Pec. Also, 55 % ED Pec matrix formulation showed very stable and constant Dox release values lower than 35 % at least in 3 h (Fig. 5b).

Storage Conditions and Dox Loading

Dox release from 55 % Pec gel microspheres stored for 6 months at 4 °C was 12 % in 3 h under the same experimental acid conditions. The results are indicating that the gel microsphere structure was preserved along this period of time, and the positive effect of biogel aging on Dox release (Fig. 6).

Conclusions

In the present work, Dox encapsulation in pectin gels was found correlated to the inverse relationship between calcium concentration and pectin esterification degree. Pectins with intermediate ED (35 and 55 %) showed high Dox encapsulation inversely proportional to the ED. On the other side, Dox release from 35 % Pec is about 2.5 times faster compared to than in 55 % Pec at pH 7.4 suggesting an effect of carboxylate esterification on drug release. The

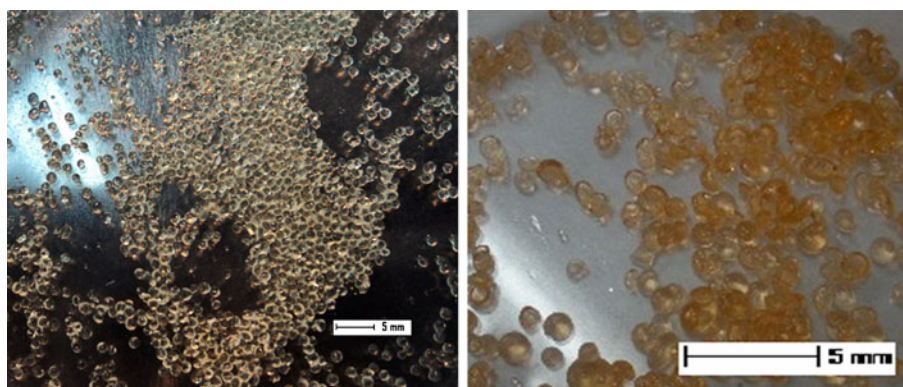


Fig. 6 Optical microscopy for 55 % PEC particles with and without Dox (*left and right*, respectively)

hydrophobic interaction of 55 % Pec with Dox should be higher than 35 % Pec, considering 20 % of ED difference. Also, the high ED could impact on microsphere structure reducing the gel stability, but no differences on gel microsphere stability in both types of microspheres in the time frame tested were observed. A compromise between ionotropic gelation (calcium concentration) and esterification degree of pectins should be considered in order to obtain microspheres with high loading capabilities but also good gel stability. Fifty-five percent Pec showed 66 % Dox encapsulation and excellent stability after 6 month storage. These results allowed to considered oral administration of Dox as an alternative in colon chemotherapies.

Vibrational spectroscopy and rheological analysis of Pec–Dox complex were significant since they allowed to establish type of interactions and fluid behavior which is relevant in order to understand the interactions between the cargo (Dox) and the matrix (55 % Pec), and determine the behavior of the formulation under physiological environments.

Based on the results presented in the present work, 55 % Pec biogels seems to be an excellent candidate for the development of Dox encapsulation in gel matrix. Studies on matrix aging conditions, new hybrid materials using the Pec–Dox system, effect of Dox–Pec formulation on mammalian cell cultures are under way in our laboratories.

Acknowledgments The present work was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), and Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT) of Argentina. We thank Dr. Paul Dumas (SMIS beam line, Soleil Synchrotron Facility, France) for his kind support and expertise during the sample analysis. We thank Mrs. Graciela Guanaja from CPKelco (Buenos Aires, Argentina) for her kind help and the donation of pectin samples; and to Dr. Mario Malaspina (Laboratorio LKM S.A.) and Dr. Nicolas Martinez from Quality Pharma Laboratories for the doxorubicin samples used in the present work.

References

- Williams, D. F. (2009). *Biomaterials*, *30*, 5897–5909.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Ziyong, C., & Zhang, D. (2008). *Advanced Drug Reviews*, *60*, 1650–1662.
- Dornish, M., Kaplan, D., & Skaugrud, O. (2001). *Annual New York Academy of Sciences*, *944*, 388–397.
- Chi, H., Moturi, V., & Lee, Y. (2009). *Journal of Controlled Release*, *136*, 88–98.
- Peng, C., Zhao, Q., & Gao, C. (2010). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *353*, 132–139.
- Nielsen, O. S., Reichardt, P., Christensen, T. B., Pink, D., Daugaard, S., Hermans, C., Marreud, S., van Glabbeke, M., Blaye, J., & Judson, I. (2006). *European Journal of Cancer*, *42*, 2303–2309.
- Vrignaud, S., Anton, N., Gayet, P., Benoit, J. P., & Saulnier, P. (2010). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *79*, 197–204.
- von Maltzahn, G., Park, J. H., Lin, K. Y., Singh, N., Schwöppe, C., Mesters, R., Berdel, W. E., Ruoslahti, E., Sailor, M. J., & Bhatia, S. N. (2011). *Nature Materials*, *10*, 545–552.
- Bockki, M., Jongbin, L., Sanghoon, K., Kwang-Geun, L., SungHo, L., & Suyong, L. (2011). *Bioresource Technology*, *102*, 3855–3860.
- Fraeye, I., Doungla, E., Duvetter, T., Moldenaers, P., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). *Food Hydrocolloids*, *23*, 2069–2077.
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, *75*, 1–18.
- Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A. (2010). *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, *1*, 149–173.
- Malam, Y., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2009). *Trends in Pharmacological Sciences*, *30*, 592–599.
- Seo, S., Lee, C.-S., Jung, Y.-S., & Na, K. (2012). Thermo-sensitivity and triggered drug release of polysaccharide nanogels derived from pullulan-g-poly(l-lactide) copolymers. *Carbohydrate Polymers*, *87*, 1105–1111.
- Manchun, S., Dass, C. R., & Sriamornsak, P. (2012). Targeted therapy for cancer using pH-responsive nanocarrier systems. *Life Sciences*. doi:10.1016/j.lfs.2012.01.008.

16. Cai, H., Caihua Ni, C., & Zhang, L. (2012). Preparation of complex nano-particles based on alginic acid/poly[(2-dimethylamino) ethyl methacrylate] and a drug vehicle for doxorubicin release controlled by ionic strength. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *45*, 43–49.
17. Oh, J. K., Lee, D. I., & Park, J. M. (2009). Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*, *34*, 1261–1282.
18. Karukstisu, K. K., Thompson, E. H. Z., Whiles, J. A., & Rosenfeld, R. J. (1998). *Biophysical Chemistry*, *73*, 249–263.
19. Kayal, S., & Ramanujan, R. V. (2010). *Materials Science and Engineering: C*, *30*, 484–490.
20. Purcell, J. M., & Fishman, M. L. (1987). *Carbohydrate Research*, *159*, 185–190.
21. Lin-Vien, D., Colthup, N. B., Fateley, W. G., & Grasselli, J. G. (1991). *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*. Boston: Academic.

APENDICE 4

Effects of Organic Solvents on Immobilized Lipase in Pectin Microspheres

L. Costas · V. E. Bosio · A. Pandey · G. R. Castro

Received: 20 December 2007 / Accepted: 8 April 2008 /
Published online: 10 June 2008
© Humana Press 2008

Abstract Lipase from *Brevibacillus agri* 52 was found stable up to 90% diethylenglycol (DEG), glycerol (GLY), and 1,2 propanediol (1,2 PRO) at 37 °C for 1 h and the stability was reduced only approximately 20% after 12 h incubation, but in 40% dimethylsulfoxide (DMSO), lipase activity was stable only for 1 h. Inhibition of the biocatalysts with dimethylformamide (DMF) was detected at 20% solvent concentration. In water immiscible systems, the stability of lipase in *n*-hexane, *n*-tetradecane and *n*-heptane resembles the water activity, but in the presence of isobutanol, 1-hexanol, and butylbutirate, the stability was significantly reduced. Lipase 52 precipitates in the presence of 50% acetone or ethanol/water mixtures, but enzymatic activity was partially recovered by adding 20% GLY, DEG, 1,2 PRO, or DMSO to the reaction mixture. Furthermore, by increasing DEG in 70% DMF/DEG mixtures, the lipase activity was protected. Encapsulation of lipase in pectin gels cross-linked with calcium ions brings three to four times more enzymatic activity in 70% water miscible organic solvents compared to aqueous systems.

Keywords Non-aqueous biocatalysis · Lipases · Enzyme stability · Solvent mixtures · Pectin gels · Gel microspheres · Enzyme encapsulation

Introduction

The use of biocatalyst outside from their biological environments enables their catalytic ability and delicate specificity to be extended toward synthetic chemistries using new

L. Costas · V. E. Bosio · G. R. Castro (✉)
CINDEFI (Institute of Applied Biotechnology) and INIFTA (UNLP-CCT La Plata-CONICET),
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina
e-mail: gcastro@gmail.com

A. Pandey
Regional Research Laboratory, Trivandrum 695 019, India

G. R. Castro
Department of Biomedical Engineering, Tufts University, Medford, MA, USA

substrates in novel reaction systems and non-natural unknown products. Even though the promise of new and exciting uses for biocatalyst is wide open, reduced reaction rates, short long-term stability, and reuse in reactors appear as barriers for the implementation of non-aqueous biocatalysis on biotechnological processes [1].

Hydrolases, like lipases, are gaining more attention in the biotechnology field because of enantioselectivity, substrate specificity, and physicochemical properties [2]. Lipases are commonly used in many fields ranging from detergents to food and pharmaceutical and chemical industries with more than billion dollar market. However, the little diversity of commercially available lipases are restricting potential uses for synthesis in organic solvents. Most of commercial lipases are produced from fungi or yeast cells and a few from Gram-negative bacteria [3]. Additionally, little information is available on lipases produced by Gram-positive bacteria, particularly from *Bacilli*, one of the most relevant extracellular industrial enzyme producers of the microbial world [4]. Recently, *Bacillus licheniformis* S-86 showed esterase activity in 50% dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol, glycerol (GLY), methanol, and propylene glycol [5]. In addition, lipase synthesized by the hyperthermophile *Pyrobaculum calidifontis* VA1 was found active for 1 h at 80% of acetonitrile, ethanol, dimethylformamide (DMF), DMSO, methanol, and 2-propanol [6].

However, operational and environmental parameters of the biocatalysts have been reported to modify relevant properties of the enzymes for biotechnological purposes like the enantio-, prochiral-, and regio-selectivity. In some cases, the physicochemical properties and composition of the organic media used as the reaction media determine the efficiency of the enzymatic conversion and product of the reaction [7].

Enzyme immobilization is a feasible industrial alternative with the advantages of enhancing enzyme half-life, improving downstream processing of products, and reusing the bioreactor in many cycles. Immobilization of the biocatalysts in matrixes can be developed using two major strategies, either by entrapment or by adsorption. Entrapped biocatalysts have the benefit of higher protection of the protein structure and biological activity compared to the adsorption method. A successful example of lipase entrapment developed in inorganic matrix based on sol-gel chemically modified silica was reported [8]. However, this technique is time-consuming because it involves the chemical modification of the matrix to be protein-friendly and also requires further processing of the sol-gel support and waste treatment of the reagents. On the other side, natural polymers offer significant advantages to encapsulate active proteins instead of chemical- modified matrixes including low cost of equipment, less expensive waste treatments, using soft techniques for cross-linking, and tailorability of molecular structure. Pectin, a heteropolysaccharide, has the advantages of gelling in presence of divalent cations, is biodegradable, non-toxic, and can be obtained from higher terrestrial plants.

Pectin is a heteropolysaccharide extracted from plant cell walls and used in many industrial applications as thickener or gelling agent. It chemically contains α -D-galacturonic acid as backbone linked through α -1,4-glycosidic linkages [9]. Some of the carboxylic groups of galacturonic acid are methylated, and depending on natural sources, pectins may have different side chains of arabinose, galactan, arabinogalactan, glucose, mannose, and xylose [10]. Commercial pectins in aqueous solution with esterification degree between 30% and 35% form gels in the presence of divalent cations. In addition, the strength of the gel increases with the decrease of temperature and pH and increase in ion concentration like calcium [11].

In a previous screening procedure, a wild-type bacterium characterized as *Brevibacillus agri* 52 was able to synthesize an extracellular lipase resistant to DMSO (Baigori, personal communication). Considering the relevance of solvent-resistant enzymes for biotransformations, lipase 52 was used as model to explore the enzyme stability in binary and ternary

miscible and immiscible water–organic solvents systems and encapsulated in pectin gels in the presence of organic solvents.

Materials and Methods

Microorganisms, Culture Conditions, and Extract Preparation

The initial assay to detect lipolytic activity was done on tributyrin agar plates containing per liter of distilled water, 5 g peptone, 3 g yeast extract, 1% (*w/v*) tributyrin, and 15 g agar. The plates were grown overnight at 37 °C, and the lipolytic activity was indicated by a clear halo around the colonies. Then, the cells were grown on Luria–Bertani (LB) agar medium during 16 h at 37 °C and picked from the agar plate and pre-cultured in 10 ml of LB medium for 4 h at 37 °C with absorbance at 560 nm (A_{560}) between 8.60 and 9.00. Those cells were then used to inoculated 150 ml of fresh LB medium during 19 h at 37 °C (early stationary phase) in a rotary shaker at 120 rpm. The resulting culture was centrifuged (Sorvall RC5C, Du Pont) at 8,000×g for 15 min (4 °C), and the cell-free supernatant was maintained at –20 °C until use and used as lipase extract.

Enzyme Assay

Lipase hydrolytic activity was measured spectrophotometrically at 405 nm with *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) as substrate at 37 °C in 50 mM Tris–HCl buffer (pH=7.1), 0.4% (*w/v*) Triton X-100 and 0.1% (*w/v*) arabic gum [12]. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of *p*-NPP per minute.

Protein Determination

Protein concentration was determined with Coomassie brilliant blue G-250 using bovine serum albumin (Fraction V) as standard [13].

Effect of Temperature, pH, and Ionic Strength on Enzymatic Activity

Activity assay were done at temperature between 30°C and 80°C in 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.1).

The effect of pH on the enzyme activity was tested at 50 °C in the range of pH 6.0–10.6, using the following buffers: 50 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (pH=6.0), 50 mM Tris–HCl, (pH=7.1, 8.0 and 8.9), and 50 mM glycine–NaOH (pH=9.6 and 10.6).

The optimal ionic strength was determined in 50 mM Tris–HCl buffer (pH=8.9) in 25 to 500 mM of NaCl at 50 °C.

In all cases, the enzymatic activity was estimated using the *p*-NPP method.

Stability Assays in Water-Miscible Solvents

Supernatant containing lipase activity was diluted properly with the organic solvent system and incubated at 37 °C for 1 h. Residual activity was assayed using the *p*-NPP method.

A proper dilution of lipase extract was incubated at 37 °C in presence of each immiscible organic solvent with constant magnetic stirring. After 1 h, the residual lipase activity was measured with the method mentioned above.

Effect of Water-Miscible Solvents on Lipase Stability

Lipase extract was incubated at different concentrations of each organic solvent during 1 and 12 h at 37 °C. After that time, the residual lipase activity was measured.

The organic solvents tested were acetone, DMF, DMSO, diethylenglycol (DEG), ethanol, glycerol (GLY), and 1,2-propanediol (1,2 PRO).

Effect of Mixed Solvents on Lipase Stability

The extract containing lipase activity was incubated in mixed solvents for 1 and 12 h at 37 °C. After that time, the residual lipase activity was measured by *p*-NPP method described above.

Preparation of Pectin Hydrogel Beads and Enzyme Activity

Citrus pectin powder was dissolved in water with agitation and mixed with the same volume of buffer 50 mM Tris–HCl buffer (pH=8.9). The pectin solution (1.5%) was drop-wise into 0.25 M CaCl₂ containing glycerol with gentle agitation at room temperature. The gel beads formed were filtrated and incubated 1 h with acetone at 4 °C. The beads were maintained at the same temperature after solvent evaporation.

Enzyme-loaded pectin hydrogel beads were prepared suspending the crude extract containing lipase activity in pectin solution in the ratio 1:1 (v/v). The solution containing lipase activity was drop-wise into 0.25 M CaCl₂ containing glycerol with gentle agitation at room temperature. The beads formed were treated in the same manner as blank pectin hydrogel beads.

Lipase activity in enzyme-loaded pectin hydrogel beads was determined, incubating 50 mg of beads in 50 mM Tris–HCl buffer, pH=8.9 during 1 h at 37 °C. Then, the beads were centrifuged, and the supernatant was removed. New buffer and 100 µl of 1 mM *p*-NPP in acetone were added. After 30 min of incubation at 37 °C with gentle agitation, the beads were centrifuged again, and the supernatant was read against the blank in a spectrophotometer at 405 nm.

Lipase stability in enzyme-loaded pectin hydrogel beads was determined, incubating 50 mg of beads in each solvent at 37 °C during 1 h. After this time, the supernatant was removed, and the residual activity was measured described above.

Reagents

All reagents were of analytical or microbiological grade from Sigma (St. Louis, MO, USA) or Merck (Darmstadt, Germany).

Results and Discussion

To optimize lipase 52 operational parameters, pH, temperature, and ionic strength were determined. The maximum lipase activity in the extract was found in the range of 37°C to 65°C, pH 8.9 and 50 mM NaCl (data not shown). Using the optimum values, lipase 52 activity was determined in the presence of organic solvents with different physicochemical properties. The criteria adopted was to select solvents with wide range of log *P*, between –2.66 (very hydrophilic solvent like glycerol) to 7.6 (very hydrophobic, e.g. *n*-tetradecane)

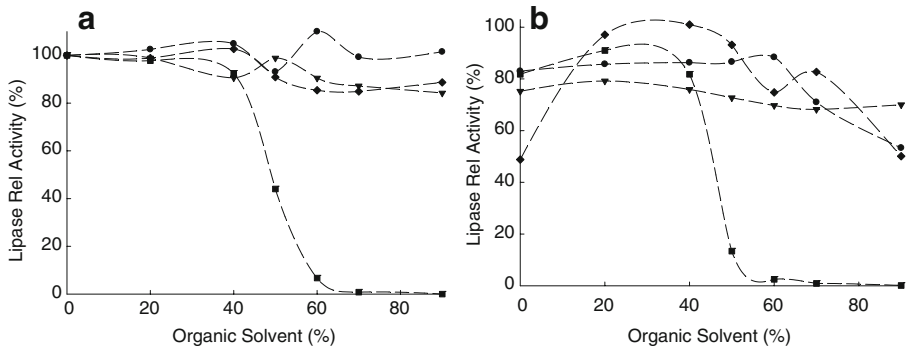
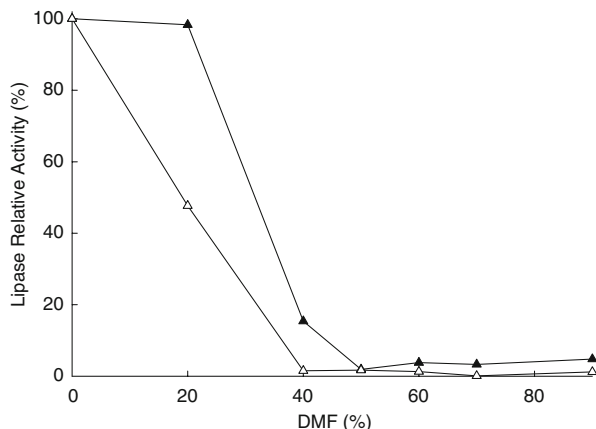


Fig. 1 Lipase stability in water miscible organic solvents after 1 h (A) and 12 h (B) incubation, respectively. Square DMSO, diamond 1,2 PRO, circle DEG; and inverted triangle GLY

[14]. Lipase 52 stability was assayed at 0% to 90% concentrations of water-miscible organic solvents: acetone ($\log P=-0.23$), DEG ($\log P=-1.98$), DMF ($\log P=-1.038$), DMSO ($\log P=-1.378$), ethanol ($\log P=-0.24$), GLY ($\log P=-2.66$), and 1,2 PRO ($\log P=0.67$). Furthermore, the enzymatic activity was tested in presence of the following immiscible solvents butyl butyrate ($\log P=1.78$), *n*-heptane ($\log P=4.0$), 1-hexanol ($\log P=1.8$), isobutyl alcohol ($\log P=0.79$), and *n*-tetradecane ($\log P=7.6$).

Lipase 52 stability was tested in water-soluble organic solvents at 1 to 12 h incubation at 37 °C (Figs. 1 and 2). In presence of DEG, GLY, and 1,2 PRO, the lipase stability remained for 1 h and decrease about 20% after 12 h of incubation (Fig. 1A, B). In DMSO, the lipase stability is reduced drastically after the solvent overpass 40% concentration. A more dramatic effect of organic solvent on the reduction of lipase 52 stability was found on DMF: less than 20% and 0% activity remains after 1 and 12 h by incubation at 40% DMF concentration at 37 °C, respectively (Fig. 2). Similarly, in a previous report, lipase from *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 incubated in hydrophilic solvent–water mixtures, e.g., acetone, ethanol, and isopropanol, was activated in the 25% to 50% solvent range, but at higher solvent concentrations, enzyme stability was solvent-dependent [18]. More recently, lipase produced by *Serratia marcescens* ECU1010 was found very stable in solvent

Fig. 2 Lipase stability in DMF after 1 h (filled triangle) and 12 h (empty triangle) incubation, respectively



mixtures acetone, ethanol, DMSO, isopropanol, and methanol at 30 °C for 24 h [19]. In agreement with our results, the activity of *Streptomyces rimosus* R6-554W lipase was reduced to 63% and 4% by incubation in 50% DMSO and DMF, respectively, for 18 h at 25 °C [20]. In the last case, loss of enzyme activity in homogeneous solvent mixtures could be correlated to the decrease of the solvation water-layer from the protein surface, thereby rigidifying the protein structure and/or denaturing the enzyme by solvent–protein interaction.

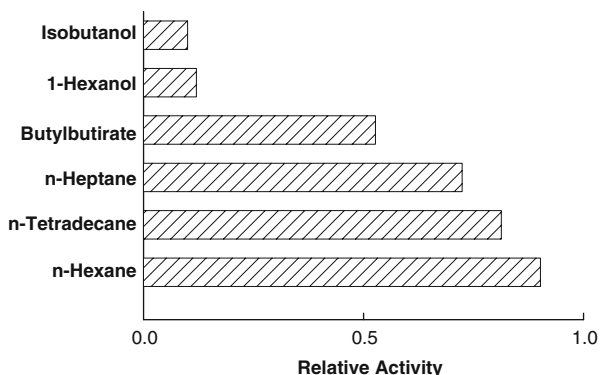
Another problem associated with some water-miscible organic solvents is the precipitation of proteins forbidding the development of those systems for biotransformation. In our case, the lipase extract became turbid at acetone and ethanol concentrations higher than 50%; under these conditions, the enzymatic activity was not able to be measurable.

In non-miscible water solvents, lipase 52 stability was reduced in all cases after 1 h incubation. The enzyme stability is reduced to about 10% to 15% by incubation in 1-hexanol and isobutanol. However, in the presence of *n*-hexane and *n*-tetradecane, the stability of lipase 52 resembles the activity in pure water systems (Fig. 3).

It is well-known that the biocatalyst specificity depends on the properties of the environment, and solvents play a crucial role in enzymes to determine activity and specificity [15]. However, lipase 52 cannot be used in the presence of organic solvents like acetone, ethanol, and DMF because the enzyme was inactivated and/or precipitated. Considering solvents like 1,2 PRO, DEG, and GLY, where lipase 52 activity was maintained for almost 12 h, it could be possible to “rescue” the enzyme activity using organic mixtures among solvents and mimicking the water effect in the reaction mixture [1]. The effects of 20% concentration of “protective” solvents in 50% acetone and ethanol–water mixtures on lipase 52 stability are presented in Fig. 4. In acetone, lipase 52 stability was higher than 70% for 1 h in the presence of 20% concentration of GLY, DEG, DMSO, and 1,2 PRO (Fig. 4A). However, in 50% ethanol, the results can be arranged in two groups (Fig. 4B). At high log *P* (DMSO and 1,2 propanediol), the enzyme stability was lower than 40% compared to the aqueous system. On the contrary, at lower log *P*, the lipase 52 stability was maintained higher than 50%. However, the “activity rescue” by solvents of lipase 52 activity was better in acetone compared to ethanol, both with very close log *P*. However, the presence of OH groups in the ethanol probably increases the protein–solvent interaction by hydrogen bridges changing structural molecular movement of the biocatalysts [16].

In another experiment, stability of lipase 52 was studied in DEG-DMF water system at 1 and 12 h, keeping the organic concentration at 70% in solution but changing the ratio DEG-

Fig. 3 Lipase stability in non-miscible aqueous solvent systems after one hour incubation at 37 °C



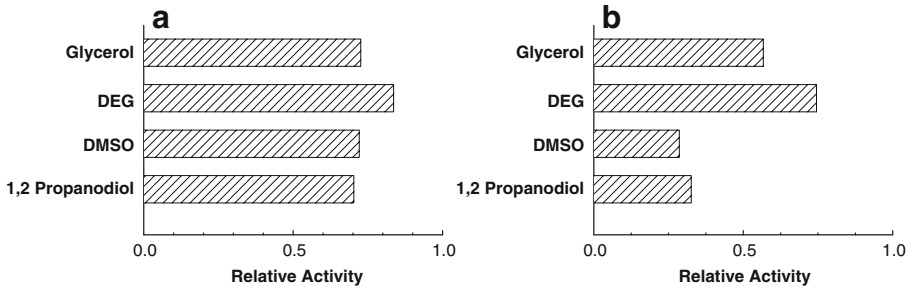


Fig. 4 Lipase stability on 50% acetone (A) and ethanol (B) supplemented with 20% water-miscible organic solvents at 37 °C for 1 h

DMF (Fig. 5). As it can be expected, the lipase stability increases as the DMF concentration decreases and concomitantly with DEG concentration increase. In this case, DEG is acting as protective agent against the deleterious presence of DMF on the enzyme stability.

On the other hand, lipase 52 stability in pectin gels cross-linked with calcium was studied to test the water-miscible solvents at 50% concentration at 37 °C used in previous experiments (Fig. 6).

The protective effect of lipase 52 encapsulation was clearly observed in all analyzed systems (Fig. 7). In DMF, the lipase stability is very high compared to water at 1 h of incubation, and also after 12 h of incubation, the enzyme activity resembles the water system value. A very different landscape when soluble lipase stability in DMF is compared with immobilized biocatalyst stability in pectin microspheres (see Fig. 2). In the case of glycerol, lipase stability was approximately constant showing no signs of inactivation, but the enzyme activity was constrained probably because of the additional diffusional barrier of the solvent [17]. Very importantly, the lipase stability was significantly increased between three to four times in DMSO, DEG, and 1,2 PRO by encapsulation in pectin (Fig. 7). In the previous experiments using soluble lipase, the enzymatic activity was stabilized in GLY, DEG, and 1,2 PRO, and up to 40% concentration in DMSO (Fig. 1A, B). However, in the immobilized system, the organic concentration tested was 50%, and the lipase activity was improved many times, as well as in presence of DMF and DMSO (Fig. 7). Similarly, lipase was activated by the presence of hydrophilic support and polar

Fig. 5 Effect of DEG concentration on lipase stability 70% DEG/DMF system after 1 h (filled circle) and 12 h (empty circle) incubation at 37 °C

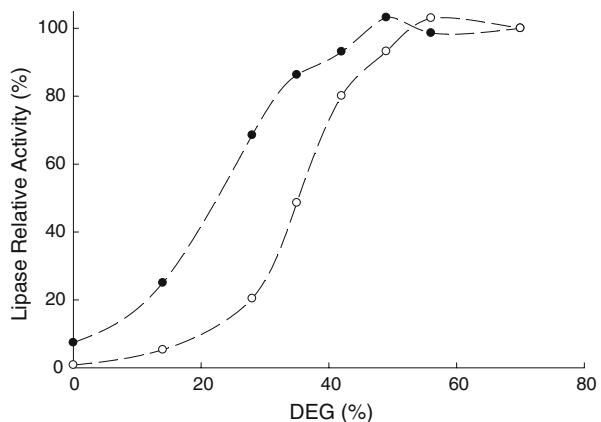
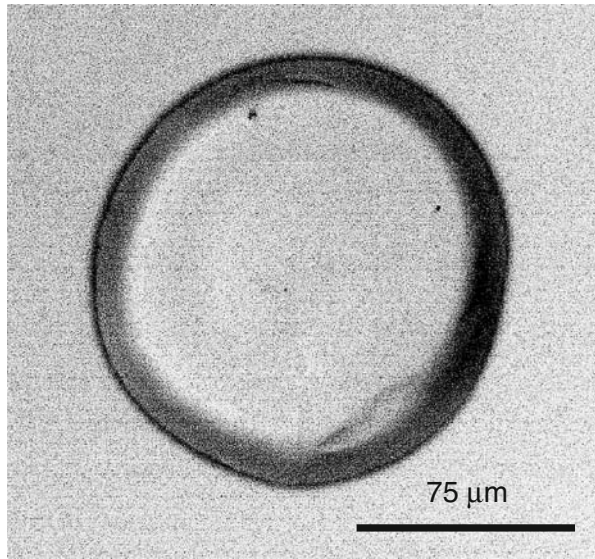
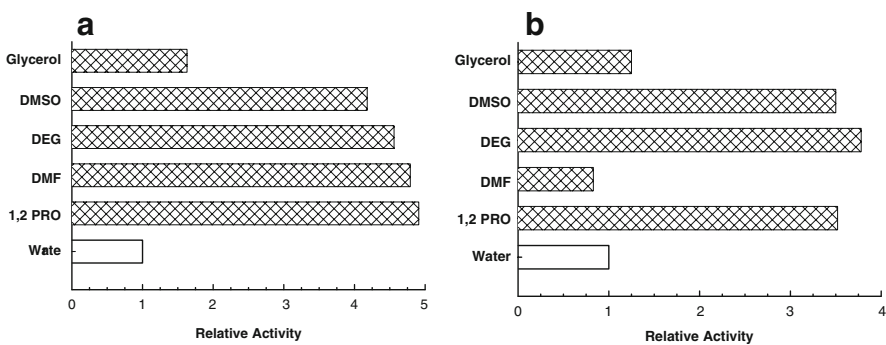


Fig. 6 Optical microscopy of pectin microspheres

organic solvents providing a sustainable system for biocatalysis: Exposure of *Baacillus coagulans* lipase immobilized on Nylon-6 in presence of 2-propanol (log $P=0.28$) increased the enzyme activity by interfacial effect [21]. A possible explanation is that the support might trap and prevent the disruption of the enzyme–water essential to maintain the three-dimensional structure of the enzyme for catalysis, as the polar solvents tend to strip water from the enzyme molecule [21]. Additionally, conformational changes around a tryptophan residue on lipase by polar miscible solvents were observed by fluorescence studies and correlated to changes of the biocatalytic activity [22]. These structural changes could be interpreted, as the change of the lid position that covers the lipase active site allow partially “unlocking” or “opening” the catalytic center of the enzyme and consequently favoring the contact with the substrate.

In conclusion, the strategy of using two water-soluble organic solvents to stabilize enzyme activity in systems where the activity was negligible or totally inhibited combined

**Fig. 7** Stability of lipase encapsulated on pectin gels in presence of miscible organic solvents after 1 h (A) and 12 h (B) incubation

with enzyme encapsulation using biopolymers open an alternative way for the development of new biotransformation systems that can be easily scale up with the advantage of recycling the biocatalyst.

Acknowledgments The authors would like to thank M.D. Baigori for helpful discussions and providing for the strain. The authors gratefully acknowledge the financial support from Pew Charitable Trust (USA), CONICET (PIP 6203/06, Argentina) and ANPCyT (BID no. 1728/ OC-AR, Argentina).

References

1. Vulfson, E. N., Halling, P. J., & Holland, H. L. (2001). *Enzymes in non-aqueous solvents*. Totowa, NJ: Humana.
2. Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). *Tibtech*, 16, 396–403.
3. Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., & Soccol, V. T. (1999). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 119–131.
4. Haba, E., Breco, O., Ferrer, C., Marqués, A., Busquets, M., & Manresa, A. (2000). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 26, 40–44.
5. Torres, S., & Castro, G. R. (2004). *Food Technology and Biotechnology*, 42, 271–277.
6. Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H., & Imanaka, T. (2002). *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3925–393.
7. Carrea, G., & Riva, S. (2000). *Angewandte Chemie. International Edition in English*, 39, 2226–2254.
8. Reetz, M. T. (1997). *Advanced Materials*, 9, 943–954.
9. Van Buren, J. P. (1991). Function of pectin in plant tissue structure and firmness. In H. W. Reginald (Ed.), *The chemistry and technology of pectin* (pp. 3–4). New York: Academic.
10. Ryden, P., & Selvendram, R. R. (1990). *Carbohydrate Research*, 195, 257–272.
11. Lootens, D., Capel, F., Durand, D., Nicolai, T., Boulenguer, P., & Langendorff, V. (2003). *Food Hydrocolloid*, 17, 237–244.
12. Gupta, N., Rathi, P., & Gupta, R. (2002). *Analytical Biochemistry*, 311, 98–99.
13. Bradford, M. M. (1976). *Analytical Biochemistry*, 78, 248–254.
14. Laane, C., Boeren, S., Vos, K., & Veeger, C. (1987). *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 81–87.
15. Hudson, E. P., Eppler, R. K., & Clark, D. S. (2005). *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 637–643.
16. Ferst, A. (1999). *Structure and mechanism in protein science*. New York: Freeman.
17. Castro, G. R., & Knubovets, T. (2003). *Critical Reviews in Biotechnology*, 23, 195–231.
18. Lima, V. M. G., Krieger, N., Mitchell, D. A., Baratti, J. C., De Felippis, I., & Fontana, J. D. (2004). *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 31, 53–61.
19. Zhao, L. -L., Xu, J. -H., Zhao, J., Pan, J., & Wang, Z. -L. (2008). *Process Biochemistry*, 43, 626–633.
20. Lešćić, I., Vukelić, B., Majeric-Elenkov, M., Saenger, W., & Abramic, M. (2001). *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 548–553.
21. Pahujani, S., Kanwar, S. S., Chauhan, G., & Gupta, R. (2008). *Bioresource Technology*, 99, 2566–2570.
22. Tsuzuki, W., Ue, A., & Nagao, A. (2003). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 1660–1666.

2012



Développement de systèmes bio-polymériques pour la délivrance de molécules d'intérêt biologique

Thèse de doctorat

Biochimie

Biologiste de la Santé

**Présentée et soutenue publiquement le 20 mars 2012
à la Faculté de Sciences Exactes de La Plata, Argentine**

par

Valeria E. Bosio

Devant le jury ci-dessous :

Roberto Salvarezza, Rapporteur, PhD-Prof.

Noemi Zaritzky, Rapporteur, PhD-Prof.

Marc Anton, Rapporteur, PhD-Prof.

Faustino, Siñeriz, Examineur, PhD-Prof.

Emmanuel Garcion, Examineur, PhD-Prof.

Directeur de thèse : Guillermo R. Castro, PhD-Prof.

Co-Directeur de thèse : Frank Boury, PhD-Prof.

Laboratoires : Micro et Nanomédecines biomimétiques (MINT U1066)
Biotechnology Applied Center (CINDEFI, CONICET)

Remerciements

A Guillermo, por todas las enseñanzas que de él recibí. Por el incentivo constante a superarme y avanzar. Por los desafíos permanentes y la libertad que me brindó al desarrollar esta tesis. Por haberme acompañado en esta etapa de mi vida desde lo intelectual y lo emotivo, dispuesto a hacerme crecer siempre.

A mi "mentor", un verdadero amigo, Edgardo. Por haberme acompañado, aconsejado y ayudado desde el día cero. Por estar siempre a mi lado, aún cuando la vida no era sólo risas. Por estar presente hasta el día de hoy, lo que me brinda esa incomparable sensación de tranquilidad y confianza.

A Cristina, por haberme incentivado siempre a que encontrara mi camino, por alentarme en los momentos duros y alegrarse hasta las lágrimas con los pequeños logros...

A "los chicos del lab", compañeros de ruta devenidos en amigos: German, Yani, Maxi, Vicky y Jose. Por todo lo que hemos compartido juntos; las eternas jornadas en el laboratorio, las meriendas bulliciosas en el box, los asados en lo de Maxi, las salidas a Buenos Aires, las despedidas con empanadas-party en lo de Guiye, la INTER!!!! Los infaltables roces, las confesiones, el apoyo... Gracias por hacer que todos esos pequeños-grandes momentos marquen a esta etapa como una de las más lindas que me han tocado vivir...

A Vero, por su generosidad al rediseñar el lugar de trabajo sin pedir nada a cambio, por dejarnos un ambiente alegre y confortable que aprendimos a querer.

A Frank, por brindarme la posibilidad de llevar adelante esta empresa, tan lejana en mi mente en su momento... Gracias por creer en mí, tomando la codirección de este proyecto de tesis.

A los chicos del laboratorio de CO₂ Supercrítico de Francia: Brice, Leila, Kien y Thomas. Gracias por todos los momentos de trabajo que pasan a ser recordados como momentos llenos de alegría y calidez. Gracias a todos los chicos de allá, por recibirme con los brazos abiertos y hacerme compartir todas sus costumbres que tan afines y emocionantes encontré!

A Corinne y su familia, por abrirme la puerta de su casa y su corazón, por hacerme sentir una más en una cultura nueva que terminara por hacer mía. Por transformar mi estadía en Angers de 2010 en una experiencia única.

A Felix, por acompañarme en esta última etapa... por aconsejarme y esperar paciente el regreso de la calma... Por estar conmigo y apoyarme en el momento más difícil...

A mi familia (Lore, de más esta aclarar que vos sos parte también), por apoyarme, escucharme y estar siempre, dispuesta a todo.

Al jurado, los Dres. Roberto Salvarezza, Noemí Zaritzky, Faustino Siñeriz , Marc Antón y Emmanuel Gracion, por tener tan buena predisposición todos desde el primer momento en que nos embarcamos en este proyecto distinto; por su tiempo y dedicación y su paciencia, sin los cuales no sería posible la cristalización de la doble titulación...

A todos los investigadores que participaron en distintas experiencias comprendidas en este trabajo de tesis: a los Dres. Jorge Guida y Elizabeth Chacon Villaba por su apoyo y participación activa en todo lo referido a los trabajos de Espectroscopia vibracional; al Dr. Arup Muckhjeery, por sus aportes en la síntesis y caracterización de derivados poliméricos; al Dr. Gustavo Marcheti y la Dra. Magdalena Mechetti por su colaboración en las experiencias de espectroscopia y análisis reológicos que se cristalizaron en un trabajo publicado; a la Dra. Noemí Zaritzky por sus valiosos aportes en los sistemas de modelado matemático, al Dr. Santacoloma, por su hospitalidad y solidaridad al facilitarnos equipamiento de citometría y análisis confocal desinteresadamente; al equipo de investigación de la línea de luz Sincrotón de Infra Rojo (SIMIS) dirigida por el Dr. Paul Dumas en París (SOLEIL): por su asesoramiento y buena predisposición; al Dr. Emmanuel Gracion por su apoyo para los estudios de biocompatibilidad de los sistemas híbridos; y a la Empresa Quality Pharma, quien nos donara la Doxorubicina sin pedir nada a cambio.

A los organismos de investigación y empresas privadas que hicieron posible el desarrollo de este trabajo de tesis en el Laboratorio de Nanobiomateriales perteneciente al Centro de Biotecnología Aplicada (CINDEFI) en la Argentina, y en el Instituto de Investigación en Micro y Nanomedicinas biomiméticas (INSERM U1066, MINT) en Francia:

al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET),
a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPyCT),
al Programa de Ayuda para Movilidades (ARIANES) de Francia,
a la empresa LKM, Sociedad Anonima, Argentina
a la Universidad de Angers, Pays de la Loire, Francia,
y al Consorcio CONICET (contraparte Argentina) - INSERM (contraparte Francesa)

A mi papá.

Objectifs

L'obtention de doses thérapeutiques avec des drogues de toxicité élevée et(ou) d'effets importants secondaires, continue d'être un défi pour la technologie pharmaceutique. Les méthodes de libération contrôlée et prolongée de molécules constituent une nouvelle stratégie de développement dans l'industrie pharmaceutique qui permet de réduire la dose, les fréquences d'administration et la toxicité de médicaments avec un impact social et économique important.

L'objectif de ce travail de thèse est de développer des véhicules plus efficaces pour le transport et la libération de molécules, qui malgré un intérêt biologique et une utilité dans le traitement de certaines pathologies chroniques, présentent une toxicité qui limite l'usage thérapeutique. Nous cherchons à développer des particules qui améliorent l'administration de drogues anticancéreuses encapsulées avec une haute efficacité et diminuent les risques d'effets secondaires. Nous proposons l'emploi de biopolymères naturels comme matrices transporteuses et le développement de technologie de production de microparticules nanostructurées à l'échelle de laboratoire, dans le but d'une application potentielle dans le domaine pharmaceutique.

Dans une étude préliminaire, on étudiera avec une molécule modèle, le congo rouge, comme analogue des médicaments, dans le but d'explorer, déterminer et optimiser des conditions expérimentales de synthèse de biogels et ses propriétés. Dans la deuxième étape des études seront réalisées avec un médicament sélectionné, la doxorubicine, un agent anticancéreux appartenant à la famille des antracyclines qui présente une toxicité élevée, mais est d'un usage fréquent pour les traitements oncologiques.

Nous étudierons différentes matrices formulées en utilisant des polymères d'origine végétale: des alginates (produits par des algues), des pectines et des gommes; nous utiliserons également un polymère d'origine microbienne (EPS et Emulsan) dont la production et une purification sera incluse dans le présent projet.

Le développement de microsphères comprenant l'utilisation des biopolymères simples, des mélanges biopolymériques, des recouvrements biopolymériques, et(ou) des systèmes hybrides (inorganiques - biopolymères), au moyen de différents polymères d'origine végétale ou synthétisés dans notre laboratoire sera exploré avec différentes stratégies méthodologiques : techniques de gélification ionique, synthèse chimique par coprécipitation colloïdale et par l'utilisation des fluides supercritiques.

Des systèmes sélectionnés seront caractérisés et évalués, en employant des techniques de microscopie (MEB, AFM,...) spectroscopie vibratoire (FTIR et RAMAN) et de diffraction de lumière (light scattering), des analyses rhéologiques et modélisation cinétique. Nous analyserons la stabilité durant le stockage, la stabilité dans des milieux simulant les fluides gastriques et intestinaux, les cinétiques de libération, ainsi que la toxicité dans des systèmes *in vitro*.

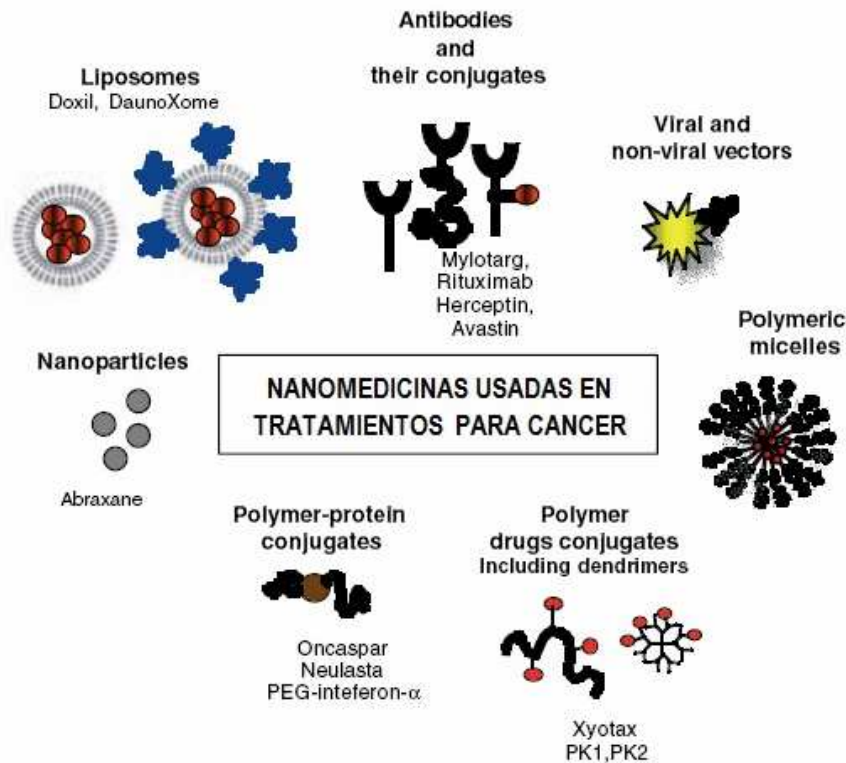
Introduction

L'encapsulation de substances dans des micro- ou nano-particules a reçu un grand intérêt durant ces dernières années pour des usages variés et divers champs d'application comme la médecine, la chimie, les cosmétiques, et l'alimentation. Sur le plan pharmaceutique, l'incorporation de molécules pharmacologiquement actives dans des microsphères permet de contrôler leur libération spatiale et temporelle dans le corps humain et de les protéger contre des processus d'inactivation. L'objectif central d'un tel système à libération contrôlée est de libérer le principe actif à l'endroit désiré et de maintenir la concentration du médicament à l'intérieur d'une fenêtre thérapeutique durant une période établie. Dans le développement de systèmes de libération contrôlée de molécules il est indispensable de connaître les interactions possibles entre la molécule transportée, la matrice de transport, et le milieu physiologique où serait effectuée la libération [Ils Durent et cols., 2011].

Récemment, différents hydrogels ont été utilisés pour la fabrication de systèmes biodégradables et biocompatibles permettant une libération contrôlée de principes actifs. L'utilisation de systèmes polymériques auto-assemblés couche par couche a démontré être d'une grande utilité pour des applications biomédicales : production de films pour un recouvrement, micro-structuration de surfaces, nanobioreacteurs, cellules artificielles et systèmes de transport de drogues [Hua Ai et cols., 2003; Zonghua et cols., 2008]. La synthèse et la fonctionnalisation de polymères synthétiques biodégradables pour une application biomédicale s'est également développée [Tian et cols., 2012]. Cependant, les inconvénients majeurs de ces systèmes sont liés à des limitations technologiques ou au coûts de production [Luckachan et cols., 2011]. Pourtant, les biopolymères présentent des propriétés remarquables telles que la diversité structurale et des propriétés biologiques spécifiques. Ils peuvent être produits par synthèse "douce", et leur biodégradabilité, ainsi que leurs propriétés rhéologiques en font des outils très attractifs pour un grand nombre d'applications [Panilaitis et cols., 2007; Bosio et cols., 2011]. Parmi les biopolymères naturels, qui ont été utilisés pour le développement de différents types de véhicules pour le transport de molécules on peut citer les acides polylactiques, la poly (ϵ -caprolactone), des polysaccharides (chitosane, amidons, cellulose, etc.), des protéines et des polypeptides (e.g. albumine, gélatine), etc.. [Je Châtre et cols., 2005 et 2006; les Côtes et cols., 2008; Missirlis et cols., 2006; Panilaitis et cols., 2007; Tang et cols., 2010;]. Pour le transport de drogues on utilise communément des systèmes polymériques obtenus essentiellement par une synthèse chimique pour l'élaboration de micro - nano-particules, avec l'objectif d'obtenir des systèmes biocompatibles et biodégradables.

Les formulations orales représentent la plate-forme la plus simple pour le transport de médicaments. Dans des formulations pharmaceutiques conventionnelles, comme des pastilles et des capsules, le transport de molécules relativement petites se produit par la route gastro-intestinale, et l'absorption du principe actif est réalisée par un processus d'absorption passive à travers les surfaces intestinales, processus gouverné par trois facteurs primaires : le degré d'ionisation, le poids moléculaire (MW), et l'hydrophobicité (qui peut être déterminé par le log P, le coefficient de partage du soluté dans le système n-octanol/eau). Par conséquent, il est important de considérer les interactions possibles entre le médicament et la matrice choisie pour

pouvoir établir des profils de libération et contrôler les dits processus au moyen des modifications de la matrice, du médicament ou les deux.



Nouvelles technologies employées pour des systèmes de *drug-delivery* dans des traitements pour le cancer [Winship Cancer Institute]

La synthèse de particules à l'aide de biopolymères peut être résumée en quatre types de mécanismes: interaction covalente ou ionotropique, formation de complexes de polyélectrolytes, et auto-assemblage de polysaccharides modifiés [Gandini et cols. 2010].

Les interactions matrice-médicament. À partir des années 60 s'est produit un développement important des outils de la biologie moléculaire, spectroscopie et modélisation moléculaire, lesquelles ont permis une plus grande compréhension des interactions moléculaires dans différents champs. La rationalisation des interactions moléculaires peut s'appliquer à diverses thématiques de recherche comme les aliments, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et les nouveaux matériaux. Les interactions moléculaires dans l'industrie pharmaceutique, en particulier, ont été étudiées pour déterminer des principes actifs dans des mélanges moléculaires complexes ou pour modifier et pour designer de nouveaux médicaments [Murphy et cols., 1966; Patel, 1998]

Les interactions hydrophobes qui entraîne une faible solubilité de certaine molécules pharmaceutiques représentent un problème sérieux pour la biodisponibilité et un défi pour le développement de systèmes de libération de médicaments. La grande diversité des biopolymères naturels permet d'envisager une option nouvelle pour le développement de

matrices porteuses et nous présentons le congo rouge comme une molécule permettant d'évaluer les interactions avec certains types de matrices [Bosio et cols., 2012]

Des matériaux hybrides. Récemment, la synthèse de matériaux hybrides a reçu une attention spéciale dans le domaine de la médecine régénérative, en particulier dans le domaine ostéo-articulaire et dans l'usage de la "chirurgie dénommée non-invasive". Dans ce cadre, la synthèse et la caractérisation de nouveaux systèmes hybrides composés de biopolymères et de carbonate de calcium, sont étudiées en biomédecine. Ce composé est l'un des minéraux les plus abondants dans la nature car c'est un matériau structural dans les organismes vivants (carapaces de mollusques par exemple), qui est généré par un processus de biominéralisation. Le composé formé peut principalement se présenter sous forme de six polymorphes différents, et ses combinaisons. Le polymorphe le plus attractif pour ce sel en fonction de ses applications en biomédecine est la vaterite, qui présente l'avantage de développer un réseau intime - ou des micro-particules présentant une grande homogénéité dans la distribution de taille, une géométrie sphérique et une nanostructure poreuse. Ce réseau peut être cinétiquement stabilisé par différentes molécules comme l'acide polyglutamique, la glycine, la L-alanine, ou l'acide aspartique [Beuvier et cols., 2011]. Ces particules ont considérablement attiré l'attention pour leur usage en encapsulation de molécules.

Afin de développer de nouvelles méthodes d'encapsulation qui offrent un bon rendement, évitent la présence de solvants organiques, et surtout qui n'altèrent pas la structure des molécules encapsulées, quelques recherches ont commencé à s'orienter vers des méthodes alternatives, comme l'usage de dioxyde de carbone comprimé (dans des conditions supercritiques). La méthode de synthèse avec des fluides dans des conditions supercritiques comme le CO₂ permet de contrôler la morphologie et la taille des particules obtenues. Cependant, peu d'équipes de recherche ont utilisé cette méthode de synthèse pour des particules de CaCO₃. Récemment, Beuvier et cols. (2011), ont décrit une méthode permettant la synthèse de particules sphériques avec un diamètre de 5 µm en utilisant le Sc-CO₂ dans un milieu aqueux. Ces particules présentaient une nanostructure poreuse avec des nano-grains de 40 nm de diamètre agglomérés depuis l'extérieur vers l'intérieur des particules, avec un centre creux de 0.7 µm. Il faut mentionner qu'au moyen de la variation des conditions de synthèse et de la présence de différentes molécules « template », la proportion de vaterite obtenue lors de la précipitation pouvait être contrôlée.

Les matrices minérales meso-poreuses comme le carbonate de calcium, présentent des avantages face à d'autres systèmes de transport des molécules car ils sont biocompatibles et bioresorbables : ils peuvent être utilisés comme excipient pour la fabrication de comprimés, et pour la régénération de tissus organiques et osseux. D'autre part, les biogels sont des systèmes très attractifs car ils possèdent une stereo-sélectivité, leur synthèse est réalisée en milieu aqueux, leur production est facilement transposable et ils sont modifiables de façon covalente, biodégradables, biocompatibles, et permettent de stabiliser des molécules. De plus, l'opportunité de les incorporer dans des systèmes de libération contrôlée pourrait permettre la libération simultanée de la charge, et des réponses synergiques du système biologique. Des microparticules de CaCO₃ ont été synthétisées en présence d'acide hyaluronique (un transporteur possible de molécules bioactives). Ces résultats sont prometteurs pour l'élaboration de matériaux biocompatibles hybrides pour (i) des applications thérapeutiques par

l'encapsulation de molécules bioactives et(ou) (ii) des applications diagnostique par l'incorporation d'agents de contraste [Boury et cols., 2004; Beuvier et cols., 2011]. Ainsi, les antécédents dans la synthèse de ce type de systèmes hybrides permettent d'envisager des résultats positifs avec d'autres biopolymères, et principalement ceux qui présentent des d'interactions avec le médicament destiné à être transporté ou libéré de façon contrôlée.

Le Congo Rouge, une molécule modèle pour étudier les interactions entre des gels de matrices biopolymériques et des médicaments

Interaction avec les Biopolymères

Sélection de la Matrice

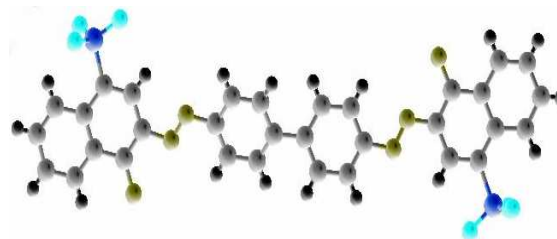
Caractérisation de la Matrice

Recouvrement de la Matrice

Pour le développement de systèmes à libération contrôlée de molécules il est indispensable de comprendre les interactions possibles entre la molécule destinée à être transportée, la matrice de transport, et l'environnement physiologique où la libération se produira.

D'autre part, l'emploi de biopolymères, en particulier les polysaccharides pour le développement de systèmes de libération contrôlée de médicaments présente un intérêt certain.

L'objectif du chapitre présent est le développement et l'étude de matrices pour la synthèse de microsphères au moyen de mélanges biopolymériques. Dans ce sens, nous avons réalisé un criblage de neuf biopolymères (polysaccharides) pour étudier les interactions avec le Congo Rouge utilisé comme molécule modèle d'antibiotiques aromatiques administrables par voie orale.



Structure moléculaire du Congo Rouge (Lye y col., 2000).

Différents mélanges de polymères, ou de coacervats, seront étudiés pour l'obtention de microsphères de gel. Nous caractériserons les interactions du gel avec la molécule encapsulée, le taux d'encapsulation et les caractéristiques de relargage.

Nous étudierons ensuite les effets de protection à l'aide d'un recouvrement permettant d'améliorer les propriétés de la matrice, notamment sa stabilité et les caractéristiques de libération de la molécule encapsulée. Pour cela, nous utiliserons l'émulsan, un complexe biopolymérique de nature microbienne, qui sera produit et purifié et caractérisé (Annexe).

Dans ce chapitre, neuf biopolymères avec différentes structures moléculaires ont été étudiés en présence du Congo Rouge durant différents temps d'incubation: 15 minutes ou 2

heures (Figure 1). Trois biopolymères ont présenté une interaction significativement plus grande que les autres après 15 minutes d'incubation, mais aussi après 2 hs d'une incubation. Cinq biopolymères interagissaient de façon significative après 2 heures à savoir : Alginate (ALG), Gomme Guar (GG), Carboxy-méthyl Gomme Guar (CMGG), Gomme Arabique (GARAB) et Gomme Garrofin (GGARROF), pendant que les pectines (PEC) de différent grade de methoxylation, la gelatina (GELATINA) et le carraghénanne (CAR) n'ont pas présenté une interaction significative avec Congo Rouge (RC).

Selection de Biopolymères

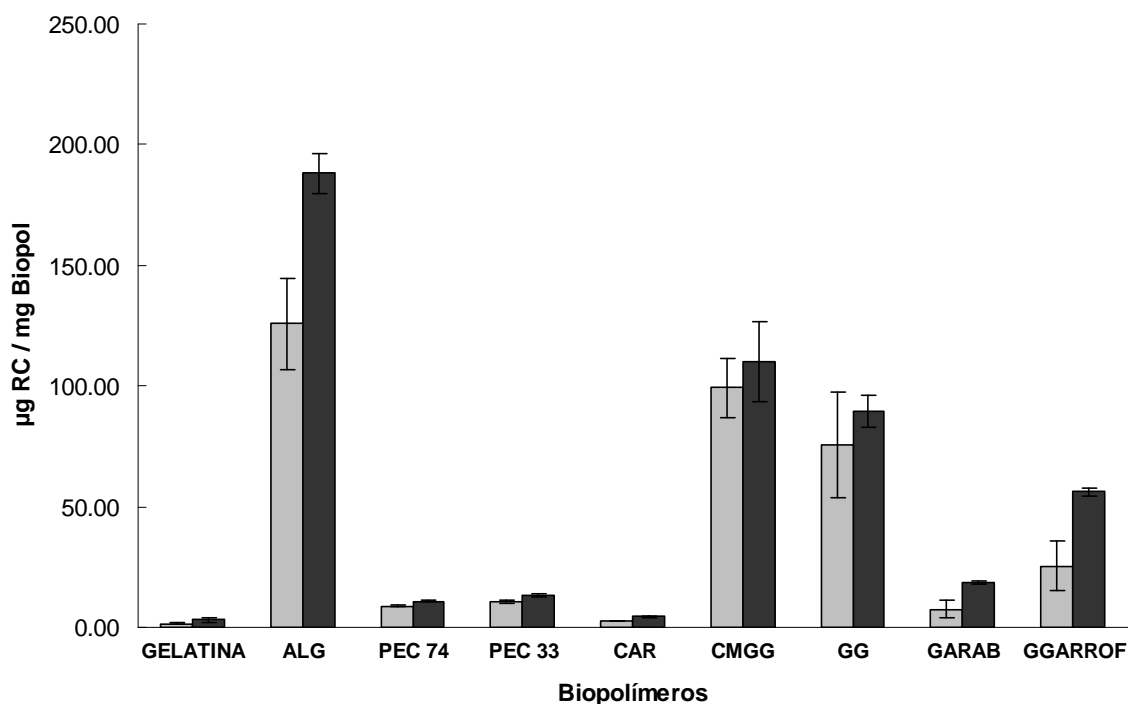


Figure 1. Essais d'interactions entre RC et différents biopolymères. RC adsorbé après 15 min d'une incubation (□) ou après 2 heures (■).

Synthèse et Caractérisation de CMGG

Composé	Analyse de CH (%)				Degré de Substitution	Rendement (%)
	Calculé		Observé			
	C	H	C	H		
GGr	32,9	4,57	30,2	4,79	-	-
CMGG	43,8	5,48	45,0	5,79	0,18	96

Table 1. Analyse de la composition structurale de Gomme Guar et de son dérivé carboxyméthylé.

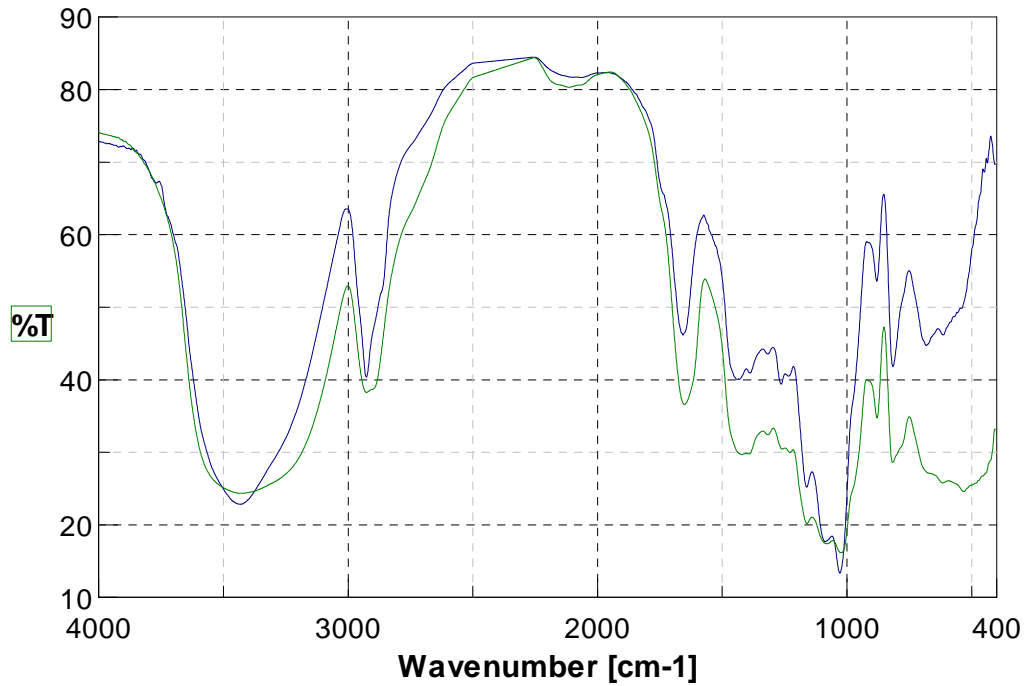


Figure 3. Spectroscopie FTIR: GG (courbe bleue) et CMGG (courbe verte).

Composé	TGA (°C)	Viscosité (cps)	Tension Superficielle (mN/m)
GG	275	30.000	62,15
CMGG	212	350-400	36,59

Table 2. Caractérisation physicochimique de GG et son dérivé carboxylméthylé.

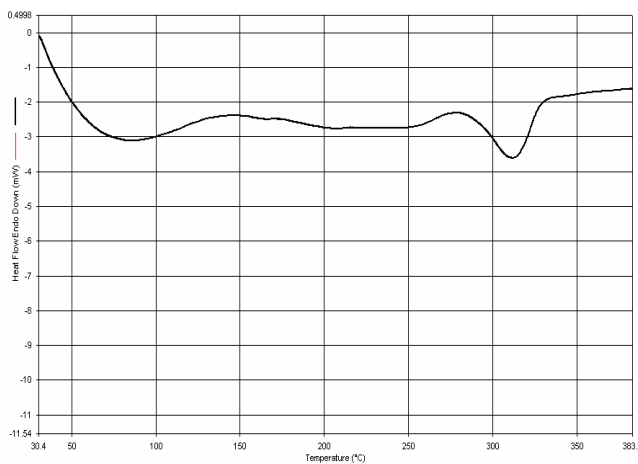


Figure 4. Etudes de DTA pour GG.

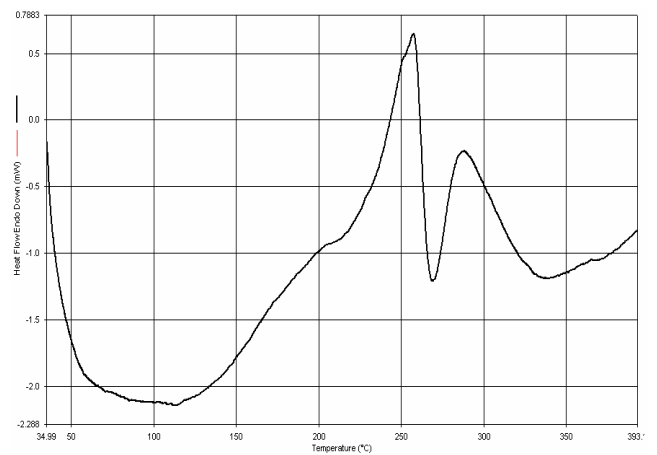


Figure 5. Etudes de DTA pour CMGG.

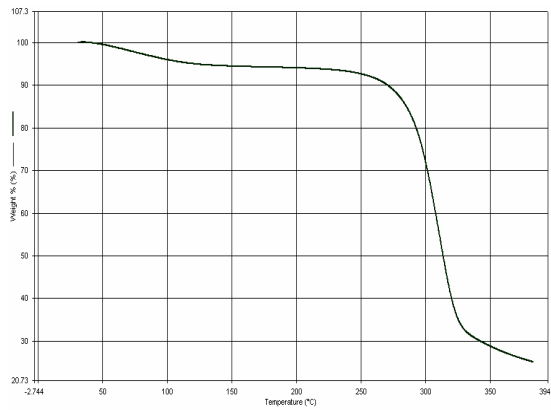


Figure 6: Etudes de TGA pour GG.

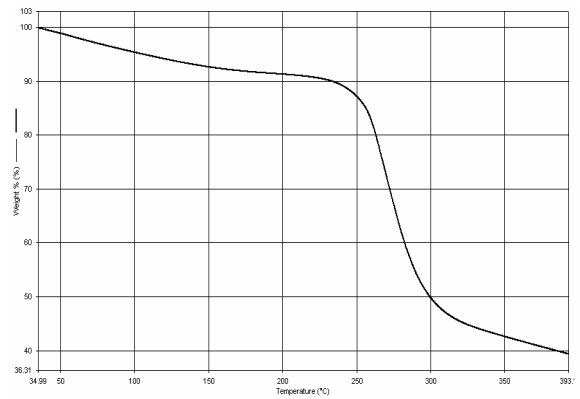


Figure 7: Etudes de TGA pour CMGG.

Synthèse de microparticules

En considérant les interactions avec RC, nous avons sélectionné ALG, CMGG et GG pour développer des matrices appropriées pour l'encapsulation. De plus, des mélanges d'ALG-CMGG ont été étudiés pour améliorer l'encapsulation du RC en présence de chlorure de calcium. En effet, lorsque l'hydrogel était constitué de 100 % d'ALG, il n'était pas capable de conserver sa structure et de permettre une libération satisfaisante du RC, Cela fut vérifié au moyen de cinétique de libération après lyophilisation des particules (des données non montrées).

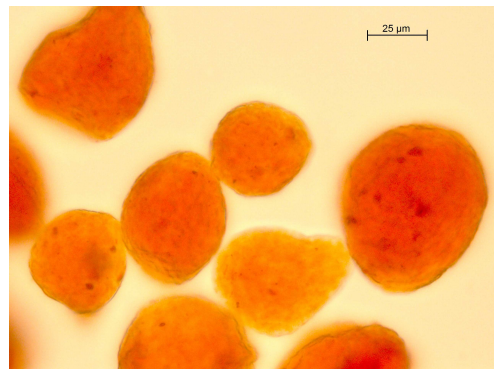


Figure 8. Microscopie Optique de microsphères de gels d'ALG-CMGG (68:32) en contenant RC.

Les essais d'inchamieto réalisés in vitro dans un milieu aqueux ont démontré l'incorporation de 135 % (p/p) d'eau dans les microsphères sèches d'ALG-CMGG (données non présentées) alors que les microsphères formulées à base d'ALG seul n'ont pas résisté mécaniquement après le processus de séchage.

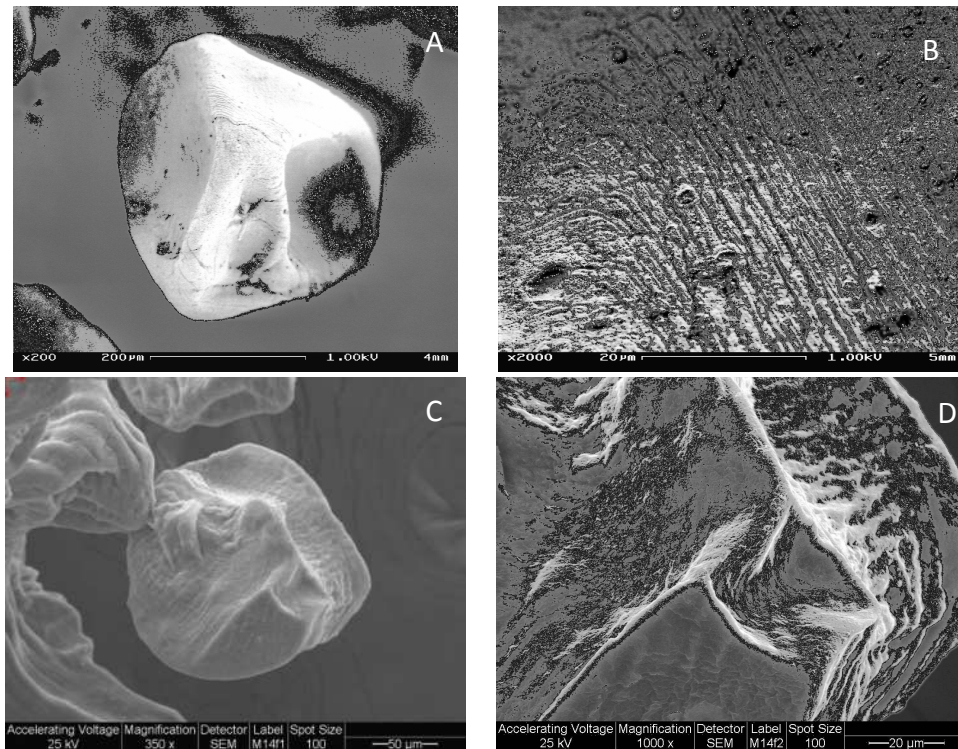


Figure 9. Microscopie SEM de microsphères de ALG (A, B) et ALG-CMGG (C, D)

Caractérisation de la matrice sélectionnée

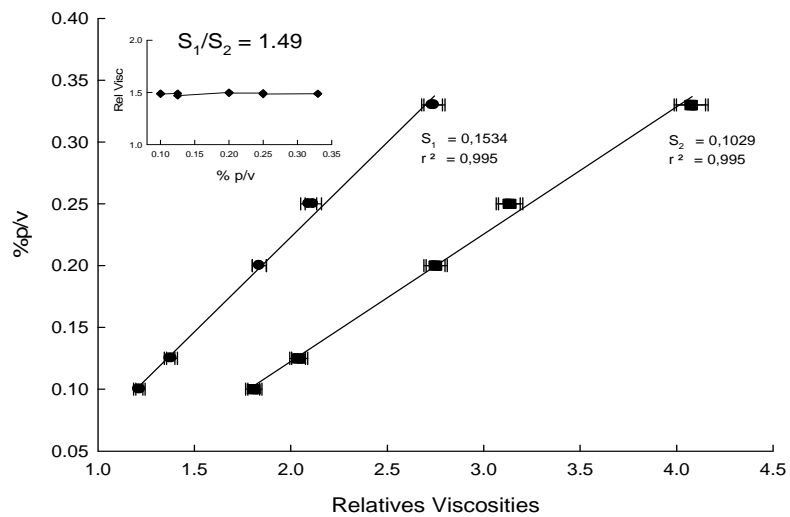


Figure 10. Changement de la viscosité relative d'une solution du mélange ALG-CMGG mesurée en absence (●) ou en présence (■) de RC. Le rapport entre les viscosité relatives des deux systèmes est présenté dans l'insert(◆).

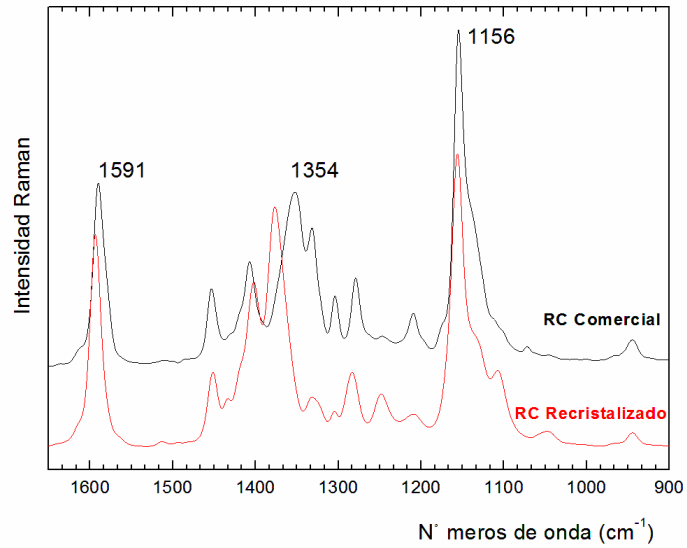


Figure 12: Spectres Raman pour le Congo Rouge commercial et recristallisé dans l'eau.

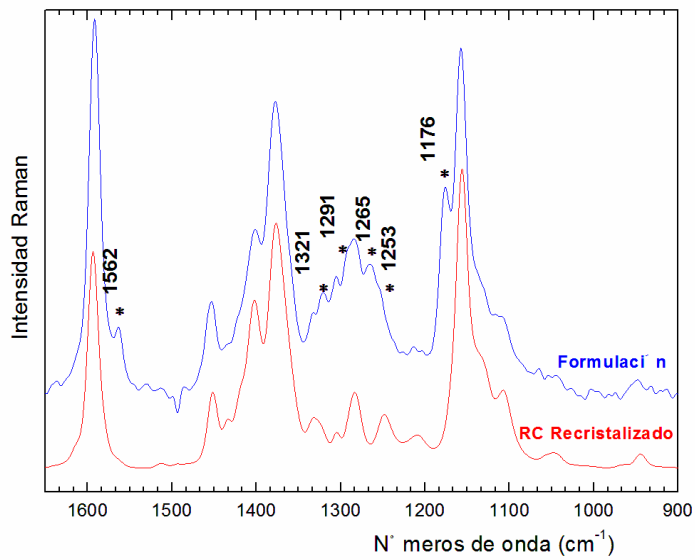


Figure 13: Comparaison de spectres Raman du Congo Rouge recristallisé dans l'eau et dans la formulation. Les nouvelles bandes observées sont indiquées par les astérisques (voir dans la Table 3).

Frecuencias Raman observadas				
RC Comercial	RC Recristalizado	Formulación	Nuevas Bandas	Asignaciones
1591	1614 sh 1595 s	1614 sh 1592 vs	1562w	Anillo fenilo
1453	1453	1454		$\nu(\text{N}=\text{N})$ (*)
1408	1403 s	1402		
1354 s	1378 vs	1378	1321	Anillo naftilo (*)
1332	1333	1333		
1305	1306	1305		?
1279 w	1285	1285	1291sh 1265	$\nu(\phi-\phi)$ $\nu_{as}(\text{SO}_3)$
1247 vw	1249	1253 sh		
1210 vw	1210 vw			
1156 vs	1158 vs	1158	1176	$\nu(\phi-\text{N})_{\text{azo}}$
1136 sh	1134 sh	1130sh		?
1106 w	1109 w	1120		?

Table 5. Assignations de bande pour les spectres Raman de la molécule de RC (état solide) à l'état pur et dans la formulation (ALG-CMGG). Abréviations : sh : épaule, vs : très intense, s : intense, w : un faible, vw : très faible.

La cinétique de libération du RC depuis les microsphères d'ALG-CMGG a été étudiée in vitro en simulant le fluide physiologique de l'estomac (pH 1,2) et les conditions intestinales (pH 7,4) avec tampon phosphate. La libération dans le temps de RC décrit un comportement hyperbolique à un pH 7,4 avec 68,2 % RC libéré au bout de 8 heures environ (Figure 14). Nous avons ensuite réalisé des études de stabilité des gels d'ALG-CMGG sans et avec recouvrement d'émulsan dans les conditions physiologiques (Figure 15).

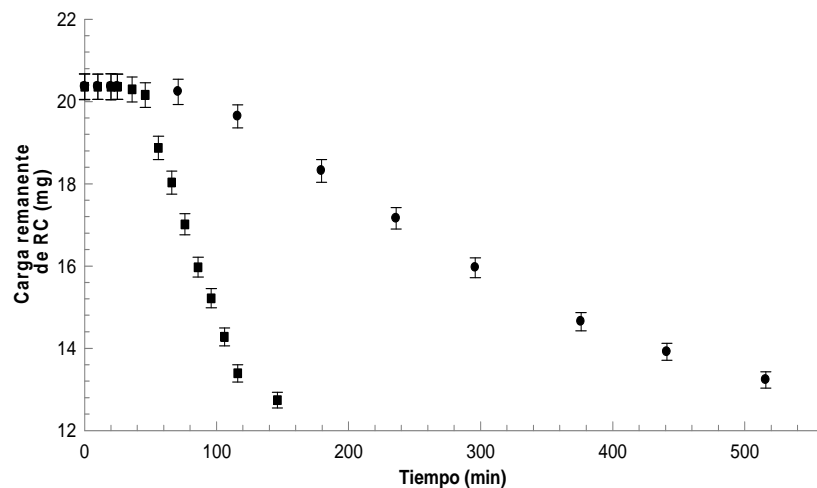


Figure 14. Temps de libération de RC depuis des sphères de ALG (■) et ALG-CMGG (●).

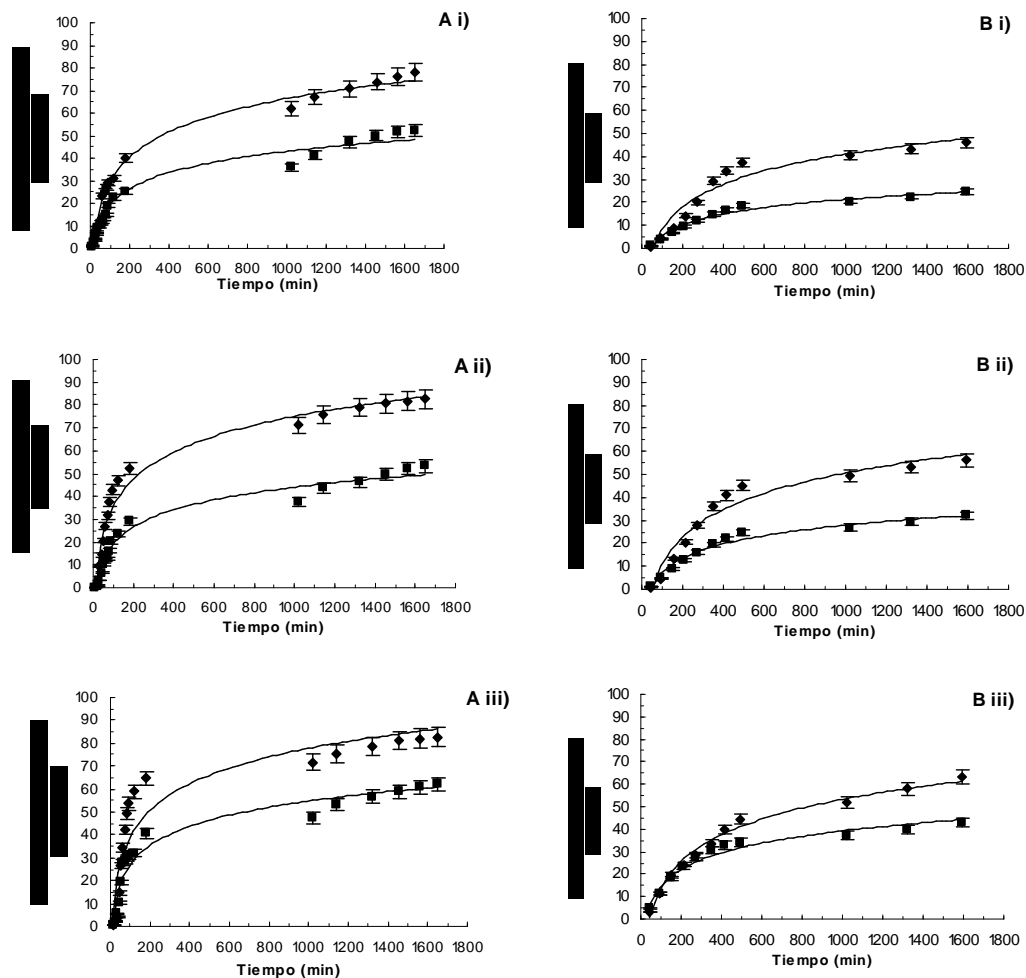


Figure 15. Libérations cumulées de RC (%) sous différentes conditions d'incubation. **A.** Profils de libération dans un tampon phosphate: i) pH 6,8; ii) 7,4; iii) 8,0. **B.** Profils de libération dans un tampon TES: i) pH 6,8; ii) 7,4; iii) 8,0. Symboles: Systèmes non recouverts d'émulsion (■) systèmes recouverts d'émulsion (◇).

Conclusion: Les essais d'interaction entre le RC et les différents biopolymères ont permis la sélection d'un polymère pour la génération d'une matrice standard constituée d'ALG. Cette matrice peut être renforcée par l'addition d'un second polymère (CMGG) qui, par coacervation complexe, va permettre l'obtention d'une matrice mixte. CMGG permet d'obtenir un biopolymère plus soluble que GG, d'un maniement plus simple dû à la faible viscosité du mélange et à sa capacité de générer des solutions limpides, ce qui est un avantage pour une utilisation à grande échelle. De plus, CMGG présente la capacité de stabiliser des gels d'ALG et permet de réaliser une lyophilisation sans abîmer la structure du gel ce qui est d'une grande importance pour le stockage de médicaments.

Les analyses de viscosité et de spectroscopie révèlent l'interaction entre le mélange biopolymérique ALG-CMGG et le RC sans doute par la présence de groupes aromatiques portés par le RC et qui interagissent avec les zones hydrophobes des biopolymères. Ce type d'interaction pourrait se retrouver pour une grande gamme de médicaments portant des groupes aromatiques.

Le résultat d'interactions entre la molécule modèle-matrice au moyen des études spectroscopiques vibrationnelles (FTIR et Raman) montrent l'importance de ces techniques pour déterminer des interactions entre des molécules dans des gels biopolymériques communément développés pour des systèmes à libération contrôlée..

Les expériences de libération contrôlée développées in vitro révèlent une libération plus lente de RC de la matrice d'ALG-CMGG comparé aux microsphères d'ALG (moins de 50 %) après 8 heures ce qui serait favorable pour une administration par voie orale.

Les résultats présentés permettent d'envisager de décliner nos résultats avec des molécules à activité pharmacologique comme les fluoroquinolones ou les anthracyclines. Parmi les applications médicales potentielles, les matrices ALG-CMGG pourraient être utilisées en chimiothérapie comme dans le cancer du côlon, ou dans des infections sérieuses microbiennes.

L'optimisation du système par recouvrement avec de l'émulsan a été vérifiée pour toutes les conditions de libération essayées, en faisant de cette macromolécule une candidate pour être utilisé dans des systèmes de libération prolongée. Dans ce contexte se pose la nécessité de caractériser ce biopolymère pour des aspects non décrits au préalable dans la bibliographie (Annexe X du chapitre 1).

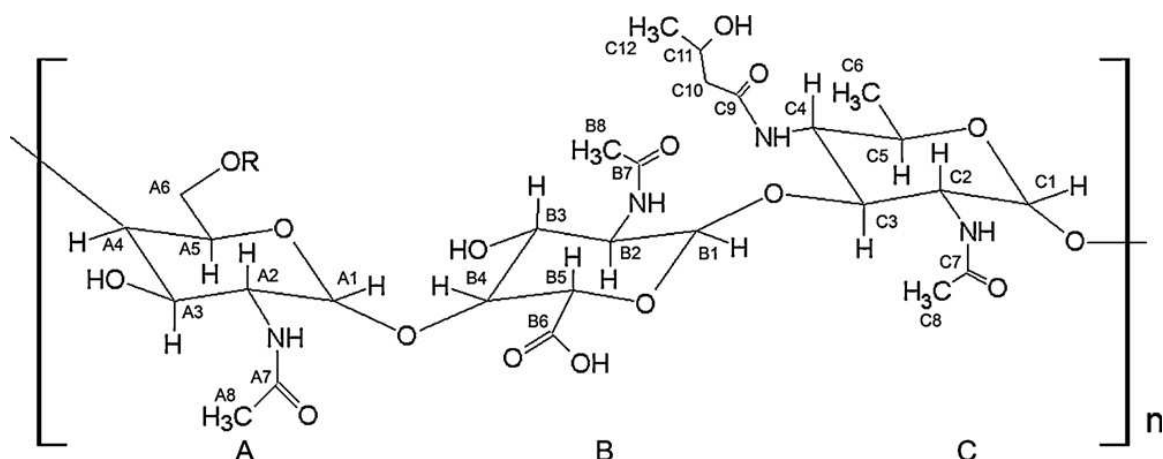
Caractérisation d'EPS/Emulsan pour son utilisation dans des recouvrements de particules

Caractérisation Physicochimique *Essais de recouvrement pour les Systèmes Inorganiques* *Essais biologiques : Réponse Inflammatoire*

L'émulsan est un complexe polymérique d'origine microbienne, excrété comme exopolysaccharide anionique par la bactérie Gram négatif : *Acinetobacter Venetianus* RAG-1. Il a été utilisé pour diverses applications de part ses propriétés d'émulsifiant naturel.

À partir des méthodes de purification d'extraits brut d'émulsan différentes fractions ont été obtenues, à savoir :

1. Emulsan "brut": il est obtenu par précipitation avec du sulfate d'ammonium ou de l'éthanol.
2. ApoEmulsano: (nommé émulsan) obtenu après l'extraction des protéines bactériennes dans la deuxième étape par du de phénol à chaud.
3. EPS + LPS: (fractions de l'apoémulsan). Selon Mercaldi et cols. (2008) l'apoémulsan contient une fraction appelée LPS (lipopolysaccharides bactériens : 80 %) chargés négativement liée de manière ionique à l'EPS (exopolysaccharide cationique : 20 %). Cette fraction contient 0.5 % de protéines et 0.01 % de DNA, lesquels proviennent de l'ApoEmulsane original. Au moyen des études physicochimiques préliminaires, Mercaldi et cols. (2008), ont conclu sur la nature cationique de cette molécule et sa capacité de stabiliser des émulsions.



Unité répétée de l'APE. Composé isolé depuis l'émulsan produit par *Acinetobacter venetianus* RAG-1. (R = un groupe acétyle ou un alcool) (DeAnn Barnharta et cols, 2012)

L'objectif de la section présente du travail de thèse sera de caractériser l'émulsan et l'EPS pour une utilisation comme système de recouvrements des matrices déjà développées et

présentées dans le premier chapitre, ainsi que des matrices qui seront détaillées dans le dernier chapitre. Nous étudierons leur influence sur la stabilisation des dites matrices et leur effet sur les processus de libération. Finalement nous étudierons l'innocuité du système par l'analyse des réponses inflammatoires sur un modèle in vitro.

Dans cette section du travail de Thèse nous avons mesuré les cinétiques de tension superficielle de l'EPS à différentes concentrations dans l'eau par la méthode de la goutte pendante dynamique. A partir des valeurs de tension superficielle vs. la concentration d'EPS dans une eau, nous avons obtenu la concentration micellaire critique du tensioactif, c'est-à-dire la concentration maximale d'EPS à partir de laquelle la tension superficielle du système atteint la valeur minimale. A partir de cette valeur, l'interface eau/air est saturée en molécules et dans l'eau se forment les premières micelles d'EPS.

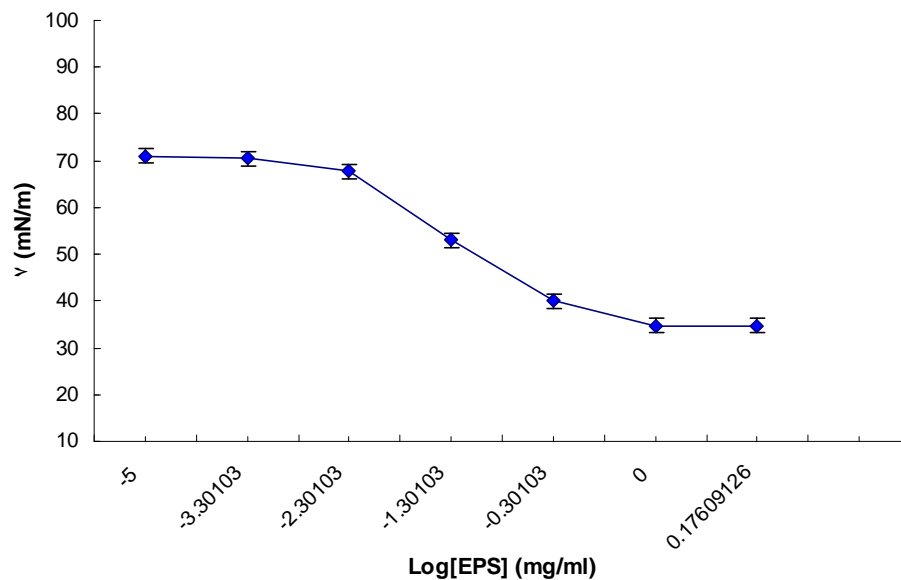


Figure 2: Détermination de la CMC pour l'EPS : 1,0 mg/ml.

Des études de charge superficielle (Potentiel zéta) en fonction du pH ont été réalisées pour comparer le comportement de l'EPS à d'autres polysaccharides de la littérature, à partir desquels on conclut que les deux biopolymères (Emulsan et EPS) présentent des comportements similaires à d'autres polysaccharides avec une charge nette négative.

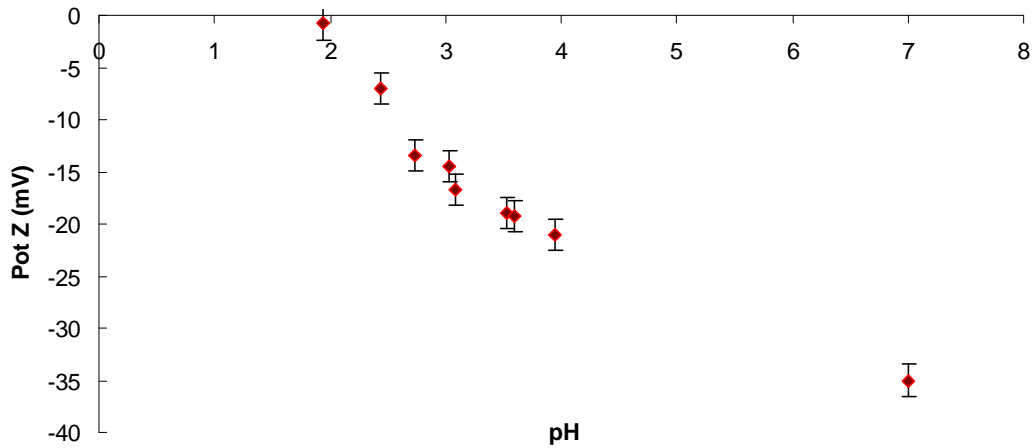


Figure 3: Mesures de Potentiel zéta d'EPS dans une solution aqueuse en fonction du pH.

Les isothermes de Langmuir n'ont pas pu être générés à partir de solutions aqueuses d'émulsan, ni à partir de solutions aqueuses d'émulsan en présence de propanol à 1,0 % (permettant d'améliorer le coefficient d'étalement de la solution de biopolymère sur la surface de l'eau). Les efforts pour générer des monocouches n'ont pas non plus donné de résultats positifs par dépôt d'une petite quantité de l'émulsan solide sur la phase aqueuse.

Nous avons analysé les propriétés de charge superficielle (application de la méthode d'Oshima) à partir de la mobilité électrophoretique mesurée en faisant varier la force ionique. Nous avons ainsi calculé le paramètre ZN, qui représente la densité de charge spatiale de la région sur une surface de l'électrolyte et $1/\lambda$, dénommé aussi "*softness parameter*": $ZNe = -2,95 \cdot 10^{+05} \text{ C/m}^3$; $1/\lambda = 7,51473 \cdot 10^{-09} \text{ m}$.

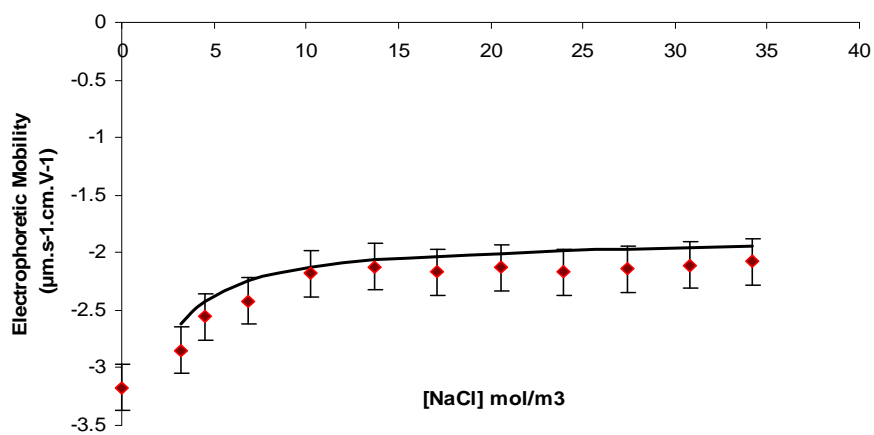


Figure 4: Profil de mobilité électrophoretique en fonction de la force ionique du milieu pour des solutions aqueuses d'EPS.

En comparant les mesures de taille des objets en phase aqueuse, on peut conclure à la formation d'aggrégats dans les solutions d'EPS concentrées, ce qui n'est pas le cas pour les solutions d'émulsan. Le potentiel ζ des deux types de polymères met en évidence la charge négative pour les deux polymères, contrairement aux modèles proposés dans la bibliographie. Les valeurs de potentiel ζ pour les concentrations distinctes semblent être influencés par la taille des objets.

Composé	Concentration (mg/ml)	d (nm)	PdI	Pot ζ (mV)
EPS	0,1	474	0,36	-37,2
	0,0001	237	0,13	-16,1
Emulsan	0,1	370	0,45	-55,0
	0,0001	302	0,19	-40,4

Table 5: Diamètres et indices de polydispersité pour des systèmes d'EPS et emulsan dans une solution à distinctes concentrations. Mesures de potentiel Z pour les mêmes systèmes.

Nous avons évalué, dans un dernier temps, la capacité des biopolymères étudiés (EPS et emulsan) ainsi que la matrice inorganique étudiée (microparticules de CaCO₃ avec et sans le recouvrement voir l'annexe complète), à générer une réponse inflammatoire sur un modèle de monocytes humains. Pour cela nous avons étudié l'activation des monocytes CD14 + par la génération d'IL-6 (interleukine 6). Cette IL-6 produite par les monocytes humains sous différentes conditions a été quantifiée, et les propriétés de stimulation par l'EPS, l'emulsan, les particules de CaCO₃ et particules de CaCO₃ avec recouvrement ont été comparées à l'activation induite par un LPS de *Escherichia coli*.

Px	LPS (pg/ml)					EPS (ng/ml)			CaCO ₃ (ng/ml)			CaCO ₃ -EPS (ng/ml)		
	0	100	33	11	3,7	100	20	4	300	60	12	100	20	4
Sans	3	11060	4371	512	10	1722	51	1	8	0	12	773	20	1
Avec	0	40	53	23	0	9	5	0	0	0	0	13	5	0
pg/ml														

Table 6. Réponse inflammatoire par IL-6 (pg/ml produits) de monocytes humains activés avec LPS, EPS, CaCO₃ et CaCO₃-EPS (3:1).

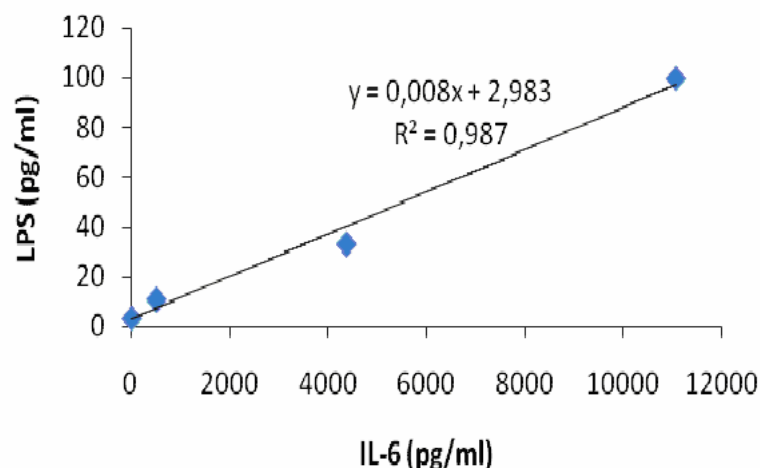


Figure 7. Courbe de calibration pour la production d'IL-6 en fonction de la quantité de LPS ajoutée au milieu d'incubation des monocytes pour son activation.

Les équivalences (rapportées aux masses) exprimées comme concentration de LPS (pg/ml) des systèmes étudiés pour atteindre le même degré d'activation sont détaillés dans la Table 7.

Echantillon	Concentration (ng/ml)	LPS équivalentes	Dev std
EPS	100	15,7	1,5

Table 7. Equivalences de LPS pour les systèmes étudiés. (Pour l'émulsan, les resultats sont tombés dehors l'échelle)

Conclusion: L'émulsan et son produit purifié (EPS) ont été caractérisés pour mieux comprendre ses caractéristiques, son mécanisme d'action et pour proposer son utilisation comme système de recouvrement des systèmes à libération contrôlée. Nous avons vérifié la capacité émulsifiante des complexes polymériques. Les mesures de mobilité électrophorétique, ont indiqué des charges superficielles négatives pour les deux polymères.

Même si l'efficacité du système de recouvrement pour la stabilisation de matrices biopolymériques ou inorganiques a été observé avec un effet retard sur la libération de molécules (Chapitre 1), cette section du travail de thèse montre que ces complexes biopolymériques ont une application limitée pour des applications thérapeutiques du fait d'une toxicité in vitro indiquée par leur capacité d'induire une réponse inflammatoire élevée. En revanche, ils peuvent présenter un intérêt pour des systèmes de diagnostic in vitro.

Sélection de biopolymères permettant d'interagir avec une drogue modèle (Doxorubicine)

Doxorubicine-Biopolymères Sélection de la Matrice Caractérisation de la Matrice

Les biopolymères naturels peuvent présenter des avantages par rapport aux polymères synthétiques du fait d'un nombre élevé de propriétés remarquables comme la grande diversité de structure chimique, leur fonctionnalité, leur stéréospécificité, une large gamme de poids moléculaires, et pour certains leur biocompatibilité et certaines propriétés biologiques. De plus, la biodégradabilité de ces macromolécules, avec des propriétés rhéologiques spécifiques font que ce sont des molécules très attractives et utiles dans de nombreuses applications. Parmi ceux-ci, les polymères de nature polyssacharidique ont été largement utilisés dans différentes industries comme cela a été détaillé [Introduction Générale].

Différents systèmes tels que des micelles, des liposomes ou des bioconjugués avec des polysols ou des protéines ont été développés pour réduire les effets secondaires de drogues anticancéreuses comme la Doxorubicine (Dox). Certains de ces vecteurs ont permis de diminuer la toxicité de la drogue, mais des problèmes immunologiques se sont présentés dans certains cas. [Peng et cols., 2010; Nielsen et cols., 2006; Vrignaud et cols., 2010; von Maltzahn et cols., 2011]. L'emploi de biopolymères de nature polyssacharidique pour le transport de principes actifs anticancéreux, comme la Dox, constitue un champ de recherche prometteur dans le domaine de la libération contrôlée de molécules [Bouhadir et cols. 2001; Missirlis et cols., 2006; Xia Tao et cols., 2007; Jianing Qi. Et cols., 2010].

D'autre part, de nombreuses études de modélisation ont été réalisées avec ces systèmes de transport de drogues en cherchant à prédire leur comportement dans diverses conditions environnementales. [Grassi et cols., 2011; Polakovic et cols, 1999; Crank, 1975].

L'objectif du chapitre présent est de réaliser un criblage de biopolymères afin de les utiliser comme matrices pour le transport de Doxorubicine. Nous étudierons les interactions moléculaires entre la matrice sélectionnée et la molécule. Finalement, nous évaluerons la capacité de charge et de libération depuis la matrice sélectionnée dans des conditions physiologiques simulées et nous proposerons un modèle mathématique permettant de décrire les profils de libération.

Sélection des biopolymères: interactions biopolymère-drogue

À partir de nos résultats, des pectines ont été sélectionnées afin de déterminer le degré de méthylation permettant la plus grande affinité avec la drogue (voir le chapitre 2).

La figure 5 montre les résultats d'interaction de Dox en fonction du degré de méthylation des pectines étudiées. Étant donné la faible variabilité des résultats obtenus nous avons procédé à un traitement statistique.

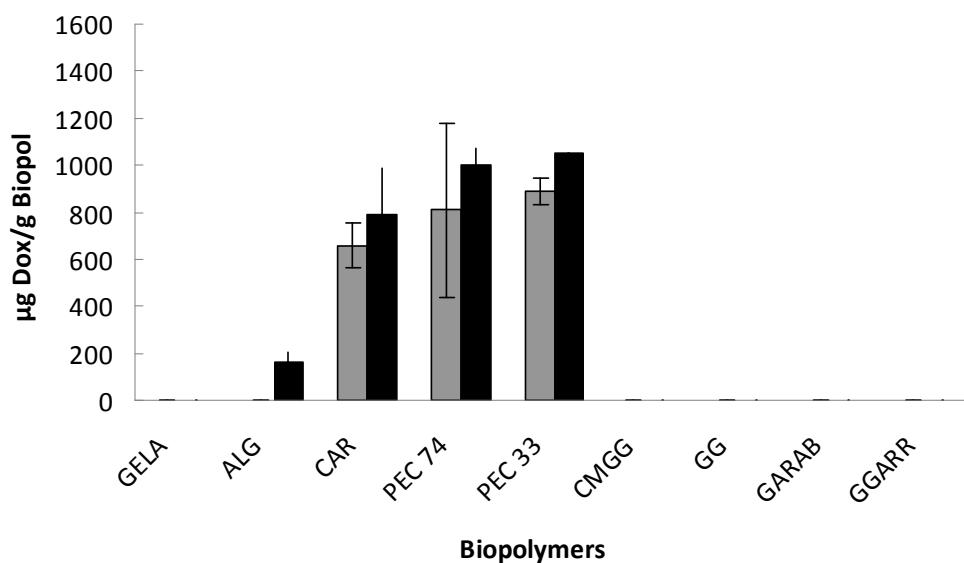


Figure 1. Essais d'interaction entre Dox et différents biopolymères. Dox adsorbée après 15 min d'incubation (□) ou après 2 heures (■).

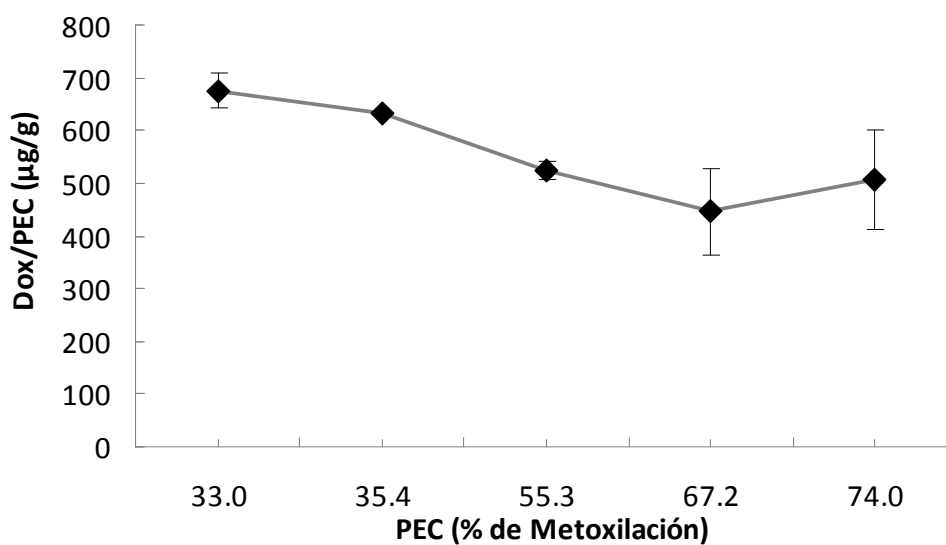


Figure 5: Quantité de Dox liée aux pectines en fonction des pourcentages de methoxylation après 2h d'incubation.

Les résultats du Test-t de Student mettent en évidence l'absence de différences significatives entre les quantités moyennes de Dox liées au polymère pour les différents degrés de methoxylation étudiés.

Formulation de matrices par gélification ionique

Afin d'optimiser les conditions pour le gélification des pectines, différents tampons ont été étudiés en présence ou non de différents pourcentages de solvants organiques. Ces essais n'ont pas indiqué de différence significative permettant de justifier un choix en comparaison des systèmes aqueux (résultats non montrés). Les pectines de faible et moyen degré de

methoxylation ont présenté la plus grande capacité à gélifier. Sur la base des résultats obtenus, et des données préliminaires de cinétiques de la libération (voir la partie Essais de Libération de Dox à partir des matrices de pectine), nous avons décidé de continuer les études avec PEC 35 et PEC 55.

Essais de charge

Des essais de complexation de la dox avec des particules formées par des pectines de type PEC 35 et PEC 55 ont été réalisées. Les quantités incorporées de Dox dans la matrice ont été déterminées après gélification et après avoir séché les particules. Nous avons obtenu des pourcentages de 66 % et de 88 % pour les PEC 55 et 35 respectivement.

Essais Rhéologiques

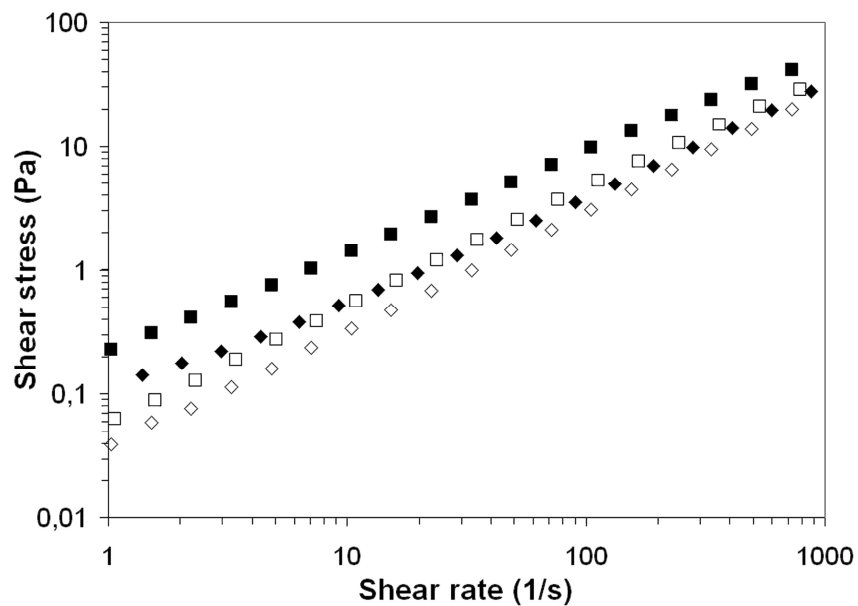


Figure 5. Comportement rhéologique pour PEC et PEC-Dox. Contrainte de cisaillement vs. vitesse de cisaillement. symboles : PEC 35 (□); PEC 35-Dox (■); PEC 55 (◇); PEC 55-Dox (◆).

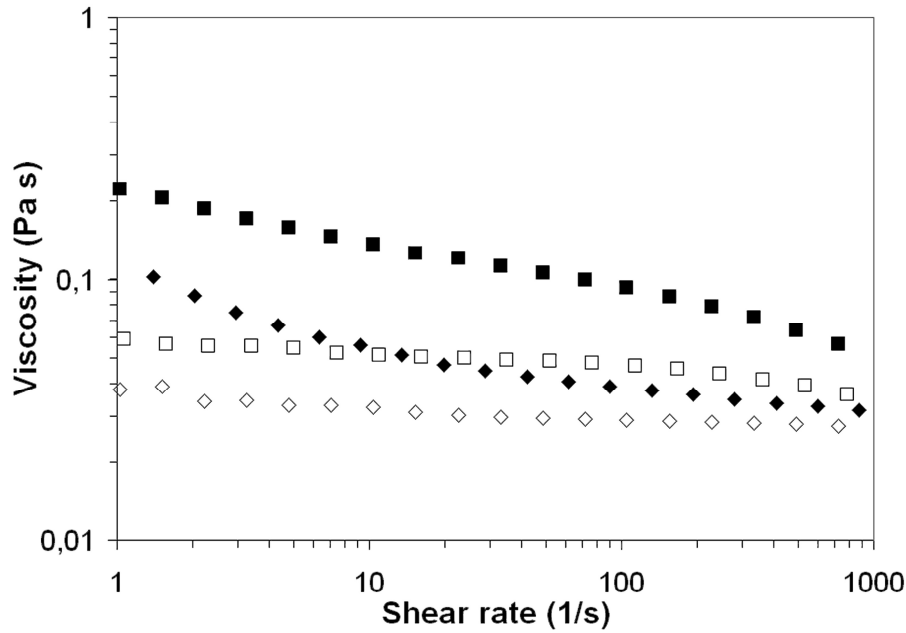


Figure 6. Comportement rhéologique pour PEC et PEC-Dox. Viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement. Des symboles: PEC 35 (\square); PEC 35-Dox (\blacksquare); PEC 55 (\diamond); PEC 55-Dox (\blacklozenge).

Modèle Rhéologique

Les données expérimentales obtenues sur les rhéogrammes ont été ajustées à l'aide de la loi de puissance pour déterminer le coefficient de consistance (K) et l'indice de comportement (n). L'équation fondamentale pour ce modèle est :

$$\tau = K(\dot{\gamma})^n \quad (\text{a})$$

Où τ est la force de coupure (Pa), $\dot{\gamma}$ est la vitesse de déformation (s^{-1}), K est l'indice de consistance (Pa s^n) et n l'indice de comportement, dont la valeur est une mesure du degré de comportement non-Newtonien (si différent de 1).

Systemes	Indice de comportement	Indice de consistance K (Pa s)	R^2
PEC 35	0.939	0.060	0.9997
PEC 55	0.952	0.037	0.9998
PEC 35 - Dox	0.807	0.218	0.9997
PEC 55 - Dox	0.833	0.087	0.997

Table 2. Caractéristiques rhéologiques de PEC 35 et PEC 55 avec et sans Dox.

Essais de charge maximale

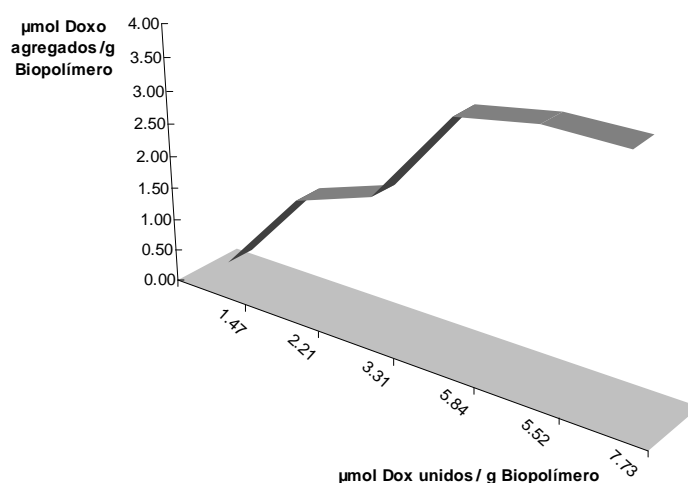


Figure 7: Détermination de charge maximale de PEC 55 avec Dox selon le procédure d'union détaillée dans "Sélection de biopolymères" dans la même section.

Etudes vibrationales: Spectroscopie FTIR

Les analyses de FTIR ont confirmé la présence d'interactions entre PEC 55 et Dox (Table 3). Les études de FTIR suggèrent une interaction complexe entre la drogue et la matrice. (Table 3). [Kayal et cols., 2010 et Purcell et cols., 1987]

Longueur d'onde (cm ⁻¹)			Δu (cm ⁻¹)	Assignations
Dox	PEC	Formulation		
3389	-	3380		σ (N-H)
3330	-	3269		σ (H-O)
2932	2936	2929		σ (C-H)
1722	1743	1733	11-10	σ (C-C), ν(-COOCH₃)
1615	1609	1628	13-9	δ (N-H), ν(-COOH), ν(C=O) and phenyl breathing modes
1408	-	1459, 1443	\sim 43	σ (C-C)
-	1328	1331		σ (C-O-C)
1077	1100	1099		σ (C-O)

Table 3. Bandes spectroscopiques (cm⁻¹) obtenues part analyse FTIR et ses assignations: Dox pur, PEC 55 (dans un état solide) et la formulation PEC 55-Dox à pH = 7,4.

Essais de libération de Dox à partir des matrices de pectine

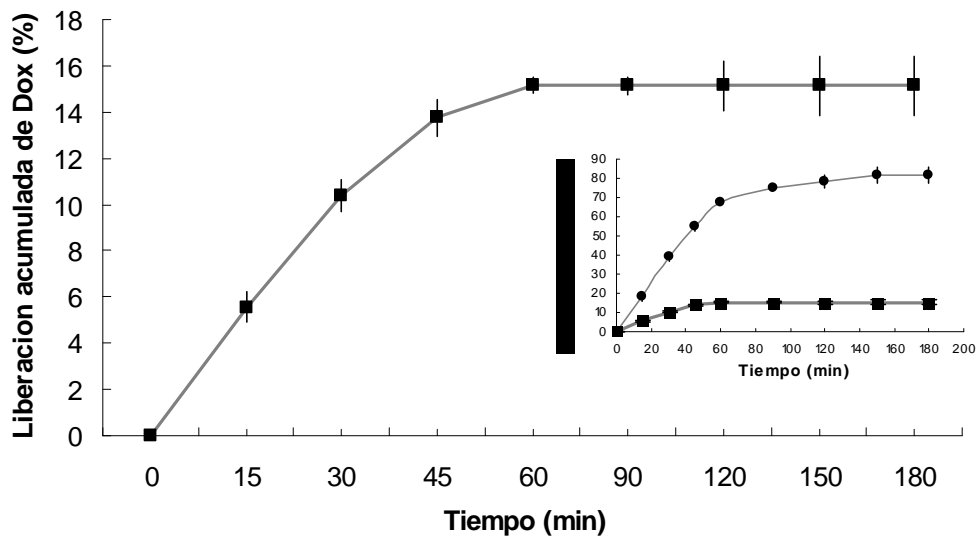


Figure 6: Profil de libération (25 °C) dans buffer MOPS pour Dox depuis une matrice composée de pectine 35 % (●) et 55% (■).

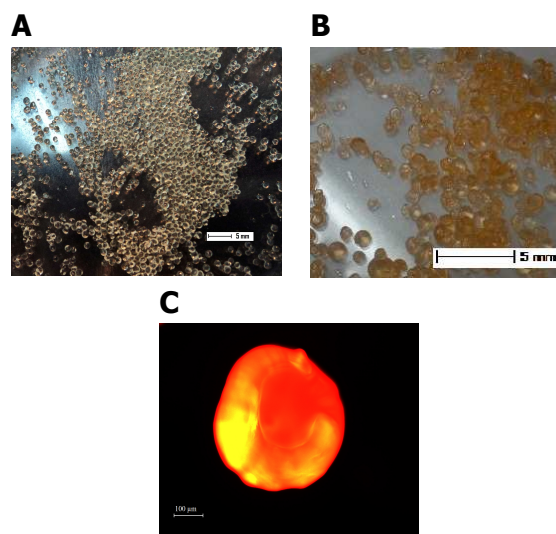


Figure 8: Images en microscopie optique pour des particules de PEC 55 sans ou avec Dox (A et B respectivement) et en microscopie de fluorescence pour une particule avec la charge (C).

Modèle mathématique de la cinétique de libération de Dox

Selon le modèle de diffusion vers un volume fini de liquide, dont la concentration reste constante, Crank propose comme solution à l'équation (1) exprimant un processus de diffusion l'expression suivante:

$$\frac{M_{0solido}}{M_{\infty liquido}} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(\alpha+1)e^{-Dq_n^2 t / R^2}}{9 + 9\alpha + q_n^2 \alpha^2} \quad (7)$$

À partir du modèle on a pu déterminer un coefficient de diffusion (D) dans le milieu liquide, ayant comme valeur $9,9633 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Nous avons ainsi pu reconstruire une courbe théorique de libération de Dox depuis la matrice de PEC 55 dans le tampon MOPS (pH=7,4) à 25 °C (Figure 9).

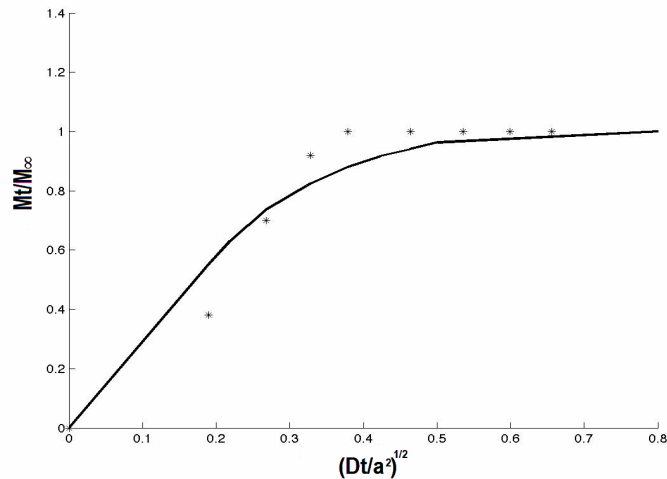


Figure 9: Courbe théorique (-) selon le modèle mathématique de diffusion depuis une matrice solide vers un volume fini de liquide agité dont la concentration ne change pas et courbe expérimentale (*) pour la libération de Dox depuis une matrice de PEC 55 dans tampon MOPS (pH=7,4) à 25C.

Etudes de stockage

La libération de Dox à partir des microsphères d'hydrogel de PEC 55 stockées durant un an à 5 °C a été de 11 % après 3 heures d'incubation sous les mêmes conditions expérimentales que celles décrites pour les études de libération. Ce résultat indique la présence d'une structure dynamique dans la matrice, et l'effet positif du processus de maturation du gel.

Essais de libération dans des conditions simulées

La PEC 55 a été sélectionnée comme matrice potentielle pour un transport de Dox par voie orale. Les études de libération ont été réalisées dans des conditions simulant le milieu gastro-intestinal pour la PEC 35 et PEC 55. (Figures 10 y 11).

Nous avons confirmé la sélection de la PEC 55 comme matrice potentielle, grâce à ses propriétés de conserver en conditions gastro-intestinales simulées, un pourcentage de charge de la drogue important.

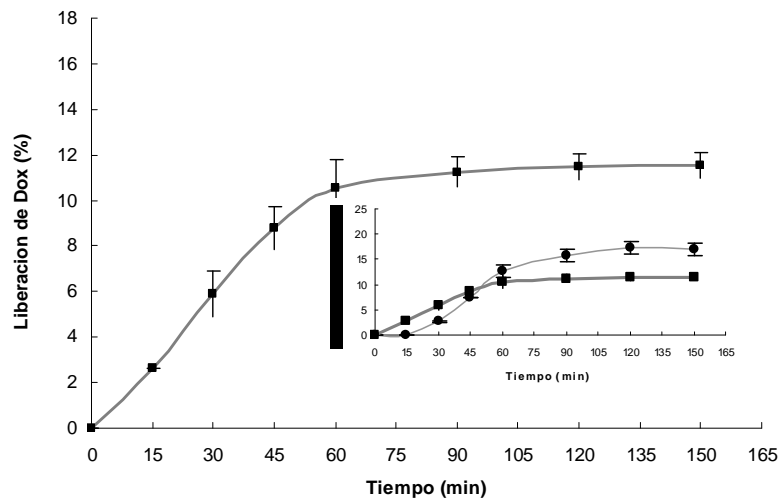


Figure 10: Profil de libération à 37° C dans Buffer Clark & Lubs (pH=2,0) pour Dox depuis une matrice composée par PEC 35 (●) et PEC 55 (■).

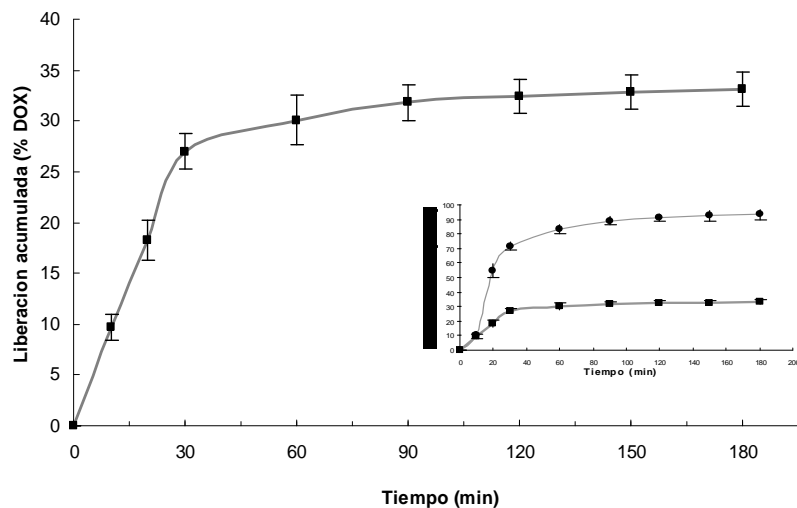


Figure 11: Profil de libération a 37° C dans Buffer Phosphate (pH=7,4) de la Dox depuis une matrice composée par PEC 35 (●) et PEC 55 (■).

Conclusion: Les études de sélection des biopolymères en présence de Dox ont permis d'établir que les carraghénanes, les pectines et l'alginate exercent les plus grandes interactions avec la drogue modèle. A partir des résultats obtenus, les pectines ont été sélectionnées comme les matrices possibles transporteuses, lesquelles ont présenté conformément à leur degré d'estérification une corrélation inverse à leur capacités de gélifier en présence de Ca^{+2} . Ce résultat nous a conduit à étudier un point bas et moyen pour le degré de méthylation: PEC 33, 35 et 55 respectivement. Du fait des propriétés de résistance mécanique des particules formulées sur la base des essais de cinétiques de libération, la PEC 33 a été écartée. Les systèmes formulés avec PEC 35 et PEC 55 ont présenté un taux élevé d'encapsulation, inversement proportionnel au degré de méthylation. D'autre part, la libération de Dox encapsulée dans une matrice de PEC 35 a été 5 fois plus rapide comparée à la libération obtenue depuis la matrice de PEC 55 ce qui suggère que l'effet de l'estérification des groupes

carboxyliques affecte la libération de drogues. Ceci pourrait être dû à la présence des groupements hydrophobes capable d'interagir avec les macromolécules. En effet, les études de spectroscopie FTIR ont permis d'établir des interactions moléculaires drogue-matrice plus intenses en particulier entre les groupes carbonyles et les noyaux aromatiques de la Dox probablement avec les zones hydrophobes de la pectine. Avec la La PEC 55 nous avons obtenu des taux d'encapsulation de Dox de 66 % et une bonne stabilité après un an de stockage.

Les études rhéologiques du complexe PEC 55-Dox ont permis d'établir l'existence d'interactions matrice-Dox, et des informations sur le comportement du système sous cisaillement. Ces interactions matrice-Dox ont été confirmées par les études spectroscopiques. Les informations obtenues sur le système sont des bases importantes pour comprendre et pour prédire le comportement Dox-matrice transporteuse, et le relier au comportement de la formulation dans des conditions physiologiques. Ces études devraient être complétées par une modélisation mathématique et adaptées pour développer des systèmes à libération contrôlée de Dox adaptés au type de tumeur et à leur localisation.

Ainsi, les biogels formés par PEC 55 pourraient être des candidats excellents pour un l'encapsulation de Dox dans une matrice d'hydrogel. Nous proposons leur utilisation dans des systèmes hybrides (matrices bio-inorganiques qui confèrent une plus grande rigidité et une homogénéité de morphologies et de tailles avec une nanoporosité contrôlée). Nous chercherons ainsi à développer des nano - microparticules permettant de transporter et libérer la Dox en vue d'améliorer sa biodisponibilité et de mieux cibler son action *in vivo*.

Synthèse de microparticules hybrides (MPh) incorporant des biopolymères conjugués avec un principe actif:

Effet template des biopolymères Sélection de la Méthode de Synthèse Optimisation des conditions de Synthèse et d'Encapsulation Caractérisation Physicochimique et Biologique

La synthèse de matériaux hybrides a reçu une grande attention ces derniers temps dans le domaine de la médecine régénérative ou en "chirurgie non invasive" (MIS) ainsi que pour le développement de systèmes transporteurs de drogues. Plus particulièrement, le carbonate de calcium est l'un des minerais les plus abondants dans la nature car c'est un constituant important de la structure de certains organismes vivants (carapaces de mollusques par exemple), qui est généré par un processus de biominéralisation. Le composé formé peut se présenter sous six polymorphes différents, et ses combinaisons. Le polymorphe le plus attractif pour des applications en biomédecine est la vaterite, réseau cristallin qui présente des avantages pour développer des nano- ou des microparticules grâce à une plus grande homogénéité dans la distribution de taille, de porosité et qui présente une géométrie sphérique.

La recherche de nouvelles méthodes d'encapsulation qui permettent un rendement d'encapsulation élevé, sans utiliser de solvants organiques et qui n'affectent pas la structure des substances actives a motivé le développement de méthodes alternatives, comme l'usage du dioxyde de carbone comprimé (fluides supercritiques).

Notre objectif, en tenant compte des avantages des biopolymères naturels pour transporter des drogues, sera de développer des microparticules hybrides (MPh) au moyen d'une synthèse chimique et dans les conditions supercritiques [Boury et cols., 2004]. Les MPh seront composées de CaCO_3 comme source inorganique et les biopolymères utilisés comme molécule caneva (« template »). Nous utiliserons les biopolymères qui ont montré des interactions importantes avec la Dox et qui sont adaptés au procédé de synthèse.

Nous comparerons les techniques de synthèse chimique et de supercritiques, et nous les optimiserons en analysant les différentes variables, comme le type de réseau cristallin pour chaque système, l'homogénéité de taille, les caractéristiques morphologiques, l'organisation du biopolymère dans la particule, ainsi que la nanostructure des MPh.

Dans ce chapitre, les microparticules de CaCO_3 ont été synthétisées conformément au procédé décrit dans la Figure 1 (voir le travail complet). La caractérisation a été faite immédiatement après la synthèse, avant de procéder à la congélation avec l'Azote liquide, au moyen de la microscopie optique et SEM (Figure 2). Nous avons observé la présence d'un système homogène et sphérique en ce qui concerne la morphologie et mesuré une valeur moyenne de $5\mu\text{m}$ pour la taille .

Synthèse

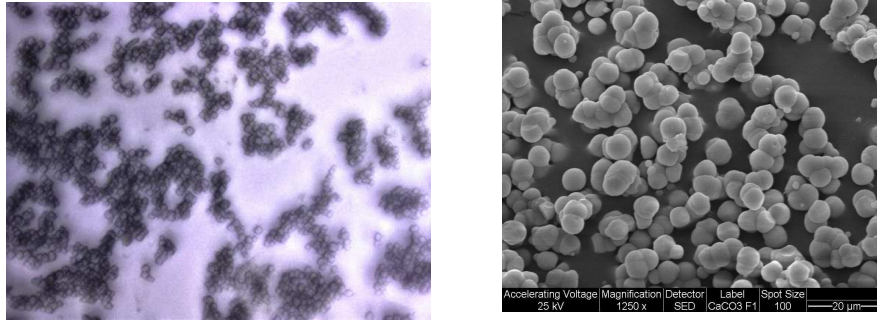


Figure 2: Microscopies pour des particules de CaCO_3 : optique (gauche), SEM (droite)

Concernant l'incorporation de PEC et de CAR les protocoles utilisés ont été modifiés par rapport à ceux décrits dans la bibliographie [Qun et cols, 2010; Caiyu Peng et cols., 2010; Martos et cols., 2010].

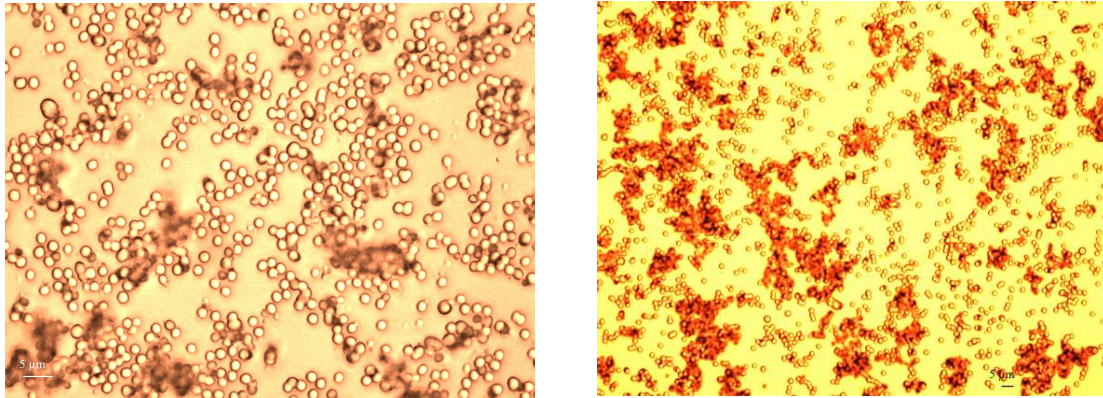
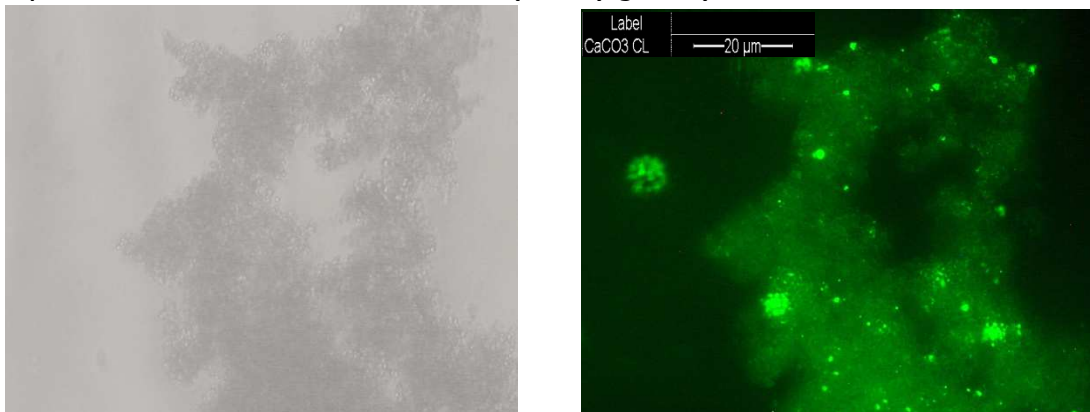


Figure 4: Microscopies optiques de MPh synthétisées à partir de PEC (gauche) et CAR (droite).

Caractérisation de la matrice

La présence des biopolymères dans les MP a été déterminée après conjugaison des biopolymères avec une sonde fluorescente (FTIC (figure 5)).



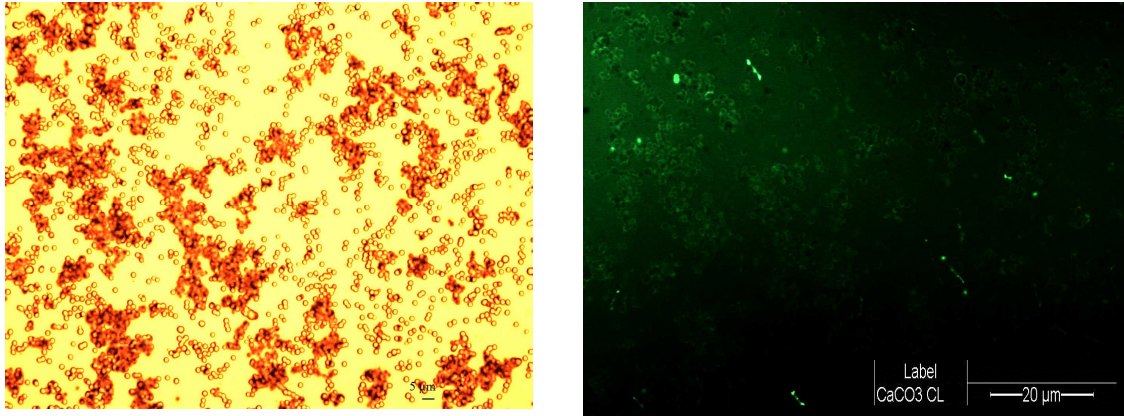
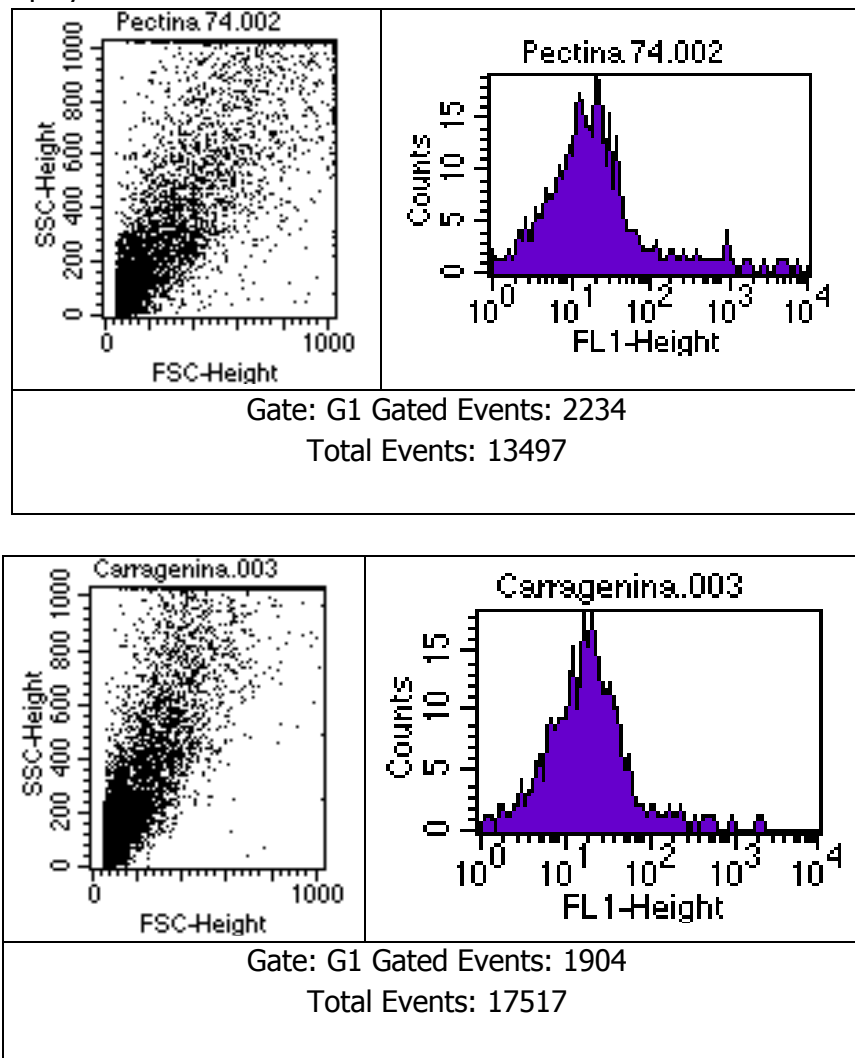


Figure 5: Microscopies optiques (gauche) et de fluorescence (droite) de MPH avec CAR *L.*

Des études ont également été réalisées par cytométrie de flux pour confirmer la présence des biopolymères avec une sonde fluorescente



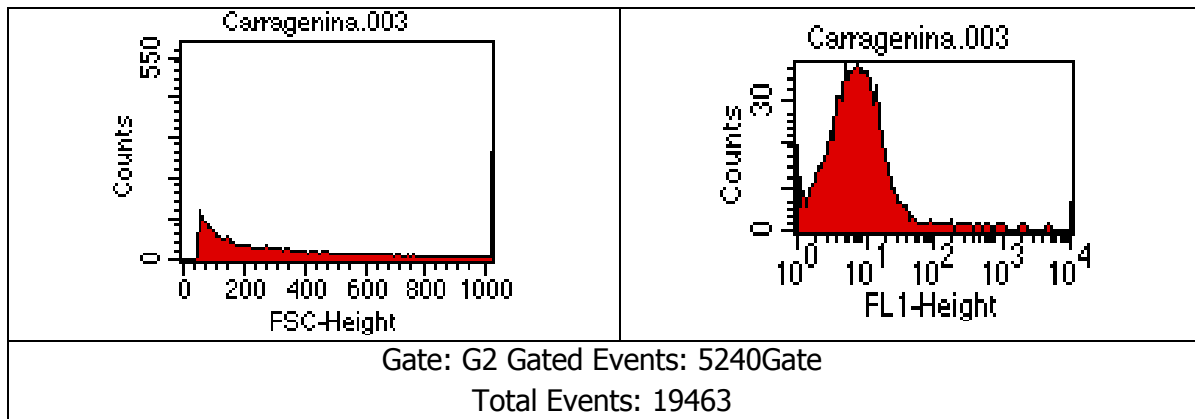


Figure 6 a.: Distribution de tailles et de charge fluorescente (CAR et PEC) pour la fenêtre un nombre 1 (Gate 1) défini comme l'aire comprise entre 400 à 800 FSC-Height et 300 à 900 SSC-Height.

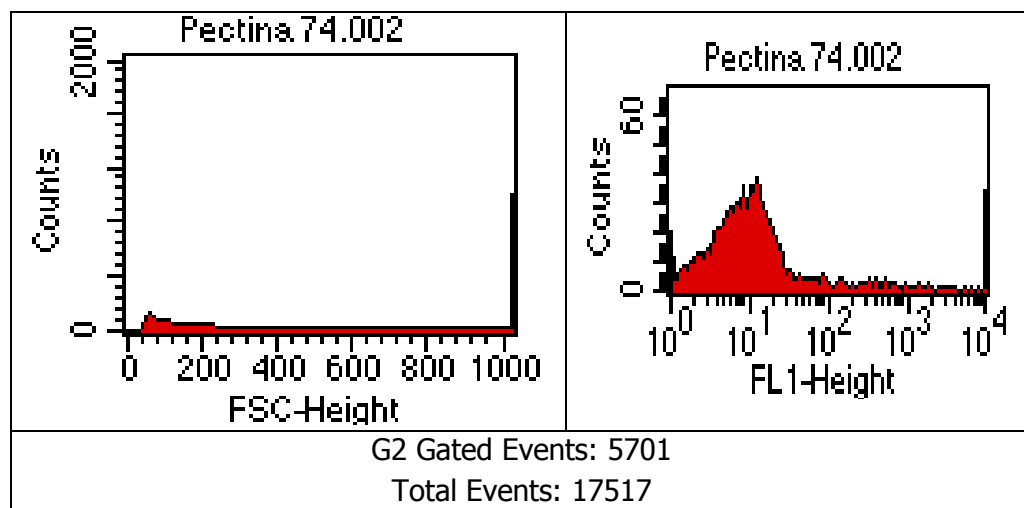


Figure 6 b: Distribution de tailles et de charge fluorescente (CAR et PEC) pour la fenêtre un nombre 2 (Gate 2) défini comme l'aire comprise entre 100 à 300 FSC-Height et 50 à 300 SSC-Height.

Les résultats observés à partir d'images de microscopie confocale (Figure 7) permettent de confirmer la présence des biopolymères à l'intérieur et en surface des matrices hybrides synthétisées comme cela était indiqué par les études de cytométrie du flux et de microscopie de fluorescence

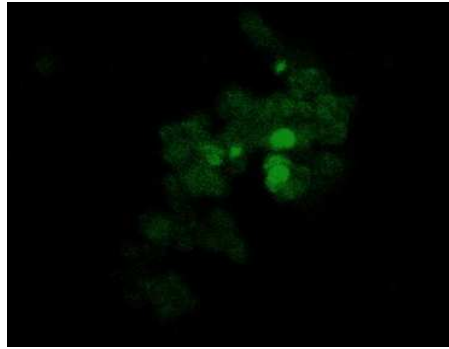


Figure 7: Microscopie Confocale de MPh/carraghénane.

Nous avons également a recouru aux techniques spectroscopiques pour déterminer les interactions possibles des biopolymères au sein du système hybride et pour évaluer l'influence sur la cristallisation de la matrice inorganique de CaCO₃: FTIR (Figure 8) et Raman (résultats non montrés).

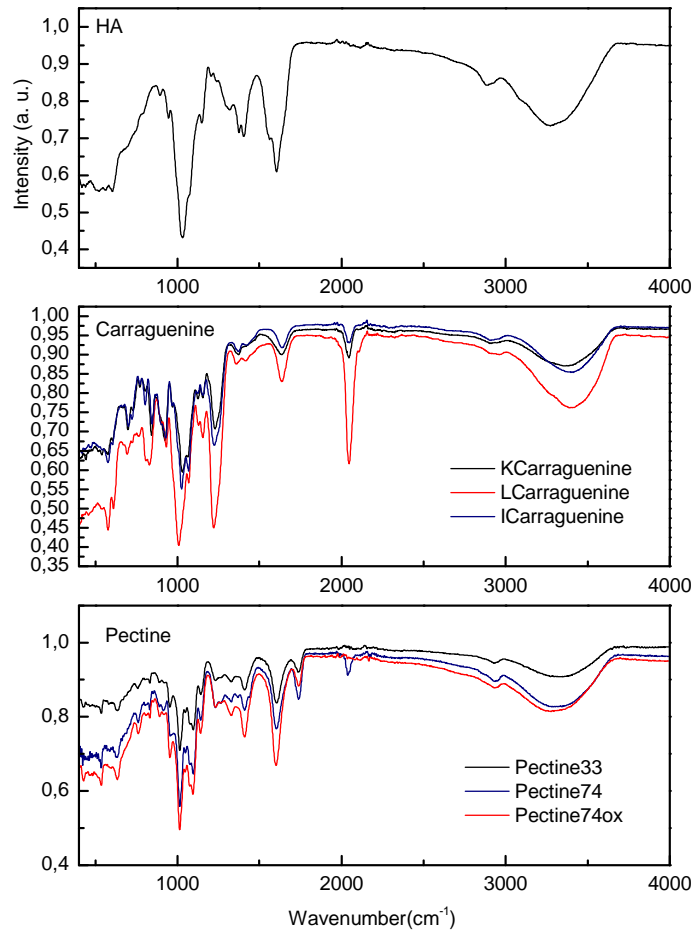


Figure 8: Spectres FTIR pour les biopolymères étudiés: PECs, CARs, Acide Hyaluronique (biopolymère contrôle).

Dans une autre étude, les effets des procédés de lavage et séchage sur la cristallisation du CaCO₃ en présence de différentes pectines et différents carraghénanes ont été évalués par XRD, spectroscopies FTIR et Raman. L'acide hyaluronique était utilisé comme biopolymère contrôle selon le brevet de Boury et cols., [Brevetez 424489, 2004], (Figures 9 et 11).

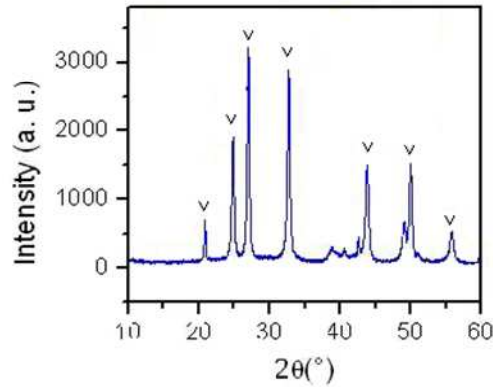


Figure 10: Spectre XRD contrôle pour le CaCO₃ (vaterite).

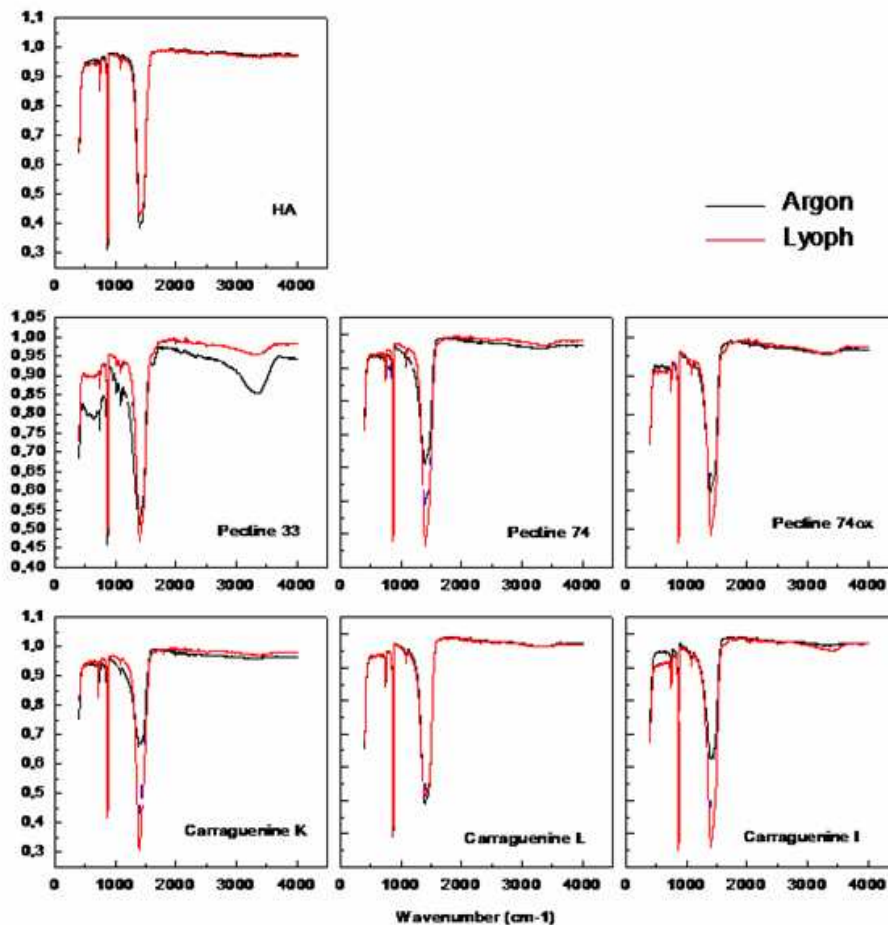


Figure 9: Spectres FTIR pour les MPH composées par chacun de 6 biopolymères et le polymère contrôle. Spectres obtenus après avoir appliqué différents processus de séchage : courant d'Argon ou lyophilisation. (nota: PEC 74ox=PEC 55)

Nous avons également étudié le procédé de synthèse des MPH par l'emploi de CO₂ dans des conditions supercritiques. Les résultats concernant les formes cristallines obtenues à partir de la synthèse par voie chimique et de la synthèse par des fluides supercritiques sont indiqués sur la figure 11.

Les analyses XRD ont montré une proportion vaterite/calcite d'environ 70/30, ce en l'absence de biopolymères, et une augmentation du pourcentage de vaterite atteignant 95 %

dans le cas des carraghénanes. Ceci est mesuré par l'intégration des bandes aux angles 24,8 ° et 29,3 ° pour caractérisant la vaterite et la calcite respectivement [Dickinson et cols., 2001]. En l'absence de biopolymères, le système inorganique seul contenant 71 % de vaterite et 29 % de calcite. En l'absence de tampon (glycine) et sans biopolymères, la proportion de vaterite était de 51 % et de 49 % pour la calcite. Finalement, en présence des biopolymères les pourcentages de vaterite atteignaient 90 %, et 95 % dans le cas des carraghénanes.

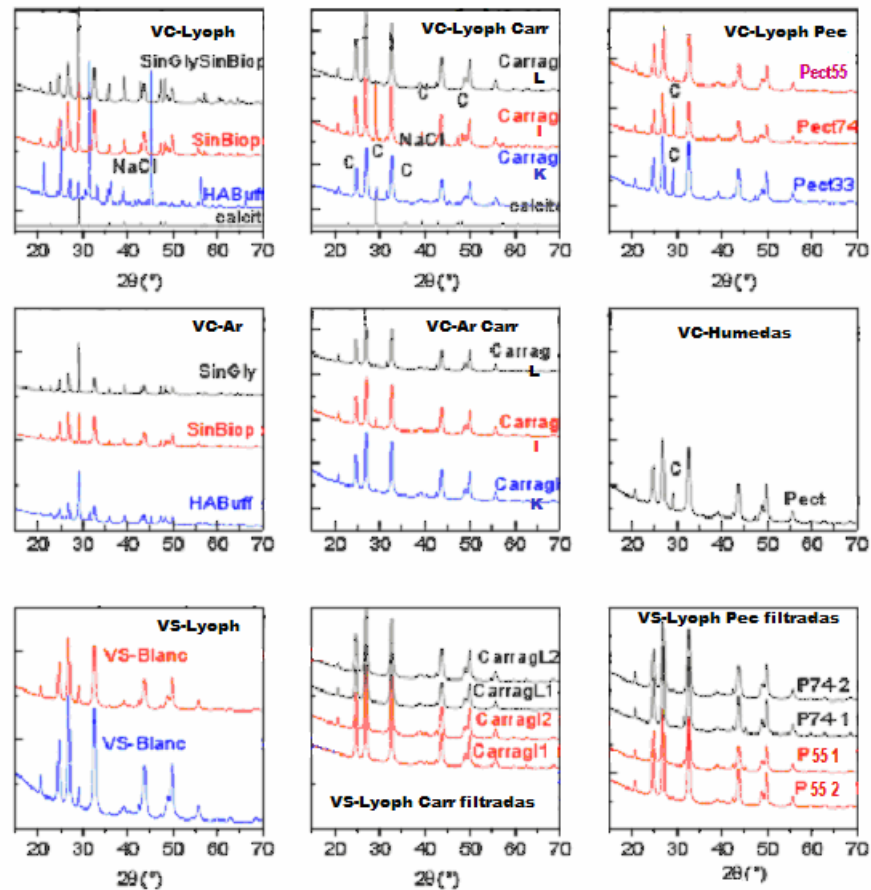


Figure 11: Spectres XRD pour les MPH obtenues avec différents biopolymères et différentes méthodes de séchage. Synthèse par voie chimique (VC) et par voie supercritique (VS). abréviations: Lyoph: séché par lyophilisation; Ar: séché par courant d'Argon. (polymorphes: V=vaterite, C=calcite, A=aragonite).

Synthèse Chimique	Lavage	Buffer	H2O MiliQ	
	Séchage	Argon	Argon	Lyoph
Pectines	33		>90 V	
	55	>90 V	>90 V	>90 V
	74		90V/10C	
Carraghénanes	K		>90 V	>90 V
	I	>90 C	85V/15C	85V/15C
	λ		50V/50C	>95 V

Table 1: Pourcentages des polymorphes trouvés pour les systèmes étudiés sous différentes conditions de séchage et de lavage et fabriqués par synthèse chimique. abréviations: V=vaterite; C=calcite.

Tous les spectres ont montré des résultats similaires: les pectines permettent d'obtenir les systèmes les plus stables. Par voie chimique, nous n'avons trouvé de méthodes de lyophilisation (congelation rapide avec N₂ liquide) des différences significatives ne se trouvent pas dans les pourcentages de vaterite trouvés. Pour le développement des MPH sous des conditions supercritiques, l'élection des meilleures conditions de synthèse et de post-traitement a été basée sur les résultats au préalable observés: un double lavage avec eau MiliQ et séché immédiat avec N₂ (l) et postérieur lyophilisation. (Figura 13).

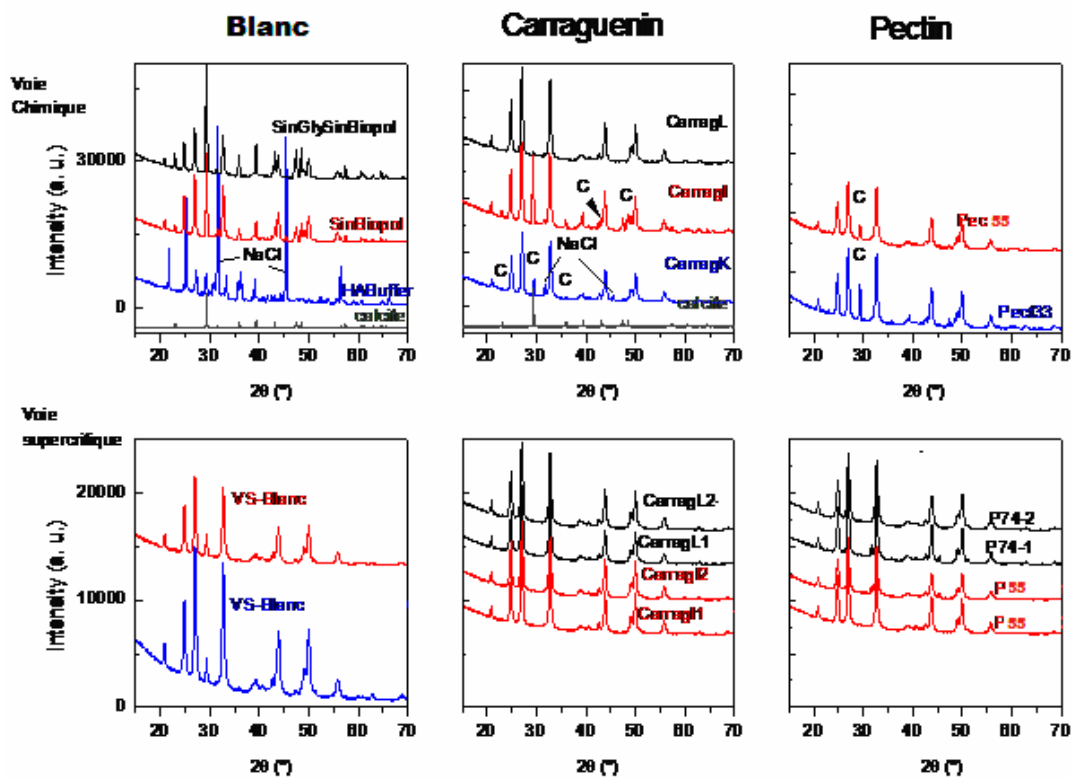
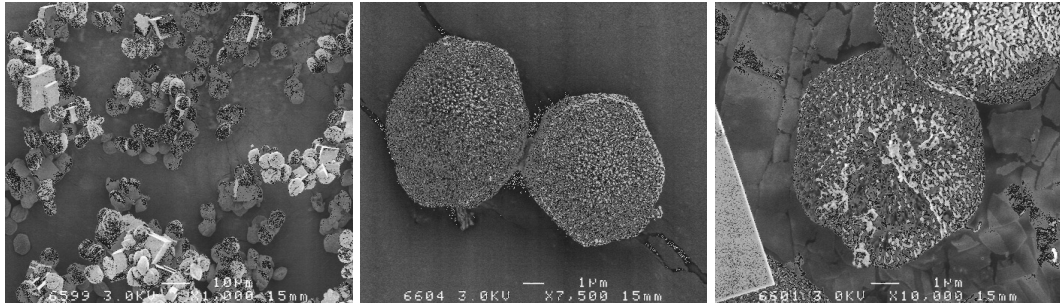


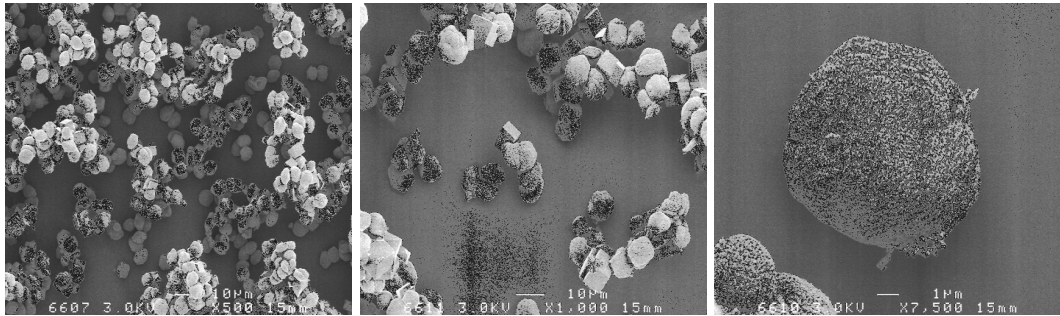
Figure 13: Spectres correspondants aux meilleures conditions de lavage et séchage (avec eau miliQ et lyophilisation respectivement) pour des processus de synthèse par voie chimique (graphiques supérieurs) et par voie SC (graphiques inférieurs).

Des images de SEM ont révélé que les différents types de MPH étaient proche du modèle sphérique avec un diamètre moyen de 2 µm dans le cas des carraghénanes, comparé à 5 µm pour le cas des particules de CaCO₃. Les MPH de pectine présentait une plus grande taille (5µm) et une distribution polymodale. Entre les pectines étudiées (PEC 33, 55 et 74) la PEC 33 permettait d'obtenir une une distribution de tailles moins disperée de même que les CAR Lambda et Iota en comparaison avec le CAR Kappa. Le système présentant la plus faible dispersion de taille était le CAR L (Figure 16).

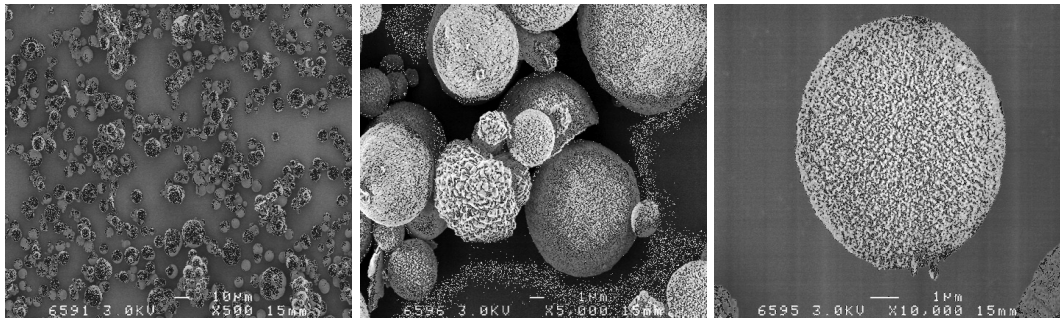
a.



b.



c.



d.

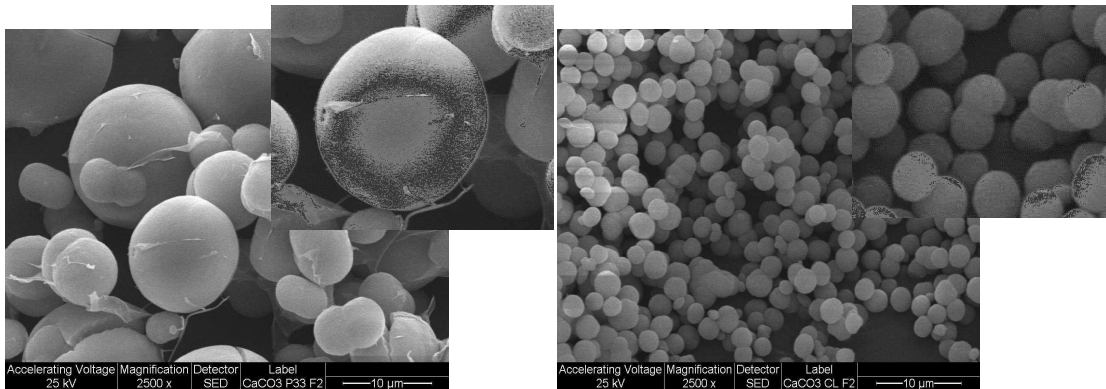


Figure 16. Images SEM pour les différents MPh synthésés par voie chimique: **a.** MP CaCO₃ sans tampon et sans biopolymères; **b.** MP de CaCO₃ sans biopolymères; **c.** MPH avec biopolymères. **d.** optimisation de la synthèse avec PEC 33 (gauche) et CAR L (droite).

Etudes d'encapsulation

Nous avons cherché à encapsuler un agent anticancéreux modèle, la Dox en utilisant trois méthodes différentes: pendant la synthèse, absorption/adsorption, recouvrement des MPH avec le biopolymère conjugué à la drogue. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la méthode d'absorption/adsorption et ceci quelque soit le mode de synthèse des MPH. Dans ces conditions, les rendements d'encapsulation atteignaient 95 %. Avec cette méthode d'incorporation nous avons évalué l'influence du type de tampon MES ou citrate, ce dernier pouvant chélater les ions Ca^{2+} (Figure 18)

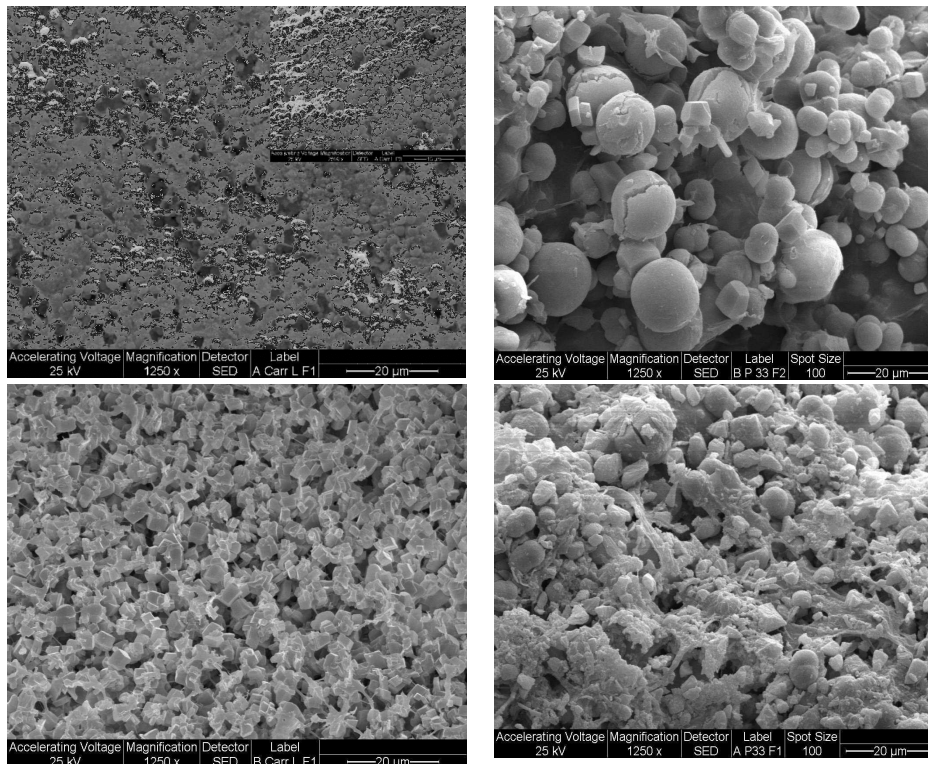


Figure 18: Microscopies SEM pour des systèmes lyophilisés de MPH contenant la Dox. grossissement : (1250X). Superieur: CAR L et PEC 33 (gauche et droite respect.) tampon MES. On bas: CARR L et PEC 33 (gauche. et droite. respect.) tampon Citrate.

Analyse par lumière de synchrotron: Détection de biopolymères et Dox

Pour déterminer la distribution des biopolymères sélectionnés (CAR L et PEC 33) dans MPHs nous avons procédé à des coupes fines (épaisseur=100nm) des particules hybrides après une immobilisation préalable dans une résine Epon. Les échantillons ont ensuite été observés par lumière de synchrotron dans la région de l'infrarouge. (Figures 19 1 a et b ; 2 a et b).

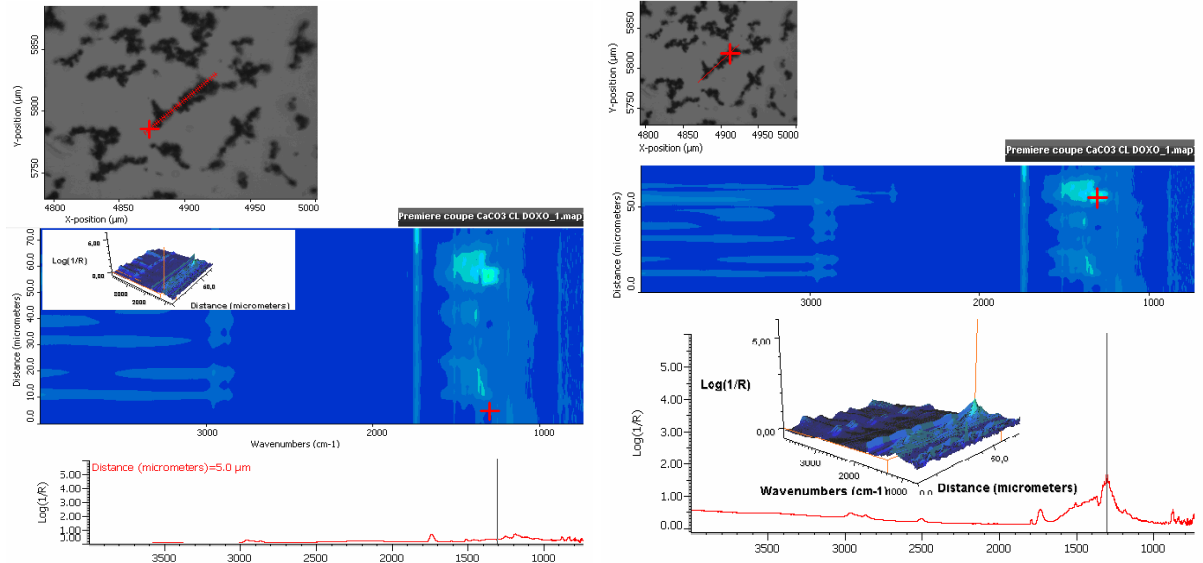


Figure 19 1.a et b (Gauche et Droite respectiv.): Images d'une coupe de MPh formulée avec **CAR L** observés sur matrice Epon pour une zone **sans MPh (Gauche)** (voir la position de la croix sur la photographie) ou **avec MPh (Droite)**. Spectre FTIR (images inférieures) indiquant la position du groupement fonctionnel biopolymérique observé dans l'espace.

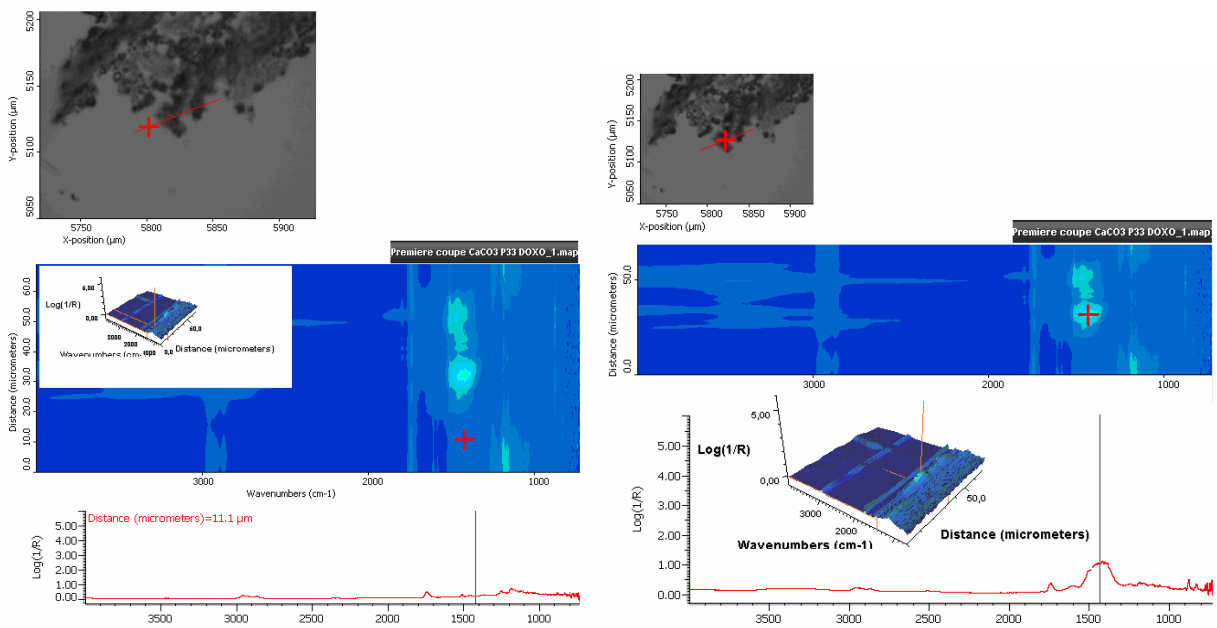


Figure 19 2.a et b (Gauche et Droite respectiv.): Image d'une coupe de MPh formulée avec **PEC 33** observés sur matrice Epon pour une zone **sans MPh (Gauche)** (voir la position de la croix sur la photographie) ou **avec MPh (Droite)**. Spectre FTIR (images inférieures) en indiquant la position du groupe fonctionnel biopolymérique observé dans l'espace.

Nous avons pu ainsi vérifier dans l'espace la présence des biopolymères à l'intérieur des particules ainsi que la Dox fluorescente (Figure 20).

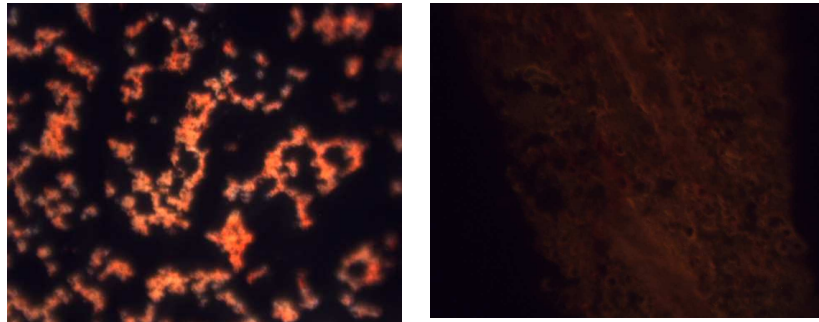


Figure 20: Images de fluorescence pour des coupes de MPh observés sur résine Epon: CAR L (gauche), PEC 33 (droite).

Etudes de libération *in vitro*.

Des essais de libération ont été réalisés dans des milieux simulant les conditions rencontrées dans le tractus gastro-intestinal. Les résultats obtenus durant 48 jours pour des particules pré - traitées en milieu acide (pH = 2.0) sont présentés sur la Figure 21.

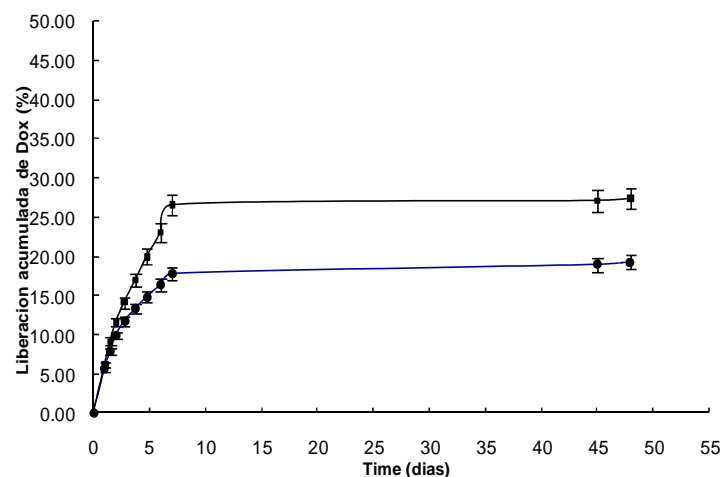


Figure 21: Essais de libération de Dox en tampon PBS stérile à 37 °C sous une agitation douce (40 rpm).

La charge initiale pour la CAR L était de 208.4 µg de Dox (rendement d'encapsulation 92 %), alors que pour la PEC 33 elle était de 154.4 µg de Dox (rendement d'encapsulation 69 %). Les libérations totales pour 48 jours ont été de 27.4 et 19.4 % respectivement.

Etudes de cytotoxicité *in vitro*

Des études de survie/mort cellulaire ont été réalisées sur de lignées de fibroblastes NHI-3T3 et sur des lignes cellulaires primaires d'astrocytes de rat. Nous avons utilisé comme témoin des particules sphériques de polystyrène avec un diamètre de 5 µm. Nous avons évalué différentes concentrations de MPh formulées avec PEC 33 et CAR L. Les résultats obtenus pour

les deux types cellulaires (Figure 22 et 23) analysés avec un Test de Student ($p < 0,5$) permettent de conclure sur la non existence de différences significatives entre les échantillons de MPh (PEC 33 et CAR L) et le témoin en terme de mort cellulaire.

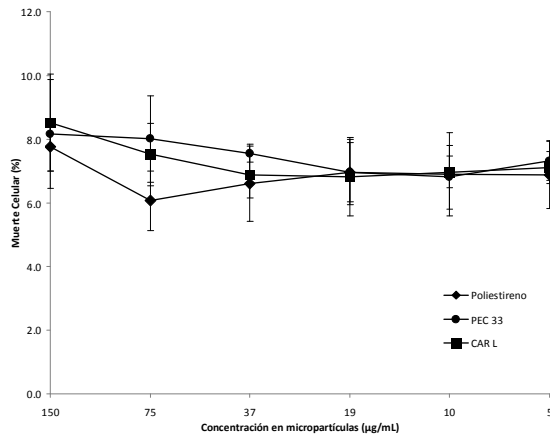


Figure 22: Mort cellulaire des lignées d'astrocytes de rats en présence de MPh contenant CAR L ou PEC 33.

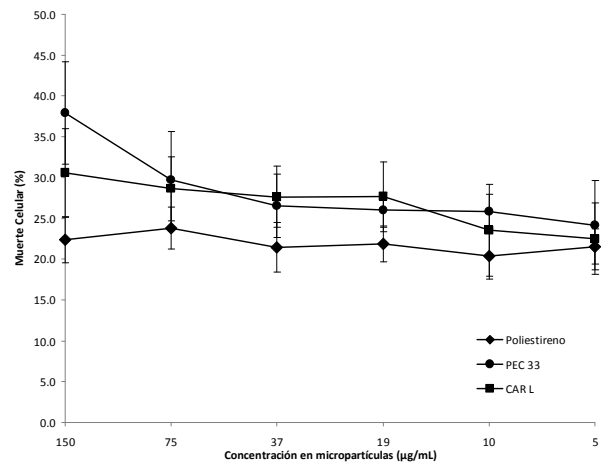


Figure 23: Mort cellulaire pour lignée de fibroblastes NHI-3T3 en présence de MPh contenant CAR L ou PEC 33.

Conclusion : La synthèse des microparticules de carbonate de calcium dépend des propriétés physicochimiques de l'environnement et des composants de la réaction, lesquels jouent un rôle crucial dans la cristallisation colloïdale. Dans les conditions expérimentales étudiées dans ce travail, le biopolymère joue le rôle de template pour la synthèse des MP. Les spectroscopies vibrationnelles (FTIR et Raman) et des Rayons X montrent que les pectines comme les carraghenanes permettent d'obtenir des systèmes stables avec un haut pourcentage de vaterite. Ces résultats ont été obtenus dans les systèmes séchés sous courant d'argon ou pour les systèmes lyophilisés. La spectroscopie de fluorescence et la microscopie confocale indiquent la présence des biopolymères dans la matrice poreuse inorganique, et les études de SEM mettent en évidence un faible indice de polydispersité pour les systèmes formulés avec les carraghenanes (I et L) et PEC 33. Cependant, les pectines permettent d'obtenir les particules les plus petites. Les systèmes ont permis l'incorporation de Dox, détectée par la technique de microscopie de fluorescence. La présence des biopolymères au sein des MPh a été réalisée avec des sondes moléculaires fluorescentes. L'analyse structurale des MPhs par spectroscopies vibrationnelles (FTIR et Raman) ont également révélé la présence de structures cristallines comme le vaterite et le calcite. La structure physique a été précisée par XRD.

Sur la base des résultats présentés nous pouvons conclure que les biopolymères sélectionnés permettent l'obtention de microparticules hybrides par voie chimique, ou par l'intermédiaire d'une émulsion d'eau dans CO₂ dans des conditions supercritiques [Boury et coll., Brevet WO 2007/072106]

D'autre part, nous n'avons pas observé de différences entre les biopolymères étudiés en ce qui concerne leur action en tant que molécule « template ». Dans tous les cas, ces polymères créent un environnement favorable pour la cristallisation du CaCO_3 dans un réseau cristallin de type vaterite. Cependant, la présence d'un tampon glycine semble nécessaire pour la synthèse de MP en milieu CO_2 supercritique. Cela pourrait être expliqué par le processus d'acidification que subit la solution à l'intérieur de l'autoclave durant la synthèse, étant donnée la solubilisation du CO_2 qui génère des espèces H^+ , HCO_3^- et CO_3^{2-} dans la solution, ralentissant la précipitation du CaCO_3 .

La synthèse chimique s'est montrée plus efficace que la synthèse alternative SC pour le système MPh-Dox. Par absorption nous avons pu obtenir de hauts rendements d'encapsulation de Dox (supérieur à 90 % dans le cas de la CAR L), des libérations prolongées dans le temps avec concentrations contrôlées dans des conditions simulant les milieux gastro-intestinaux. La faible cytotoxicité *in vitro* des particules développées permet d'envisager ces systèmes comme matrices potentielles pour des molécules anticancéreuses, ou pour augmenter l'efficacité de la réparation tissulaire.

Conclusions

L'administration de médicaments hautement toxiques reste un défi de la pharmacologie, et justifie le développement de systèmes à libération contrôlée. Dans ce contexte, nous avons développé des matrices constituées de biopolymères ou d'un système hybride biopolymère/carbonate de calcium permettant de libérer une molécule modèle..

Dans une première approche, le Congo Rouge a été utilisé comme molécule modèle et encapsulé au moyen d'une synthèse par gélification ionique. Parmi les différents biopolymères étudiés, les meilleurs résultats ont été obtenus avec des "coacervats" formés par un alginat et une gomme gomme guar carboxyméthylée. Le biogel développé s'est montré résistant aux conditions environnementales acides simulant le milieu gastrique, alors que dans un milieu alcalin la désagrégation des particules se produisait rapidement. Par ailleurs, la présence de CMGG permettait de stabiliser le gel d'ALG en permettant sa réhydratation après lyophilisation. Des expériences de libération *in vitro* ont mis en évidence une libération plus lente de RC de la matrice d'ALG-CMGG comparé aux microsphères d'ALG sur une durée supérieures à 8 heures. Les analyses rhéologiques et la spectroscopie vibrationnelle ont révélé des interactions entre le mélange biopolymérique ALG-CMGG et le RC du fait de la présence des groupes aromatiques du RC qui interagiraient avec les zones hydrophobes des biopolymères.

A partir de ces résultats, nous avons étudié les interactions entre les biopolymères et la Doxorubicine, une drogue de haute toxicité très employée dans divers traitements anticancéreux. Parmi les biopolymères potentiels qu'étaient les alginates, les carraghénanes, les pectines, les gommes et la gélatine, les pectines, suivies des carraghénanes, ont montré la plus grande interaction avec le médicament. Le biopolymère sélectionné, sur la base du rendement d'encapsulation et des caractéristiques de libération, a été PEC 55. Les études de spectroscopie FTIR ont indiqué des interactions moléculaire entre la drogue et le biopolymère, probablement entre les groupes carbonyles et les cycles aromatiques de la Dox avec les zones hydrophobes de la pectine. Une stabilité excellente a été observée après un an de stockage. Les études rhéologiques du complexe et de PEC 55-Dox ont permis d'établir l'existence d'interactions entre les deux constituants, ainsi que le comportement fluide du système. Les études de libération et la modélisation mathématiques des profils ont montré la possibilité de contrôler dans une certaine mesure la libération de Dox. Des études ultérieures pourraient être envisagées pour évaluer l'intérêt thérapeutique d'un tel système.

Les biopolymères qui ont démontré la plus grande interaction avec la Dox (pectines et des carraghénanes) ont été utilisés pour développer des systèmes hybrides biopolymériques-inorganiques à base de carbonate de calcium. Ces système, dont il est possible de réduire la taille de particule et de contrôler la porosité permettent de moduler la cinétique de libération de la Doxorubicine en jouant sur la désagrégation/solubilisation des particules, notamment en fonction du pH. La synthèse des particules de CaCO₃ a été réalisée en présence de fluides supercritiques (CO₂) et par voie chimique en utilisant les pectines ou les carraghénanes comme molécules canevas ou « templates ». Avec ces polymères, nous avons obtenu un système hybride stable contenant 95% de vaterite. Ces MPH ont permis d'obtenir des rendements d'encapsulation de la atteignant 90 % et des cinétiques de libération libérant 20 à 30 % de la

charge initiale sur des périodes de 45 jours. Ces systèmes n'ont pas montré de cytotoxicité supérieure à un témoin constitué de microsphères de polystyrène.

Nos résultats ont permis d'établir une stratégie de sélection de biopolymères potentiellement intéressant pour le développement de systèmes à libération contrôlée de médicaments. Les perspectives de ce travail en micro - et nanobiotechnologies concernent l'évaluation biologique de ces nouveaux systèmes hybrides.