



**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas**

Trabajo de Tesis Doctoral

**Desarrollo de matrices biopóliméricas basadas
en polivinil alcohol
para la liberación controlada de
antibióticos y biomoléculas**

Tesista

Lic. Martínez N. Yanina

2013

Centro de Biotecnología Aplicada (CINDEFI)
Universidad Nacional de La Plata (UNLP) – CONICET (CCT La Plata)
Argentina



Desarrollo de matrices biopólimeras basadas en polivinil alcohol para la liberación controlada de antibióticos y biomoléculas

El presente trabajo de Tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, con el financiamiento de la Universidad Nacional de La Plata, el CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

Tesista: Lic. Martínez N. Yanina

Director: Castro, Guillermo R.

Agradecimientos

A Guiye, mi Director de Tesis. Le agradezco por darme la posibilidad de tomar contacto y sumergirme en este mundo de la Investigación, que está buenísimo!!

A mis amigos del lab Vale, Germán y Maxi por compartir las experiencias de la mesada y de la vida. Trabajar en equipo, es la joya que me llevo de todo este camino recorrido.

A mi familia (Normi, Adolfo, Noe, Mariel y Felipin) por su amor, contención y amistad.

A Tato e Ivana. Una colaboración que dió sus frutos científicos y forjó una linda amistad.

A la gente de La Universidad de La Pampa, Dr. Javier Breccia y Dra. Lucrecia Piñuel. Gracias por introducirme en el mundo del Polivinil alcohol y suministrármelo cuando Sigma no lo hacía. Aprendí mucho trabajando con Uds.

Al Dr. Andrés Illaños por permitirme hacer una estadía en su laboratorio. Fue una experiencia muy fructífera y enriquecedora.

A Jimena González y su directora Dra. Vera Alejandra Alvarez del lab de Materiales Compuestos de Matriz Polimérica, INTEMA. Por recibirnos en su lab y ayudarnos a caracterizar los polímeros.

A Matheus Cardoso de LNLS Brasil, por la buena predisposición a recibir y analizar las muestras en la línea SAXS 1. A "Fionita" por ayudarnos en la misma tarea.

Ultimo pero no menos, a los organismos de investigación que hicieron posible el desarrollo del presente trabajo de Tesis en el Laboratorio de Nanobiomateriales perteneciente al Centro de Biotecnología Aplicada (CINDEFI) en la Argentina. Al CONICET, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), y la Universidad de La Plata, en particular Al Sr. Vice Presidente de la UNLP, Dr. Raúl Perdomo por autorizar los fondos para asistir y exponer mi trabajo en el NHBT Congreso Internacional de Biotecnología en Trivandrum, India.

A mis padres Norma y Adolfo.

Normi, gracias por quedarte...

INDICE

	Página
Introducción general	1
Objetivos generales	10
Referencias	11

CAPITULO 1

Desarrollo de criogeles de Polivinil alcohol y Pectina para la liberación controlada de Enrofloxacin

	Página
1.1.- Introducción	14
1.2.- Materiales y métodos	17
1.3.- Resultados y Discusión	22
1.3.1 Liberación de enrofloxacin en criogeles de PVA	22
1.3.2 Interacción de enrofloxacin con pectinas (P)	23
1.3.3 Cinética de liberación de Enrofloxacin en criogeles de PVA-P	25
1.3.4 Cinética de liberación de Enrofloxacin en sistema de películas dobles.	26

1.3.5 Caracterización del sistema película-antibiótico	27
1.3.6 Espectroscopía IR por Transformada de Fourier	27
1.3.7 Microscopía Electrónica de las películas	29
1.3.8 Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	38
1.3.9 Dispersión de rayos X abajo ángulo (SAXS)	40
1.4.- Conclusiones	42
1.5.- Referencias	44
1.6.- Apéndice	47

CAPITULO 2

Inmovilización de queratinasa en films de PVA-P conteniendo enrofloxacin para el desbridamiento de escaras

	Página
2.1.- Introducción	49
2.2.- Materiales y métodos	51
2.3.- Resultados y Discusión	57
2.3.1 Actividad de queratinasa frente a proteínas presentes en la piel.	57
2.3.2 Estabilidad de la queratinasa en presencia de enrofloxacin	58

2.3.3 Inmovilización de queratinasa en películas de PVA- P de distinto grado de metoxilación. Cinéticas de liberación.	59
2.3.4 Actividad antimicrobiana de enrofloxacin en presencia de queratinasa	64
2.3.5 Co-inmovilización de la queratinasa y enrofloxacin en películas de PVA-P	66
2.3.6 Caracterización del sistema película-antibiótico-queratinasa	67
2.3.6 Microscopía Electrónica de las películas	67
2.3.7 Difracción de rayos X (DRX)	68
2.3.8 Dispersión de rayos X a bajo ángulo(SAXS)	71
2.3.9 Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	76
2.4.- Conclusiones	77
2.5.- Referencias	79

CAPITULO 3

Estudios en agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA) de queratinasa incluidos en criogeles de PVA y PVA-P

	Página
3.1.- Introducción	82

3.2.- Materiales y métodos	84
3.3.- Resultados y Discusión	88
3.3.1 Optimización de la operación de agregación enzimática.	88
3.3.2 Estabilidad de queratinasa en presencia de solventes, temperatura y concentraciones de NaCl variable.	90
3.3.3 Parámetros cinéticos de la enzima libre y CLEA	98
3.3.4 Inmovilización de CLEA en criogeles de PVA y PVA-P55 y cinética de liberación.	98
3.3.5 Caracterización de CLEA.	100
3.3.6 Microscopía Electrónica de barrido.	100
3.3.7 Difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS).	100
3.4.- Conclusiones	101
3.5.- Referencias	103
Conclusiones generales	104
Perspectivas	109

Resumen

La utilización de quinolonas para el tratamiento antimicrobiano es muy frecuente hoy en día tanto en la medicina veterinaria como humana. Debido a la estructura química que presentan estos antibióticos, es muy importante tener en cuenta la administración en altas dosis y poder relacionarla con los efectos adversos que ello pueda generar en el ser vivo. Por lo general, las dosis utilizadas actualmente están por encima de las dosis terapéuticas alcanzando los niveles de dosis tóxicas. Sumado a la repetición en las dosis diarias, esto conlleva a la formación de cristales de quinolonas que pueden alojarse en los riñones. Por un lado, teniendo en cuenta los avances en la liberación controlada de drogas y por otro lado la utilización de matrices poliméricas para albergar tanto moléculas inorgánicas como biomoléculas, se propuso como objetivo utilizar una matriz polimérica capaz de albergar una quinolona de origen sintético y observar su liberación controlada en el tiempo. De esta forma, evitar la administración en dosis tóxicas del antibiótico ya que una liberación controlada ofrece la posibilidad de administrar dosis constantes y prolongadas en el tiempo evitando así la exposición a dosis continuas y en niveles por encima de la ventana terapéutica.

Con el fin de lograr dicho objetivo, en el presente trabajo de Tesis se trabajó con una quinolona llamada enrofloxacin y una matriz polimérica compuesta de polivinil alcohol y pectina. Ambos polímeros están aprobados para su uso en sistemas *bio*. Aprovechando las características del polivinil alcohol, se utilizaron películas a base de ciclos de congelado y descongelado para albergar a la enrofloxacin y observar su cinética de liberación y en un futuro proponer a dichas películas como dispositivos para el tratamiento de infecciones *in situ*, es decir en forma de parche o apósito en el lugar de la infección. Por lo general las infecciones alojadas en la piel se observan en zonas necróticas o lesionadas como lo son las quemaduras o las escaras. Estas zonas necróticas ofrecen una barrera en la difusión de antibióticos hacia el lugar de la infección. Es por ello que en el presente trabajo, se propuso trabajar con una queratinasa capaz de hidrolizar proteínas presentes en esas zonas lesionadas y de esta forma permitir que la administración local del antibiótico llegue al lugar de la infección. Con lo cual se trabajó con películas conteniendo el antibiótico y el antibiótico más la queratinasa.

Las películas conteniendo al antibiótico y al antibiótico más la queratinasa se caracterizaron mediante distintas técnicas utilizadas ampliamente en el área de materiales con el fin de obtener información sobre la interacción de la enrofloxacin con la matriz y si la presencia de pectina y/o la enzima, afectaban en la cinética de liberación del antibiótico.

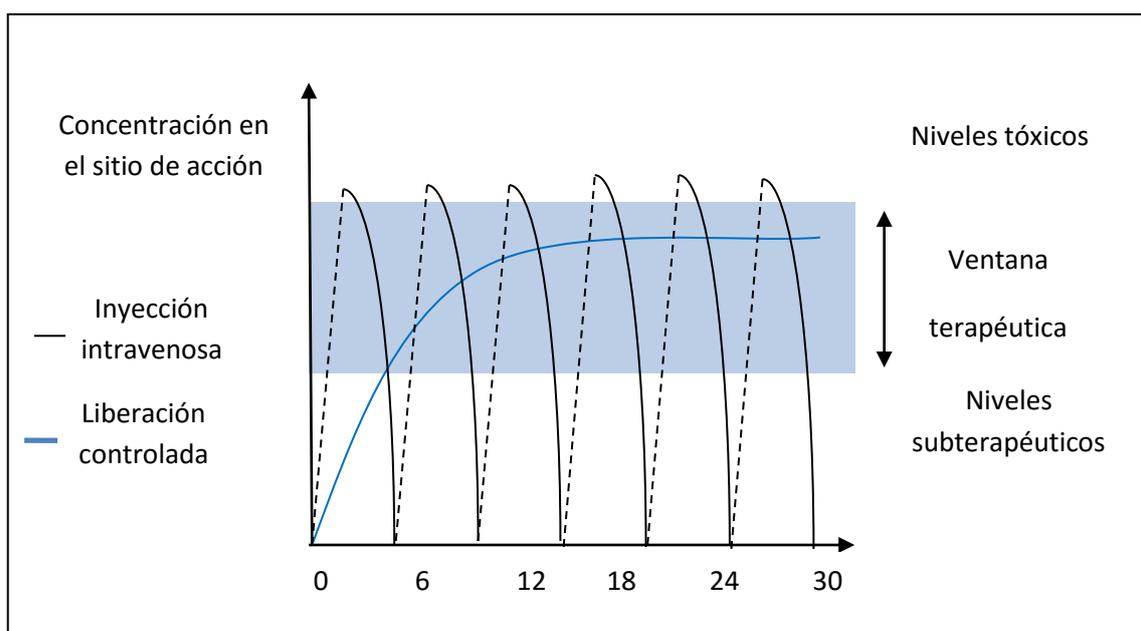
Introducción general

Actualmente, la mayoría de las metodologías terapéuticas de administración de fármacos en el cuerpo no poseen los parámetros fármaco-cinéticos requeridos para el tratamiento de las patologías, por lo que se recurre a la administración de altas dosis alcanzando niveles tóxicos. Sumado al caso de que el fármaco posea una ventana terapéutica estrecha es necesario aplicar varias dosis diarias. Los efectos adversos de estos sistemas han sido ampliamente descritos y afectan diversos órganos del cuerpo fuera del órgano blanco y desafortunadamente disminuyen la calidad de vida del ser humano (Organización Mundial de la Salud, 2004; Thanki, 2013).

La liberación controlada de fármacos, a través de mecanismos de atrapamiento y/o encapsulación de fármacos en matrices biopoliméricas, se postula como una alternativa promisoriosa a ésta problemática.

En la figura 1 se observa como los sistemas convencionales llegan a alcanzar niveles tóxicos, sin embargo no es el caso de los sistemas de liberación controlada.

Figura 1. Ventana terapéutica de fármacos. Liberación controlada vs administración intravenosa



En la **tabla 1** se detallan algunos ejemplos de biopolímeros utilizados en liberación controlada de moléculas (Pal, 2009).

Tabla 1. Aplicaciones de biopolímeros con fines terapéuticos.

Biopolímeros	Usos
Alginato	Liberación controlada de fármacos, encapsulamiento de células
Almidón	Ingeniería de tejidos, Liberación controlada de fármacos
Carragenina	Ingeniería de tejidos, Liberación controlada de fármacos
Colágeno y gelatina	Liberación controlada de fármacos, recubrimiento de heridas, ingeniera de tejidos
Derivados de celulosa	ingeniera de tejidos, Liberación controlada de fármacos
Dextrano	Liberación controlada de fármacos, recubrimiento de heridas, ingeniería de tejidos, encapsulamiento de células.
Ácido hialurónico	Liberación controlada de fármacos, recubrimiento de heridas, ingeniería de tejidos
Pectina	Liberación controlada de fármacos, recubrimiento de heridas, ingeniería de tejidos
Quitina y Quitosano	Liberación controlada de fármacos, recubrimiento de heridas, ingeniera de tejidos

Enrofloxacin y liberación controlada

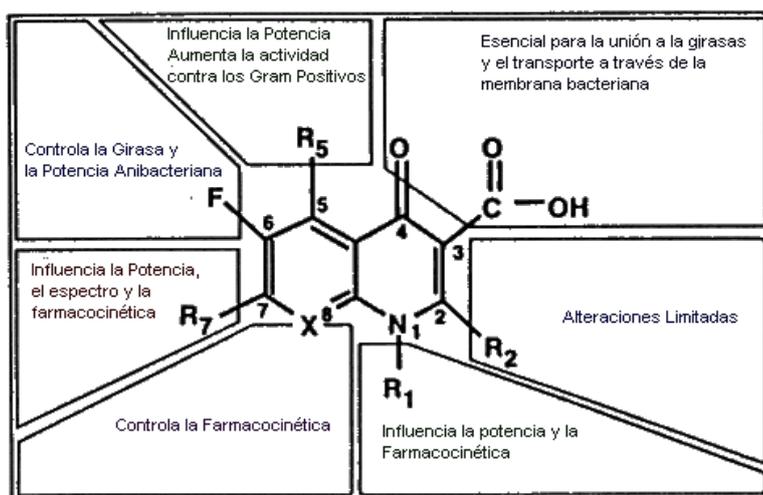
En particular, las fluoroquinolonas, antibióticos derivados del ácido nalidíxico, se han demostrado en la última década ser potentes agentes bactericidas y son ampliamente empleados en el tratamiento de patologías microbianas de amplio

espectro. Así, las fluoroquinolonas se emplean para el tratamiento de infecciones causadas por micobacterias, micoplasma, *Chlamidia*, *Legionella* y *Brucella* spp. (Lizondo y col., 1997).

El mecanismo de acción de las fluoroquinolonas consiste en la inhibición de la actividad de la enzima ADN girasa, la cual controla el superenrollamiento del ADN convirtiéndolo en una estructura relajada apta para la replicación. En consecuencia, las fluoroquinolonas inhiben la replicación del ADN bacteriano. En la figura 2 se muestra la estructura de las fluoroquinolonas y su relación funcional.

Figura 2. Relación entre estructura y función de las fluoroquinolonas

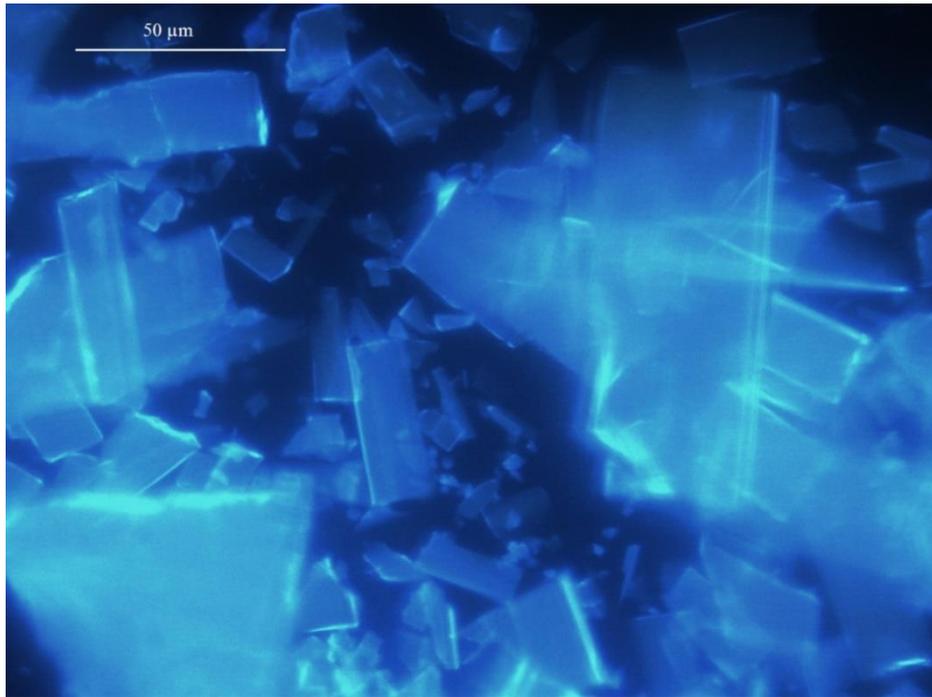
Fuente: Fármaco Web, Dpto. de Cs Fisiológicas, Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia



Relación entre la estructura y la actividad antibacteriana de las Quinolonas

Debido a su estructura, las fluoroquinolonas administradas en altas dosis presentan apilamiento molecular dado por los orbitales π de los anillos aromáticos. Este fenómeno presenta desventajas debido a que se ha observado la presencia de cristales de enrofloxacin en riñones y otros órganos. En la figura 3 se observa la formación de cristales en una solución acuosa de 10.0 mg/ml de enrofloxacin obtenida mediante microscopia de fluorescencia.

Figura 3. Microscopia de fluorescencia de cristales de enrofloxacin.



Actualmente, se ha propuesto a los sistemas de liberación controlada como una potencial solución para la administración de fármacos, especialmente hacia aquellos fármacos que presentan problemas de solubilidad en condiciones fisiológicas y problemas de biodisponibilidad. Por ejemplo, se ha informado la liberación controlada de ciprofloxacina (también perteneciente a las familias de fluoroquinolonas) en películas delgadas de quitosano y polietilenglicol entrecruzados con tripolifosfato de sodio (TPP) obteniéndose una liberación sostenida de hasta 30 horas (Wang, 2007).

Los biopolímeros son macromoléculas sintetizadas por sistemas vivos, a saber, plantas, microorganismos, etc. Por lo general, son biocompatibles es decir que no provocan efectos secundarios indeseables al contacto con los sistemas vivos. En comparación a los polímeros sintéticos, pueden ser fácilmente derivatizados obteniendo sistemas de liberación controlada eficientes (Rathi, 1999).

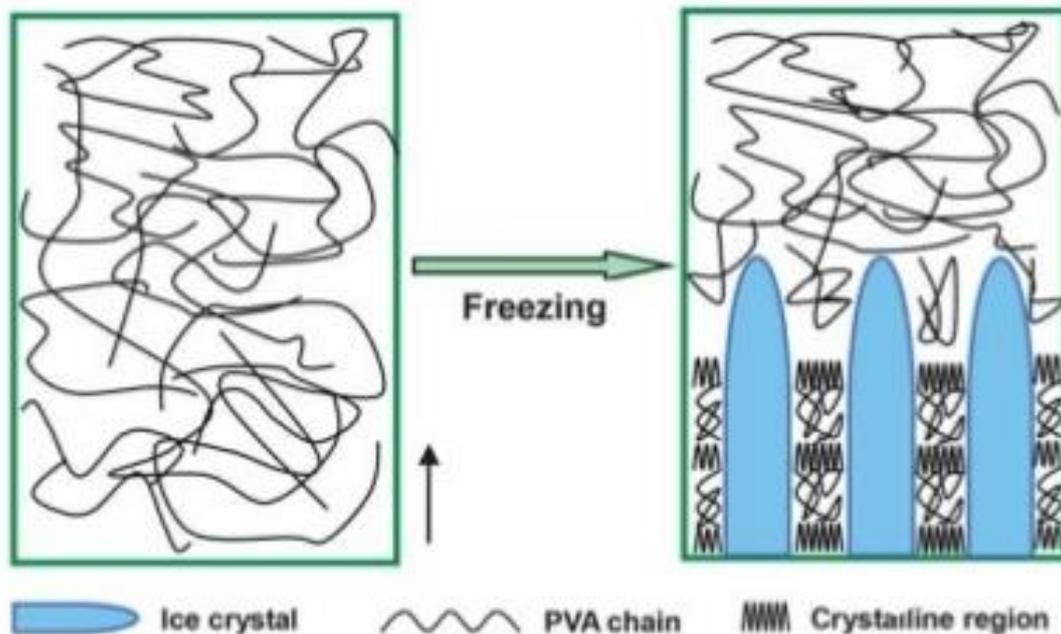
Polivinil alcohol. Formación de criogeles e interacción con otros biopolímeros

Entre los polímeros utilizados para la administración de fármacos inmovilizados en películas, se encuentra el PoliVinil Alcohol (PVA). El PVA se obtiene mediante la hidrólisis del polivinil acetato, la cual puede ser parcial o total.

Actualmente se comercializa el PVA con grado de hidrólisis de hasta un 98 %. Si bien el PVA no es obtenido de una fuente natural, ha sido aprobado por la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) para uso humano. El PVA es un polímero hidrofílico capaz de gelificar *per se*. La formación del gel de PVA se produce mediante la incubación de una solución acuosa de alcohol vinílico en ciclos sucesivos de congelado y descongelado formando una red espacial no covalente. Entonces, cuando una solución de PVA es sometida a ciclos de congelado y descongelado, el agua inicialmente cristaliza mientras el soluto queda en la fase líquida. De esta forma, se fortalecen las interacciones puente de hidrógeno intra- e inter-moleculares de las cadenas poliméricas, obteniéndose una estructura porosa estable en el rango de temperaturas ambiente a corporal humana (aproximadamente 25 a 37 °C) (Hassan, y col., 2000). Existe además un efecto de crio-concentración el cual es responsable del desplazamiento de los compuestos solubles en el agua residual en estado líquido durante el congelamiento de una solución. Los cristales de hielo son más puros y homogéneos que la solución acuosa original. Esta diferencia de solubilidad entre el agua en estado líquido y sólido (hielo) es el responsable del efecto de crio-concentración, por ejemplo expulsando los compuestos solubles hacia la fase acuosa, con una disminución gradual de la temperatura de congelamiento debido a las propiedades coligativas de la solución (Kung y col., 1993; Seedher y col., 2009). Los hidrogeles son aquellos sistemas compuestos por soluciones poliméricas, proteicas o ambas polímero/proteína con alto contenido de agua. Si estos hidrogeles son sintetizados a temperaturas menores a cero, son llamados criogeles. En la **figura 4** se observa esquemáticamente el proceso de formación de cristales de PVA.

Los macroporos presentes en estas estructuras poseen un diámetro mayor de 1 μm , los cuales permiten el transporte no sólo de moléculas de bajo peso molecular sino además de macromoléculas como células, sustratos enzimáticos y proteínas. Son altamente biocompatibles, poseen buenas propiedades mecánicas y la disponibilidad del agua en el interior de estos sistemas altamente hidratados es similar al de una solución acuosa.

Figura 4. Formación de cristales mediante el sometimiento de una solución de PVA a ciclos de congelado y descongelado.

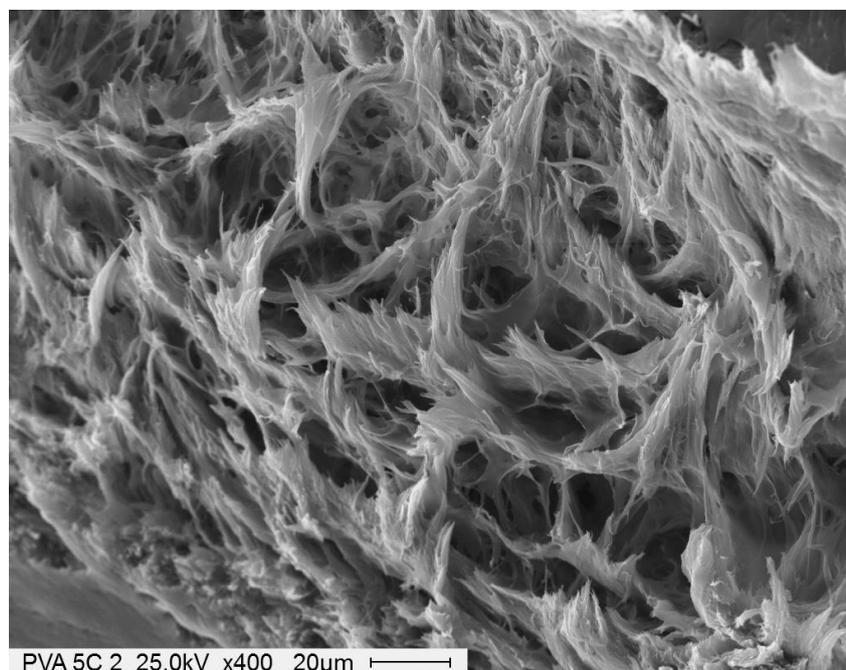


Referencia Lin Zhang y col, 2012

El agua localizada en los macroporos de un criogel posee la característica de una actividad del agua mayor (W_a) que el agua unida a nanoporos como lo es en el caso de la sílica mesoporosa también criogeles nanoporosos (Gun'koy col., 2013). Además, la temperatura de congelamiento del agua y otros líquidos localizados en poros estrechos disminuye por debajo del punto de congelamiento en comparación con una solución de un volumen mayor. Este efecto ha sido descrito por la relación de Gibbs-Thompson para líquidos confinados en poros. La química de la superficie (polaridad, presencia de grupos funcionales polares o cargados) afecta la red de puentes de hidrogeno y la distribución iónica en la superficie (Chaplin y col., 2012; Mitchell y col., 2008). Otra de las mayores ventajas de la síntesis de películas PVA reside en la ausencia del uso de entrecruzantes químicos y en consecuencia no son necesarios pasos posteriores de purificación lo cual es esencial en potenciales aplicaciones biomédicas y/o farmacéuticas (Hassan y Peppas, 2000).

En la **Figura 5** se observa la estructura macroporosa de PVA obtenida mediante microscopía electrónica.

Figura 5. Microscopia electrónica de barrido de un criogel de PVA obtenido mediante ciclos de congelado y descongelado.



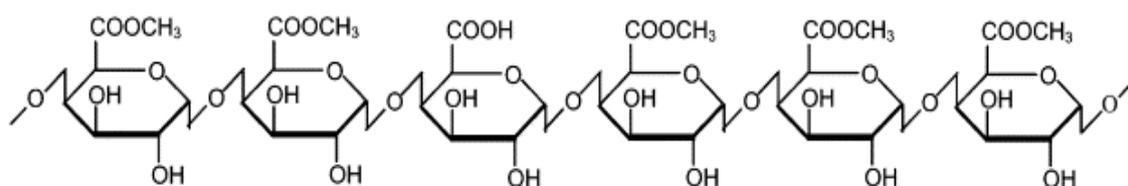
A simple vista se puede observar el gran tamaño de poros en la estructura de PVA, que en algunos caso puede llegar a aproximadamente 20 μm (**Figura 5**). Por lo que se puede especular sobre una rápida velocidad de difusión de moléculas pequeñas (fármacos, colorantes) atrapados en el criogel. Las redes poliméricas interconectadas (RPI) comúnmente llamadas redes poliméricas entrecruzadas, son sistemas en los cuales dos o más polímeros existen como componentes de una única matriz. Se ha observado que mediante el agregado de alginato en una matriz de PVA se ha logrado disminuir la liberación de Diclofenac sódico atrapado en microesferas de PVA-Alginato (Hua, 2010) Las RPI ofrecen nuevas características a la películas formadas como por ejemplo afinidad de la fármaco con los polímeros presentes (Berger, 2004).

Es interesante estudiar estos cambios en las propiedades del nuevo gel formado debido a que se puede obtener información sobre la interacción o repulsión entre los polímeros, el tipo de interacción (hidrofóbica o hidrofílica) entre el fármaco y los polímeros y el grado de cristalinidad de las películas

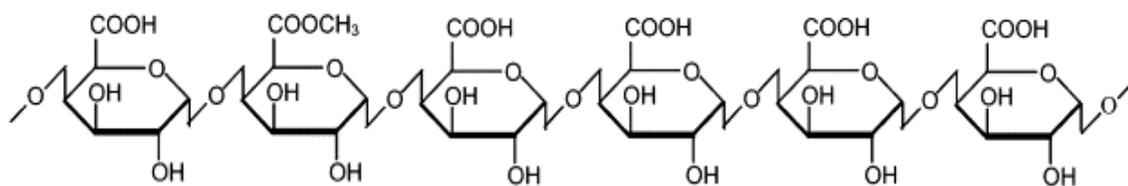
formadas. Además se puede estudiar la rugosidad de las películas y relacionarlas con la liberación de las moléculas atrapadas en su interior.

En el presente trabajo se ha estudiado la interacción PVA particularmente con pectina, y se ha observado que la interacción entre los polímeros se establece mediante puentes de H entre cadenas de ambos polímeros. Las pectinas son polisacáridos presentes en plantas las cuales son abundantes en frutas. Las pectinas pueden ser modificadas mediante la esterificación de los grupos $-\text{COOH}$ con el fin de obtener pectinas más hidrofóbicas o sea con un alto grado de metoxilación (**Figura 6**). Es interesante trabajar con estos biopolímeros debido a que ofrecen una gran versatilidad a la red polimérica interconectada con PVA.

Figura 6. Estructura de pectinas de alto y bajo metoxilo



Pectina de alto metoxilo



Pectina de bajo metoxilo

Criogel de PVA y liberación controlada de biomoléculas en el tratamiento de afecciones de la piel

Por otro lado, el uso de matrices biopoliméricas para la liberación de factores de crecimiento y enzimas como las colagenasas y uroquinasas (Wanycol., 2010) ofrece la posibilidad de inmovilizar biomoléculas y administrarlas de manera local, en forma de parches, particularmente en el lugar de las heridas,

produciéndose una liberación controlada y sostenida en el tiempo. Estos sistemas se han utilizado por ejemplo en la regeneración de tejido en tratamientos periodontales, donde la matriz es implantada en la zona de lesión tisular (Nafee, 2003). También se ha inmovilizado un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en membranas de PGLA (membrana de ácido poliglicólico y poliácidos) para la regeneración guiada de huesos (Park y col., 1997). En el caso de úlceras en la piel, se han implantado micropartículas de gelatina conteniendo el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) para una rápida regeneración del tejido dañado (Huangycol., 2008).

Actualmente existen varios desarrollos en el mercado como por ejemplo el Apligraf (Novartis, aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos: FDA, EE.UU.) el cual actualmente se comercializa, y es empleado como injertos de piel viva sustituta en el lugar donde se produjo la úlcera, la herida y/o la quemadura. El Apligraf está compuesto de células epiteliales de la epidermis y células dérmicas contenidas en colágeno. No contiene folículos de cabello ni vasos sanguíneos. Se aplica sobre la herida y se recubre con vendajes.

Mundialmente, las afecciones de la piel como quemaduras, úlceras, formación de escaras y pie diabético entre otras consumen entre el 15-20 % de los recursos destinados a la salud en los países del Norte (Organización Mundial de la Salud, 2008). La forma de abordar el tratamiento de estas patologías es variada y en el caso de las quemaduras graves, se apela a la cirugía con el fin de remover el tejido necrótico del paciente y evitar de esta forma la aparición de infecciones. Sin embargo, una alternativa a este tipo de desbridamiento es el uso de enzimas. Algunas proteasas son capaces de catalizar la degradación de proteínas presentes en la piel, y favorecen además la limpieza de la herida exhibiendo propiedades anti-inflamatorias, fibrinolíticas y antiedémicas en la zona de la herida (Vernikovskii y col., 2012).

En la actualidad no se ha desarrollado aún un sistema de liberación controlada basado en matrices poliméricas que contengan enzimas y antibióticos. Este tipo de sistemas podría ser de gran interés debido a la aplicación local en las zonas requeridas (infección/herida) en forma de parche lo que permitirá remover el tejido enzimáticamente y luego administrando el antibiótico con el fin de erradicar el proceso infeccioso.

Objetivos Generales

EL objetivo del presente trabajo de Tesis es desarrollar matrices biopoliméricas basadas en polivinil alcohol para ser empleadas en la liberación controlada de un antibiótico y una enzima previamente co-inmovilizados en la matriz. Entre los considerandos, se desea lograr una liberación prologada y estabilidad en el tiempo sin pérdida de la actividad enzimática en el caso de las proteasas. Para ello, se analizarán biopolímeros que posean la capacidad de formar películas para ser aplicados como parche en el lugar de la herida. Se estudiarán las condiciones de inmovilización, las cinéticas de liberación de las moléculas inmovilizadas y se caracterizará las formulaciones estudiadas mediante técnicas de microscopía, espectroscopia, calorimetría y de difracción de rayos X.

Referencias

- Athawale V.D., Rathi S.C. (1999). Graft polymerization: Starch as a model substrate. *J.M.S. Rev. Macromol. Chem. Phys.* 39: 445–480.
- Berger J. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biophys.* 57: 35–52.
- Chaplin M. (2012). Water structure and science. <http://www.lsbu.ac.uk/water/>.
- Gun'ko V. (2013). Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterization. *Adv. Coll. Int. Scie.* 1:187–188.
- Hassan C.M., Peppas N.A. (2000). Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Adv. Pol. Sci.* 153: 37–65.
- Hua S. (2010) pH-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca^{2+} crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium. *Int. J. Biol. Macromol.* 46: 517–523.
- Huang S. (2008). Multifunctional implantable particles for skin tissue regeneration: Preparation, characterization, in vitro and in vivo studies. *Acta Biomater.* 4: 1057–1066.
- Pal K. (2009). Biopolymers in controlled-release delivery systems. *Handbook Biopol. Biodeg. Plastics.* <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4557-2834-3.00014-8>.
- Kung K., Riond J.-L., Wolffram S., Wanner M. (1993). Comparison of an HPLC and bioassay method to determine antimicrobial concentrations after intravenous and oral administration of enrofloxacin in four dogs. *Res. Vet. Sci.* 54: 247–248.
- Lizondo M. (1997). Physicochemical properties of enrofloxacin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15: 1845-1849.
- Mitchell J, Webber J.B.W., Strange J.H. (2008). Nuclear magnetic resonance cryoporometry. *Phys. Rep.* 4:1-36.
- Nafee N. (2003). Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: in vitro/in vivo performance and effect of ageing. *Int. J. Pharm.* 264: 1–14.
- Park Y. (1998). Controlled release of platelet-derived growth factor from porous poly(L-lactide) membranes for guided tissue regeneration. *J. Control. Rel.* 51: 201–211.
- Seedher N., Agarwal P. (2009). Various solvent systems for solubility enhancement of enrofloxacin. *Int. J. Pharm. Sci.* 71: 82–87.
- Thanki K. (2013). Oral delivery of anticancer drugs: Challenges and opportunities. *J. Control. Rel.* 170:15-40

- Vernikovskii B.V., Stepanova E.F. (2012). Immobilized proteases for wound cleaning. Russ. J. Gen. Chem. 82: 572-578.
- Vladimir I., Lozinsky (1998). Cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol) solutions Russ. Chem. Rev. 67: 573-586.
- Wang Q. (2007). Controlled release of ciprofloxacin hydrochloride from chitosan/polyethylene glycol blend films. Carbohydr.Pol. 69: 336–343.
- World Health Organization (2008). A WHO plan for burn prevention and care. http://www.who.int/violence_injury_prevention.
- World Health Organization (2004). Chapter five sharing research knowledge. <http://www.who.int/whr/2004/chapter5/es/index3.html>

Capítulo 1

Desarrollo de criogeles de Polivinil alcohol y Pectina para la liberación controlada de Enrofloxacin.

1.1 Introducción

La Enrofloxacin es un antibiótico sintético de la familia de las fluoroquinolonas, presenta actividad contra un amplio espectro de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y es ampliamente utilizado en medicina veterinaria. Este antibiótico se utiliza con frecuencia en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias e infecciones entéricas en animales. Sin embargo, debido a su elevada toxicidad ha sido prohibido para uso en seres humanos (Gorla y col., 1998).

Las fluoroquinolonas se caracterizan en general por su baja solubilidad en agua y baja biodisponibilidad, lo cual dificulta su administración (Kung y col., 1993; Seedher y col., 2009).

La Enrofloxacin generalmente es administrada en altas concentraciones generándose la formación de cristales debido a los procesos de apilamiento molecular causado por las interacciones π - π intermoleculares de los anillos aromáticos del antibiótico. La acumulación de los cristales afecta a muchos órganos con consecuencias indeseables (Maurer y col., 1998).

Las películas biopoliméricas constituyen interesantes sistemas para la administración de medicamentos debido a su matriz porosa, biocompatibilidad y no inmunogenicidad lo cual permite aplicarlos de manera focalizada en el lugar de la infección.

Por esta razón, la combinación de una liberación controlada de enrofloxacin y su aplicación transdérmica podría ser una alternativa útil a explorar debido a las siguientes ventajas reducción de las máximas concentraciones de antibiótico en plasma manteniendo la concentración del antibiótico en un nivel constante dentro de la ventana terapéutica durante un período establecido de tiempo disminuyendo de esta forma la frecuencia de administración. En consecuencia, se logra disminuir los efectos secundarios adversos en el organismo.

El PVA es un polímero hidrofílico capaz de gelificar *per se*, formando películas y cuya estructura consta de una red espacial no covalente formada durante los ciclos de congelado y descongelado. La mayor ventaja de éste procedimiento reside en la ausencia del empleo de agentes entrecruzantes químicos y en consecuencia no son necesarios pasos posteriores de purificación, lo cual es esencial para potenciales aplicaciones biomédicas y/o farmacéuticas (Hassan &

Peppas, 2000).

El PVA se encuentra aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA). Actualmente el PVA es utilizado en las industrias del papel, textil y en cosmética entre otras. Las películas de PVA son no-inmunogénicas y no-carcinogénicas para el ser humano razón por la cual presentan una elevada potencialidad para aplicaciones biomédicas (Jiang y col., 2011).

Cuando una solución de PVA es sometida a ciclos de congelado y descongelado, el agua inicialmente cristaliza mientras el soluto permanece en la fase líquida. De esta forma, se fortalecen las interacciones puente de hidrógeno intra e inter-moleculares de las cadenas poliméricas, obteniéndose una estructura porosa estable en solución acuosa, a temperatura ambiente y corporal (37 °C) (Hassan y col., 2000).

Los hidrogeles físicos se forman a partir de interacciones tipo puente hidrógeno, como se mencionó anteriormente. Estas generan zonas de carácter cristalino que proporcionan sitios con rigidez estructural desde los cuales se desarrolla la matriz de polímero. Las soluciones acuosas de PVA presentan la característica de generar gran cantidad de núcleos cristalinos, lo cual provee a la matriz de ciertas propiedades tales como un alto grado de hinchamiento, naturaleza elástica y una gran resistencia mecánica. Las películas resultantes son denominadas criogeles.

Las redes poliméricas entrecruzadas son sistemas en los cuales al menos uno de los componentes biopoliméricos es polimerizado y/o entrecruzado en presencia de otro. Entre las ventajas de estas mezclas poliméricas cabe mencionar la resistencia del sistema final, capacidad de unión de moléculas hidrofílicas o hidrofóbicas y la modulación en la liberación de las drogas/biomoléculas atrapadas en la matriz polimérica (Prashantha y col., 2001; Yoo y col., 2000).

En trabajos previos, se ha reportado la adición de alginato a una solución de Polivinil Alcohol (PVA) previo a los ciclos de Congelado y Descongelado (C/D) resultando en un película que presenta una baja cinética de liberación de la droga cargo (Hua y col., 2010). Además, se han desarrollado películas compuestas de PVA y pectina en distintas proporciones, observándose una

reducción en la temperatura de transición vítrea que incrementa la rigidez de la película a medida que aumenta la proporción de PVA en la película (Coffin y col., 1996; Fishman y col., 1998). Más recientemente, se ha publicado un trabajo en el cual se desarrolló una película de PVA y pectina fotoestable con potenciales aplicaciones en el empaquetamiento de alimentos (Kaczmarek y col., 2011).

Las pectinas se encuentran presentes como polisacáridos estructurales en los frutos de las plantas, y están compuestas por bloques de homogalacturano y rhamnogalacturanos. Las pectinas son utilizadas comúnmente como estabilizadores, gelificantes y agentes emulsificantes en la industria alimenticia. De acuerdo al grado de metoxilación (presencia de metil esterres) en las cadenas biopoliméricas, las pectinas pueden ser clasificadas de acuerdo a su contenido de esterificación en bajo, medio o alto grado de metoxilo. Las pectinas poseen la capacidad de gelificar en presencia de cationes mediante un proceso denominado gelación ionotrópica. Sin embargo, las condiciones de gelificación son diferentes de acuerdo al grado de metoxilación. Las pectinas de bajo y medio grado de metoxilación gelifican en presencia de cationes divalentes, como el Ca^{+2} . Mientras que las pectinas de alto metoxilo gelifican en presencia de condiciones ácidas (iones H^{+}) y solutos (e.g. sacáridos) (Zsivanovitsy col., 2004). Las pectinas han sido aprobadas por la FDA y son ampliamente utilizadas como agentes viscosantes en alimentos y en la formulación de drogas (FDA, *Select Committee on GRAS Substances*).

Objetivo

El presente trabajo pretende desarrollar una matriz polimérica compuesta de PVA-P (PVA y Pectina) con el objeto de obtener un sistema de liberación controlada de enrofloxacin. Se estudiarán las mejores condiciones experimentales de entrecruzamiento de las películas de PVA, el tipo y las concentraciones más adecuadas de pectina con el fin de establecer un sistema de liberación controlada de enrofloxacin. Los criogeles serán estudiados mediante ensayos morfológicos a través de microscopía electrónica, dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS) y la posible interacción entre la droga y la matriz mediante espectroscopía vibracional (FTIR).

Aprovechando las propiedades del PVA para formar películas, el sistema

desarrollado pretende ser utilizado en el tratamiento de infecciones de la piel, aplicando la película en forma de *parche* en el lugar de la herida..

1.2 Materiales y métodos

Materiales

Se utilizó PVA con un peso molecular promedio de 13-23 KDa (98–99 % hidrólisis), y enrofloxacin (grado analítico) provistos por Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). Las pectinas con diferente grado de metoxilación (35.5 %, LM; 62.5 %, MM; y 71.1 %, HM) fueron gentilmente donadas por CPKelco, Argentina.

La enrofloxacin fue preparada en soluciones stock de 500 µg/ml en 0,1M HCl o 50 mM buffer citrato (pH= 3,5).

Determinaciones analíticas de enrofloxacin

La enrofloxacin se determinó espectrofotométricamente utilizando un lector de multiplacas UV-Vis (EPOCH-BIOTEK) a 275 nm correspondiente al máximo de absorbancia de la solución de enrofloxacin. La validez de la curva de calibración comprende un intervalo entre 0,0 a 20,0 µg/ml de enrofloxacin determinada a pH= 5,5.

Alternativamente, se cuantificó a la enrofloxacin en un espectrofluorímetro PerkinElmer LS 50B con λ_{ex} = 275 nm y λ_{em} = 437 nm. La validez de la curva de calibración comprende un intervalo entre 0,0 a 0,03 µg/ml de enrofloxacin determinada a pH= 5,5.

Ajuste de los ciclos de congelado y descongelado (C/D)

Con el objetivo de ajustar el tiempo de congelado y descongelado, se incluyó al colorante cristal violeta dentro de las películas de PVA y PVA-P y se observó el perfil de liberación del colorante. En una primera formulación el tiempo de los ciclos de C/D fue de 8 horas cada uno. Sin embargo, en el caso de las películas de PVA se observó mucha dispersión entre los duplicados. Con lo cual se extendió el tiempo de C a 20 horas y D permaneció en 8 horas. De esta forma se obtuvieron desviaciones estándar menores al 5 % y se procedió a preparar los criogeles con 20 horas de C y 8 horas de descongelado y se repitió este

procedimiento 3 veces en total.

Preparación de las películas

Soluciones acuosas conteniendo 30,0 % (p/v) de PVA y pectina de concentración 0,2 % (p/v) o 2,0 % (p/v) (previamente incubadas con 10,0 a 70,0 µg/ml de enrofloxacina) fueron mezcladas para producir películas de 15 % (p/v) PVA y 0,1 o 1,0 % (p/v) pectina conteniendo 5,0 a 35,0 µg/ml de enrofloxacina. Las soluciones fueron incubadas en placas de Petri y congeladas a -18 °C por 20 horas y luego descongeladas a temperatura ambiente (25 °C) por 8 horas. Los ciclos de congelado (C) y descongelado (D) fueron repetidos 3 veces en total.

Análisis FTIR

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) fue realizada en un espectrofotómetro Jasco FTIR 4200. Las muestras a ensayar fueron liofilizadas y mezcladas con KBr al 10 %. El intervalo de medida fue de 500 a 4000 cm⁻¹ para todas las muestras.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de los criogeles y mezclas (PVA-P) fue analizada en un microscopio Philips SEM 505 (Rochester, USA). Los criogeles fueron liofilizados para su observación. Se realizó un recubrimiento conductor para su análisis.

El análisis de la rugosidad de las imágenes obtenidas fue realizado mediante el programa ImageJ (NIH, U.S.A.). La rugosidad de la superficie se determinó por la desviación estándar del promedio del valor de grises de los píxeles de la imagen (1024 × 832). Las imágenes fueron abiertas con el programa y convertidas a una imagen de 8 bits. Luego se seleccionaron las imágenes y se realizó un histograma de cada una. El valor de la desviación estándar es proporcional a la rugosidad de la superficie.

La determinación de los poros de la película, se realizó seleccionando un área de la imagen y la misma fue analizada con la función *plot profile* del programa (Manual del Usuario ImageJ).

Preparación de las soluciones acuosas

Se prepararon soluciones de 15 a 30 % (p/v) de PVA en agua destilada. Las disoluciones se obtuvieron luego de calentar a 80 °C durante 90 min el polímero con agitación constante. Se prepararon soluciones de 1,0-2,0 % (p/v) de diferentes pectinas en agua destilada y constante agitación.

Interacción entre las pectinas y la Enrofloxacina

10 µg/ml de Enrofloxacina fueron incubados con soluciones conteniendo 1,0 % (p/v) pectina (P) con diferente grados de metoxilación (35.5 %, 62.5 %, y 71.7 %) durante 30 y 90 minutos. Luego se precipitó con una solución de etanol 96,0 % (v/v) a 0 °C, y posteriormente la suspensión fue centrifugada a 10,000 xg durante 10 min. Se colectó el sobrenadante y se midió absorbancia a 279 nm para determinar la concentración de enrofloxacina remanente en la fracción soluble.

Ensayos de liberación

Las películas comprendidas entre 150 a 200 mg de criogel de PVA y PVA-P fueron incubadas en 1,5 ml de solución reguladora de acetato 50 mM (pH= 5,5, correspondiente al pH de la piel) a 37 °C en tubos plásticos cerrados (tipo Eppendorf, de 2,0 ml de capacidad). A diferentes intervalos de tiempo especificados se extrajeron alícuotas de 0,5 ml y fueron repuestas con igual volumen de buffer. La determinación del antibiótico liberado en el medio acuoso fue analizada mediante fluorescencia como se explicara previamente.

Ensayo de liberación en película de dos capas

Se estudió la liberación de enrofloxacina contenida en una película compuesta por dos capas utilizando una celda de difusión (Nesseem y col. 2011, Devi y col. 2003) conteniendo un volumen total del película de 0,78 ml en una membrana de diálisis con un tamaño de poro de corte correspondiente a 5 KDa., la cual fuera previamente hidratada en 50 mM buffer citrato (pH= 5,5). En la **Figura 1** se observa la celda de difusión diseñada para sostener el criogel de PVA-P conteniendo NaCl en la parte superior y enrofloxacina en la parte inferior. Los criogeles están dispuestos en una membrana de diálisis. El compartimiento receptor contiene 1,65 ml de buffer citrato 50 mM bajo continua agitación (100 rpm).

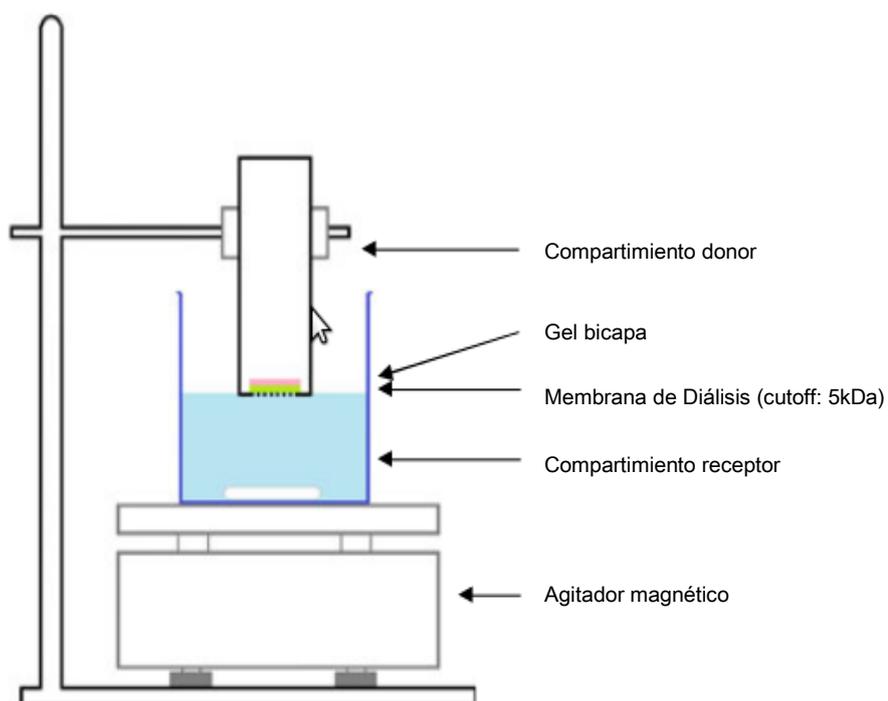


Figura 1. Celda de difusión de enfloxacin cuantificada mediante U.V

El efecto de la segunda capa en el sistema, fue analizada adicionando en la parte superior un criogel de PVA-P previamente equilibrado con distintas concentraciones de NaCl a 37.0 ± 0.5 °C durante 12 horas. Se retiraron alícuotas de 300 μ l del compartimento receptor a diferentes intervalos de tiempo y se repuso con el mismo volumen de buffer 50 mM citrato (pH= 5,5). La Enfloxacin fue determinada espectrofotométricamente utilizando un lector de multiplacas UV-Vis (EPOCH-BIOTEK) a 275 nm.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los ensayos de DSC se realizaron con un calorímetro TA-Instrument DSC Q2000 V24.10 Build 122. El intervalo de temperaturas estudiado comprendió desde 20 hasta 260 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera de N₂.

Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de cristalinidad de todas las muestras mediante la siguiente formula.

$$X_{cr} = \Delta H_m / \Delta H^{\circ}_m \times 100 \quad (1)$$

En donde: ΔH_m es el calor de fusión medido y ΔH°_m es el calor de fusión del material 100 % cristalino (138,6 J/g; Peppas y col. 1976)

Dispersión de Rayos X a bajo ángulo (SAXS)

Las medidas de SAXS se llevaron a cabo en la línea D1B-SAXS1 ubicada en el Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (Campinas, Brasil). El haz incidente fue de 8 KeV y la longitud de onda de 1,55 Å detectados mediante un detector Pilatus 3000K. Las muestras sólidas fueron ubicadas en un portamuestras de acero inoxidable y sostenidas en ambos lados por una cinta Kapton. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente. Se utilizó behenato de plata en polvo para calibrar la distancia entre la muestra y el detector y la posición del haz.

Las muestras se midieron a una distancia de 3,0 y 0,8 m entre la muestra y el detector. Al variar la distancia, se pueden analizar las muestras en un rango más amplio del vector de dispersión (*scattering*) q :

$$q = (4\pi / \lambda) \sin \theta$$

siendo 2θ el ángulo de dispersión).

Conociendo el valor de q_{\max} se puede obtener información de la distancia, d , entre los dominios o cristales en el criogel mediante la siguiente aproximación

$$d = 2\pi / q_{\max}$$

En donde q_{\max} es el modulo del vector de dispersión (*scattering*) correspondiente al máximo de intensidad en la función obtenida mediante SAXS (Singh y col., 2003).

1.3 Resultados y discusión

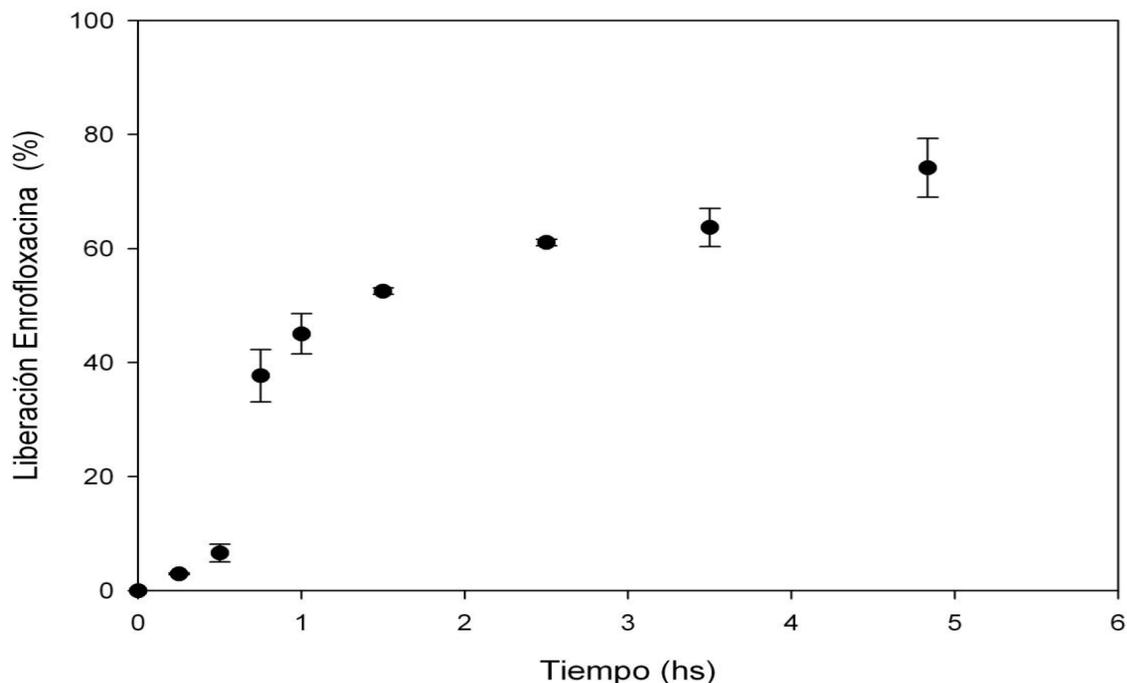
1.3.1 Liberación de Enrofloxacin en criogel de PVA

La liberación de enrofloxacin (5,0 µg/ml) contenida en una matriz de PVA fue evaluada a pH= 5,5 correspondiente al pH de piel humana normal (Braun-Falcoy *col.*, 1986). Si bien la enrofloxacin está prohibida para su uso en humanos, se evaluó la liberación en condiciones de piel humana normal debido a que también coincide con la de algunos animales como los caninos y a la posibilidad de disminuir su toxicidad al reducir la concentración del antibiótico. De esta forma, se propone a la enrofloxacin como una droga modelo dentro de una matriz que puede ser utilizada tanto en seres humanos como en animales.

La cinética de liberación de enrofloxacin siguió un perfil de orden cero con un 70 % de liberación del antibiótico luego de 4,5 horas de incubación (**Figura 2**).

El gran tamaño de poro de la matriz sería una posible explicación a la rápida difusión de enrofloxacin desde la matriz hacia la solución buffer.

Figura2. Cinética de liberación de enrofloxacin encapsulada en criogel de PVA.



Se ha descrito previamente que la adición de copolímeros conlleva a la formación de redes poliméricas interconectadas con diferentes propiedades tales como mayor estabilidad mecánica de los geles y mayor eficiencia de encapsulación entre otras (Hua y col., 2010; Kaczmarek y col., 2011). Por lo tanto, se estudió la interacción de la enrofloxacin con pectinas de diferente grado de metoxilación con el objetivo de introducir la pectina en la matriz para retardar la liberación de enrofloxacin. Como se explicó previamente, lo interesante en la estructura molecular de las pectinas reside en las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas que presenta favoreciendo la posible interacción de la enrofloxacin en estas zonas.

1.3.2 Interacción de Enrofloxacin y pectinas

Se estudió la interacción de enrofloxacin entre pectinas de distinto grado de metoxilo 35.5 % (LM), 62.5 % (MM) y 71.1 % (HM). La pectina de alto metoxilo fue seleccionada debido a que se asocia a un 20 % más a la enrofloxacin que las otras pectinas (**Figura 3**). Considerando el pK_a de la pectina es de aproximadamente 3,5 y el de la enrofloxacin cuyo $pK_a = 7,7$ bajo condiciones ácidas suaves como lo es un $pH = 5,5$, la mayoría de los grupos carboxilo no esterificados de la pectina estarían parcialmente ionizados y en consecuencia se favorecería una interacción electrostática con la matriz sumado a la interacción de la enrofloxacin en las zonas hidrofóbicas de la pectina HM. En la figura 3C se observa el espectro IR de la enrofloxacin y de enrofloxacin en presencia de pectina. En la tabla 1 se plasmaron las asignaciones de los grupos funcionales característicos de la enrofloxacin. Se observa un corrimiento hacia el rojo de los grupos $\sigma\text{-COOH}$ de la enrofloxacin desde 1.733 cm^{-1} hacia 1.728 cm^{-1} en enrofloxacin-pectina. Así como también el máximo asignado a la amina terciaria de la enrofloxacin muestra un desplazamiento batocrómico (hacia el rojo) desde 1.154 a 1.149 cm^{-1} correspondiente a la quinolona libre y a la incorporada en la matriz, respectivamente. A su vez el anillo aromático de la enrofloxacin muestra un desplazamiento batocrómico desde 1470 a 1451 cm^{-1} correspondiente a la enrofloxacin libre y la unida a pectina HM.

Estos resultados, confirman la interacción de la pectina con la quinolona tanto con los grupos polares como con las regiones hidrofóbicas.

Figuras 3. Efecto del grado de esterificación de las pectinas vs % de unión. P33: pectina 33,0 % DE, P62: 61,5 % DE, P71: 71,7 % DE. A, incubación luego de 30 min; B, incubación luego de 90 min.

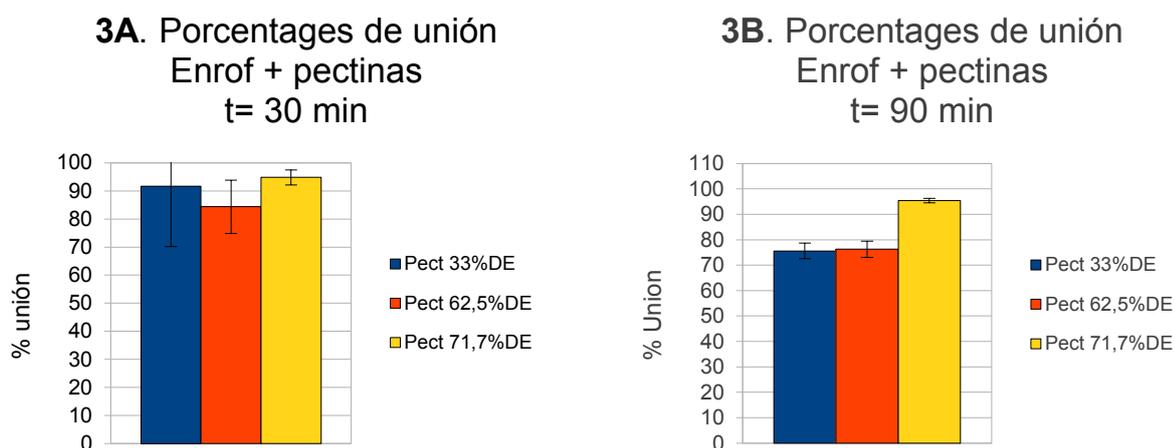


Figura 3C. Espectroscopía vibracional FTIR de enrofloxacin y enrofloxacin-pectina HM

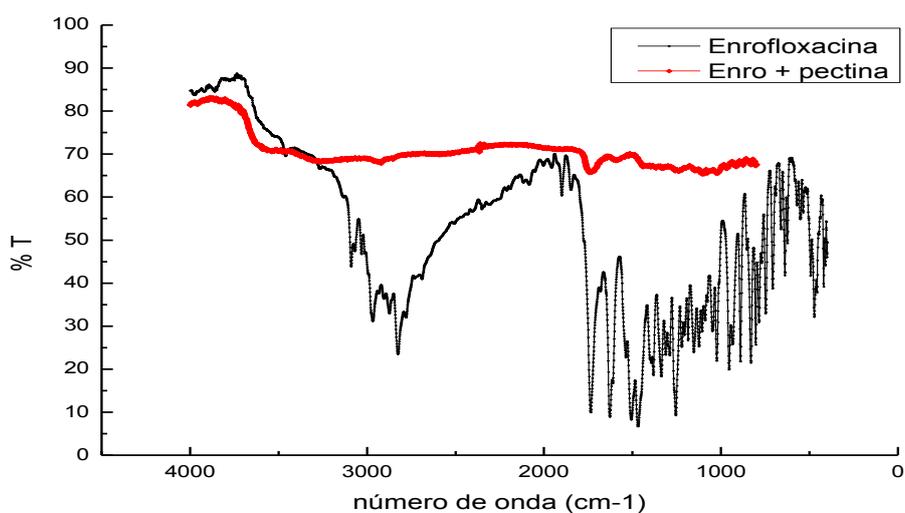


Tabla 1. Asignaciones de Enrofloxacin y Enrofloxacin-Pectina HM

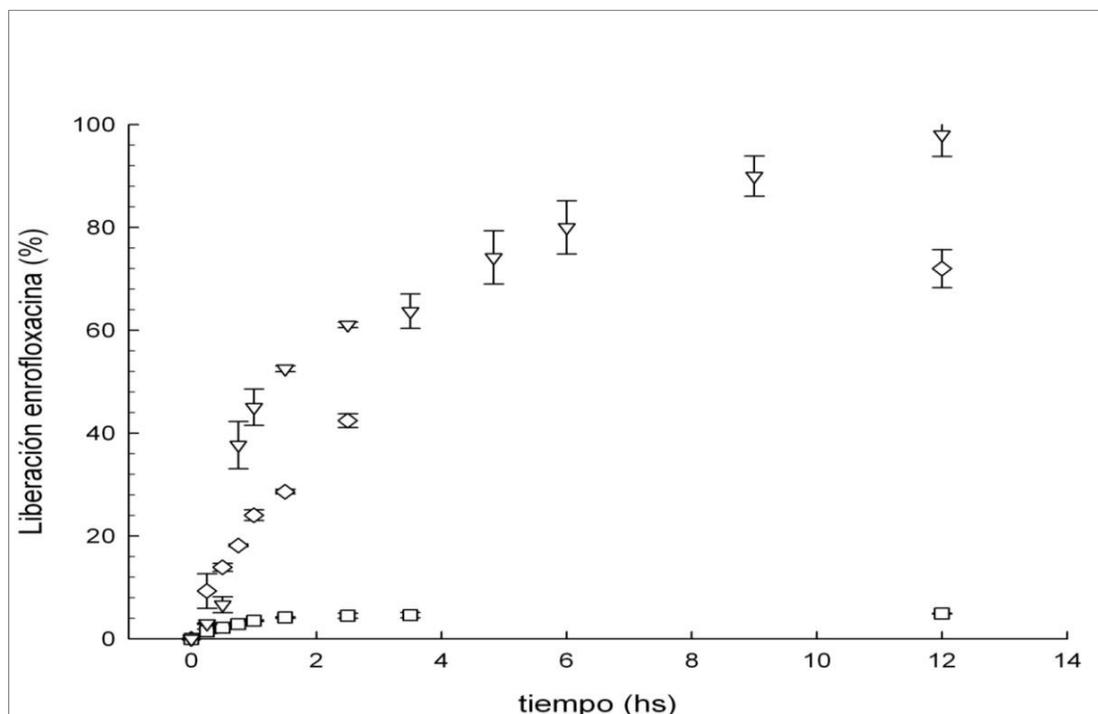
Enrofloxacin	Pectina-ENROF	Asignaciones
Numero de onda (cm ⁻¹)		
1733	1728	COOH
1628	1595	C=O piridina
1470	1451	Anillo aromático
1154	1149	Amina terciaria

1.3.3 Cinética de liberación de Enrofloxacin contenida en criogeles de PVA-P

Se desarrollaron criogeles de PVA conteniendo 0,1 y 1, 0 % (p/v) pectina HM y enrofloxacin con el fin de estudiar la cinética de liberación del antibiótico. El antibiótico (5,0 µg/ml) fue incorporado a las soluciones de PVA-P antes de realizar los ciclos de congelado y descongelado. Las películas conteniendo pectina al 1.0 % (p/v) liberaron sólo un 3.7 % de enrofloxacin luego de 4,5 hs de incubación a 37 °C (**Figura 4**).

Es interesante destacar que la presencia de pectina retardó la liberación 14 veces en comparación con la liberación de enrofloxacin contenida en geles de PVA-P al 0,1 % (p/v). En la **Figura 4** se observa la cinética de liberación de la enrofloxacin desde criogeles de PVA y PVA-P (0,1 y 1,0 %, p/v), lo que sugiere una dependencia entre la concentración de pectina en la matriz y el porcentaje de liberación del principio activo. Además, el carácter hidrofóbico de la enrofloxacin y el incremento en la concentración de HM pectina en la película no afecta las propiedades mecánicas del criogel, fenómeno anteriormente descrito en criogeles de PVA conteniendo atenolol (Kenawy y col., 2010). Más aun, la interacción entre los grupos OH del PVA y los carboxilos libres de la pectina podrían formar una red estable dentro del criogel atribuida a la formación de puentes de hidrogeno, como ya se informara previamente (Fishman y col., 1998; Kaczmarek y col., 2011).

Figura 4. Efecto de las concentraciones de pectina en películas de PVA en la liberación de enrofloxacin. Notación: ▽, PVA, ◇, PVA-P0,1% (p/v), □, PVA-P1,0%(p/v).



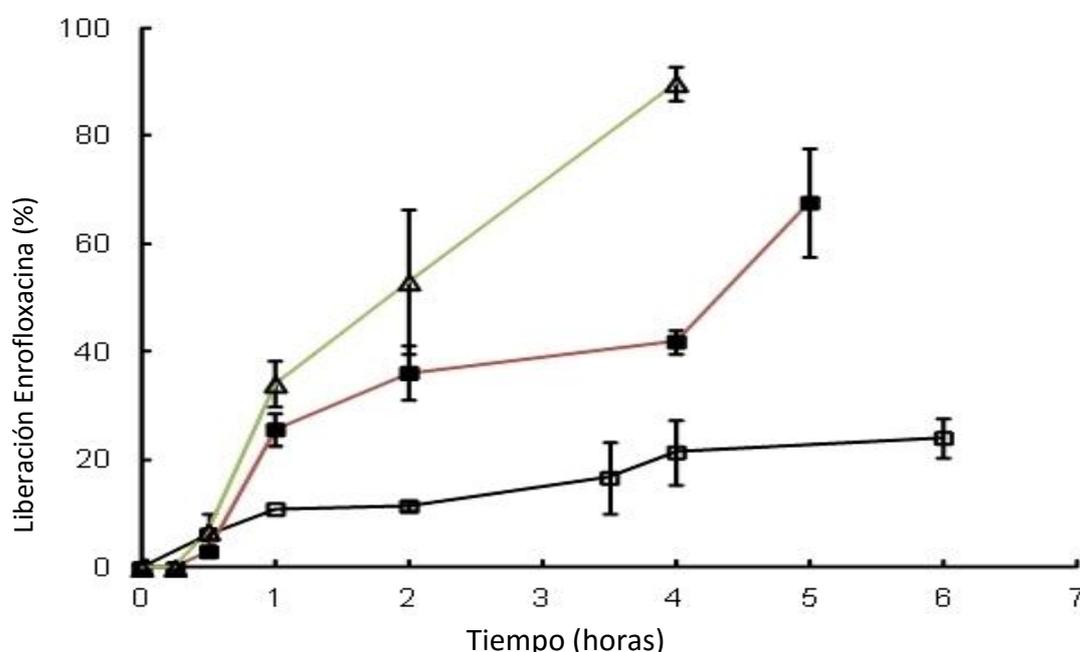
1.3.4 Cinética de liberación de Enrofloxacin en sistema de doble capa.

Considerando la escasa liberación de la enrofloxacin en los criogeles de PVA-P (1,0 % p/v), se procedió a estudiar la cinética modificando la fuerza iónica a través de una película colocada en una doble capa. Este sistema se ha aplicado anteriormente para la liberación controlada de drogas y proteínas durante intervalos de tiempo comprendidos entre 10 a 15 horas (Lu y col., 1998; Su y col., 2009). El análisis matemático en la liberación de la enrofloxacin en el sistema de doble capa mostró un perfil de orden cero (**Figura 5**). En la figura 1 se muestra un esquema de la celda de difusión la cual alberga en la parte superior de la película de PVA-P una concentración elevada de NaCl y en la parte inferior del película 35,0 µg/ml de enrofloxacin. Este sistema de doble capa liberó hasta un 89.8 % de la droga luego de 4 horas de incubación cuando en la parte superior se utilizó una concentración de 1.5 M NaCl (**Figura 5**). La cinética obtenida fue de primer orden y es comparable con la liberación sin

pectina como se observara en la **Figura 2**.

La liberación de enrofloxacin se redujo en un 41.9 % cuando en la parte superior del gel se utilizó NaCl 0,75 M. Estos resultados muestran que la liberación de enrofloxacin puede ser modulada tanto por la concentración de pectina HM así como por la concentración de sales. De esta forma, se evita el problema del apilamiento (*stacking*) molecular de la enrofloxacin contenida en criogel de PVA-P.

Figura 5. Liberación controlada de enrofloxacin en sistema de doble capa de PVA-P 1 % p/v. 1,5 M NaCl (Δ), 0,75 M NaCl (\blacksquare) y sin NaCl (\square).



1.3.5 Caracterización del sistema película-antibiótico

1.3.6 Espectroscopia IR con Transformada de Fourier

A fin de obtener información acerca del tipo de interacción entre la enrofloxacin y los componentes de la matriz, se realizaron análisis de espectroscopía vibracional (FTIR). En la **Figura 6** se aprecia el espectro de la enrofloxacin libre y en presencia de PVA-P. El espectro FTIR muestra modos vibracionales característicos en la enrofloxacin de los grupos -CH aromáticos a $\nu > 3000 \text{ cm}^{-1}$, vibraciones características del anillo aromático a 1.500 cm^{-1} y vibraciones

correspondientes a los grupos halógenos a 1.400 cm^{-1} (**Tabla 6.1**). Se observa un corrimiento hacia el rojo de los grupos $\sigma\text{-COOH}$ de la enrofloxacin desde 1.733 cm^{-1} hacia 1.728 cm^{-1} en la formulación. Así como también el máximo asignado a la amina terciaria de la enrofloxacin muestra un desplazamiento batocrómico (hacia el rojo) desde 1.154 a 1.142 cm^{-1} correspondiente a la quinolona libre y a la incorporada en la matriz, respectivamente.

Figura 6. Espectro de FTIR. **A** Enrofloxacin-PVA-P. **B** Enrofloxacin.

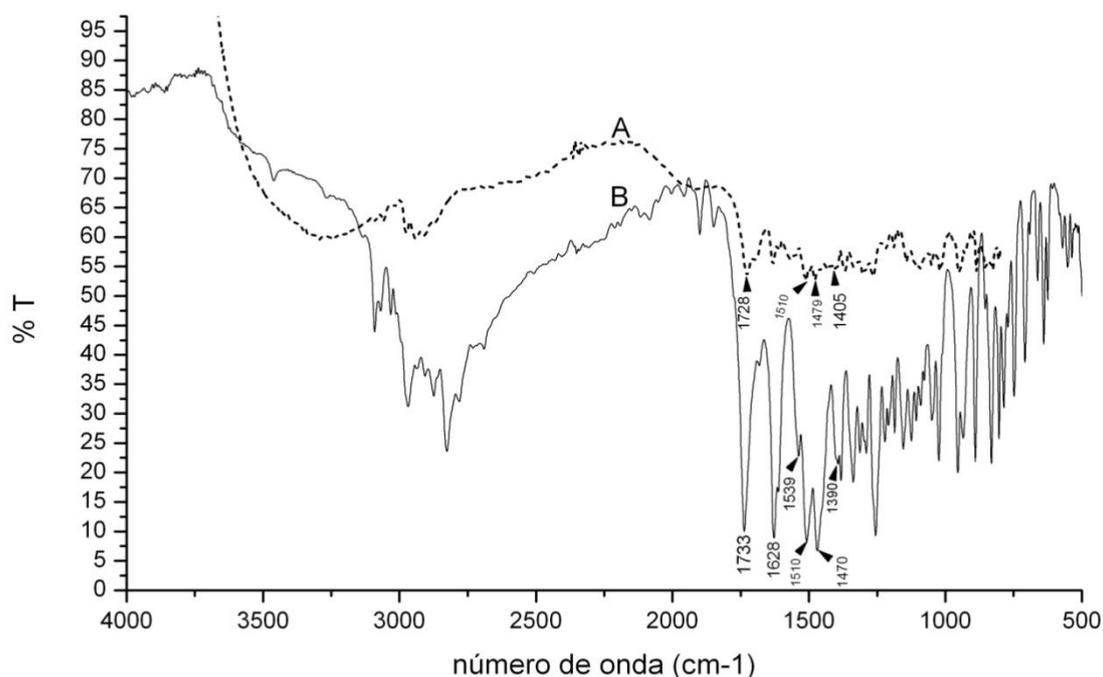


Tabla 6.1. Asignaciones de bandas obtenidas por FTIR de enrofloxacin libre y del criogel de PVA-P conteniendo enrofloxacin

Número de onda (cm^{-1})		$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Asignaciones
Enrofloxacin	Formulación		
1733	1728	+5	COOH
1628	1631	-2	C=O piridina
1510	1510	0	C=C N=C piridina
1470	1479	-9	Benceno monosustituído
1390	1405	-15	C-F
1154	1142	+12	Amina terciaria

$$\Delta\nu = \nu_{\text{enrofloxacin}} - \nu_{\text{formulación}}$$

Por el contrario, los máximos asignados al benceno monosustituido y el grupo F-C mostraron un corrimiento hipsocrómico (hacia el azul del espectro) entre las bandas de la enrofloxacin libre y la que está contenida en la formulación. Estos resultados sostienen a los grupos polares como los responsables de la interacción entre la enrofloxacin y la matriz.

1.3.7 Microscopia Electrónica de barrido de las películas

Como se observa en las imágenes de microscopía electrónica de barrido, al incrementar los ciclos de C/D y al aumentar la concentración de pectina se modifica la rugosidad en el criogel (**Figura 7**). Al realizar un histograma de la imagen, se obtiene la desviación estándar (Std Dev) del promedio de la distribución de grises en la imagen. Cuanto menor es la desviación estándar, menos rugosa es la imagen (Wang y col., 2005)

Al comparar el valor de Desviaciones Estándares (Std Dev) entre la figuras 7a y 7b, no se observan diferencias en la rugosidad de la superficie del criogel al aumentar de 3C a 5C (DE= 45 y 42 respectivamente) y tampoco en el corte, es decir en el interior del criogel (DE=44 y 46 respectivamente).

Con respecto al interior de los criogeles de PVA 3C, la rugosidad disminuye en presencia de pectina y la distribución del tamaño de poro es más heterogénea. Esto se observa en los perfiles del gráfico (*plot profile*) en la imagen 7A. En la superficie en cambio, la rugosidad disminuye solo en presencia de pectina al 0,5 % (p/v) (*Std dev*= 38) y el tamaño de poro disminuye en presencia de pectina en todas las concentraciones (0,5 y 1,0 % p/v).

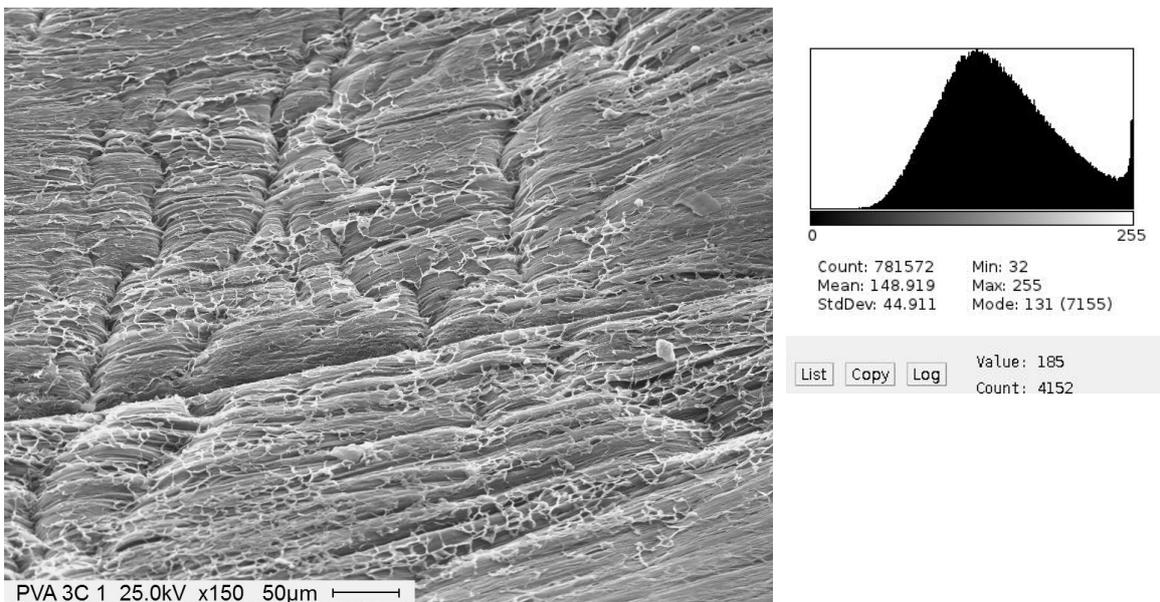
Los criogeles con mayor número de ciclos de CD, es decir de 5C, presentan una disminución en el tamaño de poro en su interior en presencia de pectina. La rugosidad en la superficie también disminuye en presencia de pectina, observándose una diferencia muy marcada entre la superficie y el corte (**Figura 7M**) en donde la pectina “tapiza” la superficie del criogel. Se observa entonces, que existe una tendencia de la pectina a cubrir la superficie del criogel de PVA es por ello que disminuye la rugosidad del mismo en presencia de pectina.

Figura7. Microscopía electrónica de las distintas formulaciones del criogel de PVA con diferentes ciclos de congelamiento y descongelamiento (C/D) y en presencia de diferentes concentraciones de pecina de HM.

7A,PVA3C C/D superficie; **7B**, PVA5C C/D superficie; **7C**, PVA 3C C/D corte; **7D**, PVA 5C C/D corte; **7E**, PVA P 0,5 % (p/v) 3C C/D

superficie; **7F** PVA P 0,5 % (p/v) 5C C/D superficie; **7G** PVA P 0,5 % (p/v) 3C C/D corte; **7H** PVA P 0,5 % (p/v) 5C C/D corte; **7I** PVA P 1.0 % (p/v) 3 C/D superficie ; **7J** PVA P 1.0 % (p/v) 5 C/D superficie; **7K** PVA P 1.0 % (p/v) 3 C/D corte; **7L** PVA P 1.0 % (p/v) 5 C/D corte; **7M** PVA P 1.0 % (p/v) 5 C/D superficie y corte.

Figura 7A.PVA 3C superficie.



Plot profile

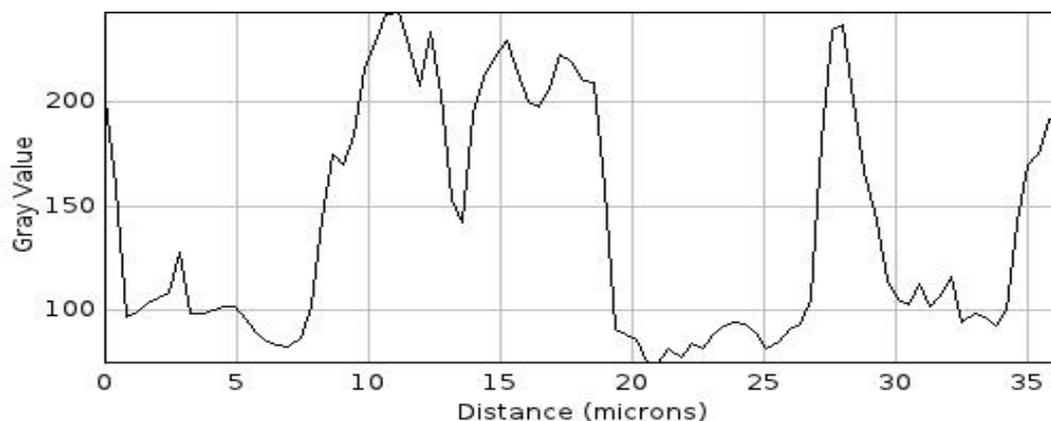


Figura 7B. PVA 5C superficie

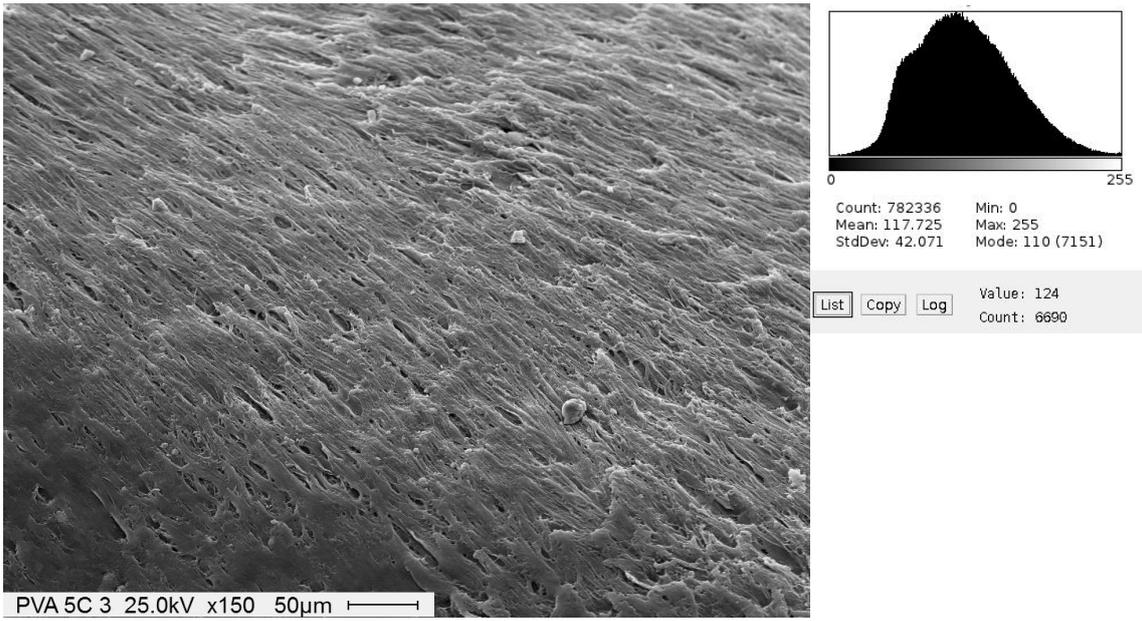


Figura 7C. PVA 3C corte

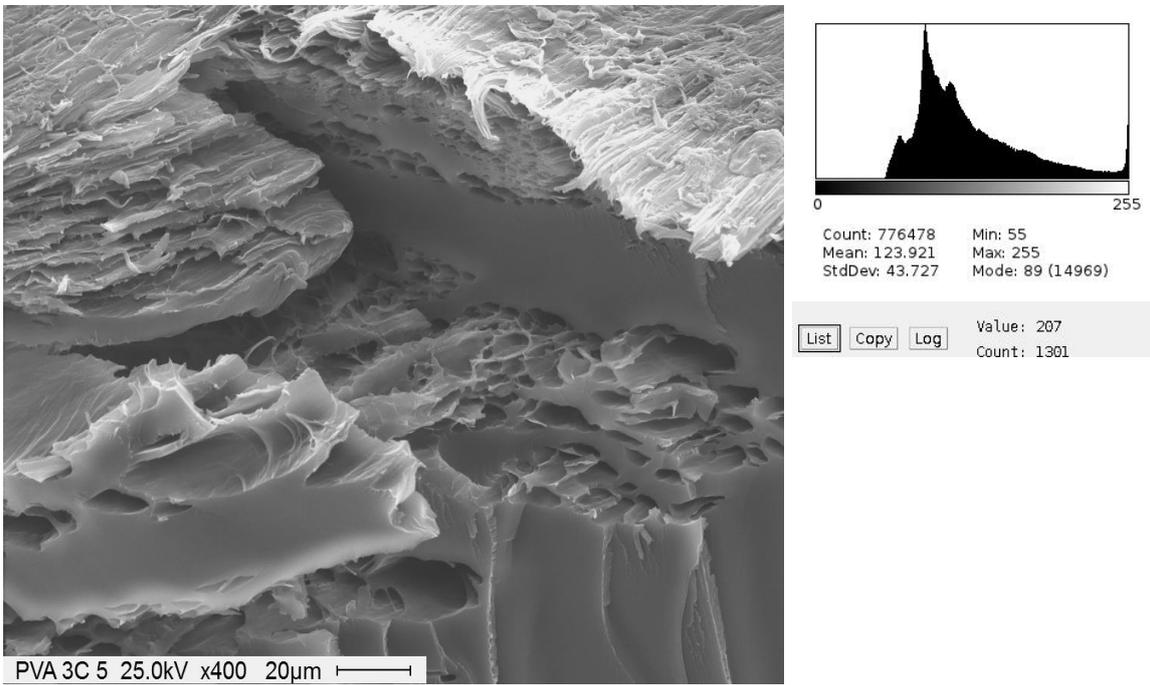


Figura 7C Plot Profile

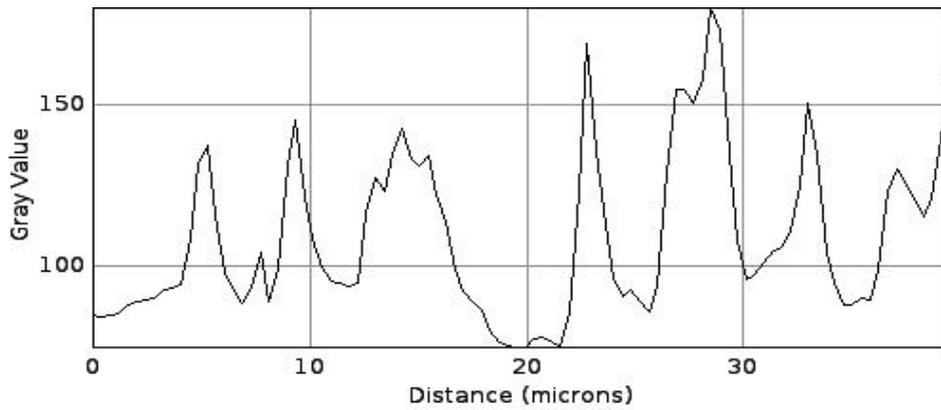
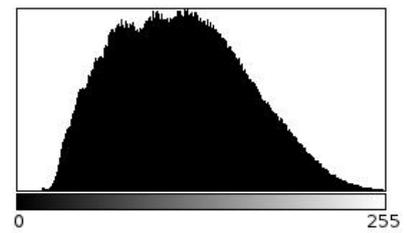
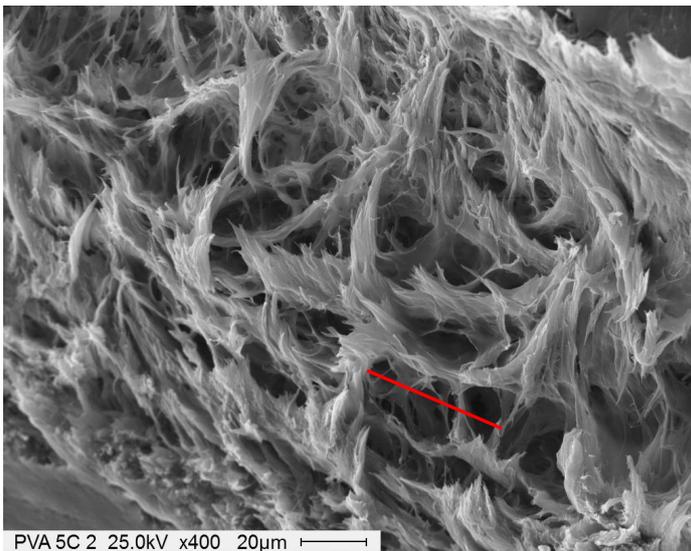


Figura 7D.PVA 5C corte



Count: 780044 Min: 16
 Mean: 113.038 Max: 255
 StdDev: 45.557 Mode: 116 (6103)

Value: 74
 Count: 5469

Plot profile

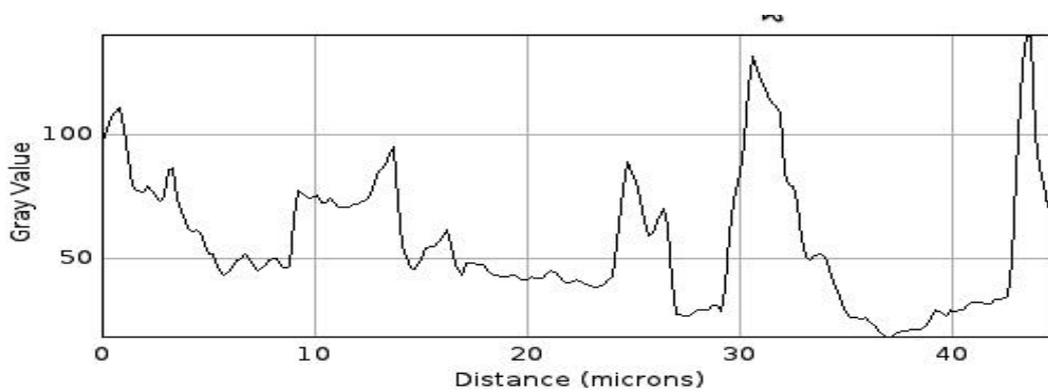
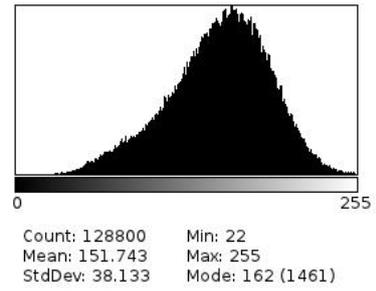
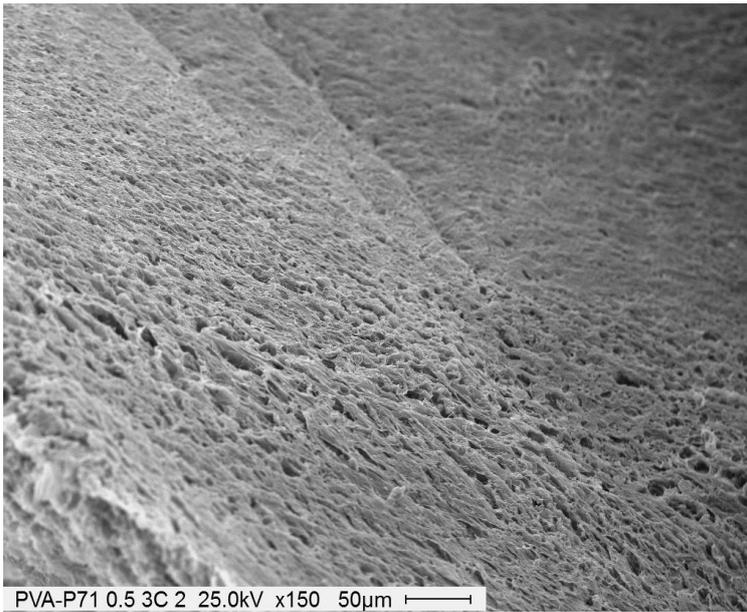
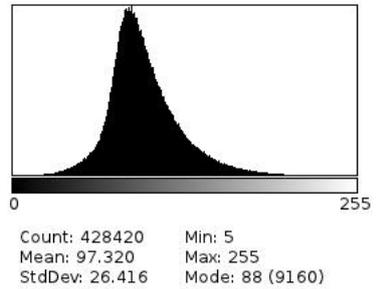
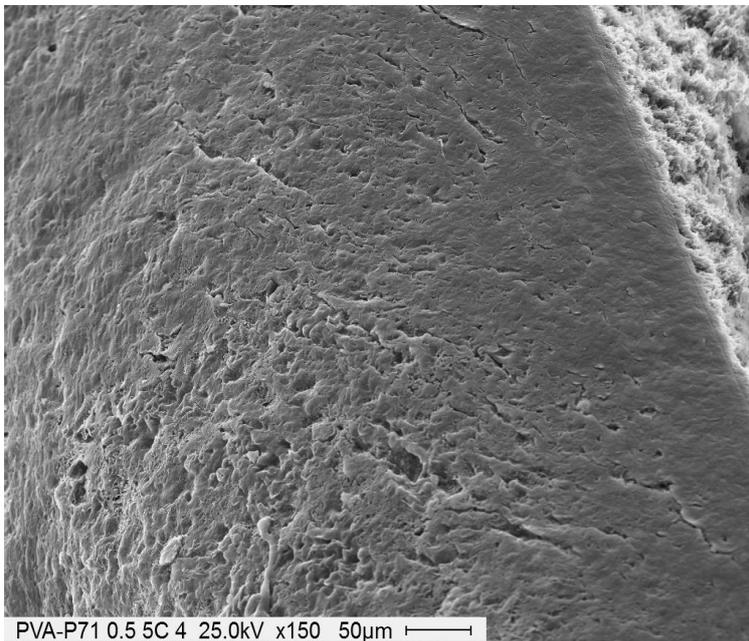


Figura 7E. PVA P71 0.5 %(p/v) 3C superficie



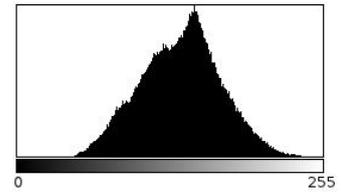
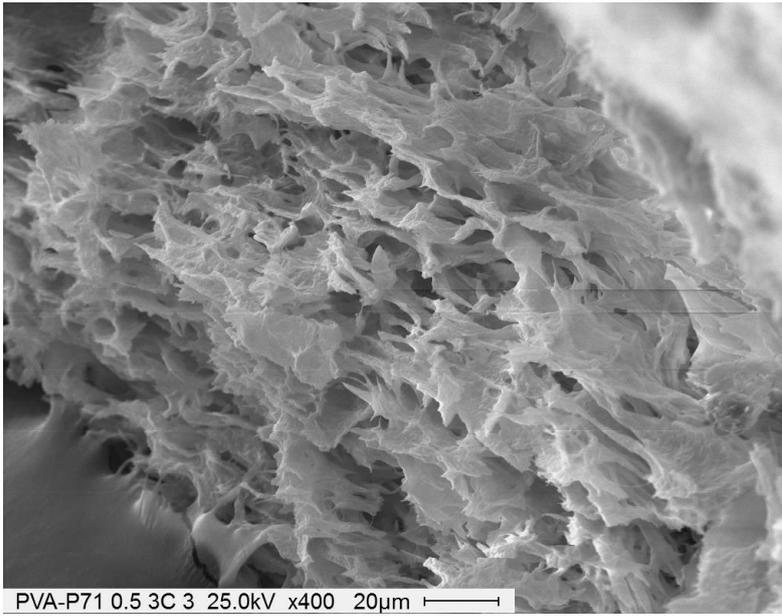
List Copy Log

Figura 7F. PVA P71 0.5 % (p/v) 5C superficie



List Copy Log Value: 18
Count: 46

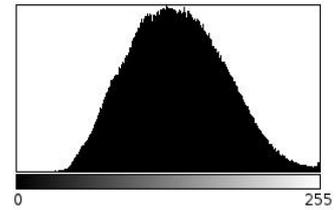
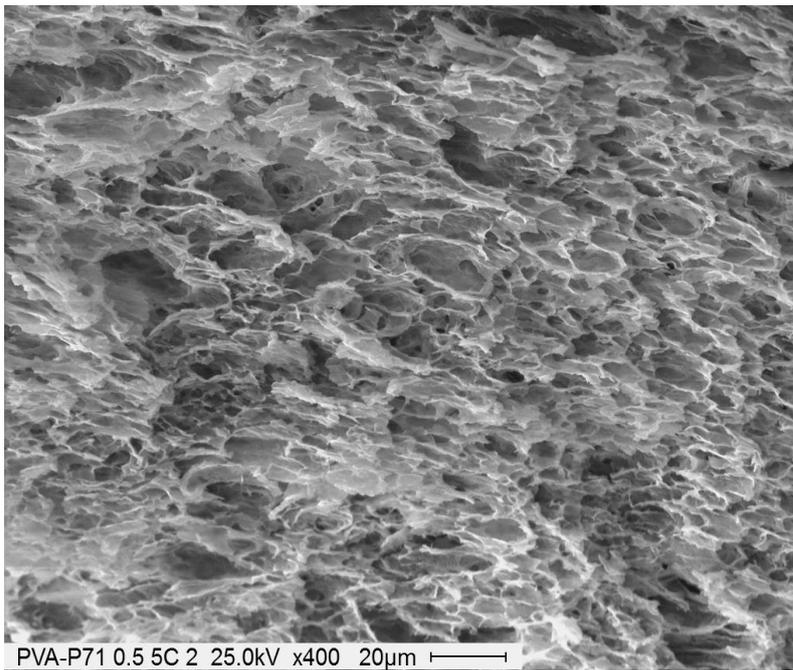
Figura 7G. PVA P71 0.5 %(p/v) 3C corte



Count: 283179 Min: 36
Mean: 136.662 Max: 255
StdDev: 33.605 Mode: 148 (3889)

List Copy Log Value: 176
Count: 1611

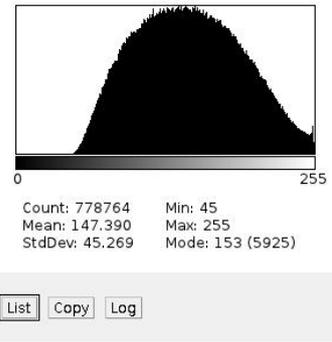
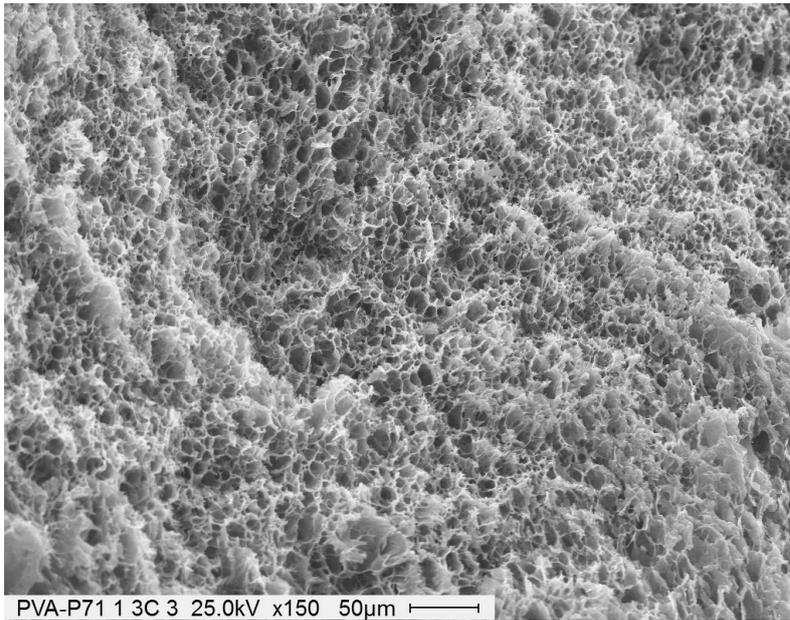
Figura 7H. PVA P71 0.5 %(p/v) 5C corte



Count: 779280 Min: 23
Mean: 134.621 Max: 255
StdDev: 40.429 Mode: 126 (7161)

List Copy Log

Figura 7I. PVA P71 1.0 %(p/v) 3C superficie



Plot profile

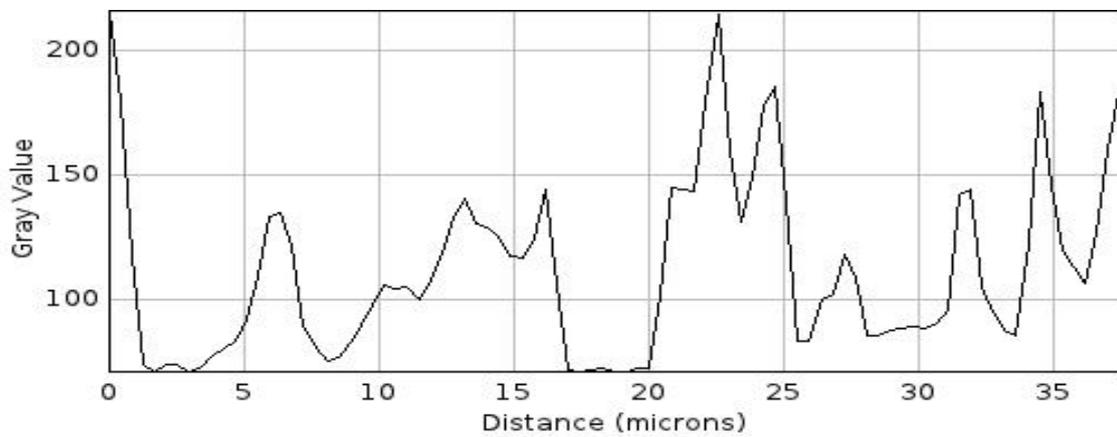
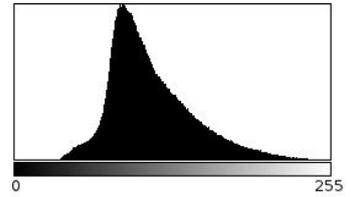
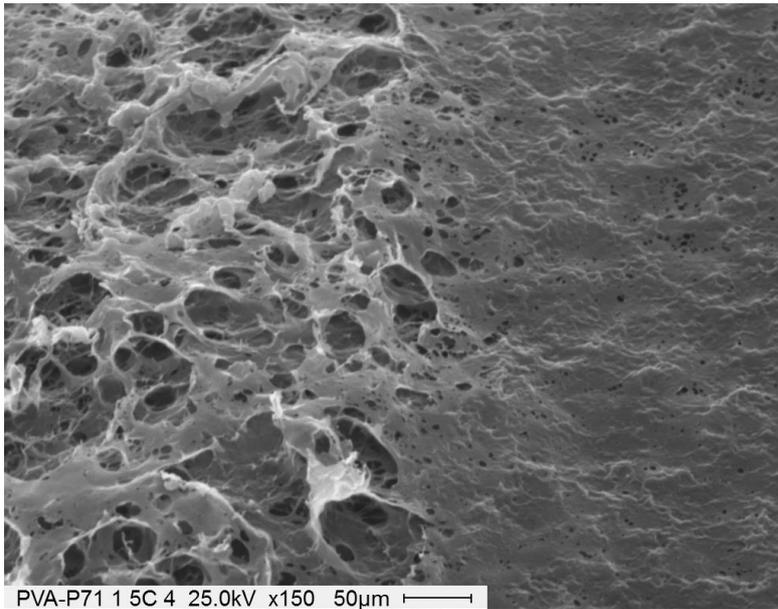


Figura 7J. PVA P71 1.0 %(p/v) 5C superficie

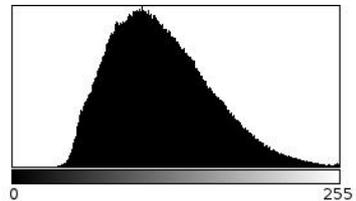
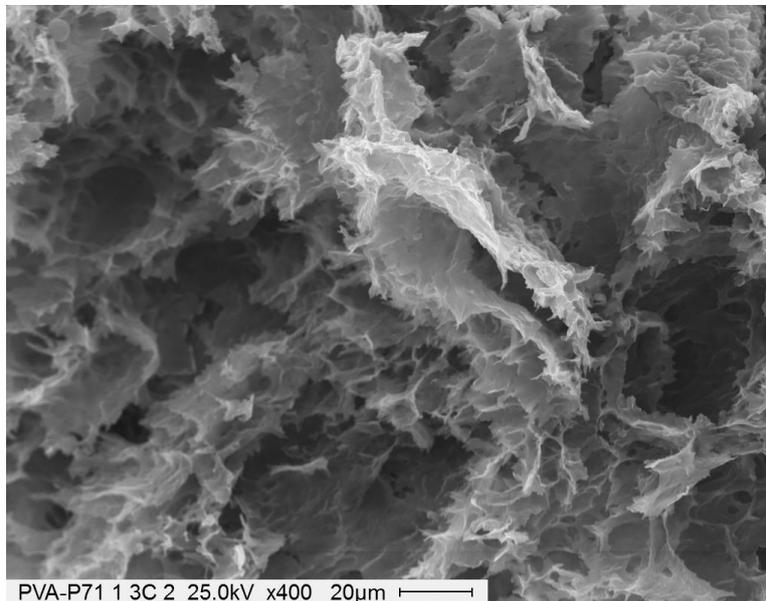


Count: 771903 Min: 29
Mean: 110.041 Max: 255
StdDev: 33.853 Mode: 85 (13082)

List Copy Log

Value: 11
Count: 0

Figura 7K. PVA P71 1.0 %(p/v) 3C corte

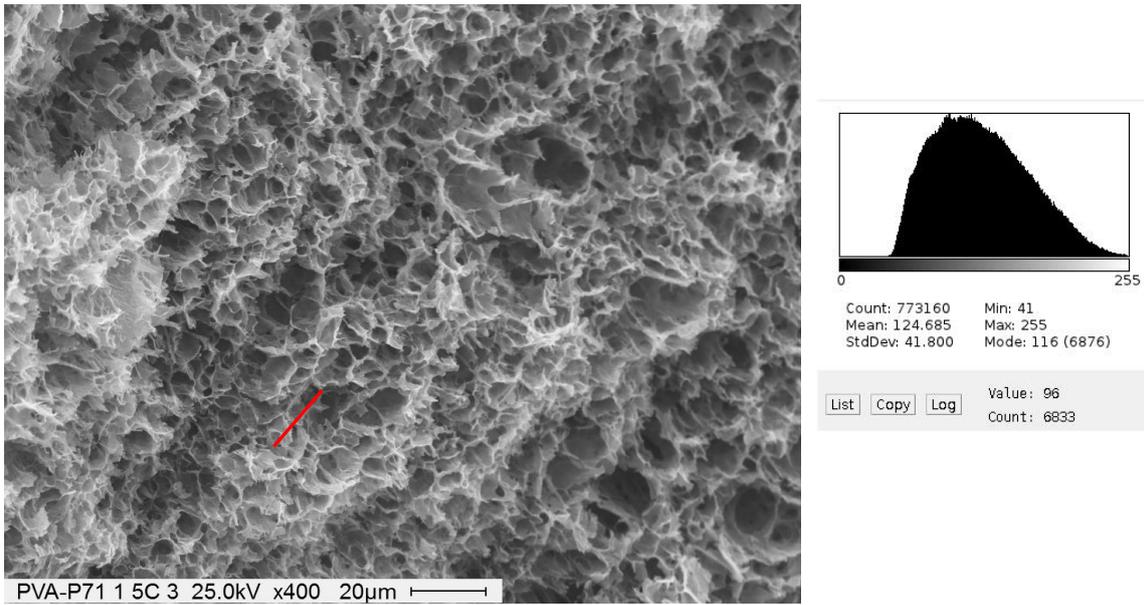


Count: 776478 Min: 33
Mean: 115.827 Max: 255
StdDev: 39.258 Mode: 101 (8175)

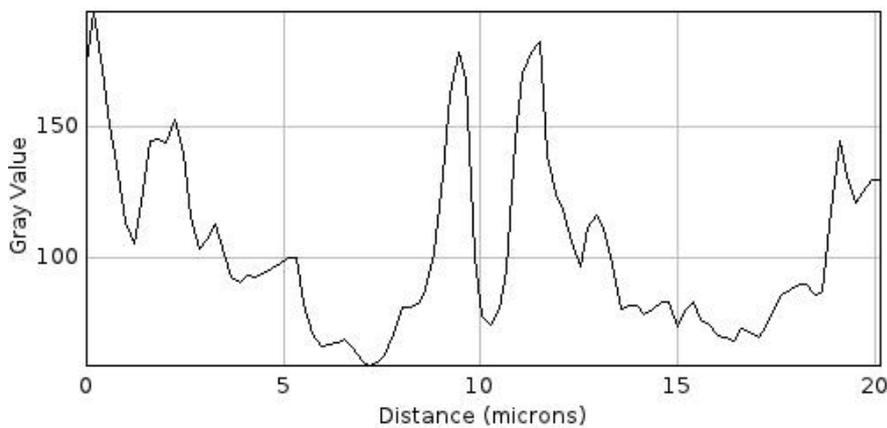
List Copy Log

Value: 100
Count: 7882

Figura 7L. PVA P71 1.0 %(p/v) 5C corte

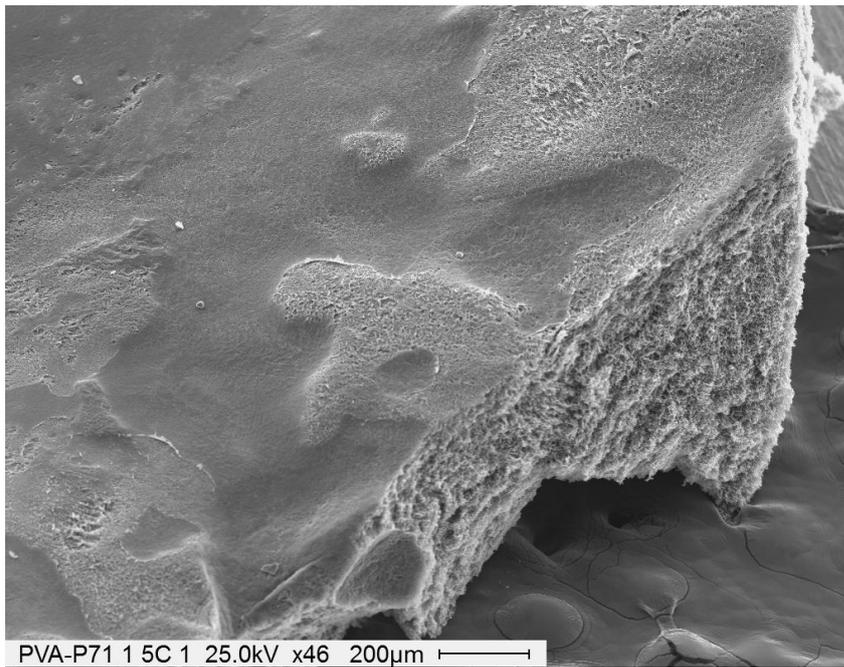


Plot profile



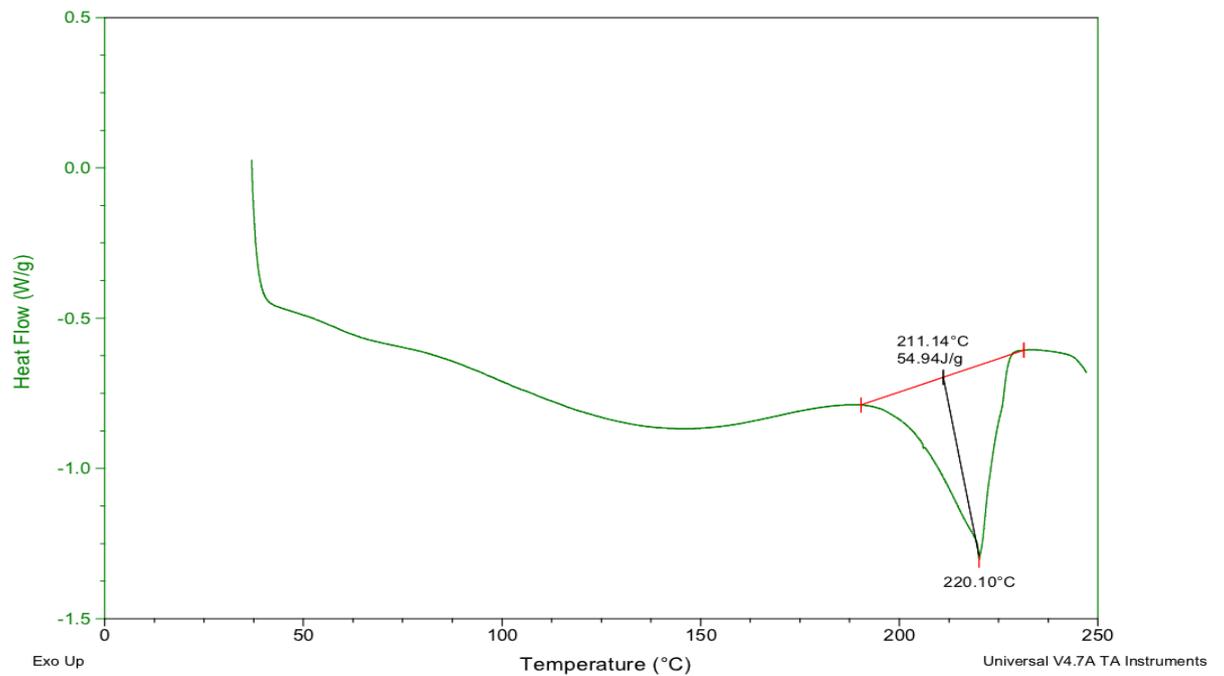
El parámetro de la rugosidad en la superficie de un película es importante a tener en cuenta en aplicaciones biomédicas debido a que cuanto más rugosa sea la superficie de la película, mayor será la adhesión celular en el caso de *scaffolds* o mallas poliméricas. Además, se ha reportado que la liberación de biomoléculas se ve afectada por la rugosidad de los películas de PVA (Valente y col., 2013).

Figura 7M. PVA P71 1.0 %(p/v) 5C superficie y corte



1.3.8 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

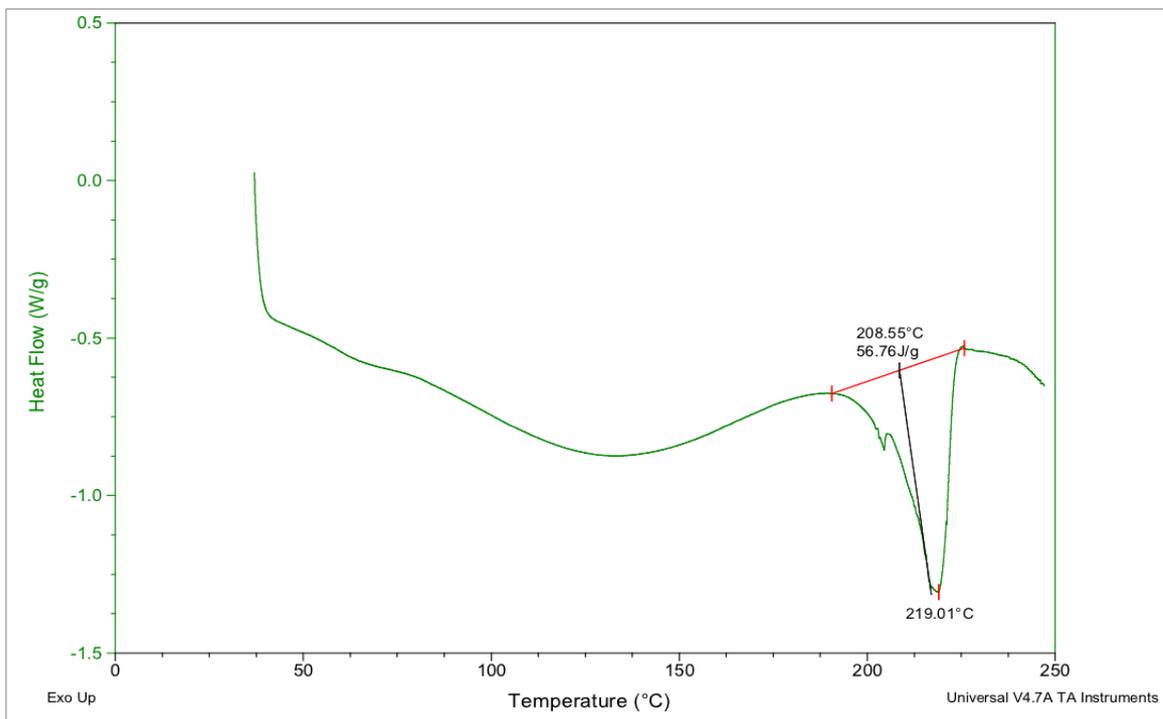
Figura 8a. DSC PVA 3C C/D



En la **figura 8a** se observa un termograma de *DSC* correspondiente a una película de PVA con 3C C/D. El valle pronunciado a 220,10°C corresponde a la temperatura de fusión (T_m) de la película de PVA. La T_m es la temperatura en la cual los dominios cristalinos del polímero pierden su estructura, es decir se funden. Al aumentar la cristalinidad, aumenta el valor de T_m . El valor de T_m del PVA (220,10 °C) se mantiene constante en presencia de pectina (219,01 °C) y en consecuencia el porcentaje de cristalinidad no se ve afectado.

El calor necesario para fundir la muestra, ΔH , fue determinado mediante la integración del área bajo la curva entre los intervalos comprendidos entre los 190 a 245 °C. Mediante la ecuación 1, se obtuvo el porcentaje de cristalinidad de ambas muestras.

Figura 8b. *DSC* PVA P 71 1% (p/v) 3C C/D.



Los valores obtenidos son resumidos en la **Tabla 3**:

Tabla 3. Valores de ΔH , T_m y X_{cr} de las muestras de PVA y PVA-Pectina de 71 % de metoxilación.

Muestra	ΔH (J/g)	T_m (°C)	X_{cr} (%)
PVA	54,94	220,10	40,00
PVA-P71	56,76	219,01	40,95

1.3.9 Dispersión de rayos x a bajo ángulo (SAXS)

La difracción de rayos X de bajo ángulo se utiliza cuando las características relevantes de la muestra se encuentran a nivel nanométrico, desde 1 hasta los 100 nm (Chiavacci y col., 2003; Mansur y col., 2004). En un equipo de SAXS con una fuente de sincrotrón la radiación es muy intensa y monocromática, lo que posibilita el análisis de muestras que poseen una dispersión de rayos X muy débil (es decir muestras con bajo contraste electrónico entre sus diferentes fases)

En la **figura 9** se observa un máximo de intensidad correspondiente a un valor de $q_{max} = 0,70 \text{ nm}^{-1}$ el cual está asociado a los dominios nano-cristalinos de la película de PVA (Mansur y col., 2004). En presencia de HMP y HMP-enrofloxacin, el valor de $q_{max} = 0,70 \text{ nm}^{-1}$ es el mismo en ambas muestras. De esta forma se observa que la presencia de pectina y de enrofloxacin no alteran la maya cristalina de PVA, más aun estos resultados confirman lo observado a través las medidas de DSC.

Mediante el análisis de los datos considerando el modelo de dominios aislados embebidos en una matriz continua, la distancia promedio entre los dominios, d , puede ser estimada por la siguiente ecuación aproximada:

$$d = 2\pi / q_{max} \quad (1)$$

En donde q_{max} es el modulo del vector de dispersión (*scattering*) correspondiente al máximo de intensidad en la función obtenida mediante SAXS (Singh y col., 2003).

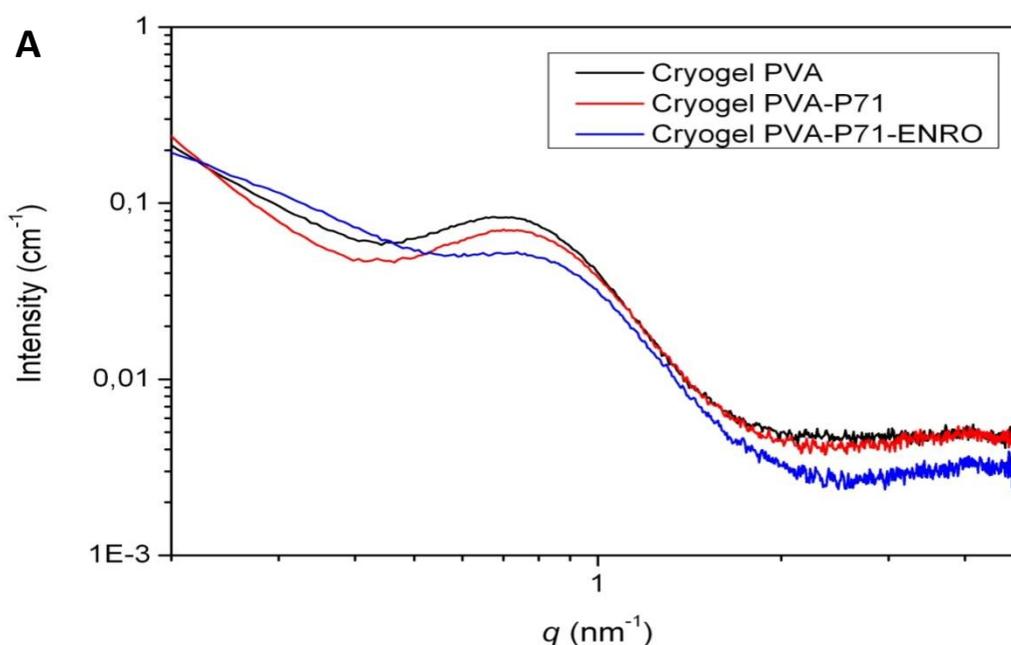
El tamaño promedio de los dominios o cristales es determinado asumiendo que los mismos son entidades esféricas, con un radio R , formando un arreglo

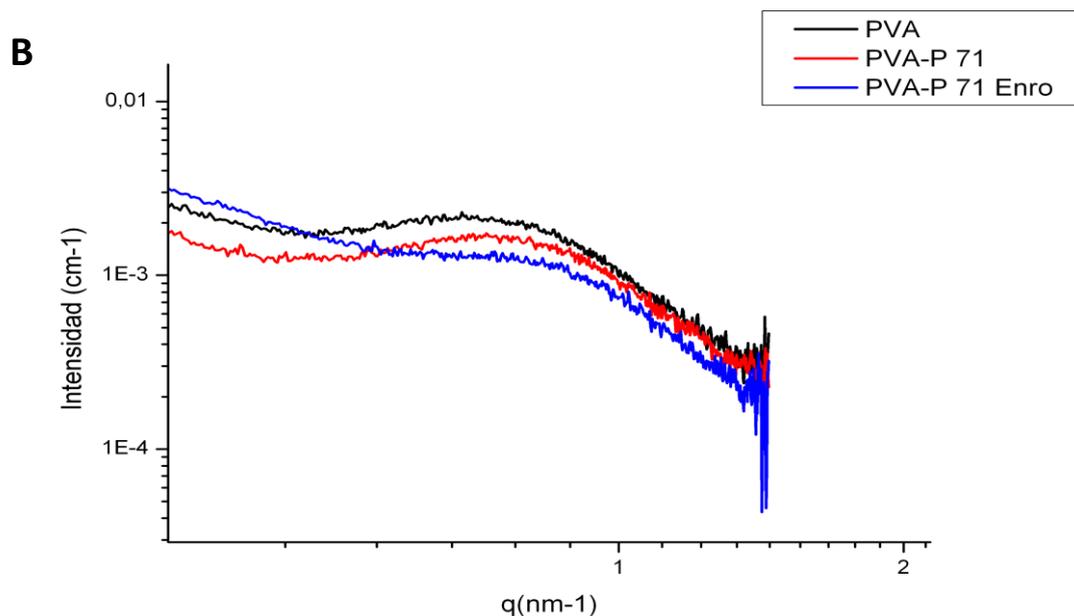
compacto de las cadenas poliméricas.

Basándose en la ecuación 1, se obtiene un tamaño promedio de los nanocristales de PVA de 8,97 nm ($q_{\max}= 0,7 \text{ nm}^{-1}$) y de 8,97 nm para las películas de PVA ($q_{\max}= 0,7 \text{ nm}^{-1}$). Estos resultados se encuentran en concordancia con los valores reportados recientemente donde los cristales de PVA fueron medidos a través de la difracción de rayos-X con un tamaño comprendido entre 7-20 nm (Yano y col., 2003; Matejka y col., 2004; Ricciaedi y col.; 2004).

Por otro lado, las fuerzas intermoleculares puente de H son las responsables de estabilizar la matriz entrecruzada de la película de polyvinil alcohol, presentandose las cadenas ordenadas de forma paralela entre sí (Hodge, 1996; Ram y col., 2004). La forma usual de encontrar esos dominios es en forma lamelar. Estas láminas poseen típicamente un espesor de alrededor de 10-20 nm (Schottner, 2001; Ram y col., 2004) con lo cual es coherente suponer que la red entrecruzada de PVA está formada por cristales embebidos en una matriz amorfa y que la presencia de HMP al 1,0 % (p/v) no afecta la conformación de los dominios de PVA.

Figura 9. Espectro de SAXS. La distancia entre la muestra y el detector fueron de:0,8 m (A) y de 3,0 m (B).





1.4 Conclusiones

La producción de las películas de PVA mediante los ciclos de C/D es una técnica sencilla y puede ser fácilmente escalable. Sin embargo, la presencia de pectina es un prerequisite esencial para mantener a la enrofloxacin incluida dentro del gel. El análisis de FTIR confirmó la interacción de la enrofloxacin con la pectina HM tanto entre las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de la quinolona. A su vez, mediante el análisis de FTIR de la matriz compuesta por PVA- P HM se corroboró el corrimiento hacia el rojo en los grupos polares del antibiótico, carboxilo y amina. Sin embargo, los grupos hidrofóbicos de la molécula fueron desplazados mediante un corrimiento hacia el azul indicando la ausencia de interacción entre el antibiótico y la matriz de PVA-P. Es posible que el rearrreglo de las cadenas poliméricas dentro de la matriz de PVA no permita que las zonas hidrofóbicas de la pectina interactúen con la enrofloxacin.

Por otro lado, el sistema de doble capa es otra técnica desarrollada para modular la liberación de enrofloxacin sola y/o en conjunto con la presencia de pectina en la matriz. Por lo que se puede concluir que el sistema presenta una gran versatilidad, siendo posible alterar la cinética de liberación al modificar los componentes del mismo, como lo son la concentración de HM pectina y NaCl.

Con respecto a la matriz, la presencia de pectina afecta la rugosidad en la

superficie y en el interior de los criogeles motivo por el cual la liberación de enrofloxacin también se ve afectada en presencia de este biopolímero. Esto se observa en las imágenes SEM, donde al aumentar los ciclos de C/D se pudo observar como la pectina va recubriendo la superficie del criogel.

Mediante análisis de *DSC*, la T_m de la película de PVA no se observa afectada en presencia de HMP y el valor del vector de q_{max} tampoco se modifica al analizar los espectros de SAXS en presencia de HMP ni de enrofloxacin.

De esta forma, la formulación propuesta ofrece un potencial uso en el tratamiento de infecciones tópicas mediante la aplicación de una película de PVA-P conteniendo enrofloxacin como agente terapéutico.

Parte del contenido de este capítulo ha sido publicada en la revista Appl. Biochem. Biotechnol. 2012; 167:1421-1429. **Polyvinyl alcohol-pectin cryogel films for controlled release of enrofloxacin.** Martinez YN, Piñuel L, Castro GR, Breccia JD

1.5 Referencias

- Anónimo (1997). Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Pectin, high ester.
<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm260948.htm>.
- Braun-Falco O., Korting H.C. (1986). Normal pH value of human skin. *Hautarzt*. 37:126-129.
- Chiavacci L.A. (2003). Small-angle X-ray scattering and X-ray absorption near-edge structure study of iron-doped siloxane-polyoxyethylene nanocomposites. *J. Appl. Crystallogr.* 36: 405-409.
- Coffin D.R., Fishman M.L., Trung V.L. (1996). Thermomechanical properties of blends of pectin and poly(vinyl alcohol). *J. Appl. Polym. Sci.* 61: 71–79.
- Devi V.K., Saisivam S., María G.R., Deepti, P.U. (2003). Design and evaluation of matrix diffusion controlled transdermal patches of verapamil hydrochloride. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29: 495–503.
- Fishman M.L., Coffin D.R. (1998). Mechanical, microstructural and solubility properties of pectin/poly (vinyl alcohol) blends. *Carbohydr. Polym.* 35: 195–203.
- Gorla N. (1999). Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed in vitro to enrofloxacin and ciprofloxacin. *Toxicol. Lett.* 104: 43 – 48
- Hassan C.M., Peppas N.A. (2000). Structure and applications of poly(vinyl alcohol) Hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Adv. Polym. Sci.* 153: 37–65.
- Hodge R.M. (1996). Water absorption and states of semicrystalline poly(vinyl alcohol) films. *Polymer* 37:1371–1376.
- Lin H.-Y. (2013). Pectin-chitosan-PVA nanofibrous scaffold made by electrospinning and its potential use as a skin tissue scaffold. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 24: 470-484.
- Hua S., Ma H., Li X., Yang H., Wang A. (2010). pH-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca^{2+} crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium. *Int. J. Biol. Macromol.* 46: 517–523.
- Jiang S., Liu S., Feng W. (2011). PVA hydrogel properties for biomedical application. *J. Mech. Behav. Biomed. Mat.* 4:1228–1233.
- Kaczmarek H. (2011). Accelerated weathering of pectin/poly(vinyl alcohol) blends studied by spectroscopic methods. *J. Appl. Polym. Sci.* 122: 1936–1945.
- Kenawy E., El-Newehy M.H., Al-Deyab S. (2010). Controlled release of atenolol from freeze/thawed poly(vinyl alcohol) hydrogel. *J. Saudi Chem. Soc.* 14: 237–240.
- Kung K., Rioud J.-L., Wolfram S., Wanner, M. (1993). Comparison of an HPLC and

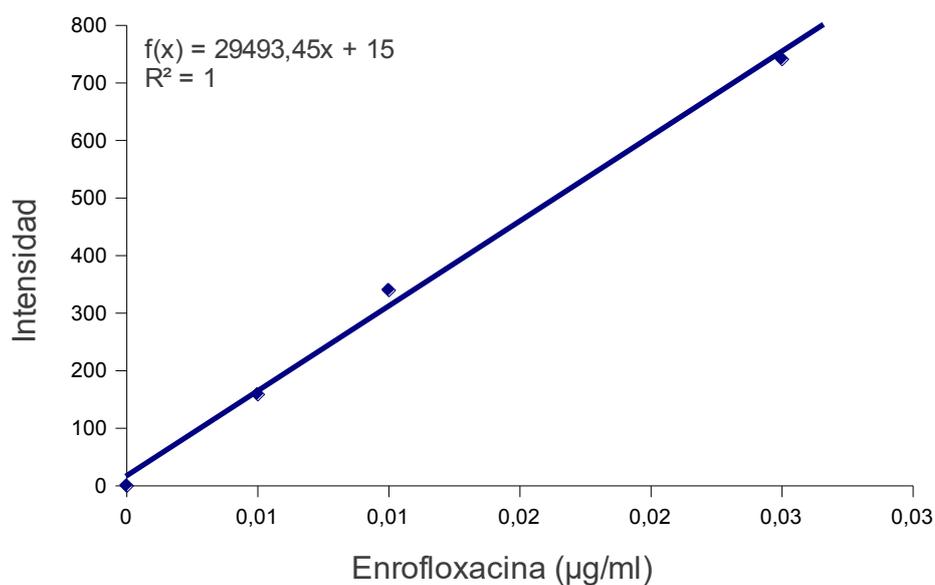
- bioassay method to determine antimicrobial concentrations after intravenous and oral administration of enrofloxacin in four dogs. *Res. Vet. Sci.* 54:247–248.
- Lu S., Ramirez, F., Anseth K. (1998). Modeling and optimization of drug release from laminated polymer matrix devices. *AIChE J.* 44: 1689–1696.
- Mansur H.S. (2004). Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer* 45:7193–7202.
- Matejka L., Dukh O., Hlavata D. (2004). Block copolymer organic-inorganic networks. Formation and structure ordering. *Macromol.* 36:7977–7985.
- Maurer N., Wong K.F., Hope M.J., Cullis P.R. (1998). Anomalous solubility behavior of the antibiotic ciprofloxacin encapsulated in liposomes: a ¹H-NMR study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1374: 9–20.
- Nesseem D.I., El-Houseny S.S. (2011). Development of novel transdermal self-adhesive films for tenoxicam, an anti-inflammatory drug. *Life Sci.* 89: 430–438.
- Prashanta K.V. (2001). Interpenetrating polymer networks based on polyol modified castor oil polyurethane and poly(2-hydroxyethylmethacrylate): Synthesis, chemical, mechanical and thermal properties. *Bull. Mat. Sci.* 24: 535–538.
- Ram S., Mandal T.K. (2004). Photoluminescence in small isotactic, atactic and syndiotactic PVA polymer molecules in water. *Chem. Phys.* 303:121–128.
- Ricciardi R., Auriemma F., De Rosa C., Laupretre F. (2004). Investigation of the crystallinity of freeze/thaw poly(vinyl alcohol) hydrogels by different techniques. *Macromol.* 37: 9510-9516
- Schottner G. (2001). Hybrid Sol–Gel-Derived Polymers: Applications of multifunctional materials. *Chem. Mat.* 13:3422–3435.
- Seedher N., Agarwal P. (2009). Various solvent systems for solubility enhancement of enrofloxacin. *Indian J. Pharm Sci,* 71: 82–87.
- Singh T.J. (2003). Morphology and conductivity studies of a new solid polymer electrolyte: (PEG)_xLiClO₄. *Bull. Mat. Sci.* 26: 707–714.
- Su X., Kim B.-S., Kim S., Hammond P., Irvine D. (2009). Layer-by-Layer-assembled multilayer films for transcutaneous drug and vaccine delivery. *ACS Nano* 3: 3719–3729.
- Valente A. (2013). DNA–poly(vinyl alcohol) gel matrices: Release properties are strongly dependent on electrolytes and cationic surfactants. *Colloids Surf. B* 101: 111–117.
- Wang Y.-W. (2005). Gelatin blending improves the performance of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) films for biomedical application. *Biomacromolecules* 6: 566-571.

- Yano S., Kurita K., Iwata K., Furukawa T., Kodomari M. (2003). Structure and properties of poly(vinyl alcohol)/tungsten trioxide hybrids. *Polymer* 44: 3515–3522.
- Yoo M.K., Sung Y.K., Lee, Y.M., Cho, C.S. (2000). Effect of polyelectrolyte on the lower critical solution temperature of poly(*N*-isopropyl acrylamide) in the poly(NIPAAm-co-acrylic acid) hydrogel. *Polymer* 41, 5713–5719.
- Zsivanovits G., MacDougall A.J., Smith A. C., Ring S. G. (2004). Material properties of concentrated pectin networks. *Carbohydr. Res.* 339:1317–1322.

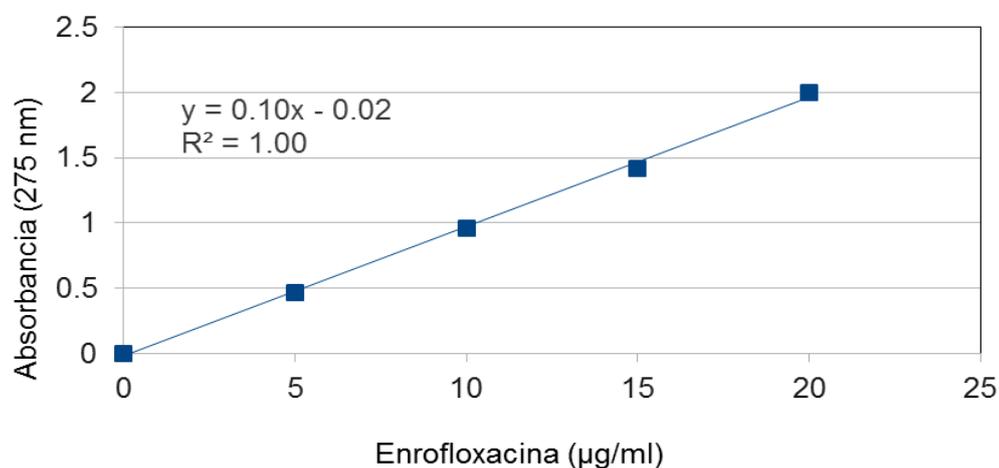
1.6 Apéndice Capítulo 1

Curva de Calibración enrofloxacina

La enrofloxacina se preparó en buffer acetato 50 mM (pH= 5,5= y se midió la intensidad de la fluorescencia a distintas concentraciones del antibiótico. El rango de linealidad se observa entre 0,01 y 0,03 µg/ml. Las determinaciones se efectuaron por triplicado. Las mediciones se realizaron en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50B con λ_{ex} = 275 nm y λ_{em} = 437 nm.



La enrofloxacina fue determinada espectrofotométricamente utilizando un lector de placa UV-visible (EPOCH-BIOTEK) a 275 nm. El rango de linealidad se observa entre los 5,0 y los 25,0 µg/ml de enrofloxacina



Capítulo 2

Inmovilización de queratinasa en films de PVA-P conteniendo enrofloxacin para el desbridamiento de escaras

2.1 Introducción

Las quemaduras de piel son un gran problema sanitario a escala mundial. Aproximadamente, 100.000 casos por año son reportados y cerca de 5.000 pacientes mueren debido a complicaciones relacionadas con quemaduras (Organización Mundial de la Salud, 2008). Por otro lado, en enfermos que padecen diabetes el tratamiento del pie diabético es altamente costoso insumiendo un 15-20 % de los recursos destinados a salud en países del primer mundo (Organización Mundial de la Salud, 2005).

En general, el tejido muerto que cubre la herida en una quemadura/ulcera de piel es una vía de ingreso a la entrada de microorganismos los cuales colonizan la zona y diseminan la infección en el cuerpo dando lugar a septicemias.

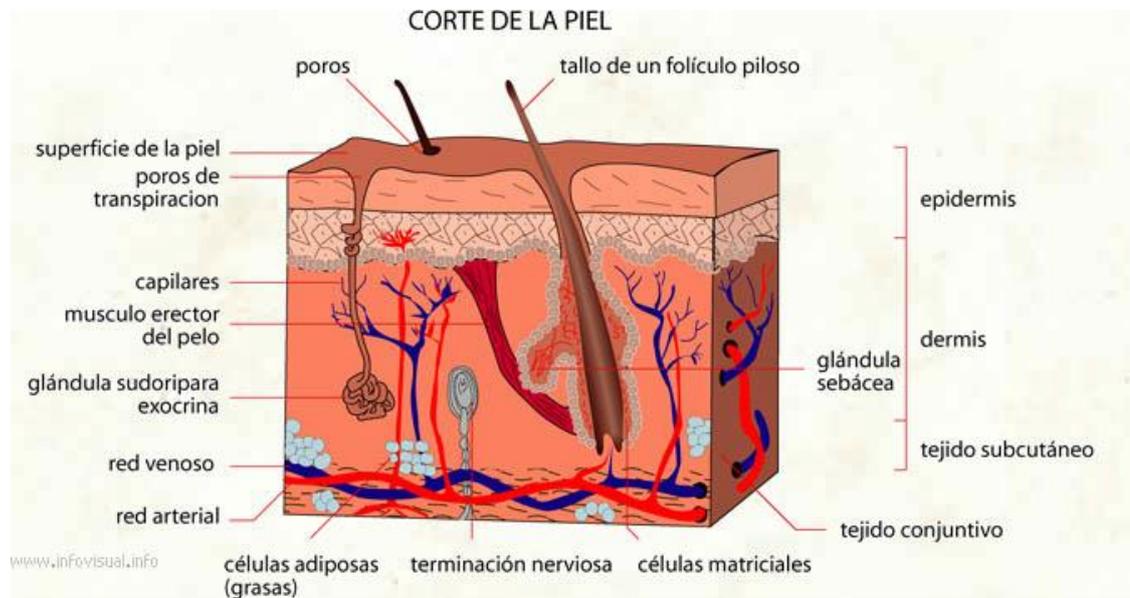
A su vez, la actividad antimicrobiana de los antibióticos es reducida severamente en la administración tópica debido a la formación de escaras (Wang y col., 2009). La escara formada en una quemadura de tercer grado, es avascular ya que se encuentra en la superficie de la dermis, y alejada varios milímetros de la vasculatura. En consecuencia, la administración tópica de antibióticos no alcanza los niveles terapéuticos debido a que existe un impedimento difusional generado por el tejido muerto, debajo del cual se aloja la infección (Manafi y col., 2008). Por esta razón, se recurre a la administración de elevadas concentraciones de antibióticos para el tratamiento, sobrepasando la ventana terapéutica y produciendo de esta forma efectos secundarios indeseables. A su vez, cuando la remoción del tejido necrosado se realiza mediante métodos quirúrgicos, no solo se pone en riesgo al paciente sino que además su estabilidad fisiológica.

Actualmente, en el tratamiento tradicional de úlceras y quemaduras en la piel se ha retirado la venda y está siendo reemplazado por nuevas terapias. Estas nuevas alternativas terapéuticas consideran la incorporación de enzimas, células, biomoléculas, matrices acelulares entre otros, los cuales poseen el propósito de acelerar el proceso de cicatrización y limpieza de la herida (Wan y col., 2010).

En la **Figura 1** se observa un esquema de la piel. La epidermis o capa externa está compuesta principalmente de 4 tipos celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Los queratinocitos en particular, son células productoras de queratina.

En la dermis se encuentran fibras como el colágeno y la elastina. La dermis está compuesta principalmente por colágeno tipo I (85-90 %), tipo III (8-11 %) y tipo V (2-4 %)

Figura 1. Composición de la piel humana.



(Fuente: www.infovisual.info)

La degradación enzimática del tejido muerto en una herida, conocido como desbridamiento, preserva el potencial de epitelización espontánea que posee la piel (Krieger y col., 2012). Las enzimas que actualmente son consideradas para efectuar el desbridamiento enzimático son las proteasas. Las proteasas son una gran familia de enzimas hidrolíticas ampliamente utilizadas en la industria de detergentes, alimenticia, farmacéutica, diagnóstica y en la industria de la química fina (Anwar y col., 1998). Entre ellas, las proteasas de origen microbiano ocupan un 65 % del nicho industrial de enzimas (Zvidsai y col., 2001). Algunas proteasas han sido descritas con capacidad de catalizar la degradación de proteínas presentes en la piel. Su accionar es beneficioso debido a que favorecen la limpieza de la herida exhibiendo propiedades anti-inflamatorias, fibrinolíticas y antiedémicas en la zona de la herida (Vernikovskii y col., 2012). Las queratinasas se han clasificado dentro de la clase de proteasas con un número E.C. 3.4.99 (Comité Internacional de enzimas, Owen y col., 1983). Dentro del grupo de proteasas, las queratinasas son

capaces de hidrolizar queratina insoluble en forma eficiente (Onafide y col., 1998). Las queratinasas se han aislado de bacterias y hongos, su peso molecular se ha descrito en rango de los 20 a 60 KDa y son activas a pH alcalinos (Gradisar y col., 2005).

Objetivos

El objetivo del presente trabajo es utilizar las películas de PVA-P desarrolladas en el capítulo anterior (Cap. 1) conteniendo enrofloxacin con el fin de inmovilizar una queratinasa aislada de *Paecilomyces lilacinus* (LPS #876) y así utilizar el sistema en forma de apósito en el lugar de la infección. En tal sentido, la enzima sería la encargada de remover el tejido lesionado y permitir una mejor difusión del antibiótico en el lugar de la infección.

Para ello, se emplearon pectinas de diferente grado de metoxilación y se estudió la variación de la concentración del biopolímeros en relación a las velocidades de liberación de la enzima y enrofloxacin. De esta forma, se seleccionó la matriz más adecuada la cual se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas, calorimétricas y cristalográficas.

2.2 Materiales y métodos

Materiales

Las características de las pectinas, PVA y enrofloxacin empleadas en el presente capítulo fueron descritas en el capítulo anterior 1.

La enzima queratinasa fue gentilmente suministrada por el grupo de investigación del Dr. Cavalitto (Cavello y col., 2013).

La piel en polvo azul-celeste (HPA) es una preparación de alto contenido de colágeno parcialmente desnaturalizado, el cual fue derivatizado covalentemente con el colorante azul brillante Remazol. El sustrato enzimático azocoll, es colágeno derivatizado con colorante azo 5-acetil-2-[4-[N-(2-hidroxietil)amino]-2-metilfenilazo]-4-metiltiazol y posee un color rojo brillante. Los mismos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

El Agar Mueller Hinton (Britania S.A., Argentina), está compuesto por caseína ácida hidrolizada (17,5 g/l), pasta de extracto de corazón (5,0 g/l), almidón (1,5 g/l),

agar (12,0 g/l), pH= 7.4 ± 0.2.

Preparación de las películas

Soluciones acuosas conteniendo 30,0% (p/v) de PVA y 2,0–4,0 % (p/v) pectina fueron mezcladas para producir películas con concentraciones finales de 15% (p/v) PVA y 0,5-1,0 % (p/v) pectina.

Las soluciones poliméricas se mezclaron con 5,0 µg/ml enrofloxacin y/o 0,163 UE (Unidades Enzimáticas) de queratinasa bajo agitación. Las soluciones fueron incubadas en placas de Petri y congeladas a -18°C por 20 horas y luego descongeladas a temperatura ambiente (25°C) por 8 horas. Los ciclos de congelado (C) y descongelado (D) fueron repetidos 3 veces en total.

Estudios de Liberaciones

Las liberaciones de enrofloxacin y queratinasa contenidas en criogeles de PVA–P fueron realizadas incubando una porción (25±3.1mg) de criogel en 1,5 ml de buffer acetato (pH= 5.5) a 37 °C. Alícuotas de 300 µl fueron retiradas a distintos tiempos y repuestas con igual volumen de buffer. La liberación del antibiótico de los criogeles fue medida por fluorescencia (espectrofluorímetro Perkin Elmer, modelo LS50B) empleando λ_{ex} = 275nm y λ_{em} = 437 nm. La liberación de la queratinasa se determinó ensayando la actividad enzimática en las alícuotas como se describe a continuación.

Ensayos de actividad enzimática

La actividad enzimática fue determinada mediante la incubación de una alícuota (100 µl) de la enzima libre o sobrenadante resultante de la liberación, con 250 µl de 1,0 % (p/v) de azocaseína disuelto en buffer 100 mM Tris-HCl (pH= 9.0). El tiempo de incubación fue de 30 min a 37 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 1,0 ml de ácido tricloroacético (10,0 %, p/v). Posteriormente, la solución resultante fue centrifugada a 10,000 xg por 10 min. El blanco de reacción se realizó con 100 µl de la enzima inactivada térmicamente mediante una incubación a 60 °C durante 30 minutos. Luego, 1,0 ml de 1,0 M NaOH fue añadido al sobrenadante y se midió la absorbancia a 440 nm. La actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0,01 unidades de absorbancia a 440 nm por

minuto bajo las condiciones experimentales.

Cuantificación proteica

Las proteínas se cuantificaron usando el reactivo Fluorescamina (Sigma-Aldrich, Buenos aires, Argentina) según el protocolo (Udefriend y col., 1972). La curva de calibración se realizó con BSA (Albúmina de Suero Bovino) como estándar. El procedimiento fue el siguiente: 50 μ l de la muestra se mezclaron con 325 μ l de Buffer Borato 12 mM (pH= 9,0) y luego 125 μ l de Fluorescamina (300 mg/ml) fueron añadidos, la solución resultante se homogeneizó. La fluorescencia fue determinada empleando λ_{ex} = 390 nm y λ_{em} = 478 nm (PerkinElmer modelo LS 50B espectrofluorímetro).

Caracterización bioquímica de la enzima libre purificada

Con el objetivo de estudiar la especificidad de la queratinasa sobre proteínas presentes en la piel, fueron utilizados un grupo de sustratos cromogénicos y se determinó la actividad enzimática espectrofotométricamente. Los sustratos cromogénicos fueron divididos en sustratos insolubles como queratina azul-celeste, piel en polvo azul-celeste, Azocolágeno, Azoqueratina y Rojo Congo de elastina. Los sustratos solubles empelados fueron Azoalbumina y Azocaseína.

Ensayo con queratina azul-celeste y Azoqueratina como sustratos de la enzima

La Azoqueratina fue sintetizada utilizando plumas de gallina como sustrato según lo descrito previamente (Riffel y col., 2006). La Azoqueratina es queratina derivatizada covalentemente a un grupo cromogénico azo debido a su estructura $R_1-N=N-R_2$ donde R_1 y R_2 corresponden a anillos aromáticos. Cuando la hidrólisis enzimática ocurre sobre el sustrato proteico, el grupo cromogénico se libera ionizándose en las condiciones alcalinas generándose el cambio de color debido al corrimiento batocrómico generado por la deslocalización de los electrones. Similar procedimiento fue llevado a cabo con 30 mg de sustrato queratina azul-celeste, con un tiempo de incubación de 25 min, determinándose absorbancia a 440 nm (Joshi y col., 2007). En este caso, el grupo cromóforo es tiazina metilada y el producto coloreado se obtiene mediante el mismo proceso descrito anteriormente. El procedimiento se detalla a continuación: fueron pesados 5,0 mg de cada uno de los

sustratos, y disueltos en 900 µl de 100 mM Tris-HCl buffer (pH= 9.0), posteriormente se agregó una alícuota de la enzima apropiadamente diluída. La solución resultante fue incubada a 37 °C con agitación durante 90 min. La reacción fue detenida incubando los tubos en un baño a 0 °C (agua y hielo) durante 30 min. A continuación la solución resultante fue centrifugada a 10,000 xg por 10 min y se determinó la absorbancia a 595 nm. (El blanco se realizó con 100 µl de la enzima inactivada térmicamente). Una unidad queratinasa fue definida como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0,01 unidades a 595 nm por minuto.

Ensayo con piel en polvo azul-celeste (HPA), Azocolágeno y Elastina Rojo Congo

Se llevó a cabo con similar procedimiento como fuera descrito anteriormente, el tiempo de incubación fue de 20 min a 37 °C y se midió absorbancia a 595 nm para HPA, 520 nm para azocoll y 495 nm para la elastina rojo congo.

Los compuestos cromóforos unidos al HPA, Azocolágeno y Elastina Rojo Congo fueron descriptos en materiales.

Actividad antimicrobiana de Enrofloxacin en presencia de queratinasa

La actividad antimicrobiana de la fluoroquinolona fue estudiada en una bacteria Gram negativa no fermentativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15492 utilizando el Método de Difusión en Discos (DDM) de acuerdo a CLSI/NCCLS (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, anteriormente denominado *National Committee for Clinical Laboratory Standards*). El protocolo DDM fue modificado utilizando cilindros estériles de 8 mm de diámetro externo, 6 mm de diámetro interno y 10 mm de alto en vez de discos de papel. Los cilindros fueron ubicados sobre agar Mueller-Hinton previamente inoculado con la bacteria y se agregaron 25 µl de enrofloxacin (100 µg/ml) conteniendo diferentes cantidades de queratinasa (5,5; 11,0; 22,0 y 44,0 µg/ml). Luego se incubó la placa de Petri a 37 °C durante 24 horas. Se determinaron las zonas de inhibición del crecimiento de la bacteria mediante la determinación de los diámetros de los halos. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Determinación de la estabilidad de la enzima en presencia y ausencia de criogel

Una vez desarrollado el criogel con la enzima, se disolvieron 20 mg en 250 µl del sustrato, se midió actividad enzimática y se compararon las unidades con la

enzima libre.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de los criogeles y mezclas (PVA-P) fue analizada en un microscopio Philips SEM 505 (Rochester, USA). Los criogeles fueron liofilizados para su observación.

El análisis de la rugosidad de las imágenes obtenidas fue realizado mediante el programa ImageJ (NIH, U.S.A.). La rugosidad de la superficie se determinó mediante la desviación estándar del promedio del valor de grises de los píxeles de la imagen (1024 × 832). Las imágenes fueron abiertas con el programa y convertidas a una imagen de 8 bits. Luego se seleccionaron las imágenes y se realizó un histograma de cada una. El valor de la desviación estándar es proporcional a la rugosidad de la superficie.

La determinación de los poros de la película, se realizó seleccionando un área de la imagen y la misma fue analizada con la función *plot profile* del programa (Manual del Usuario ImageJ).

Actividad enzimática en presencia de enrofloxacin

Con el fin de estudiar el efecto de la enrofloxacin en la actividad enzimática, se incubó la queratinasa libre en una solución de antibiótico 5 µg/ml a 37 °C durante 3 horas. Luego de la incubación, se midió la actividad enzimática residual utilizando azocaseína como sustrato. El cálculo del porcentaje de actividad fue definido como 100 % para la enzima libre en ausencia de enrofloxacin y determinada bajo las mismas condiciones experimentales. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y el valor obtenido es el resultado del promedio.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los ensayos de DSC se realizaron en intervalo de temperaturas comprendido entre 20 hasta 260 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera de N₂ en un calorímetro TA-Instrument (modelo Q2000 V24.10 Build 122).

Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de cristalinidad de todas las muestras mediante la siguiente fórmula.

$$X_{cr} = \Delta H_m / \Delta H^{\circ}_m \times 100 \quad (1)$$

En donde: ΔH_m es el calor de fusión medido y ΔH°_m es el calor de fusión del material 100 % cristalino (138,6 J/g; Peppas y col. 1976).

Dispersión de Rayos X (DRX)

Las medidas de las películas secas se realizaron utilizando un equipo Analytical Expert Instrument ($K\alpha\text{Cu}=1.54 \text{ \AA}$) desde $2\theta = 3^\circ$ a 60° con una velocidad de 2 $^\circ$ /minutos a temperatura ambiente. La tensión del generador fue de 40 kV y la corriente de 40 mA.

El porcentaje de cristalinidad se determinó utilizando la opción análisis de máximo (*peak analysis*), e integración de máximo (*integrate peak*) del programa Origin Pro (*Origin Lab Corporation*, Northampton, EE.UU.).

Dispersión de Rayos X a bajo ángulo (SAXS)

Las medidas de SAXS se llevaron a cabo con haz incidente de 8 KeV y una longitud de onda de 1,55 \AA en la línea D1B-SAXS1 empleando un detector Pilatus 3000K (Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón, Campinas, Brasil). Las muestras sólidas fueron ubicadas en un porta muestras de acero inoxidable sostenidas en ambos lados por una cinta Kapton. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente. Se utilizó behenato de plata en polvo para calibrar la distancia entre las muestras y el detector y la posición del haz.

Las muestras se midieron a una distancia de 3,0 m y 0,8 m entre la muestra y el detector. Al variar la distancia, se pueden analizar las muestras en un rango mayor del vector de dispersión (*scattering*) q , en donde:

$$q = (4\pi / \lambda) \sin \theta \quad (2)$$

En donde 2θ es el ángulo de dispersión.

Determinando experimentalmente el valor de q (ecuación 1) se puede obtener información de la distancia d , entre los dominios o cristales en el criogel mediante la siguiente ecuación aproximada:

$$d = 2\pi / q_{\max} \quad (3)$$

En donde q_{\max} es el modulo del vector de dispersión (*scattering*) correspondiente al máximo de intensidad en la función obtenida mediante SAXS (Singh, 2003).

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Actividad de queratinasa frente a proteínas presentes en la piel

La actividad enzimática se determinó en diversos sustratos derivados de proteínas presentes en la piel como el colágeno, elastina y queratinasa para establecer la especificidad de la enzima. La queratinasa aislada de *P. lilacinus* posee una amplia especificidad sobre distintos sustratos y no sólo es capaz de hidrolizar la queratina, sino también sustratos insolubles. En el presente trabajo se observa que de todos los sustratos testeados, el colágeno parcialmente degradado es el que posee mayor grado de hidrólisis (Tabla 1)

Tabla 1. Especificidad de la queratinasa de *P. lilacinus* en presencia de diferentes sustratos.

Sustrato	Absorbancia (nm)	Grado de hidrólisis (ΔAbs / min) x 10³)
Azoalbumina		177.3 \pm 0.6
Azocaseína	440	120.3 \pm 2.3
Azoqueratina		52.5 \pm 7.2
Elastina Rojo Congo	495	240.0 \pm 7.1
Azocoll	520	240.3 \pm 17.6
HPA		3,502.3 \pm 186.4
Queratina azul- celestes	595	2.4 \pm 0.1

Este amplio rango de sustratos hidrolizables por la queratinasa de *P. lilacinus* la permiten clasificar como perteneciente al grupo de enzimas más utilizadas en diversas industrias como las textiles, de detergentes y bioconversión de desechos

de pesca. Además, se ha informado el uso de este tipo de enzimas para mejorar la administración de antimicóticos en uñas (Najafi y col., 2006). Las láminas de queratina que componen la uña presentan una gran barrera difusional con lo cual el desbridamiento enzimático favorecerían la penetración de los fármacos (Gupta y col., 2006).

Sin embargo, cuando las proteasas son directamente aplicadas sobre una herida, se inactivan fácilmente haciendo la terapia ineficiente como es en el caso de ungüentos y vendas. Por ejemplo, el efecto necrolítico de proteasas posee una vida media de 15-30 min (Abdel-Mohsen y col., 2011). Este fenómeno se observa debido a que en una herida, la producción de metaloproteinasas (MPS) es elevada. Se ha estudiado que la concentración de MPs en heridas crónicas aumenta de 10 a 25 veces comparada con su producción basal en un tejido no injuriado. Este efecto se produce como consecuencia de un proceso inflamatorio del tejido dañado atribuido a la presencia de interleukina 1 y del factor de necrosis tumoral α (α TNF) que estimulan la producción de MPs e inhiben la síntesis de inhibidores de MPs en el tejido (TIMPs). Las MPs son necesarias en el proceso de degradación de la matriz extracelular (MEC) que se dañó a causa de la herida. Es necesaria la remoción de fibronectina, colágeno y elastina de la MEC para promover la migración celular y la angiogénesis, lo cual es solo posible con la formación de una nueva MEC (Tregrove y col., 1999).

La inmovilización de enzimas no solo permite la localización de la actividad enzimática en un lugar físico determinado sino que además aumenta su estabilidad ante procesos de proteólisis debido a proteasas presentes en la piel (Anwar y col., 1998).

2.3.2 Estabilidad de la queratinasa en presencia de enrofloxacin

En los primeros ensayos, se procedió a estudiar la actividad enzimática de la queratinasa (8,3 UE/ml) en presencia y ausencia de enrofloxacin (5,0 μ g/ml). Los resultados indican que no existen diferencias significativas en la actividad de queratinasa en presencia y ausencia del antibiótico ($p < 0,05$). Estos resultados confirmaron el posible uso de la queratinasa seleccionada como posible componente de un apósito de PVA-P-enrofloxacin (previamente descrito en el capítulo 1) para aplicación tópica.

A su vez ensayos realizados en presencia de PVA permitieron establecer que la

queratinasa no se inactiva con los ciclos de congelado y descongelado. No existe inactivación de la enzima en el proceso de inmovilización. Los resultados se muestran en la tabla 2

Tabla 2. Unidades enzimáticas de la enzima libre e inmovilizada

Enzima	Unidades Enzimáticas (UE x 10⁻³)
Soluble	0,11 ± 5,0
Inmovilizada	0,10 ± 3,6

Por lo tanto se puede concluir que la queratinasa no se inactiva durante el proceso de congelado y descongelado en presencia de PVA y tampoco en presencia del antibiótico.

2.3.3 Inmovilización de queratinasa en películas de PVA-P de distinto grado de metoxilación. Cinéticas de liberación.

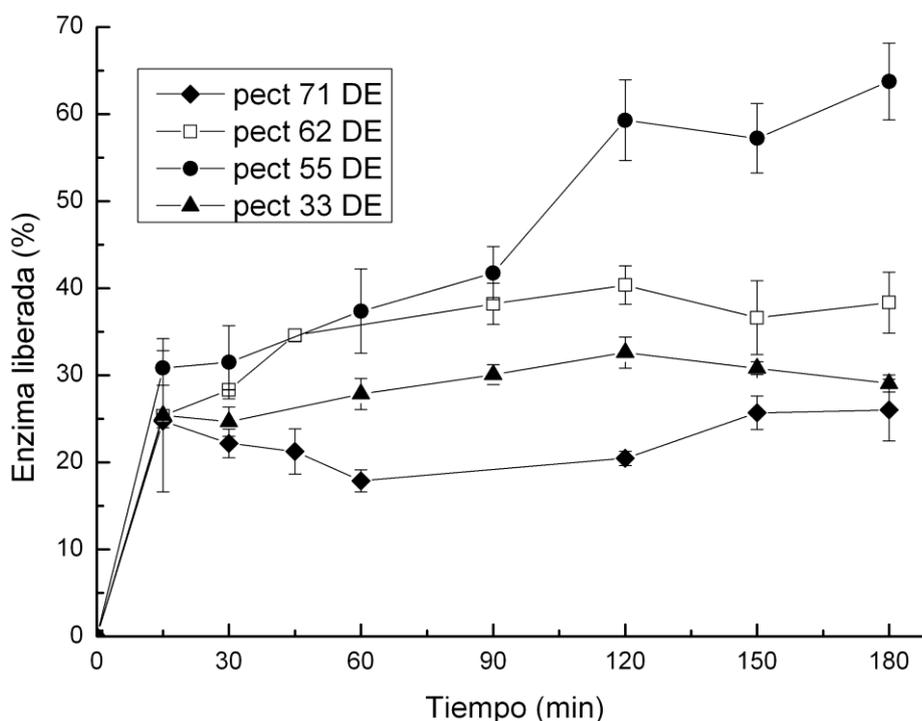
Se procedió a inmovilizar la queratinasa en una matriz de PVA-P de alto metoxilo (71,7 % DE) empleando dos concentraciones, 0,5 y 1,0 % (p/v). Se estudió la cinética de liberación de la enzima desde las matrices incubadas a 37 °C, observándose un 25,4 y 19,6 % respectivamente luego de 3 horas de incubación. Estos resultados sugieren que a mayor concentración de pectina, mayor es la barrera difusional de la matriz obstaculizando la liberación de la enzima. A los efectos prácticos del presente trabajo, donde se pretende que la enzima difunda y actúe rápidamente desde la matriz a la zona afectada es conveniente una rápida cinética de liberación. Con lo cual, la concentración de pectina se ajustó a 0,5 % (p/v) y se procedió a estudiar el efecto del grado de esterificación de las pectinas en la liberación de la queratinasa.

Se ensayaron entonces, pectinas de diferente grado de metoxilación con el objeto de estudiar la liberación de la queratinasa en geles de PVA-P 0,5 % (p/v). En la **Figura 1** se observa la cinética de liberación de la enzima inmovilizada en películas de PVA-P con diferente grado de metoxilación.

En concentraciones menores al 0,5 % (p/v) de pectina, se observa una elevada dispersión entre los duplicados. Esto se observó al estudiar la cinética de liberación de la enzima inmovilizada en criogeles de PVA-P55 con un 0,25 % (p/v) de pectina.

Probablemente se debe a que el entramado del gel empleando bajas concentraciones de pectina no es homogéneo, con lo cual la liberación de la enzima no es reproducible.

Figura 1. Efecto del contenido de metoxilación de diferentes pectinas en la cinética de liberación de queratinasa inmovilizada en un gel de PVA-P 0,5 %.



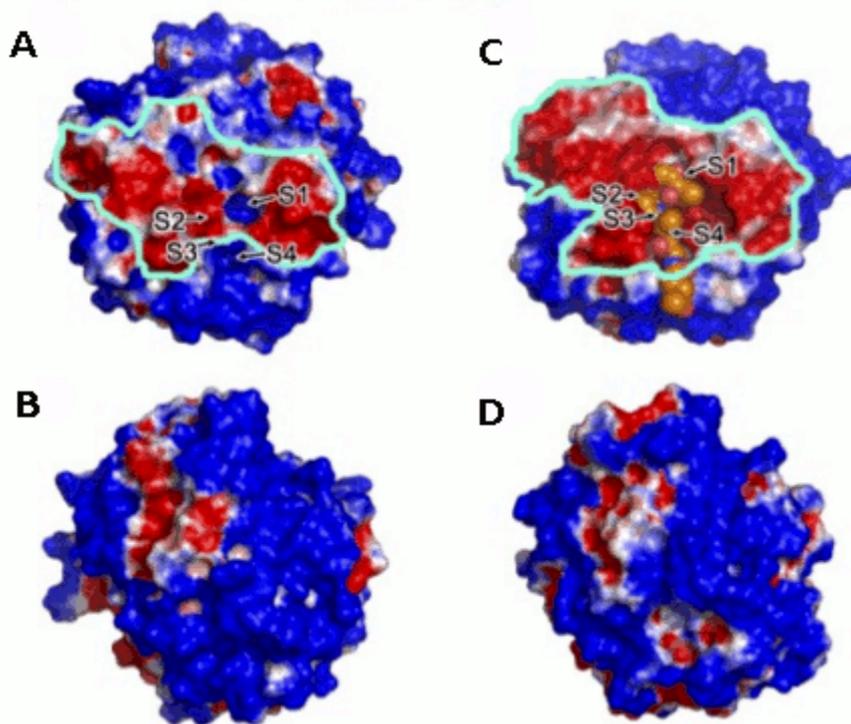
La liberación de la queratinasa de la matriz de PVA-P 55.0 % DE (**Figura 1**) fue de 63.8 ± 0.2 % luego de 180 min de incubación. A su vez, la cantidad de enzima liberada desde la matrices de PVA-P 62,0 % DE y 71,7 % DE fueron de $37.3 \pm 3,5$ % y $26.0 \pm 3,5$ %) respectivamente luego de 180 min de incubación. Sin embargo, los criogeles compuestos de PVA-P 33,0 % DE mostraron un porcentaje intermedio de liberación $29.1 \pm 1,0$ %, ubicado entre las pectinas de alto porcentaje de metoxilación.

Estos resultados pueden analizarse teniendo en cuenta las posibles interacciones de la enzima y los biopolímeros con diferente porcentaje de metoxilación. Si se considera que el pK_a de la pectina está comprendido en el

rango de 3,0-4,0 (Plaschina y col., 1978), al pH de trabajo de 5,5, las pectinas se encuentran ionizadas negativamente, posibilitando una interacción iónica con la queratinasa.

En un reciente trabajo se obtuvieron las estructuras cristalinas de dos queratinasas provenientes del hongo *P. lilacinus* (PL) y *Lecanicillium psalliotae* (LP). En la **Figura 2** se muestra el potencial positivo (azul) y el negativo (rojo) de las enzimas. El sitio activo con potencial negativo se remarcó en celeste y las zonas hidrofóbicas en naranja (Liang y col., 2010). Como es observable en la figura A, la mayor parte de la superficie de las dos queratinasas posee carga residual positiva. Este hecho favorecería la interacción con las pectinas presentes en el gel de PVA.

Figura 2. Estructura cristalina de la queratinasa de *P. lilacinus* (C y D) y *Lecanicillium psalliotae* (A y B) (Liang y col., 2010).



Con el objetivo de estudiar las posibles interacciones iónicas entre la queratinasa y las pectinas, se estudió la liberación de la queratinasa en los criogeles de PVA-Pectinas en presencia de buffer 50 mM acetato (pH= 5,5) con y sin NaCl (750 mM) (**Tabla 3**). Como se observa en la tabla 3, debido al proceso de *salting-in* o aumento de la solubilidad de la enzima mediada por sales, la liberación

de la queratinasa aumenta como en el caso de las pectinas de 33,0 y 62,0 % DE ($p > 0.05$). Sin embargo, la pectina de alto metoxilo 71.7 % DE genera un ambiente más hidrofóbico en el gel debido a la presencia de un alto contenido de grupos metoxilo (-ROCH₃). En este caso, no existen diferencias significativas en la liberación de la queratinasa en presencia o ausencia de NaCl. Como se observa en la Tabla 3, las interacciones hidrofóbicas entre la matriz y la queratinasa (cuyas zonas hidrofóbicas se encuentran en el sitio activo de la enzima) retardan la liberación de la enzima comparando el porcentaje de liberación con otras pectinas, debido a que la presencia exterior de NaCl favorece las interacciones hidrofóbicas en el interior de la película de PVA.

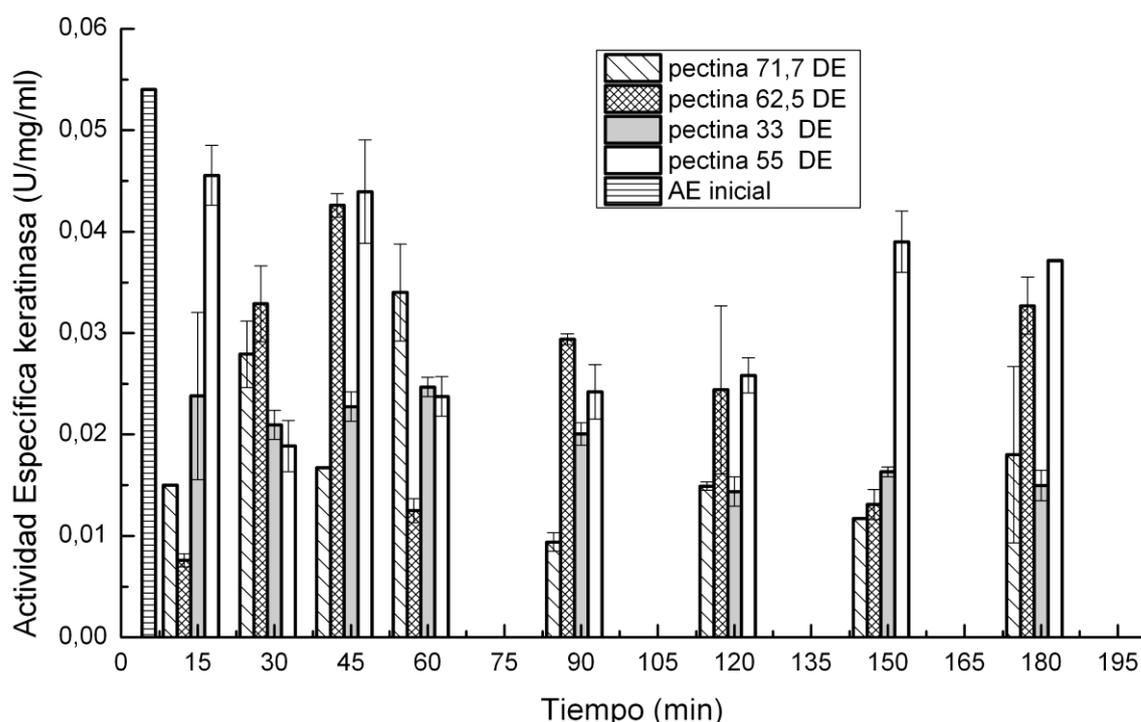
Por otro lado, el porcentaje de queratinasa liberada desde la matriz de PVA-P 55.0 % es el mayor de los cuatro casos y no existen diferencias significativas en el porcentaje de liberación en ausencia o presencia de NaCl. En este caso, es posible que las interacciones iónicas entre la matriz y la enzima sean más débiles, lo que puede atribuirse a que aproximadamente el 55 % de la pectina se encuentra metoxilada, permitiendo una elevada difusión de la enzima (65.8 ± 3.8 % en tres horas). La presencia de NaCl no contribuye a una mayor solubilización de la enzima quizás porque de por sí la enzima tiende a difundir bajo las condiciones experimentales hacia la solución acuosa.

Tabla 3. Efecto del contenido de metoxilos de las pectinas en geles de PVA-P 0.5 % en la liberación de queratinasa en presencia y ausencia de NaCl determinado a 180 minutos.

Pectina (%, DE)	Liberación queratinasa (%)	
	con NaCl	sin NaCl
71.7	34.0 ± 4.0	26.0 ± 3.5
62.7	57.3 ± 0.2	41.7 ± 3.5
55.0	65.8 ± 3.8	63.8 ± 0.2
33.0	57.5 ± 1.5	29.1 ± 1.1

En la **Figura 3** se observa la actividad específica de la enzima liberada vs tiempo. El perfil constante en la actividad específica de la enzima indica que la matriz no afecta la estabilidad enzimática.

Figura 3. Actividad específica de la queratinasa liberada

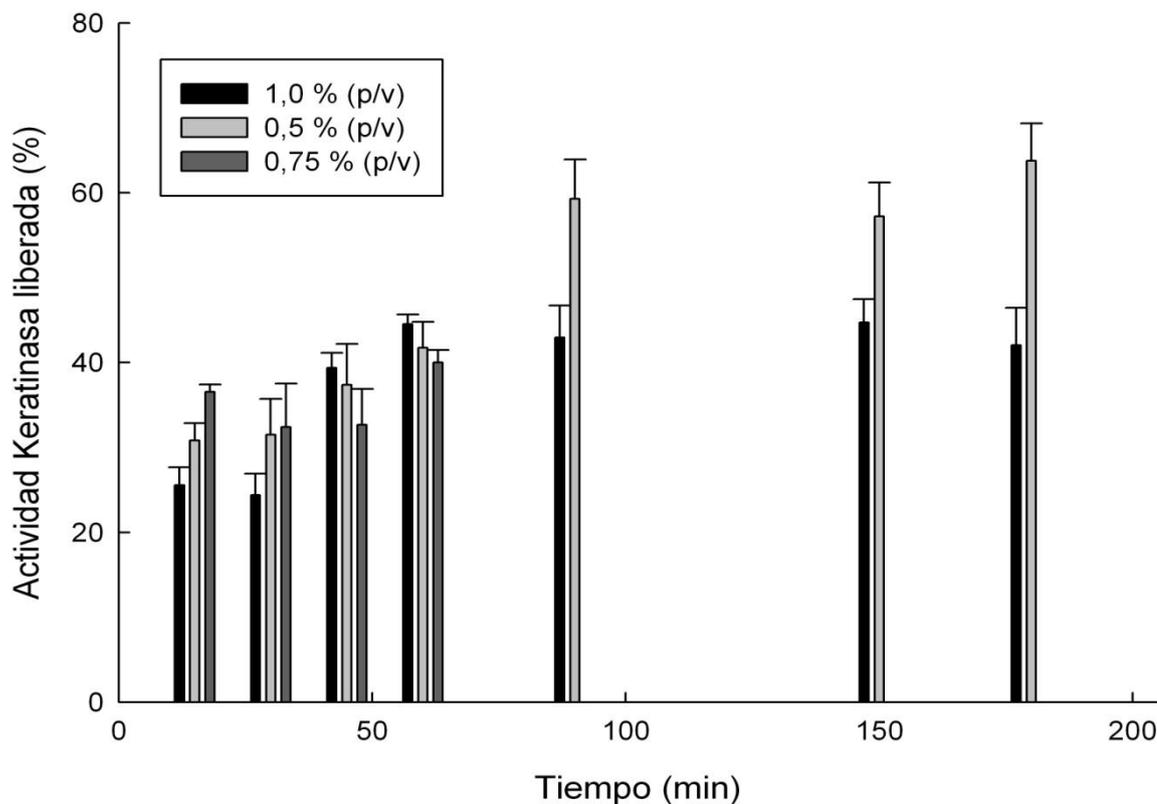


De acuerdo a los resultados presentados, se eligió a la película compuesta por PVA-P 55.0 % DE, debido a que el porcentaje de liberación obtenido es el mayor comparado entre los cuatro casos estudiados, luego de tres horas de incubación a 37 °C a pH= 5,5.

Con el fin de ajustar la concentración óptima de pectina, se estudió la liberación de la queratinasa en películas de PVA-P 55.0 % DE empleando tres concentraciones de pectina 0,50, 0,75 y 1.00 % (p/v).

Como se observa en la **Figura 4**, el sistema más apropiado es el que posee 0,5 % (p/v) de pectina debido a que el porcentaje de liberación obtenido es el mayor.

Figura 4. Efecto de la concentración de pectina en la liberación de la queratinasa.



2.3.4 Actividad antimicrobiana de enrofloxacin en presencia de queratinasa

Posteriormente, se realizaron ensayos de difusi3n de enrofloxacin en placa, con el fin de observar potenciales interacciones entre la queratinasa y la enrofloxacin. Se ensay3 la actividad antimicrobiana utilizando el protocolo de discos de difusi3n y no se observaron diferencias entre el halo control (enrofloxacin) y los halos formados por el antibi3tico en presencia de distintas UE de queratinasa (**Tabla 4**). Estos resultados muestran que la enzima no afecta la acci3n antimicrobiana de la enrofloxacin permitiendo la co-inmovilizaci3n de ambos, la enzima y el antibi3tico, en la misma matriz de PVA-P 55,0 % DE 0,5 % (p/v). Se procedi3 entonces, a observar el perfil de liberaci3n controlada de ambos la enzima y el antibi3tico.

Figura 5. Ensayo de difusión en discos.

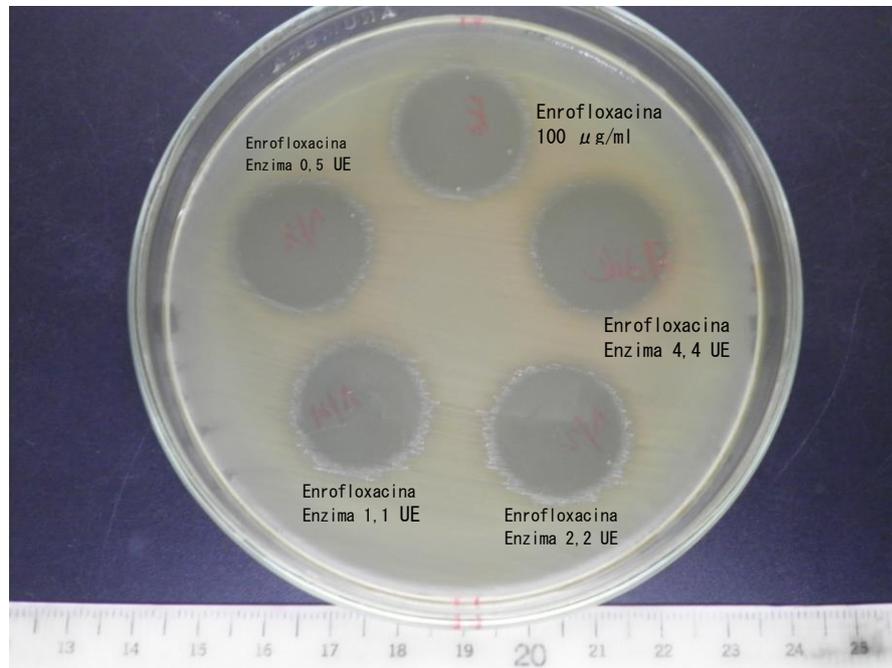


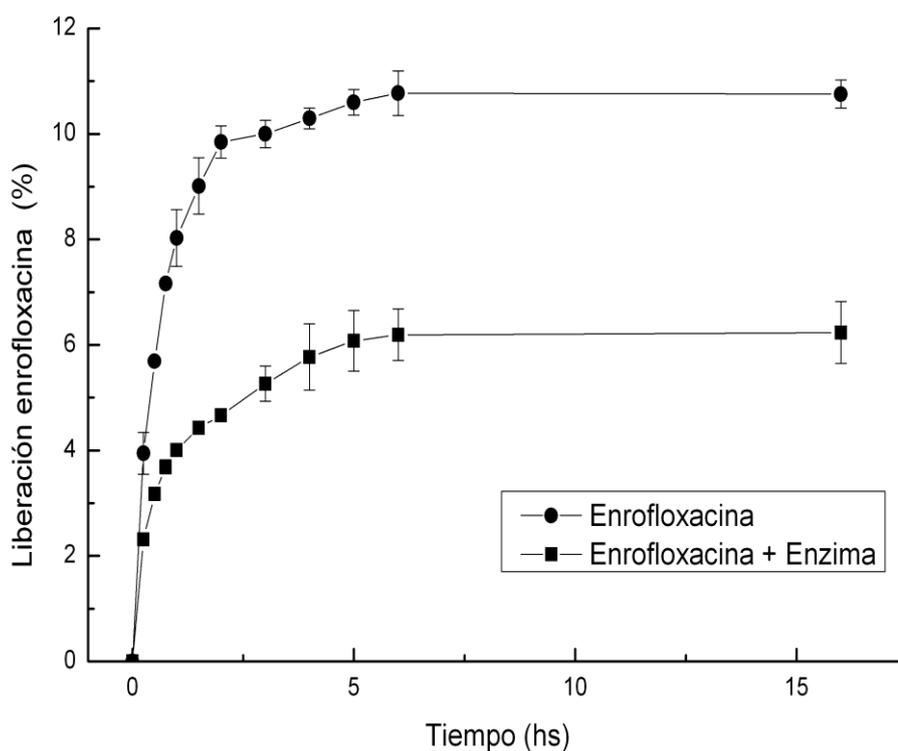
Tabla 4. Actividad antimicrobiana de enrofloxacin (0,1 mg/ml) incorporada en criogeles de PVA-P 55,0 % conteniendo o no queratinasa.

Queratinasa (UE)	Halo (cm)
0,0	1.90 ± 0,14
0,55	1.85 ± 0,21
1,1	1.80 ± 0,00
2,2	1.90 ± 0,14
4,4	2.00 ± 0,00

2.3.5 Co-inmovilización de la queratinasa y enrofloxacin en películas de PVA-P

Finalmente, se estudió la liberación simultánea de enrofloxacin y queratinasa desde la matriz elegida previamente utilizando como control el sistema sin enzima. Como se observa en la **Figura 6** la liberación de enrofloxacin posee una cinética de liberación de primer orden, sin embargo la cinética se ve retardada en presencia de la enzima. Probablemente ambos compiten por difundir hacia afuera de la matriz, generando la enzima una barrera difusional para la enrofloxacin.

Figura 6. Cinética de liberación de enrofloxacin y enrofloxacin con queratinasa de películas de PVA-P 55,0 % incubadas a 37 °C.



2.3.6 Caracterización de la matriz

2.3.6 Microscopía electrónica de barrido

Las películas fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido (*SEM*) a fin de obtener información sobre la superficie de los sistemas y el efecto de la presencia de la enzima en la morfología de los criogeles de PVA-P. Como se muestra en la **Figura 7**, la disminución en la rugosidad del criogel es evidenciada por la presencia de queratinasa (**Figura 7b**) comparando las películas sin enzima (**Figura 7a**).

Figura 7a. Imágenes de muestras de PVA-P en ausencia de queratinasa obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (*SEM*). Histograma

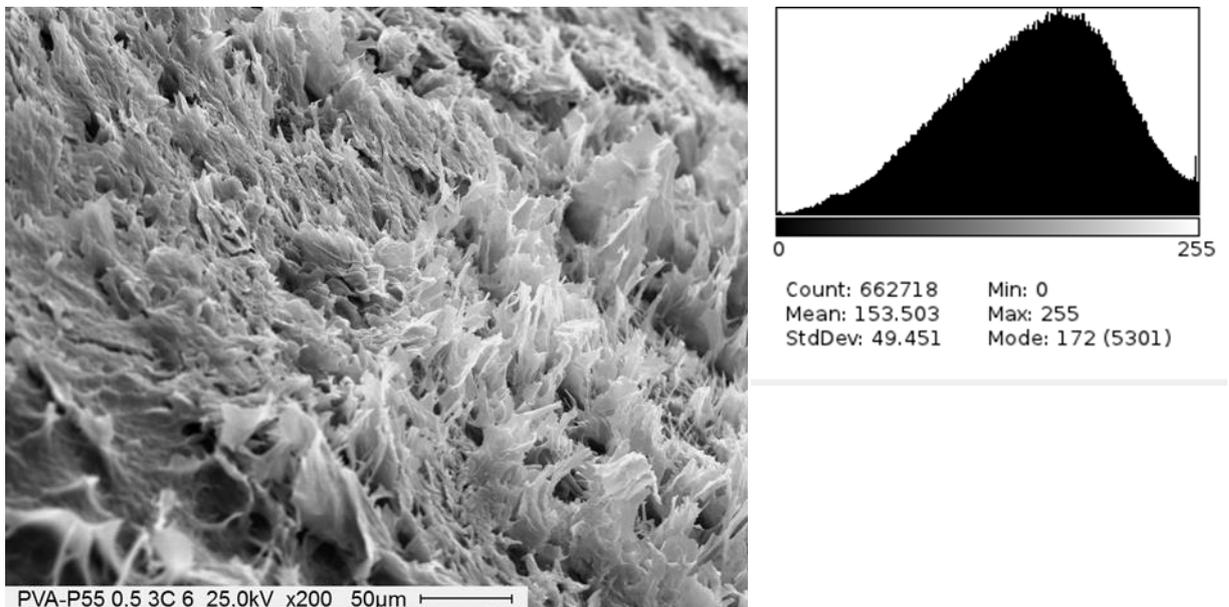
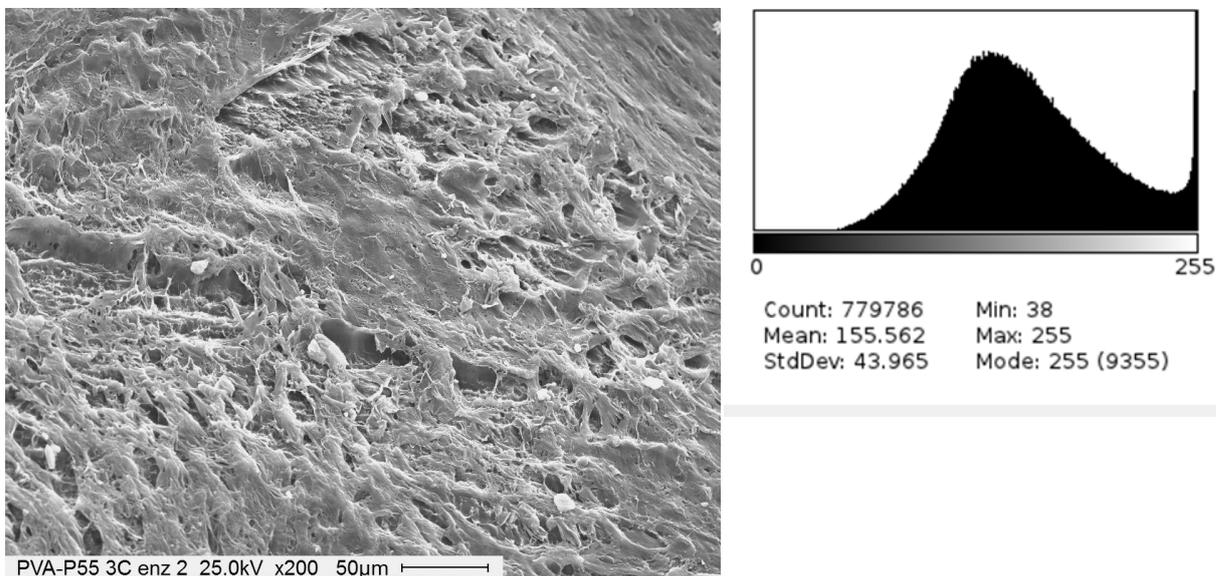


Figura 7b. Imágenes de muestras de PVA-P en presencia de queratinasa obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (*SEM*).

Histograma



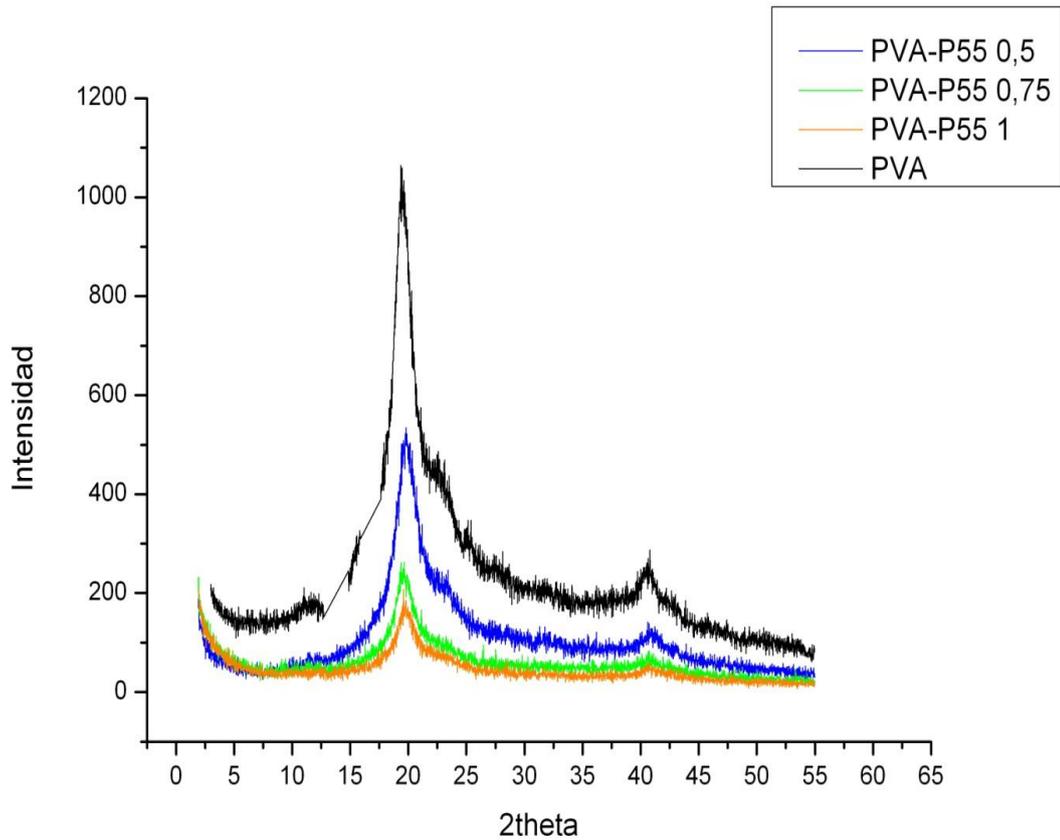
La información del histograma obtenido de las imágenes confirma la disminución de la rugosidad debido a que la desviación estándar es menor en presencia de la enzima comparando con el blanco.

2.3.7 Difracción de Rayos X (DRX)

Las películas de PVA-P fueron estudiadas con el fin de obtener los patrones de difracción de la estructura de los criogeles. En este caso, la información que se puede obtener está relacionada con el orden o re-arreglo de las cadenas poliméricas a larga distancia como consecuencia de interacciones a corta distancia.

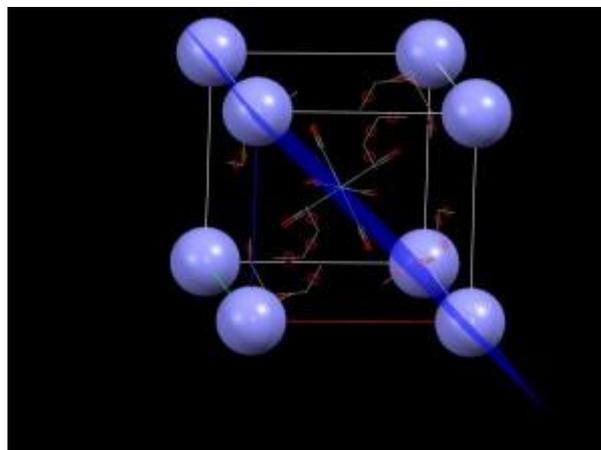
Como se observa en la **figura 8**, el patrón de difracción de la muestra de PVA muestra un máximo de intensidad a $19,3^\circ$ correspondiente a la reflexión 101 la cual está dada por la interferencia intermolecular entre las cadenas de PVA en la dirección de las interacciones puente de H (Hong y col.,1998).

Figura 8. Difracción de Rayos X de las muestras de PVA y PVA-P con diferentes concentraciones.



Para identificar los diferentes planos y direcciones en un cristal se usan los índices de Miller, en este caso la reflexión 101 se refiere al plano que se está estudiando. En la siguiente **Figura 9** se muestra dicho plano:

Figura 9. Plano 101 según el Índice de Miller



(Fuente: http://abragam.iqm.unicamp.br/wordpress/?page_id=886)

La intensidad de la difracción y el tamaño de los cristales está determinado por el número de cadenas poliméricas empaquetadas resultando en cristales más grandes al aumentar la intensidad de la reflexión 101. Por ejemplo, se ha observado que al aumentar el número de ciclos de congelado y descongelado, aumenta la intensidad en la reflexión 101 de criogeles de PVA (Ricciardi y col., 2004).

Por otro lado, a medida que aumenta la concentración de pectina en el criogel, el porcentaje de cristalinidad disminuye considerablemente (**Tabla 5**) mostrando una posible interacción entre los polímeros. Este fenómeno también se ha observado en la incorporación de óxido de grafito en criogeles de PVA donde se ha observado que existe una interacción entre ambos componentes (Salavagione y col., 2009).

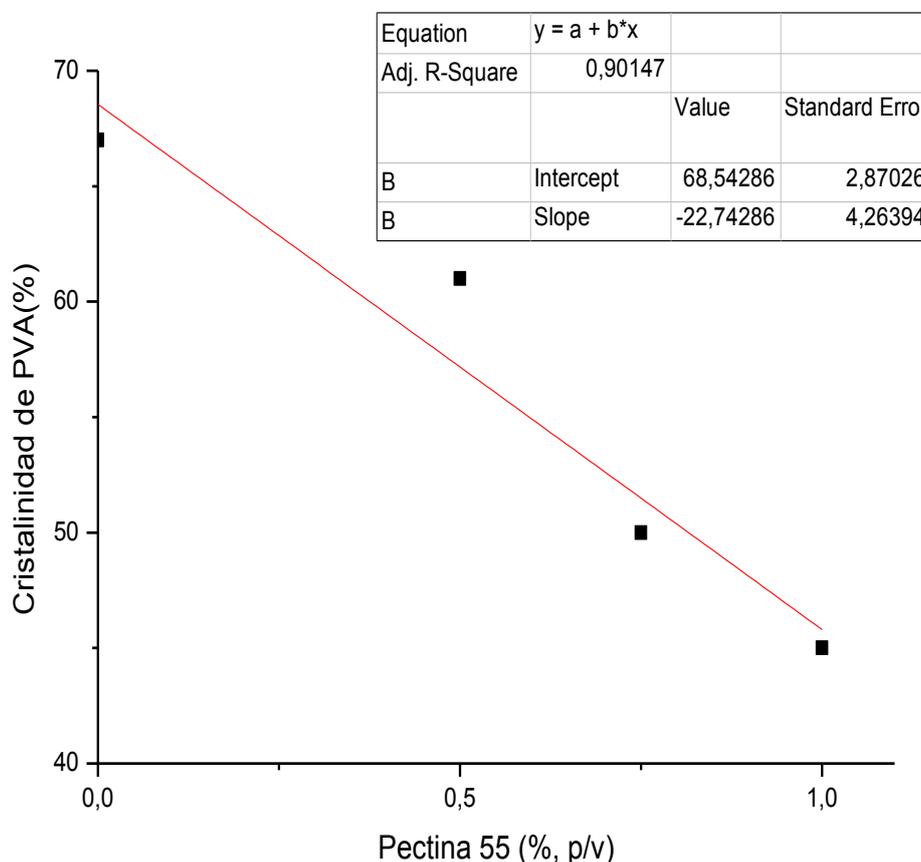
Tabla 5. Porcentaje de cristalinidad de criogeles de PVA conteniendo o no pectina 55 % DE.

Contenido de Pectina 55	Cristalinidad
(%, P/V)	(%)
0,00	67
0,50	61
0,75	50
1,00	45

Cuando son graficados los resultados experimentales del efecto del contenido de pectina en la cristalinidad de los criogeles de PVA se observa una relación lineal la cual se puede expresar por la ecuación inserta en la **Figura 10**.

De esta manera, podríamos establecer la cinética de liberación de la queratinasa en función de conocer el grado de cristalinidad del gel de PVA mediante el control del agregado de pectina

Figura 10. Regresión lineal.



2.3.8 Dispersión de Rayos X a bajo ángulo (SAXS)

Las muestras se estudiaron mediante la dispersión de rayos X a bajo ángulo con el objetivo de corroborar la incorporación y localización de la enzima en la matriz de PVA y PVA-P conteniendo enrofloxacin. En la **Tabla 6** se presentan los valores del vector q_{max} para cada muestra. La presencia de pectina 55,0 % de metoxilación (0,5 % p/v) no altera el valor de q_{max} comparado con el de PVA $q_{max} = 0,7 \text{ nm}^{-1}$ (Mansur y col., 2007; Yano y col., 1998). La presencia de enrofloxacin en la matriz de PVA-P55 tampoco altera el valor de q_{max} pva sin embargo, al agregar la queratinasa a la matriz de PVA-P55 si se observa un pequeño corrimiento en al valor de $q_{max} = 0,69 \text{ nm}^{-1}$ el cual es más pronunciado en presencia de la enzima y el

antibiótico como componentes de la matriz de PVA-P55 $q_{\max} = 0,64$. En trabajos previos, se ha observado que la incorporación de BSA, una proteína globular, en la matriz de PVA modifica sus propiedades cristalinas observándose un corrimiento en el valor del vector q_{\max} , hecho que permite confirmar la incorporación de la BSA dentro de la matriz (Mansur y col., 2007). En la figura 9 se observa el espectro de SAXS donde se ha colocado la muestra a 0,8 y 3 m del detector. Los valores de la tabla fueron obtenidos de esos gráficos.

Utilizando la función de la ecuación 1 donde $d = 2\pi / q_{\max}$ siendo q_{\max} el valor del vector q_{\max} donde la intensidad es máxima, se obtiene que para la muestra de PVA-P1a distancia de los nanodominios (d) es $d = 8,97$ nm y el espaciado de los nanodominios de PVA-P55 Enrofloxacin Queratinasa es $d = 9,81$ nm. Estos resultados indican que la presencia de enrofloxacin y queratinasa en la matriz de PVA-P alteran el espaciado entre los dominios o nanocristales de PVA en 0,84 nm. Tanto la enzima como el antibiótico estarían ubicados entre los nanocristales de PVA aumentando el espaciado entre ellos.

En trabajos similares, se ha informado que la presencia de 3-mercaptopropiltriétoxosilano (MPTES) en criogeles de PVA incrementa el espaciado de los nanodominios de PVA en 1,5 nm (Mansur y col., 2007).

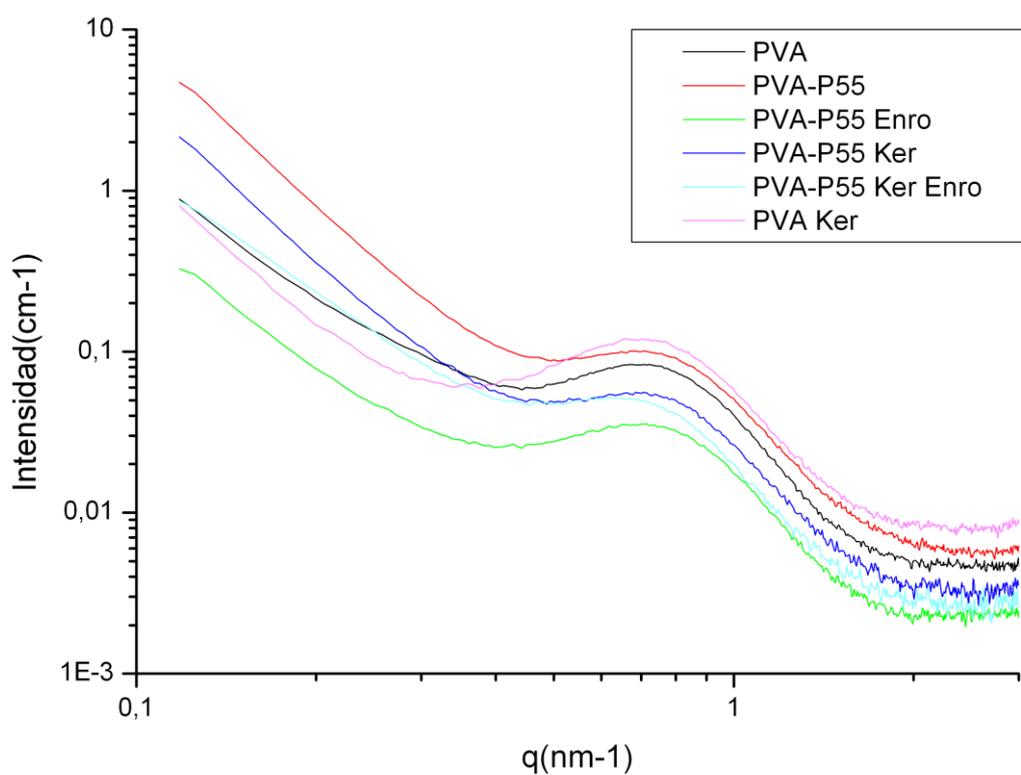
En el **Esquema 1** se muestra como es el espaciado de los cristales de PVA y PVA-P55. Teniendo en cuenta los resultados de DRX y los de SAXS, se concluye que al aumentar la concentración de pectina, cambia el estado del film de PVA desde semicristalino a más amorfo sin embargo, analizando los resultados de SAXS la distancia entre los nanodominios de PVA no cambia al menos en presencia de 0,5 % (p/v) de pectina 55 % metoxilación. Sería interesante variar las concentraciones de pectina desde 0,5 % v/v hasta 1,0 % v/v y observar el patrón de dispersión de SAXS con el fin de observar una relación entre la concentración de pectina y el espaciado de los nanodominios de PVA.

En presencia de la enzima y el antibiótico se observa un aumento en el espaciado de los nanodominios del criogel de PVA-P.

Tabla 6. Valores del vector q obtenidos de los gráficos de SAXS.

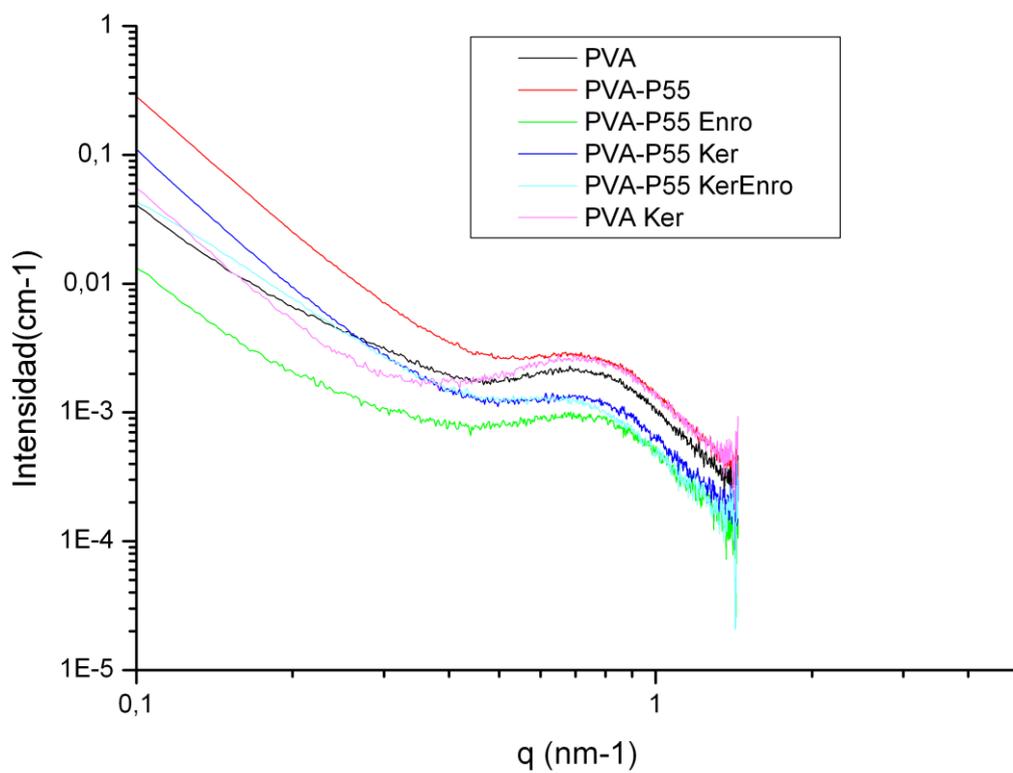
Muestra	q (nm ⁻¹)
PVA	0,70
PVA-P55	0,70
PVA-P55 Enrofloxacina	0,70
PVA-P55 Queratinasa	0,69
PVA-Queratinasa	0,70
PVA-P55 Enrofloxacina Queratinasa	0,64

Figura 11. Resultados de los análisis de las muestras obtenidas mediante SAXS a una distancia de 0,8 m entre el detector y la muestra.



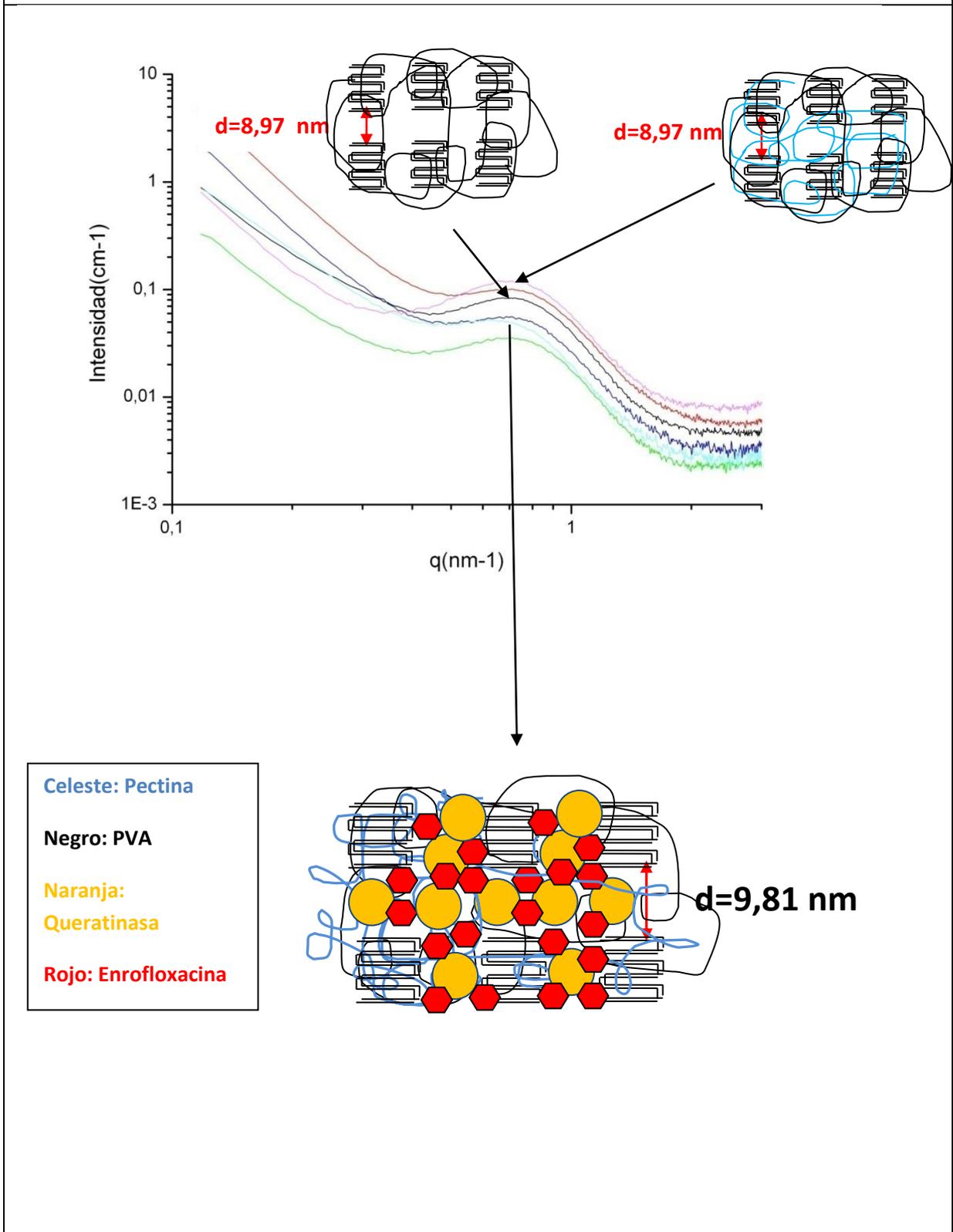
Abreviaturas: Ker, queratinasa; Enro, enrofloxacina.

Figura 12. Resultados de los análisis de las muestras obtenidas mediante SAXS a una distancia de 3 m entre el detector y la muestra



Abreviaturas: Ker, queratinasa; Enro, enrofloxacina

Esquema 1. Se muestran los nanodominios de PVA y PVA-P55



2.3.9 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Figura 13. Calorimetría diferencial de barrido de los criogeles con diferente composición.

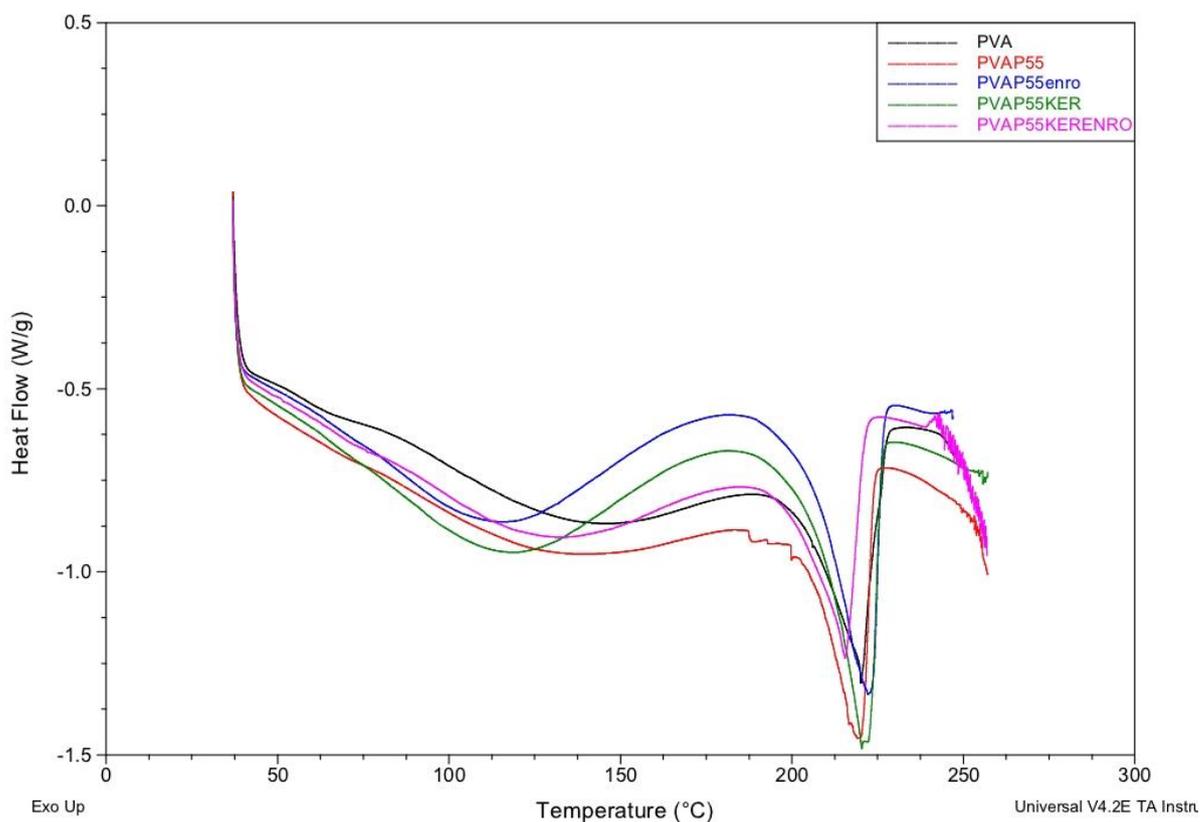


Tabla 7. Valores de ΔH y X_{cr} obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido de las muestras

Muestra	ΔH (J/g)	T_m (°C)	X_{cr} (%)
PVA	54,94	220,10	40,0
PVA-P55 (0,5 % p/v)	60,72	219,94	44,8
PVA-P55 (0,5 % p/v) Enrofloxacina	71,61	222,22	52,45
PVA-P55 (0,5 % p/v) Queratinasa	71,13	220,35	55,48
PVA-P55 Enrofloxacina Queratinasa	48,64	215,50	35,7

El análisis mediante calorimetría diferencial de barrido permite observar como la adición de diferentes componentes de la formulación afecta el porcentaje de cristalinidad de la matriz de PVA. En la tabla 7 se observa como decae el porcentaje de cristalinidad en la matriz de PVA-P55 Queratinasa Enrofloxacina. Este resultado denota la incorporación de ambos componentes en la matriz de PVA-P55 y confirma los resultados obtenidos anteriormente mediante SAXS.

2.4 Conclusiones

En el presente trabajo se ha demostrado que los geles surgidos de las cuatro formulaciones estudiadas presentan un ambiente adecuado para contener a la queratinasa debido a que se retiene el 100 % de la actividad enzimática en las condiciones operacionales ensayadas. Este hecho puede ser atribuido a la estructura porosa e hidrofílica de los biopolímeros.

El sistema desarrollado de PVA permite la modulación de la liberación de la enzima mediante la elección de pectinas con distinto grado de metoxilación y variando su concentración.

La co-inmovilización de una fluoroquinolona, como lo es la enrofloxacina, y la queratinasa en la misma matriz no afecta la actividad enzimática permitiendo así la liberación controlada de ambos componentes.

Finalmente al caracterizar la matriz, se observó que la enzima está incluida dentro de la matriz y que su presencia modifica las propiedades cristalinas de la misma como fuera observado mediante SAXS y DSC.

Con respecto a la interacción de pectina y PVA en la matriz, se ha observado que el aumento de la concentración de pectina 55 % DE es inversamente proporcional al porcentaje de cristalinidad del criogel, tornándose más amorfo cuando la concentración de pectina es incrementada. Esto denota una interacción entre ambos polímeros. Como fuera observado en los ensayos de liberación de queratinasa en presencia de diferentes concentraciones de pectina 55 % DE, al aumentar la concentración de pectina disminuye la liberación de la enzima hacia la solución (figura 3). Relacionando estos resultados con los obtenidos mediante XRD (figura 8) se podría establecer una cinética de liberación de la enzima teniendo en cuenta la cristalinidad del gel y la concentración de pectina en el mismo.

Parte del contenido del presente capítulo se publicó en la revista *Bioresource Technology* 2013; 145: 280-284. **Immobilized keratinase and enrofloxacin loaded on pectin PVA cryogel patches for antimicrobial treatment.**

Martínez YN, Cavello I, Hours R, Cavalitto S, Castro GR.

2.5 Referencias

- Abdel-Mohsen A.M., Aly A.S., Hrdina R., Montaser A.S., Hebeish A. (2011). Eco-synthesis of PVA/chitosan hydrogels for biomedical application. *J. Polymer. Environ.* 19: 1005-1012.
- Anwar A, Saleemuddin M. (1998). Alkaline protease: a review. *Biores. Technol.* 64: 175–183.
- Cavello I, Hours R. (2013). Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. *Proc. Biochem.* 48: 972–978.
- Gupta R., Ramnani P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 21-33.
- Gradisar H. (2005). Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. *Appl Environ Microbiol*, 71: 3420–3426.
- Hong P. (1998) Solvent Effect on Structural Change of Poly(vinyl alcohol) Physical Gels. *J. Appl Pol Sci*, 69: 2477–2486.
- Krieger Y., Bogdanov-Berezovsky A., Gurfinkel R., Silberstein E., Sagi A., Rosenberg L. (2012). Efficacy of enzymatic debridement of deeply burned hands. *Burns* 38: 108-112.
- Liang L. (2010). The crystal structures of two cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi and their contribution to infection against nematodes. *FASEB J.* 24: 1391-1400.
- Manafi A., Hashemlou A., Momeni P., Moghimi H.R. (2008). Enhancing drugs absorption through third-degree burn wound eschar. *Burns* 34: 698-702.
- Mansur H.S, Mansur A. (2007). LNLS activity report.
- Mansur H.S. (2007). Protein Immobilization in PVA Hydrogel: A Synchrotron SAXS and FTIR Study. *Solid State Phenomena* 121-123: 1355-1358
- Najafi M.F., Deobagkar D.N., Mehrvarz M., Deobagkar D.D. (2006). Enzymatic properties of a novel highly active and chealator resistant protease from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 1433-1440.
- Onifade A.A. (1998). A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Biores. Technol.* 66: 1–11.
- Peppas N.A, (1976). Differential scanning calorimetry of crystallized PVA hydrogels, *J. Appl. Polym. Sci.* 20: 1457–1465.
- Plaschina I.G., Braudo E.E.(1978). Circular dichroism studies of pectin solutions. *Carbohydr. Res.* 60: 1–8.

- Ricciardi R. (2004). X-ray Diffraction Analysis of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels, Obtained by Freezing and Thawing Techniques. *Macromolecules* 37: 1921-1927.
- Salavagione H.(2009). Synthesis of poly(vinyl alcohol)/reduced graphite oxide nanocomposites with improved thermal and electrical properties *J. Mater. Chem.* 19: 5027–5032.
- Singh T. (2003).Morphology and conductivity studies of a new solid polymer electrolyte: (PEG)_xLiClO₄ *Bull. Mater. Sci.* 26:707-714
- Shoichiro Y., Iwata K. (1998). Physical properties and structure of organic-inorganic hybrid materials produced by sol-gel process *Mat Sci Eng. C* 6: 75-90.
- Trengove N. (1999).Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep. Reg.* 7: 442–452
- Vernikovskii, B.V., Stepanova, E.F. (2012). Immobilized proteases for wound cleaning. *Russ. J. Gen. Chem.* 82: 572-578.
- Wan A. (2010).Nanomaterials for *in situ* cell delivery and tissue regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev* 62: 731–740.
- Wang, X.Q., Hayes, M.T., Kempf, M., Cuttle, L., Mill, J., Kimble, R.M. (2009).The poor penetration of topical burn agent through burn eschar on a porcine burn model. *Burns* 35: 901-902.
- World Health Organization (2005). World Diabetes Day: too many people are losing lower limbs unnecessarily to diabetes.
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2005/pr61/en/index.html>
- World Health Organization (2008). A WHO plan for burn prevention and care.
<http://www.who.int/violence injury prevention>.
- Zvidzai C.J., Zvauya R. (2001). Purification of protease from an alkalophilic *Bacillus subtilis* CHzI isolated from a Zimbabwean hot spring Zimbabwe, *J. Food Biochem.* 25: 1–13.

Capítulo 3

Estudios en agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA) de queratinasa incluidos en criogeles de PVA y PVA-P

3.1 Introducción

La inmovilización de queratinasa en criogeles de PVA-P prolonga la liberación controlada de la enzima sin perder su actividad catalítica y permite localizar la terapia en las heridas, como fuera descrito en el Capítulo 2. Sin embargo, el desafío es mantener la actividad enzimática en condiciones interfaciales (por ejemplo en la piel), en el microambiente de la herida y además evitar los procesos de autólisis que presentan comúnmente las proteasas (Castro, 1999). Este factor es de gran importancia si se considera el almacenamiento de un parche conteniendo una enzima y un antibiótico.

En una herida, aumenta la presión parcial de dióxido de carbono (pCO_2) debido a que es insoluble en las condiciones de hiperoxia que se genera durante el proceso de cicatrización. Este fenómeno ha sido observado en animales donde se incrementó la pCO_2 en el ambiente hasta un 5 % produciéndose una acidosis respiratoria. El tejido tiende a compensar metabólicamente este efecto generando una alcalosis que reduce la deposición de colágeno (Hunt, 1988) y la activación de proteasas en el lugar de la herida, proceso que fuera descrito en el **Capítulo 2**.

Los Agregados Enzimáticos Entrecruzados (CLEA, por sus siglas en inglés) se presentan como una alternativa para incrementar la estabilidad estructural de una proteína y prolongar la actividad enzimática aún en condiciones extremas de operación. Los CLEAs se pueden producir mediante la precipitación de la enzima y el subsiguiente entrecruzamiento de la misma con un agente químico bifuncional como por ejemplo glutaraldehído. Esta técnica fue desarrollada como alternativa a los cristales enzimáticos entrecruzados que se comercializaban en un primer momento (Cao y col., 2001). La necesidad de obtener una enzima de alta pureza para formar los cristales son procesos de elevado costo debido a los procesos de cultivo celular, producción y purificación. Por otro lado, se ha demostrado que se pueden obtener resultados comparables al precipitar las enzimas presentes en extractos crudos y luego mediante agentes entrecruzantes generar agregados enzimáticos.

La precipitación de las enzimas en solución acuosa mediante el agregado de sales, solventes orgánicos, polímeros no-iónicos o ácidos son técnicas de larga data y ampliamente empleadas en la purificación de proteínas (Hofland y col.,

2000). A su vez, se ha observado una hiperactivación de la actividad enzimática de CLEAs constituidos por lipasas (Lopez-Serrano y col., 2002), y otras enzimas como penicilina acilasa (Van Langeny col., 2002). La obtención de CLEAs se ha extendido a una gran variedad de enzimas como lacasas, fitasas, galactosa oxidasas, tripsina, glucosa oxidasa, β -galactosidasa y alcohol deshidrogenasa. En todos los casos, se mantuvo la actividad catalítica de estas enzimas mostrando que el sistema es versátil en un amplio rango de enzimas y permite su reutilización (Schoevaart y col., 2004).

Entre las propiedades de los solventes orgánicos que pueden ser utilizados se encuentran:

- a. El coeficiente de partición o $\log P$, se define como el cociente de la concentración de un determinado solvente en una mezcla de 1-octanol y agua. Teniendo en cuenta el valor de $\log P$ se puede predecir la solubilidad de cierto solvente en el disolvente. Por ejemplo, mientras menor es $\log P$ de un solvente, mayor es su hidrofiliidad con lo cual será más soluble en agua y poseerá mayor capacidad de reemplazar las moléculas de agua unidas a las moléculas biológicas.
- b. La constante dieléctrica de un solvente (ϵ) se define como la capacidad de una sustancia para aislar cargas entre sí. Tomado como medida la polaridad del disolvente, mayor ϵ significa mayor polaridad, y una mayor capacidad para estabilizar las cargas.

De esta forma, en el caso de los solventes polares, cuyo ϵ es mayor que los solventes no polares, poseen la capacidad de formar puentes de H con las proteínas, reemplazando las moléculas de agua unidas a las proteínas (Affleck, 1992). Se ha demostrado que al variar la ϵ de un solvente, se pueden controlar la quimioselectividad de una enzima obteniendo productos (R o S) (Sakai, 2004).

Objetivos

El presente trabajo plantea el desarrollo de CLEA utilizando el extracto crudo de la queratinasa de *Paecilomyces lilacinus* (LPS#876) mediante la precipitación con acetona y entrecruzado con glutaraldehído. Los CLEA obtenidos se expondrán a condiciones de solventes polares y no polares, temperatura y NaCl. Se estudiará la estabilidad de la enzimática entrecruzada comparada con la enzima libre. De esta manera, se podrá obtener información sobre la estabilidad de la enzima en esas condiciones y luego testear en piel de animales.

3.2 Materiales y métodos

Materiales

Los solventes: isobutanol, etanol y Dimetil Sulfóxido (DMSO) de grado analítico fueron provistos por Biopack (Buenos Aires, Argentina). La acetona y los buffer fueron adquiridos a la compañía Anedra S.A. (Buenos Aires, Argentina). La azocaseína fue provista por Sigma Aldrich, (Buenos Aires, Argentina). Los reactivos restantes empleados en el presente trabajo fueron de grado analítico o similar.

El extracto crudo de queratinasa de *Paecilomyces lilacinus* (cepa LPS #876) fue producido en el CINDEFI por el grupo de investigación del Dr. Cavalitto (Cavello y col., 2013).

Precipitación del extracto enzimático

Un volumen de 500 μ l de extracto crudo de queratinasa conteniendo típicamente 2,0 mg/ml de proteínas, fue precipitado con acetona (500 μ l a 9,5 ml) a 0 °C. El precipitado resultante se centrifugó a 10,000 xg durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se determinó su actividad enzimática. El precipitado fue resuspendido en 500 μ l de solución buffer 100 mM Tris-HCl (pH= 7.4) y posteriormente se ensayó actividad enzimática.

Desarrollo del CLEA

Se agregaron 100 ml de acetona (0 °C) a 10 ml de solución de extracto de queratinasa (2,0 mg/ml de proteínas) con agitación. Luego de 30 minutos, se agregaron 4,36 ml de una solución de glutaraldehído (25 %, v/v) como agente entrecruzante y la mezcla se incubó durante 1 h. Todas las etapas del proceso fueron realizadas en baño de hielo. Finalmente, el CLEA resultante fue lavado 3 veces con 5,0 ml de solución buffer Tris-HCl (100 mM, pH= 7,4) y posteriormente centrifugada a 10,000 xg durante 10 minutos.

Ensayos de actividad enzimática

La actividad enzimática de queratinasa fue determinada mediante la utilización de azocaseína como sustrato, como fue informado en el **Capítulo 2**.

En el caso del CLEA se pesaron 10 mg de CLEA. La actividad enzimática (UE) fue definida como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0,1 unidades de absorbancia a 440 nm por minuto bajo las condiciones experimentales.

Estabilidad enzimática en presencia de solventes

10 mg de CLEA y 3,5 UE de enzima fueron incubados a 37 °C durante 1 h en 900 µl de acetona, etanol y DMSO apropiadamente diluidos para obtener concentraciones correspondientes a 20, 39, 60 y 79 % (v/v) de solventes miscibles con agua.

En el caso de solventes no polares como isobutanol y n-hexano, debido a su insolubilidad en medios acuosos, fueron diluidos en etanol para obtener soluciones miscible con agua de solventes/etanol comprendidas entre 20/80, 41/59, 59/41, y 79/21 % (v/v) respectivamente.

En los experimentos con queratinasa libre se tomaron 100 µl de solución y se le determinó la actividad enzimática luego de 60 minutos de incubación en solventes a 37 °C. En el caso del CLEA, se retiró el sobrenadante, se agregaron 250 µl de sustrato y se midió actividad enzimática. Los experimentos se realizaron por duplicado. El 100 % de actividad fue referido a los valores experimentales resultantes de la incubación de la enzima libre y el CLEA (10 mg) en buffer Tris-HCl (100mM, pH=7,4) a 37 °C.

Estabilidad enzimática a distintas concentraciones de NaCl

10 mg de CLEA y 3,5 UE de enzima fueron incubados a 37 °C durante 1 hora en buffer acetato (50 mM, pH=5,5) en presencia de 250 mM, 750 mM y 1,0 M de NaCl respectivamente.

Luego de la incubación durante 60 minutos en el experimento con la enzima libre se tomaron 100 µl, y se incubaron con el sustrato determinándose la actividad enzimática. En el caso de CLEA, se retiró el sobrenadante, se agregaron 250 µl de sustrato y se midió actividad enzimática. Los experimentos se realizaron por duplicado. El 100 % de actividad fue referido a la incubación de la enzima libre y el CLEA (10 mg) en buffer Tris-HCl (1,0 M, pH=7.4) a 37 °C.

Estabilidad enzimática frente a la temperatura

10 mg de CLEA y 3,5 U.E de queratinasa fueron incubados a las temperaturas 37, 45, 60 y 65 °C por un lapso de una hora.

En otros experimentos y siguiendo el mismo procedimiento las muestras fueron incubadas a 45 °C durante 30 minutos y 1, 2, 3 y 12 horas en buffer acetato (50 mM, pH= 5,5). Luego de transcurrido dicho intervalo de tiempo se procedió a determinar la actividad enzimática como fuera descrito anteriormente.

Inmovilización del extracto enzimático y CLEA en criogeles de PVA y PVA-Pectina y cinética de liberación

100 mg de CLEA y 3,5 UE del extracto crudo fueron incubados con 1,5 ml de PVA al 15 % (p/v) y 1,5 ml de Pectina 55 % DE (0,5 %, p/v; P55). Las soluciones fueron sometidas a 3 ciclos de congelado y descongelado de acuerdo al protocolo establecido en el capítulo 2.

Luego, se pesaron 40 mg de cada muestra y se incubaron en 300 µl de buffer Acetato (50 mM, pH=5,5). A diferentes intervalos de tiempo fueron retirados alícuotas y se ensayó actividad en el sobrenadante. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos de la enzima libre y CLEA fueron

estimados al medir la velocidad inicial de reacción utilizando diferentes concentraciones de azocaseína en el rango de 0,153 a 30 mg/ml en buffer 100 mM Tris-HCl pH 9.0 at 37 °C. Los valores de K_m y V_{max} de la enzima libre y CLEA fueron calculados a través de la regresión no lineal de Hanes-Hultin utilizando la siguiente fórmula

$$\frac{S_0}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{S_0}{V_{max}}$$

En donde S_0 es la concentración inicial de sustrato (tiempo 0); V_0 es la velocidad inicial de reacción; K_m es la constante de Michaelis-Menten de afinidad al sustrato y V_{max} es la velocidad máxima de reacción de la enzima.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los CLEA desarrollados se secaron con flujo de aire y luego se observaron en un microscopio electrónico de barrido (Philips SEM modelo 505, Rochester, EE.UU.).

Estabilidad del CLEA y la enzima libre

100 mg de CLEA y 1.0 ml de enzima libre fueron incubados en buffer Tris-HCl (100mM, pH=7,4) a 37 °C. Alícuotas de 100 μ l de enzima libre fueron retiradas a intervalos de tiempo de 1, 12 y, 24 horas y 2 meses, a los cuales se les determinó actividad enzimática. En el caso del CLEA se pesaron 10 mg en cada experiencia.

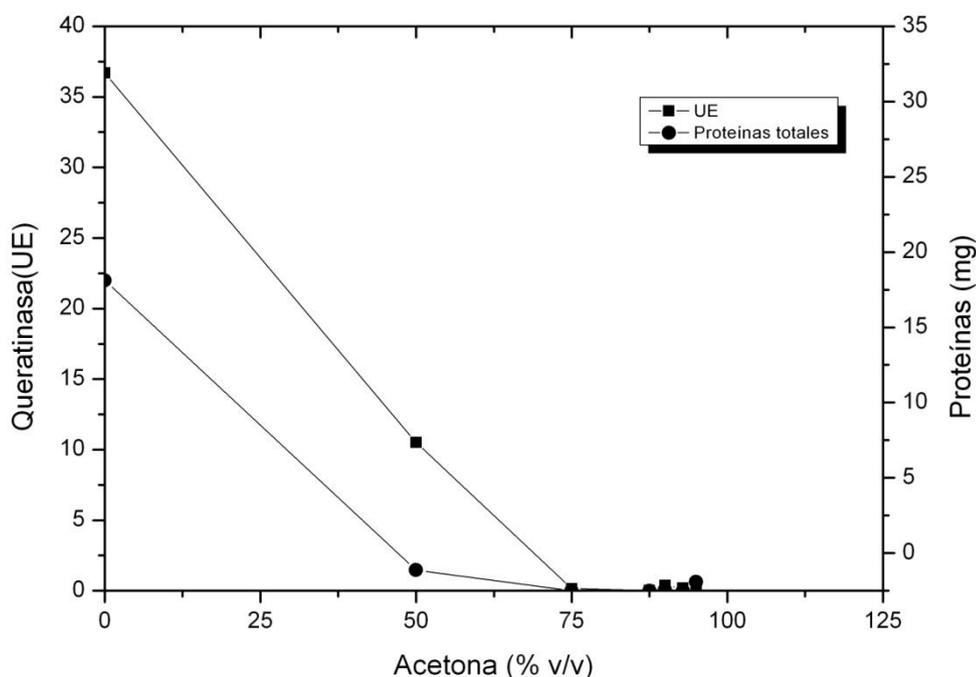
3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Optimización de la operación de agregación enzimática.

La queratinasa con actividad específica de 18,35 UE/mg fue precipitada con concentraciones crecientes de acetona y se obtuvo un 100 % de precipitación con una concentración de acetona de 75 % (v/v) sin pérdida aparente de la actividad enzimática.

En la **Figura 1** está representado el precipitado y el perfil de proteínas de la queratinasa al agregar diferentes concentraciones de acetona. Se observa que a partir de la adición de una concentración de 75 % de acetona se completa la precipitación de la enzima. Sin embargo, se utilizó una concentración final de acetona del 90 % (v/v) con el fin de asegurar la precipitación completa considerando que la actividad enzimática permanece constante aún en elevadas concentraciones de acetona.

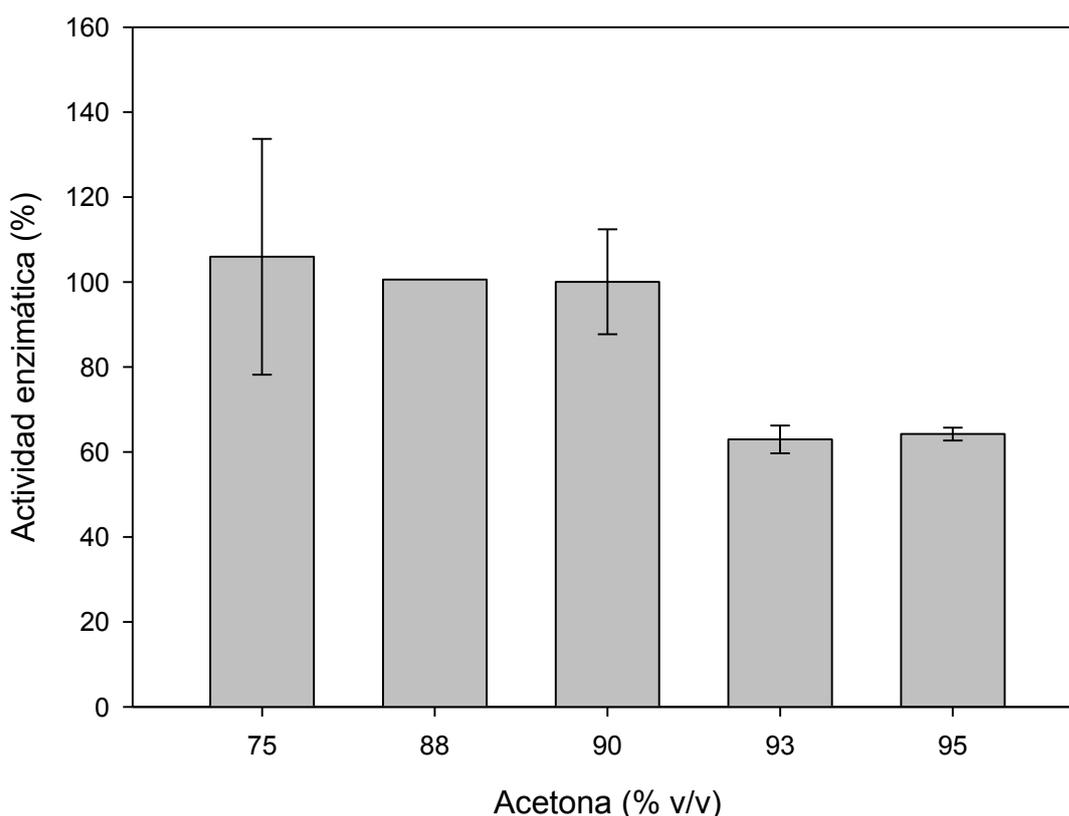
Figura 1. Efecto de la concentración de acetona en la precipitación de queratinasa.



En la **Figura 2** se observa que la presencia del solvente no afecta la actividad enzimática luego de la resuspensión y evaporación del solvente en el

precipitado obteniendo un 100 % de actividad enzimática hasta concentraciones de acetona del 90 % (v/v). Sin embargo se debe notar que la actividad enzimática decae a partir de concentraciones de acetona superiores al 93 % (v/v). Es probable que por encima de un 90 % v/v de acetona, las moléculas de agua esenciales involucradas en la estructura enzimática y la catálisis hayan sido secuestradas por el solvente, rigidificando la estructura enzimática ocasionando cambios irreversibles en la estructura tridimensional de la enzima. Es por ello que la actividad enzimática se ve afectada.

Figura 2. Actividad enzimática de queratinasa recuperada de los precipitados resuspendidos.



Una vez estudiadas las condiciones de precipitación se procedió a desarrollar el CLEA de acuerdo a la técnica descrita en materiales y métodos. La actividad enzimática resultante en el CLEA fue del 15 %. Si bien esto es una

desventaja debido que se pierde un 85 % de actividad enzimática en el proceso de entrecruzado con glutaraldehído, se obtienen otras ventajas como se discutirá posteriormente.

3.3.2 Estabilidad de queratinasa en presencia de solventes, temperatura y concentraciones de NaCl variable.

Se estudió la estabilidad enzimática de la enzima libre (extracto crudo) en distintas concentraciones de solventes polares y no polares. En la **Tabla 1** se describen los solventes utilizados y algunas de sus propiedades fisicoquímicas.

Tabla 1. Propiedades de los solventes empleados en el presente trabajo.

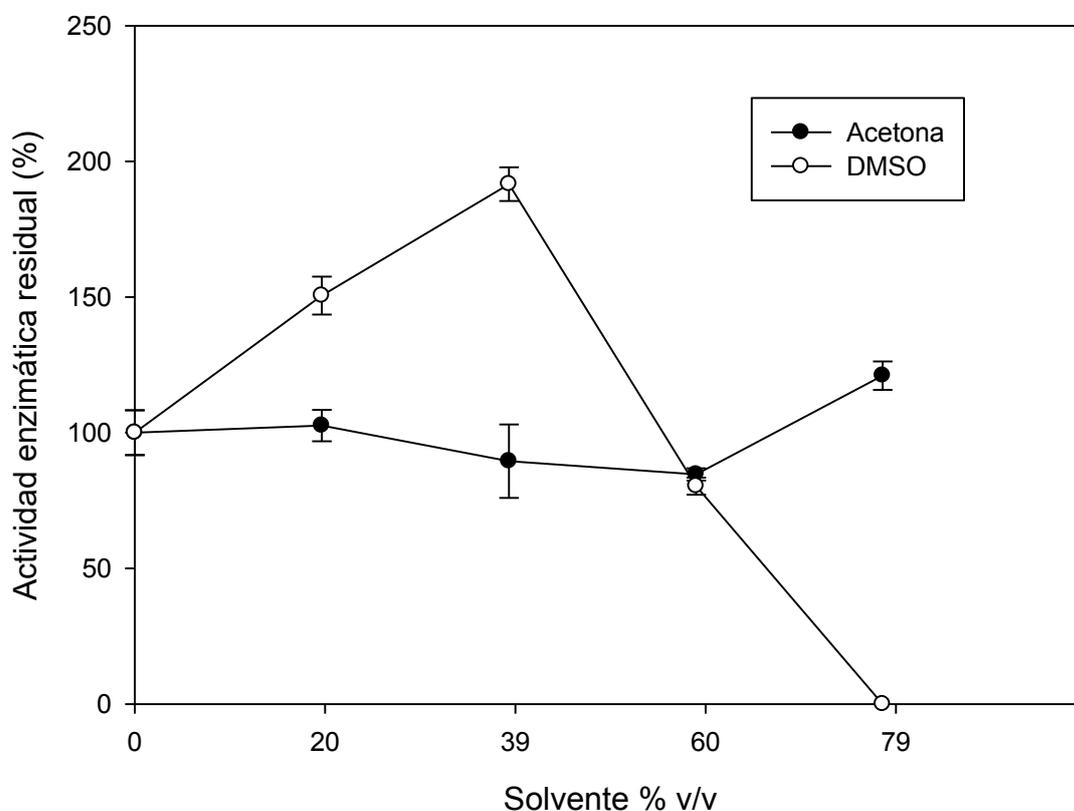
Solvente	Solubilidad en agua (g/l) (25 °C)	Log P	Constante dieléctrica (ϵ)
H ₂ O	-	1,00	80,2
DMSO	miscible	-1,35	47,0
Acetona	miscible	-0,042	21,0
Etanol	miscible	0,07	24,6
Isobutanol	87,0	0,8	16,68
n-hexano	0,0095	3,9	2,0

Los ensayos de estabilidad enzimática en presencia de solventes se realizaron con concentraciones crecientes de solventes con el fin de establecer las concentraciones mínimas que provocan inhibición de la actividad enzimática de queratinasa en solución. Determinadas las concentraciones de solventes mínimas se procedió a estudiar la estabilidad de los CLEAs en presencia de solventes y comparar con la enzima libre.

Como se observa en la **Figura 3**, el extracto crudo de queratinasa se inactiva a elevadas concentraciones de DMSO (79 %, v/v). Esta es una concentración inusual de inactivación enzimática ya que el DMSO es considerado un solvente caotrópico fuerte con lo cual se esperaría una inactivación enzimática a menores concentraciones de solvente (Castro, 2000).

Por otro lado, la queratinasa retuvo el 100 % de actividad en presencia de acetona bajo las mismas condiciones experimentales. Al comparar los valores de ϵ de ambos solventes, el valor de ϵ para el DMSO es 2,2 veces mayor que el de la acetona. En una concentración de 79 %, v/v DMSO es probable que la mayoría de las biomoléculas estén interaccionando con el solvente más que con el agua. De esta forma el DMSO adquiere una mayor tendencia que la acetona a interaccionar con las cargas residuales de la enzima, estableciendo interacciones más fuertes con la enzima rigidificando su estructura (**Figura 3**).

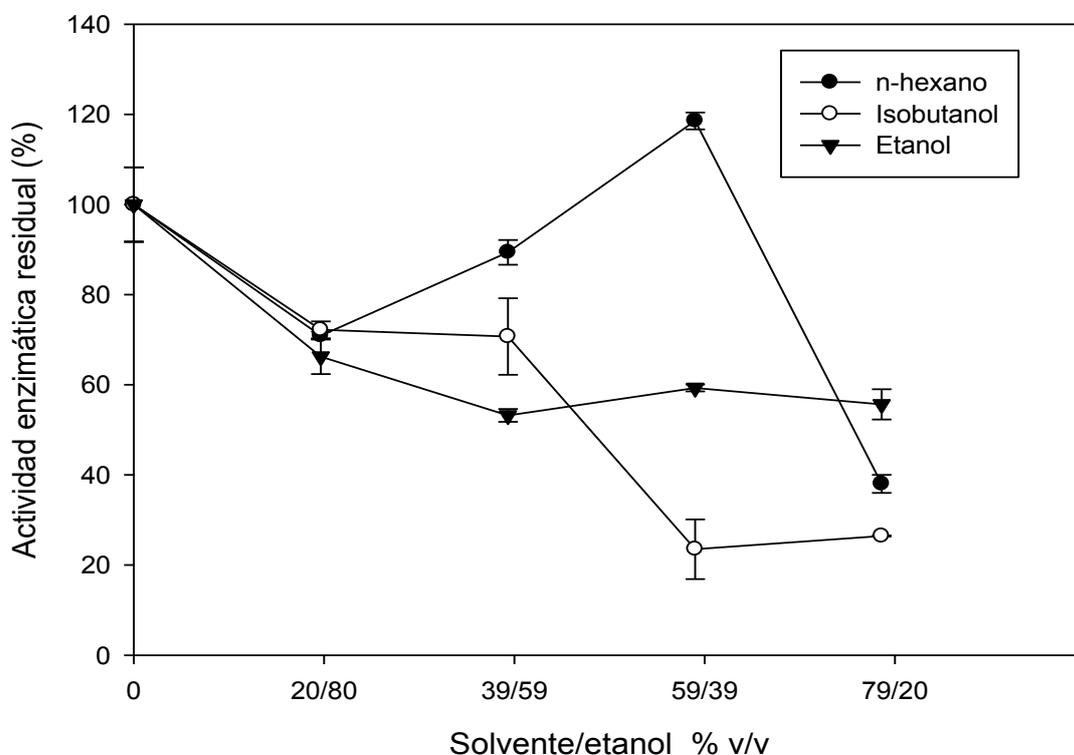
Figura 3. Actividad de queratinasa soluble frente a distintas concentraciones de solventes polares.



Sin embargo, en presencia de solventes no-polares no se observa una pérdida total de actividad en los tres solventes ensayados (79 %, v/v) (**Figura 4**). En este caso, las zonas hidrofóbicas de la enzima estarían interactuando con los solventes no polares mientras que el sitio activo de la enzima, de carácter polar ya que es una serin proteasa, no se vería afectado. Similares resultados se han descritos en diversas proteasas incubadas en solventes (Castro y Knubovets, 2003; Rahmany col., 2006).

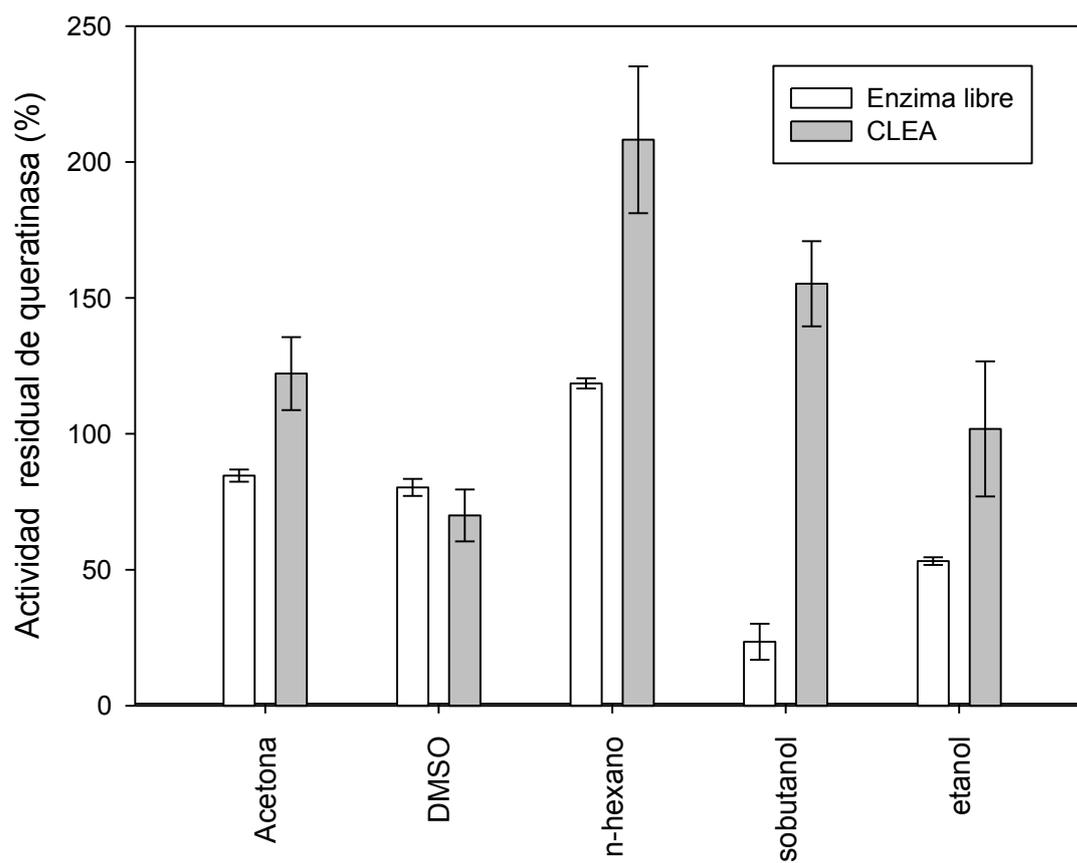
Debido a la escasa solubilidad de los solventes no polares, isobutanol y n-hexano, en medios acuosos y con el objeto de evitar problemas interfaciales se realizaron los experimentos solubilizando estos solventes primero en etanol, y posteriormente adicionándolos a las soluciones acuosas (**Figura 4**). El etanol en este caso se considera como control de actividad enzimática.

Figura 4. Actividad de queratinasa soluble frente a distintas concentraciones de solventes no polares disueltos en etanol



A continuación se estudió la estabilidad de queratinasa libre y en CLEA en 59 % (v/v) de solventes luego de una hora de incubación (**Figura 5**).

Figura 5. Actividad de queratinasa libre y en CLEA en presencia de 59 % de solventes.



Es interesante notar que la actividad de queratinasa es en general mayor en solventes polares que no polares o sea en solventes con log P negativos y constantes dieléctricas elevadas (**Tabla 1**).

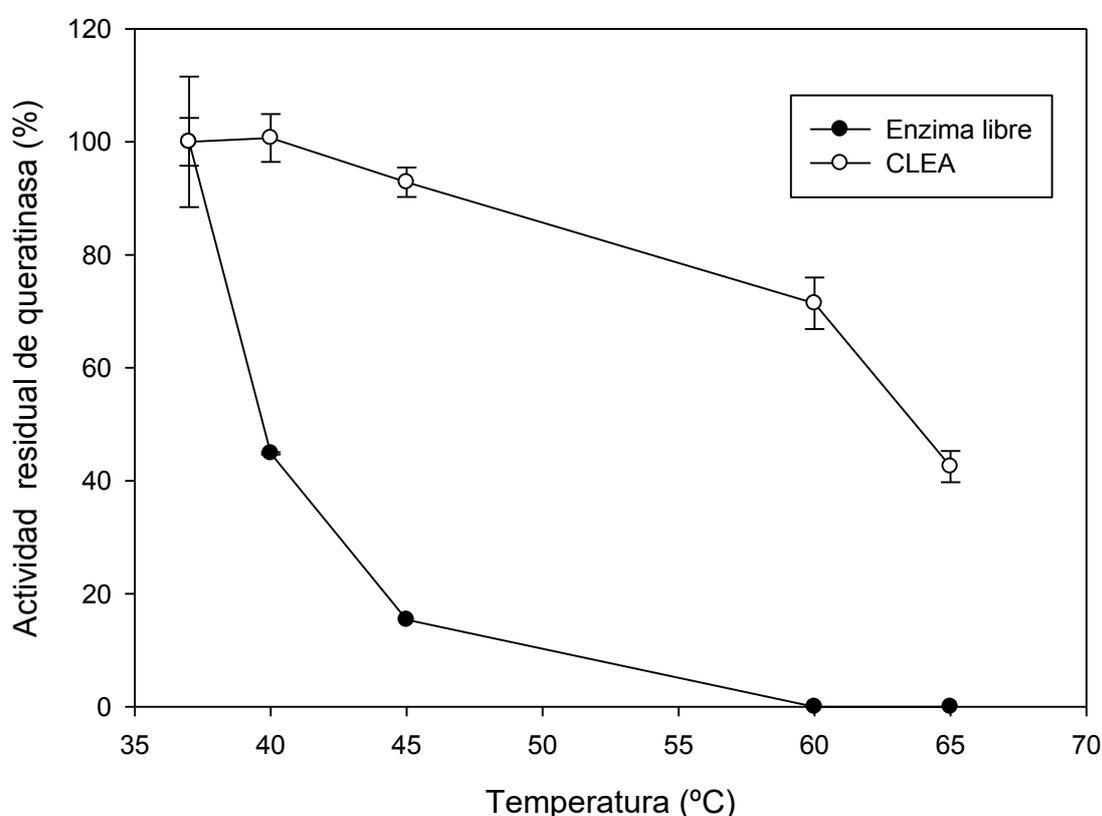
En la **figura 5** se observa que la actividad del CLEA en presencia de acetona, n-hexano e isobutanol es 1,4, 1,73 y 6,6 veces mayor que la enzima libre luego de 1 hora de incubación en una solución de 59/41 solventes-agua testeados. Encontrándose diferencias significativas entre los solventes mencionados ($p \leq 0,05$).

El efecto protector del CLEA se debe al entrecruzamiento del agregado enzimático el cual evita la desestabilización de la estructura terciaria de la

enzima en presencia de solventes. Esta tendencia también se observó en CLEAs de otra hidrolasa, la subtilisina, cuya actividad residual en presencia de solventes orgánicos fue del 80 % (Sangeetha y col, 2008).

Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a determinar la estabilidad de la enzima libre a distintas temperaturas y se comparó con el CLEA.

Figura 6. Estabilidad térmica de queratinasa libre y en CLEA incubadas durante una hora.

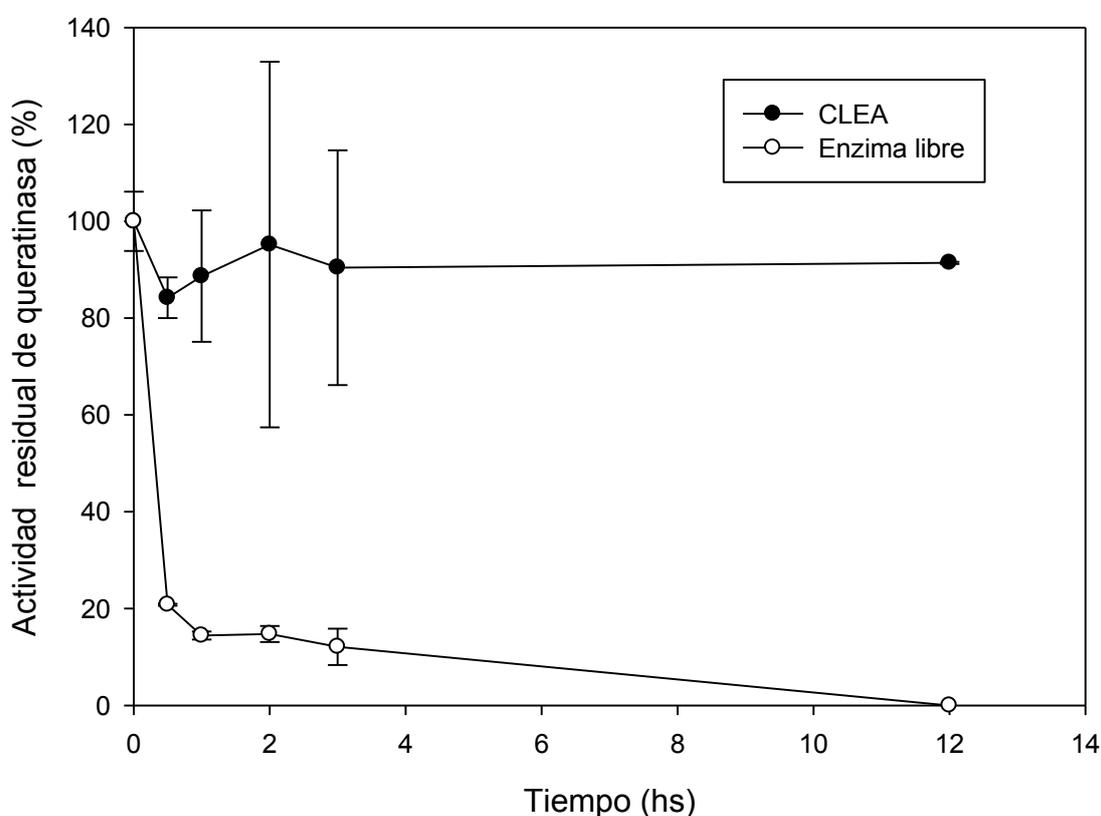


En la **figura 6** se observa la inactivación de aproximadamente el 80 % de la queratinasa libre a 45 °C, sin embargo a la misma temperatura se mantiene el 100 % de actividad enzimática del CLEA. A 60 °C la inactivación de la enzima libre es completa, sin embargo el CLEA mantiene el 72 % de la actividad enzimática luego de 1 hora de incubación. El efecto protector del CLEA frente a las altas temperaturas en comparación con la enzima libre es evidenciado a 65

°C donde la queratinasa libre está completamente inactivada pero por el contrario el CLEA mantiene el 42,5 % de la actividad enzimática.

De acuerdo a los resultados anteriores se procedió a estudiar la estabilidad de la queratinasa en CLEA y la enzima libre incubando a 45 °C. Como se aprecia en la **Figura 7**, luego de 12 horas el CLEA mantiene el 91% de la actividad enzimática. Sin embargo, la enzima libre queda completamente inactivada luego de 12 horas de incubación a 45 °C.

Figura 7. Estabilidad de la queratinasa soluble y en CLEA a 45 °C



Mediante tratamiento estadístico se determinó que no existen diferencias significativas entre los diferentes tiempos de incubación de la queratinasa en CLEA ($p \geq 0.05$).

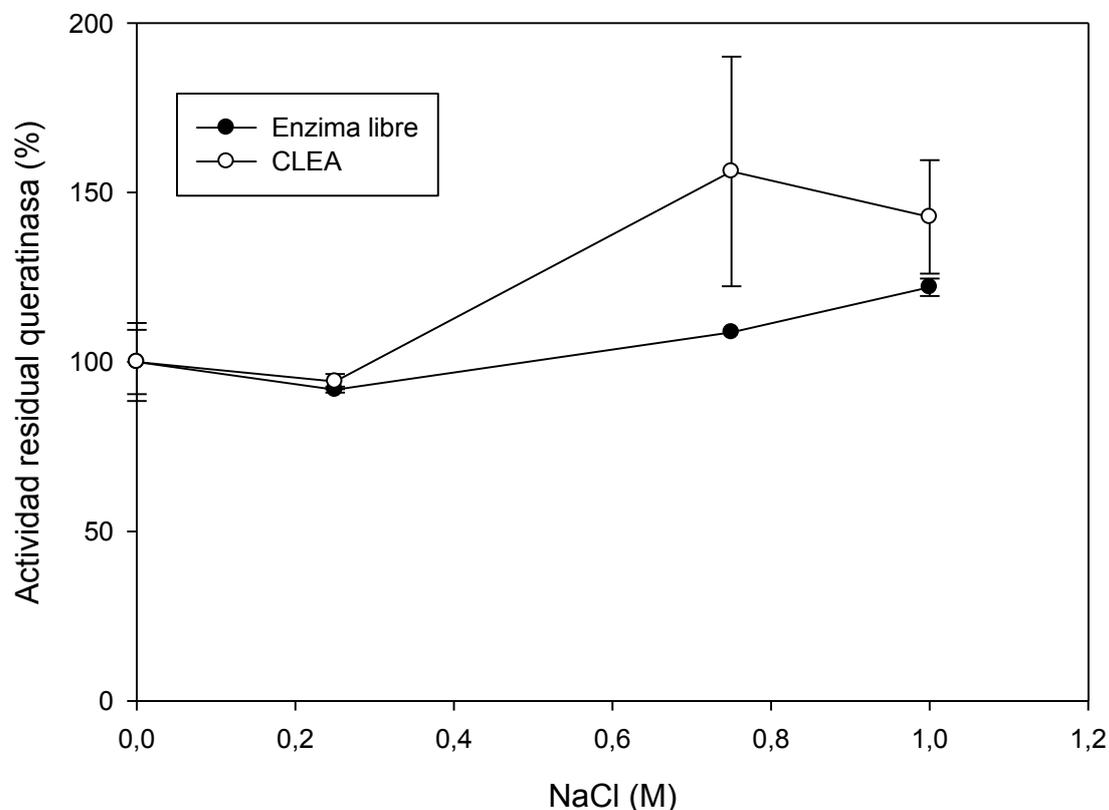
El efecto de iones en los procesos biocatalíticos es considerable, debido a que se ha informado la activación de enzimas en presencia de sales previo a la liofilización de la solución enzimática. Este fenómeno está relacionado a

posibles efectos de coordinación de la molécula de agua con la enzima, lo cual permite una mayor flexibilidad estructural y una mayor velocidad de catálisis enzimática (Halling, 2004).

Los iones cosmotrópicos son en general aquellos con una alta densidad de carga y en consecuencia poseen la capacidad de estructurar las moléculas de agua en su entorno. Estos iones son $\text{CH}_3\text{COO}^{1-}$, SO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Li^{1+} , Na^{1+} , H^{1+} y OH^{1-} entre otros. Los iones cosmotrópicos poseen una mayor interacción por las moléculas de agua que las moléculas de agua con ellas mismas con lo cual los iones cosmotrópicos son capaces de romper las uniones puentes de H entre las moléculas de agua. La entropía del sistema resultante es menor que la del sistema conteniendo agua pura debido a que las moléculas de agua están mejor organizadas alrededor de los iones (Zhao, 2006).

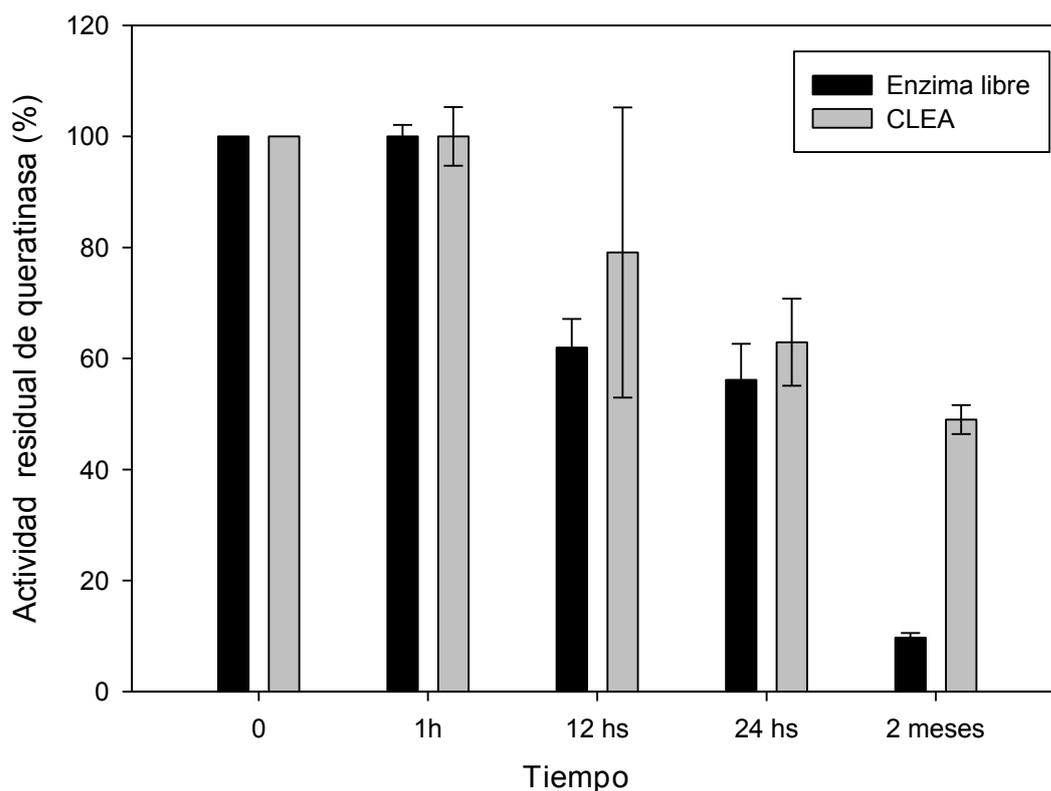
En la **figura 8** se observa que tanto la enzima libre como el CLEA se activan en presencia de concentraciones crecientes de NaCl.

Figura 8. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de queratinasa.



El almacenamiento de las enzimas en solución acuosa provee desventajas debido a que las enzimas pueden presentar procesos de autólisis como en el caso de algunas hidrolasas, disminuyendo su capacidad catalítica (Bickerstaff y col., 1993; Castro, 1999). Por lo tanto, se estudió la estabilidad de la queratinasa libre y en CLEA a temperatura ambiente durante diversos intervalos de tiempo comprendidos entre 1, 12, y 24 horas, y 2 meses en solución buffer. En la **figura 9** se plasmaron los resultados de dicho experimento y se observa que si bien la queratinasa libre no presenta un alto grado de autólisis en 24 horas, a los dos meses se aprecia un decaimiento sustantivo en la actividad enzimática del 90 %.

Figura 9. Estabilidad de queratinasa libre y el CLEA en función del tiempo.



Por otro lado, el CLEA mantiene el 51 % de la actividad enzimática luego de dos meses de incubación bajo las mismas condiciones experimentales.

El tratamiento estadístico permitió determinar que no existen diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los valores de las muestras de CLEA hasta las 24

horas de incubación. Sin embargo, si existen diferencias significativas entre las 24 horas y los 2 meses de incubación ($p \leq 0,05$). Entre las muestras de enzima libre y enzima en CLEA se estableció que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) a los dos meses de incubación en buffer.

Estos resultados experimentales permiten demostrar el efecto protector que posee el entrecruzamiento de los agregados enzimáticos frente a condiciones extremas de operación como son solventes no polares, altas temperaturas y largos periodos de tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente.

3.3.3 Parámetros cinéticos de la enzima libre y CLEA

Como se observa en la **Tabla 2** existe una diferencia apreciable en el valor de K_m y V_{max} entre la enzima soluble y el CLEA. Estas diferencias se deben a la menor afinidad por el sustrato que posee el CLEA ya que el valor de K_m es 2 veces mayor que el valor de K_m de la enzima libre. La rigidificación de la enzima en el CLEA y las restricciones difusionales son posibles razones de esta tendencia.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la enzima libre y CLEA.

Queratinasa	V_{max} (UE)	K_m (mg/ml)
Soluble	62.5	2.43
CLEA	50.0	5.50

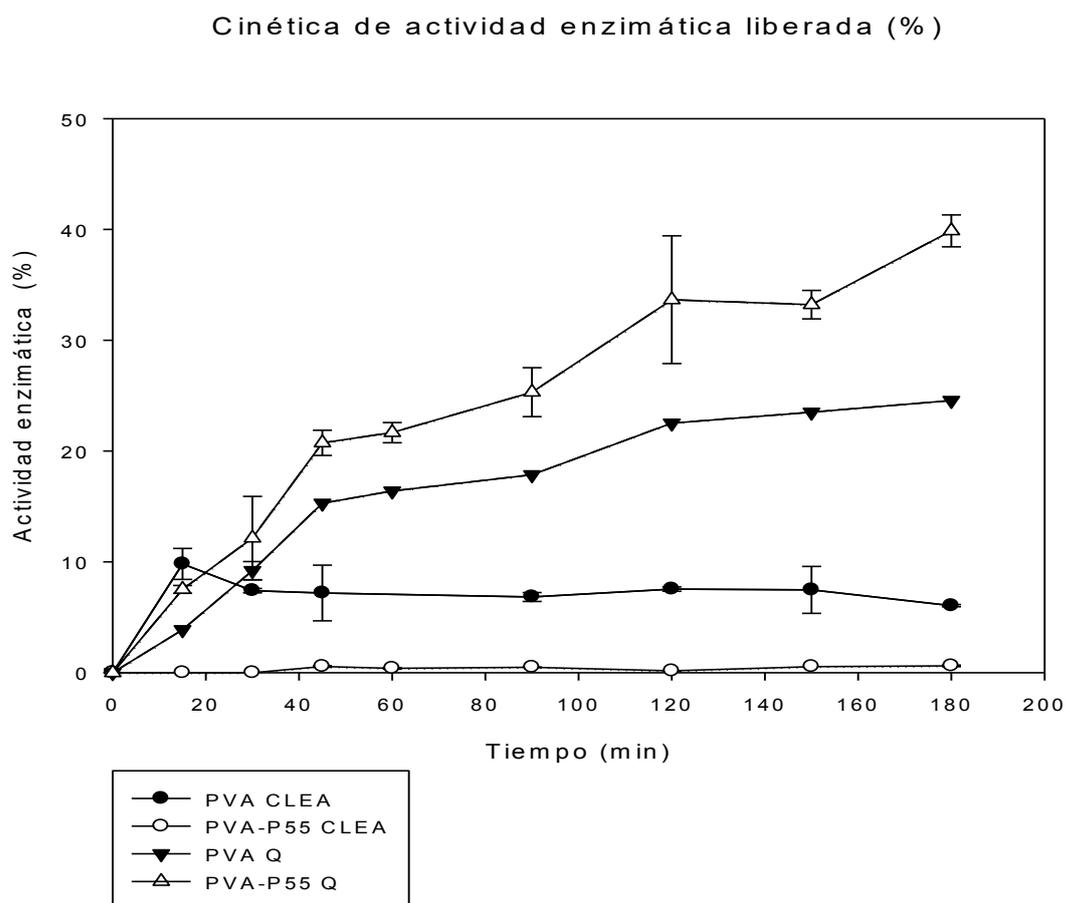
3.3.4 Inmovilización del extracto enzimático y CLEA en criogeles de PVA y PVA Pectina y cinética de liberación

Se procedió a desarrollar estudios de inmovilización de la queratinasa libre y CLEA en criogeles de PVA y PVA-P 55 con el objeto de realizar estudios de liberación.

La presencia de pectina en los criogeles de PVA retarda la liberación de la queratinasa en forma de CLEA. Al inmovilizar el CLEA en criogeles de PVA-P la cinética de liberación disminuye 6 veces en comparación con la cinética en los criogeles de PVA (figura 10). Así, al inmovilizar el CLEA en criogeles de PVA-

P55 se observa una retención casi del 100 % del agregado enzimático en el criogel durante 3 horas de incubación.

Figura 10. Cinética de liberación de queratinasa libre y en CLEA de películas de criogel de PVA y pectina (55 % DE)



Abreviaturas: P55, pectina 55 % DE; Q,: extracto crudo de queratinasa.

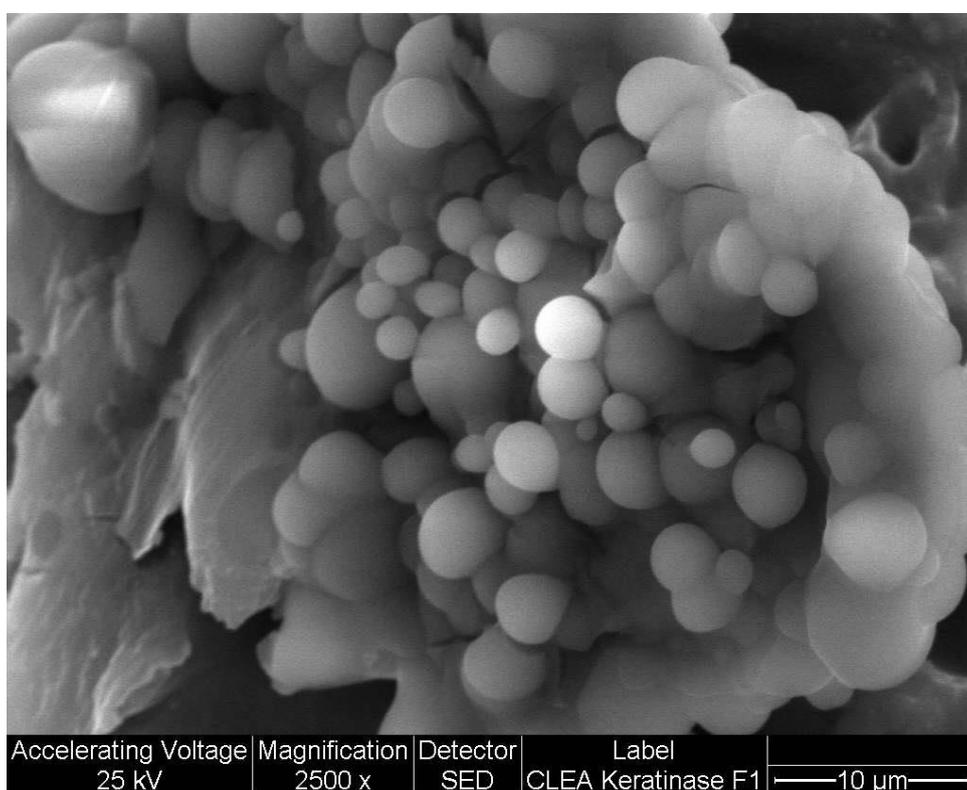
Además, la liberación de los CLEA en PVA y PVA-P es significativamente menor que en los sistemas en donde la queratinasa soluble se encuentra inmovilizada. Este efecto podría deberse al tamaño de los CLEA, que son significativamente mayores que el tamaño que posee la queratinasa (37,0 kDa, Cavello y col. 2013 aproximadamente 8,7 nm) con lo cual es esperable que los agregados enzimáticos entrecruzados queden retenidos en el entramado polimérico, retardando la cinética de liberación.

3.3.5 Caracterización del CLEA

3.3.6 Microscopía electrónica de barrido

Los CLEA de la queratinasa fueron analizados mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 11). Se analizó el tamaño de partículas y se determinaron al menos dos distribuciones de diámetro promedio $d = 3,15 \pm 0,25$ y $d = 2,13 \pm 0,24$.

Figura 11. Microscopía electrónica de la queratinasa en CLEA precipitado con acetona.

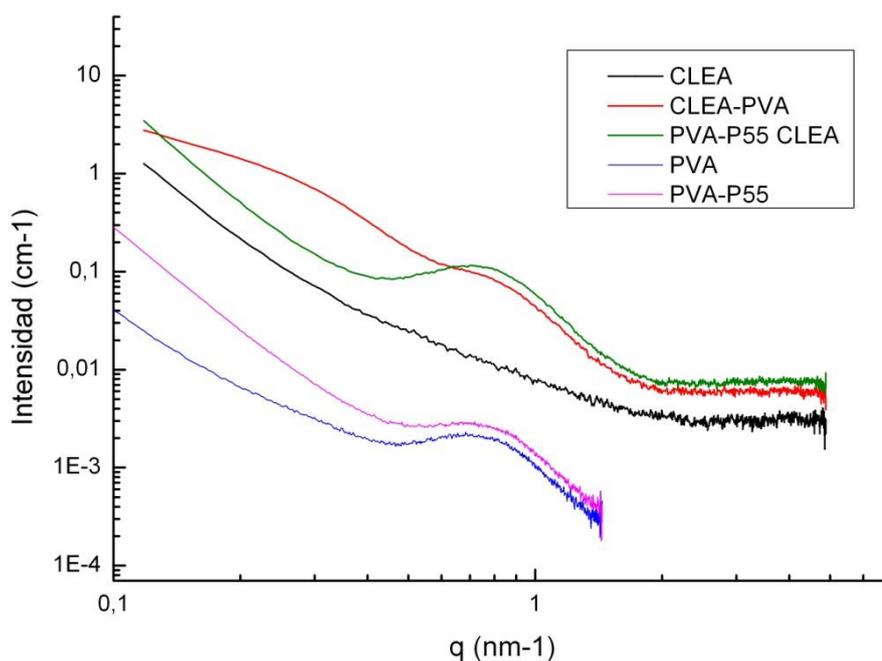


3.3.7 Dispersión de rayos x a bajo ángulo (SAXS)

Finalmente, se obtuvo el patrón de difracción de Rayos X de bajo ángulo de las muestras con el objetivo de observar la incorporación del CLEA en los criogel. En la **figura 12**, se observa la naturaleza amorfa del CLEA y como su incorporación afecta la semi-cristalinidad del criogel de PVA debido a que la intensidad del vector q_{max} disminuye formándose un “hombro” a valores de q inferiores. Es interesante destacar que en presencia de pectina en el criogel de PVA, la cristalinidad del criogel no se ve afectada debido a que los valores de

q_{max} son iguales para ambas muestras PVA-P55 y PVA-P55 CLEA $q_{max}=0,7$. Como fue observado en la figura 10, la pectina se une preferentemente a los agregados enzimáticos entrecruzados, permitiendo de esta forma la interacción intermolecular de las cadenas de PVA.

Figura 12. Difracción de rayos X a bajo ángulo



3.4 Conclusiones

En el presente trabajo se observó que el desarrollo de CLEA posee ventajas sobre el empleo de la queratinasa libre debido a que mejora la catálisis frente a solventes no polares, T, fuerza iónica y almacenamiento en el tiempo. El procedimiento desarrollado para la obtención de CLEA es simple, reproducible y escalable.

Se observó además la posible ubicación de los agregados de queratinasa los cuales interactúan preferente con la pectina y no entre las cadenas poliméricas de PVA y pectina.

La inmovilización del CLEA en los criogeles desarrollados retarda la liberación en comparación con la inmovilización del extracto crudo en los criogeles de PVA y PVA-P.

Mediante la combinación de queratinasa libre y CLEAs, así como el contenido de pectina en el film de PVA se puede regular las actividades enzimáticas liberadas de los criogeles.

Parte del contenido del actual capítulo fue enviado para su publicación, noviembre 2013, bajo el título: **Studies on PVA Pectin cryogels containing crosslinked enzyme aggregates of keratinase**. Martínez N.Y., Cavello I., Cavalitto S., Illanes A., Castro G.R.

3.5 Referencias

- Affleck R. (1992). Solvent dielectric effects on protein dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA .89: 5167-5170.
- Bickerstaff G.F. (1999). Protease activity and autodigestion (autolysis) assays using Coomassie blue dye binding. Anal. Biochem. 210: 155-158.
- Cao L.Q., van Langen L.M., van Rantwijk F., Sheldon R.A. (2001). Cross-linked aggregates of Penicillin acylase: Robust catalysts for the synthesis of h-lactam antibiotics. J. Mol. Cat. B:Enzym. 11: 665-670.
- Castro G.R. (2000). Properties of soluble α -chymotrypsin in neat glycerol and water. Enzyme Microbial. Technol. 27: 143-150.
- Castro G.R., Knubovets T. (2003). Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. Crit. Rev. Biotechnol. 23: 195-231.
- Cavello I., Hours H., Rojas N., Cavalitto S. (2013). Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. Process Biochem. 48:972-978
- Halling P. (2004). What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media? Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 359: 1287–1297
- Hunt T.K. (1988). The physiology of wound healing. Ann. Emer. Med. 17:1265-1273
- Lopez-Serrano P., Cao L., van Rantwijk F., Sheldon R.A. (2002). Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases. Biotechnol. Lett. 24:1379–1383.
- Rahman R.A. (2006). An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization. Enzyme Microb. Technol. 39: 1484–1491.
- Sakai K. (2004) Chiral discrimination controlled by the solvent dielectric constant. Tetrahedron: Asymmetry. 15: 1073–1076.
- Sangeetha K. (2008). Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications. Int. J. Biomacromol. 43: 314–319.
- Schoevaart R. (2004). Preparation, Optimization, and Structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). Biotechnol. Bioeng. 87: 754-762.
- Van Langen L.M., Janssen M.H.A., Oosthoek N.H.P., Pereira S.R.M., Svedas V.K., van Rantwijk F., Sheldon R.A. (2002). Active site titration as a tool for the evaluation of immobilization procedures of penicillin acylase. Biotechnol. Bioeng. 79: 224–228.
- Zhao H. (2006). Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. Bioorg. Chem. 34: 15–25.

Conclusiones generales

Es interesante destacar que la síntesis de películas compuestas de PVA obtenidas mediante ciclos de congelado y descongelado a temperatura ambiente es una técnica escalable y podría ser considerada como una metodología de Química Verde debido a que no existen intermediarios químicos durante su síntesis y el producto residual es agua, y por lo tanto una técnica sustentable. Además estas películas no son inmunogénicas y son biocompatibles por lo que presentan un gran potencial de aplicación en el área biomédica.

En particular, en el presente trabajo de Tesis, se estudiaron las películas de PVA como potenciales matrices o vehículos capaces de contener un antibiótico y con la posibilidad de que el sistema fuera aplicado en el lugar de la herida o daño tisular con el fin de combatir la infección allí radicada mediante una liberación sostenida del antibiótico. A tales efectos, primeramente se analizó la liberación controlada de un colorante como el cristal violeta con el objeto de optimizar los ciclos de congelado y descongelado, obteniéndose ciclos 20 horas de congelado y 8 horas de descongelado, los cuales presentaban desviaciones estándar menor al 10 %. Este hecho ha permitido establecer que el Cristal Violeta es un buen indicador para el seguimiento de las propiedades de las películas de PVA.

Posteriormente, se estudió la cinética de liberación de enrofloxacin atrapada en la matriz de PVA y fue observada una rápida cinética de liberación del antibiótico desde la matriz. Razón por la cual se procedió al estudio de interacción de biopolímeros con enrofloxacin. Los mejores resultados se obtuvieron con pectinas de alto metoxilo. Se confirmó además que la interacción de la enrofloxacin y la pectina HM es a través de los grupos polares y no polares del antibiótico.

Mediante análisis de FTIR de la enrofloxacin y la matriz de PVA-P HM se corroboró el corrimiento hacia el rojo en los grupos polares del antibiótico, carboxilo y amina. Sin embargo, los grupos hidrofóbicos de la molécula fueron desplazados mediante un corrimiento hacia el azul indicando la ausencia de interacción entre el antibiótico y la matriz de PVA-P. Es posible que el rearreglo

de las cadenas poliméricas dentro de la matriz de PVA no permitan que las zonas hidrofóbicas de la pectina interactúen con la enrofloxacin.

Por otro lado, el sistema de doble capa es otra técnica desarrollada para modular la liberación de enrofloxacin sola y/o en conjunto con la presencia de pectina en la matriz. A los fines prácticos y pensando al sistema con posibles aplicaciones biomédicas se podría reemplazar el NaCl por otra sal.

Por lo que se puede concluir que las películas de PVA presentan una gran versatilidad, siendo posible alterar la cinética de liberación al modificar los componentes del mismo, como lo son la concentración de HM pectina y NaCl.

Con respecto a la matriz, la presencia de pectina afecta la rugosidad en la superficie y en el interior de los criogel motivo por el cual la liberación de enrofloxacin también se ve afectada en presencia de este biopolímero. Esto se observa en las imágenes SEM, donde al aumentar los ciclos de C/D se pudo observar como la pectina va recubriendo la superficie del criogel.

El sistema compuesto por PVA-HMP-enrofloxacin fue caracterizado mediante el análisis de DSC. La T_m de la película de PVA no se ve afectada en presencia de HMP y el valor del vector de q_{max} tampoco se modifica al analizar los espectros de SAXS en presencia de HMP ni de enrofloxacin.

De esta forma, a través de lo expuesto en el capítulo uno, al obtener una liberación prolongada en el tiempo de la enrofloxacin en matrices de PVA-PHM se propone al sistema simple y de bajo costo para ser utilizado en el lugar de la infección en forma de *parche*.

En el capítulo dos, se explica la problemática en la difusión de los agentes bactericidas a través de la piel injuriada la cual está compuesta por tejido necrótico. Tal es el caso del pie diabético, las quemaduras de piel y las escaras. Se propuso entonces la incorporación de una queratinasa, enzima capaz de hidrolizar proteínas presentes en la piel tales como keratina, elastina y colágeno. De esta forma la enzima sería la responsable de remover el tejido necrótico permitiendo una difusión más eficiente del antibiótico en el lugar de la herida.

Se observó primeramente que la queratinasa seleccionada es capaz de hidrolizar colágeno, elastina, albúmina de suero bovino y queratina entre otros

sustratos. Luego se estudió el efecto en el grado de metoxilación de las pectinas en la liberación de la queratinasa en películas de PVA-P. Se confirmó que las diferencias en las cinéticas de liberación entre las diferentes pectinas se deben a interacciones iónicas e hidrofóbicas establecidas entre la matriz y la enzima. Además se estableció una relación entre el efecto en la concentración de pectina 55 (55 % de metoxilación) y la liberación de la enzima. Es interesante destacar que la enzima retiene el 100 % de actividad luego de los ciclos de congelado y descongelado necesarios para obtener las películas de PVA-P. Además, en presencia de la enzima, el antibiótico mantiene sus propiedades antibacterianas.

Al caracterizar la matriz mediante difracción de rayos X, se observó una relación entre el porcentaje de cristalinidad de la matriz y el agregado de distintas concentraciones de P 55. Estos resultados sugieren una interacción entre ambos polímeros. A través de la dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS) se estableció que ambos la enzima y el antibiótico son atrapados entre los cristales de PVA, debido a que en presencia de éstos se observó una pequeña diferencia en la distancia de los nanodominios de PVA-P de 1nm.

De esta forma, se propone al sistema como una alternativa a los métodos convencionales de desbridamiento, en los cuáles la cirugía del tejido necrótico es la opción comúnmente utilizada.

En el capítulo 3 se plantea la problemática de las condiciones hostiles a las que se enfrenta la keratinasa en una herida, a saber alcalosis, condiciones interfaciales y temperatura. Además la estabilidad enzimática es un desafío a la hora de pensar en el almacenamiento dado que los procesos de autólisis son frecuentes en proteasas. Se planteó entonces el desarrollo de un sistema enzimático agregado y entrecruzado (CLEA por sus siglas en Inglés) con el fin de intentar resolver algunas o todas, en el mejor de los casos, las problemáticas enunciadas anteriormente. La obtención de CLEAs es una técnica sencilla, escalable y ampliamente utilizada en gran variedad de enzimas.

En esta última parte del trabajo de tesis se observó que el desarrollo de CLEA posee ventajas sobre el empleo de la queratinasa libre debido a que mejora la

estabilidad frente a solventes no polares, temperatura, fuerza iónica y almacenamiento en el tiempo.

Se observó además la posible ubicación de los agregados de queratinasa los cuales interactúan preferente con la pectina y no entre las cadenas poliméricas de PVA y pectina.

La inmovilización del CLEA en los criogeles desarrollados retarda la liberación en comparación con la inmovilización del extracto crudo en los criogeles de PVA y PVA-P.

Mediante la combinación de queratinasa libre y CLEAs, así como el contenido de pectina en el film de PVA se puede regular las actividades enzimáticas liberadas de los criogeles.

Concluyendo, en el presente trabajo de Tesis se lograron los siguientes objetivos:

- Se logró una cinética de liberación prolongada de la enrofloxacin contenida en criogeles de PVA-Pectina.
- Se utilizó una matriz que preserva el 100 % de actividad de la enzima soluble aun sometiendo el sistema a ciclos de congelado y descongelado.
- La cinética de liberación de la enzima puede ser regulada de acuerdo al porcentaje de metoxilación de las pectinas.
- Como alternativa a la enzima soluble, se planteó un sistema de agregados enzimáticos entrecruzados con el fin de otorgarle al sistema mayor robustez y estabilidad bajo condiciones no óptimas de la enzima soluble.
- El sistema posee potenciales aplicaciones biomédicas debido a que
 - los polímeros seleccionados son biocompatibles y no inmunogénicos
 - El antibiótico y la enzima albergados en la matriz mantienen sus propiedades antibióticas y catalíticas, respectivamente

- El sistema ha sido caracterizado en detalle, observándose interacción y ubicación entre los componentes de la matriz y las moléculas inmovilizadas en la misma.

Por último se debe mencionar que los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis se encuentran aprobados para su patentamiento por el CONICET bajo el título: Forma transdérmica de liberación controlada para el tratamiento de lesiones de la piel, autores: Castro Guillermo R, Martínez N. Yanina , Cavello Ivana y Cabalitto Sebastián (2013).

Perspectivas

Las perspectivas del sistema basado en PVA y Pectinas desarrollado en el presente trabajo de Tesis son amplias y bienaventuradas por varias razones:

- Es un sistema “todo en uno” donde en la misma matriz co-existen la enzima y el antibiótico manteniendo sus propiedades catalíticas y antimicrobianas, respectivamente. Este tipo de sistema no se encuentra actualmente en el mercado para ser utilizado en el tratamiento de infecciones de la piel.
- Es un sistema versátil, en el cual podría estudiarse la inmovilización de otras quinolonas y otras enzimas que presenten problemas de estabilidad frente a condiciones agresivas de pH, temperatura, fuerza iónica y almacenamiento.
- La presencia de pectinas con distinto grado de metoxilación ofrece la posibilidad de interactuar con moléculas hidrofóbicas o más bien hidrofílicas, hecho que ofrece al sistema una variedad de moléculas a ser inmovilizadas dentro de la matriz de PVA.
- Los polímeros utilizados son no inmunogénicos con lo cual una fase siguiente del trabajo de tesis es ensayar el sistema en modelos de piel o en animales.