

## **SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MATRICES HÍBRIDAS DE BIOPOLÍMERO-SÍLICE PARA USO EN ENCAPSULACIÓN Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE VITAMINA C**

REVUELTA M.V.<sup>1,2</sup>, FERNÁNDEZ VAN RAAP M.B.<sup>3</sup>; MENDOZA ZÉLIS P.<sup>3</sup>;  
SÁNCHEZ F.H.<sup>3</sup>; NAVARRO A.S.<sup>4\*</sup>, CASTRO G.R.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>CINDEFI (UNLP-CONICET, La Plata), <sup>2</sup>FCAI-UNCuyo (Mendoza), <sup>3</sup>IPLP (Dpto. de Física (UNLP, CONICET- La Plata), <sup>4</sup>CIDCA (UNLP, CONICET- (La Plata), <sup>5</sup>School of Eng., Tufts University (Ma., USA),  
47 y 116. CP 1900, La Plata, Argentina - \*albanavarro@yahoo.com.ar

### **Resumen:**

El objetivo de este estudio es diseñar y caracterizar matrices híbridas compuestas por sílice y pectina (P) como soportes para encapsular la vitamina C o ácido ascórbico (AA). Se presentan resultados experimentales sobre las síntesis, las estructuras y el estudio de liberación del AA. En la síntesis se utilizó la pectina (P) como biopolímero y dos tipos de precursores de sílice: tetraetilortosilano (TEOS) y metiltrimetoxisilano (MTMS). Las muestras se sintetizaron por el método sol-gel en presencia de distintos agregados de pectina. La estructura de los materiales híbridos obtenidos se estudió por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y por difracción de rayos X (XRD). Los resultados mostraron la formación de dos estructuras distintas de matrices como consecuencia de la presencia o no de MTMS. Con MTMS, se observa una estructura abierta y tamaños de poros de 0,8 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras que sin MTMS, la estructura es más densa mostrando tamaño de poros del orden de los nanómetros. En las medidas de XRD no se detectaron ninguno de los picos característicos del AA, por lo que se podría afirmar que en todas las muestras el AA se incorporó en el interior de las matrices diseñadas, revelando una organización amorfa. Las matrices preparadas en presencia o no de MTMS mostraron diferencias significativas en los porcentajes de liberación del AA; comportamiento que se correlaciona con las diferentes estructuras observadas en ESEM. Además se observa que el porcentaje de liberación de AA se incrementa para aquellas matrices sintetizadas con una proporción menor de pectina.

### **Introducción:**

Los materiales híbridos (inorgánico-orgánico) sintetizados con la ayuda del método sol-gel constituyen, desde los últimos años, una nueva clase de materiales con prometedoras aplicaciones en biomedicina, biocatálisis y en biosensores. Una de las investigaciones de más rápido crecimiento en biotecnología es la inmovilización de diversas biomoléculas y la

encapsulación de sustancias activas en matrices preparadas por sol-gel, en las cuales conservan sus actividades biológicas. Una serie de enzimas, anticuerpos y células han sido inmovilizados con éxito en materiales inorgánicos-orgánicos y en matrices de sílice. (Pope, 1999; Livage, 2001; Shchipunov, 2004). La estructura porosa de la matriz híbrida es un parámetro fundamental para la eficiencia del proceso de inmovilización y encapsulación, ya que estos poros poseen nano dimensiones y permiten regular la difusión de sustancias activas, como también la de sustratos y productos de la reacción enzimática. Son conocidas las interacciones entre las fases de estos materiales, donde a menudo la fase inorgánica se une en forma covalente con el polímero orgánico, dando lugar a materiales híbridos con mejores propiedades. Por otra parte, tal combinación asegura la citocompatibilidad, biodegradabilidad y la posibilidad de manipular la tasa de liberación de moléculas bioactivas.

Los materiales híbridos son sintetizados in situ por hidrólisis y condensación de alcóxidos y por combinaciones de polímeros para crear una mezcla de materiales inorgánicos-óxidos con polímeros orgánicos obteniendo estructuras de nanoescala (Livage, 2001; Haas, 2003; Castelvetro, 2004). Los componentes orgánicos más utilizados en la síntesis de materiales híbridos son: polietilenglicol, alcohol polivinílico, acrilamida, alginato, carragenina y gelatina, entre otros.

El compuesto orgánico elegido en este estudio fue la pectina, que es un polisacárido frecuentemente utilizado como material encapsulante, debido a su biocompatibilidad y capacidad de formar gel. Estructuralmente la pectina está constituida por una cadena de ácido galacturónico que están unidos entre sí por enlaces  $\alpha$ -1,4, los cuales pueden estar esterificados con metanol (Sriamornsak y col., 2003).

El ácido ascórbico (AA), vitamina C, posee una amplia variedad de funciones biológicas, farmacéuticas y dermatológicas. El AA es considerado uno de los antioxidantes naturales más potentes otorgando protección contra las enfermedades relacionadas con el “estrés oxidativo” reduciendo el riesgo de la arteriosclerosis, enfermedades cardiovasculares y algunas formas de cáncer (Lee, 2000). Se dificulta su empleo por ser inestable en medio acuoso, al aire, a la luz y al calor; por lo cual su atrapamiento en matrices inertes sería una alternativa para preservar su actividad biológica logrando una biodisponibilidad mayor. Asimismo, estas matrices inertes adecuadamente diseñadas podrían asegurar, regulando la liberación, la actividad biológica del AA durante un tiempo prolongado.

En el presente trabajo se desarrollan y caracterizan matrices híbridas compuestas por sílice y pectina en las cuales se encapsula el ácido ascórbico y se determinan cinéticas de liberación. Estas matrices tendrían aplicación en el desarrollo de soportes para el transporte de AA en envase de alimentos.

## **Materiales y Métodos:**

### *Materiales*

Tetraetilortosilano (TEOS), metiltrimetoxisilano (MTMS), ácido ascórbico (AA) y 2,6-diclorofenolindofenol fueron comprados a Sigma-Aldrich (Argentina). Pectina de bajo

metoxilo (P), DE  $\approx$  33% fue una donación de CPKelco (Dinamarca). El cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), el ácido clorhídrico (HCl) y otros reactivos fueron de grado analítico (Anedra, Argentina).

#### *Preparación de las matrices híbridas polímero/sílice*

En todos los casos las matrices híbridas se prepararon mediante el método de sol-gel usando (TEOS) y (MTMS), siguiendo el procedimiento de un solo paso.

Prepolimerización del TEOS: el tetraetoxiortosilano se mezcló con agua destilada y HCl en una relación molar TEOS:  $\text{H}_2\text{O}$ : HCl= 1:5:10<sup>-2</sup> para formar una solución. Luego se dejó prepolimerizar la solución durante 24 horas a 4 ° C.

Matrices de Pectina/TEOS - Matrices de Pectina/TEOS/MTMS: en todas las matrices la relación en volumen TEOS prepolimerizado: pectina fue de 2:1. El AA se adicionó a una solución de pectina, se mezcló con 0,05 M de NaOH y luego se agregó el TEOS prepolimerizado y el MTMS, en el caso que correspondiera. La mezcla se agitó vigorosamente y se vertió en una placa de petri para su gelificación. Una vez formado el gel se sumergió en una solución de  $\text{CaCl}_2$  0.063 M durante 30 min. Luego el gel resultante se secó a 30 °C en estufa durante 24 horas generándose el xerogel. Una muestra de control de los xerogeles se sintetizó sin la adición de AA. En la Tabla 1 se muestran las diferentes formulaciones diseñadas de las matrices.

**Tabla 1.** Formulación de las matrices biopolímero/sílice.

Muestras*	Composición de las matrices híbridas	
	Pectina (%)	AA (mg/ml)
2M-49	2.0	49.0
3.2M-49	3.2	49.0
3.2M	3.2	-
6M-49	6.0	49.0
3.2	3.2	-
3.2-49	3.2	49.0
3.2-61	3.2	61.0
6-61	6.0	61.0

\*La presencia del MTMS en la formulación de la matriz es indicada por la letra M en la nomenclatura de la muestra.

#### *Caracterización de las matrices híbridas biopolímero/sílice*

La morfología de la superficie de algunas de las matrices seleccionadas se examinó por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM XL-30 Philips, EE.UU). Las muestras se escanearon con una tensión de aceleración de 15 kV. Los tamaños de poros de

las imágenes de las matrices, obtenidas por ESEM, se analizaron a través del programa ImageJ.

Los difractogramas de rayos X de las matrices se obtuvieron utilizando un difractor de rayos-X, (X'Pert PW 3050, EE.UU). Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron en un rango de ángulo de  $2\theta = 2^\circ - 60^\circ$ , usando radiación Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$ ), con una longitud de paso de  $0,02^\circ$  y un tiempo de adquisición por paso de 4 s.

#### *Estudio de liberación de AA a partir de las matrices híbridas*

En los ensayos de liberación de AA se utilizaron fragmentos de xerogeles de 0,8 x 0,6 cm y 0,08 cm de espesor aproximadamente, pesados a la décima de miligramo. La liberación del ácido ascórbico se estudió en medio acuoso a pH = 5,0, 37° C y 150 rpm. En cada intervalo de muestreo, se retiró una alícuota de solución de cada frasco y se reemplazó inmediatamente con un volumen idéntico de medio fresco. El ácido ascórbico se determinó por duplicado empleando una modificación del método AOAC (2005) 967.22 por titulación con 2,6-diclorofenolindofenol. La muestra se mezcló con 10 ml de una solución de ácido oxálico al 1%, posteriormente se tituló con una solución de 2,6-diclorofenolindofenol hasta que el viraje rosa permaneciera por lo menos 5 s, registrando el volumen empleado en la titulación para realizar los cálculos. El contenido de ascórbico se expresó en mg AA/100g de muestra.

## **Resultados y Discusión**

#### *Preparación de las matrices híbridas polímero/sílice*

En la Tabla 2 se muestra la formulación de algunas de las matrices diseñadas junto con los tiempos de gelación (t), el pH final de síntesis y el aspecto de las mismas una vez formadas.

**Tabla 2.** Formulación de las matrices polímero/sílice.

<b>Muestra</b>	<b>pH</b>	<b>t (horas)</b>	<b>Aspecto</b>
3.2	5.5	0	opaco
3.2M	5.5	1/3	opaco
3.2-49	2.0	36	transparente
3.2M-49	2.0	48	transparente

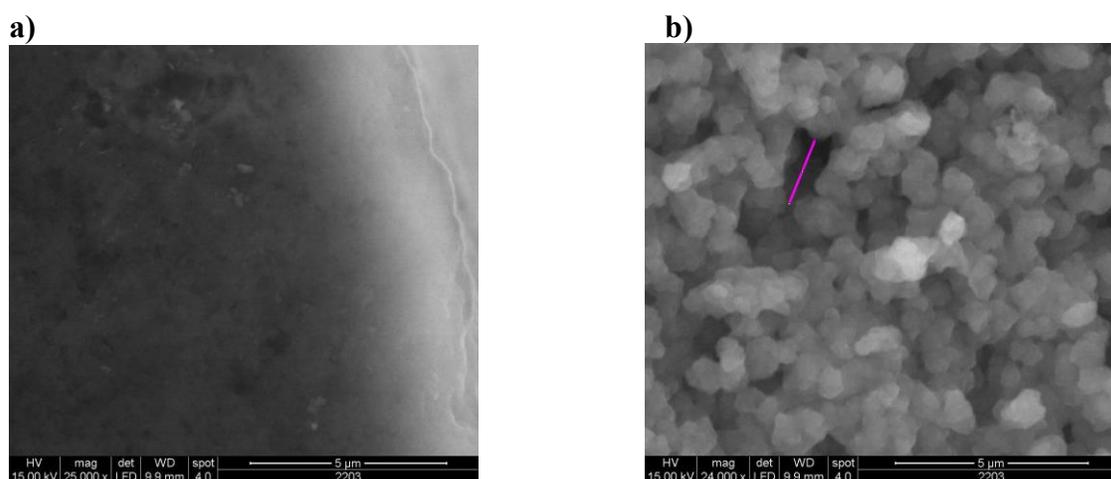
Como se observa en la tabla 2, existen diferencias entre el pH, el tiempo de gelación y el aspecto de las matrices controles, respecto de las que contienen al ácido ascórbico. Los xerogeles controles presentan pH 5.5, un tiempo de gelación de pocos minutos y un aspecto opaco de la matriz. La tabla 2 muestra que la incorporación de AA a las matrices modifica tanto el pH, el tiempo de gelación como también el aspecto, obteniendo matrices

ácidas, tiempos de gelación de horas y xerogeles transparentes. Estos parámetros muestran el efecto que causa la adición del AA en la síntesis y en la estructura final del xerogel.

### *Caracterización de las matrices*

#### *Análisis morfológico*

En la Fig. 1 se muestran las micrografías obtenidas a través de ESEM de los xerogeles de control (sin AA) con y sin MTMS.



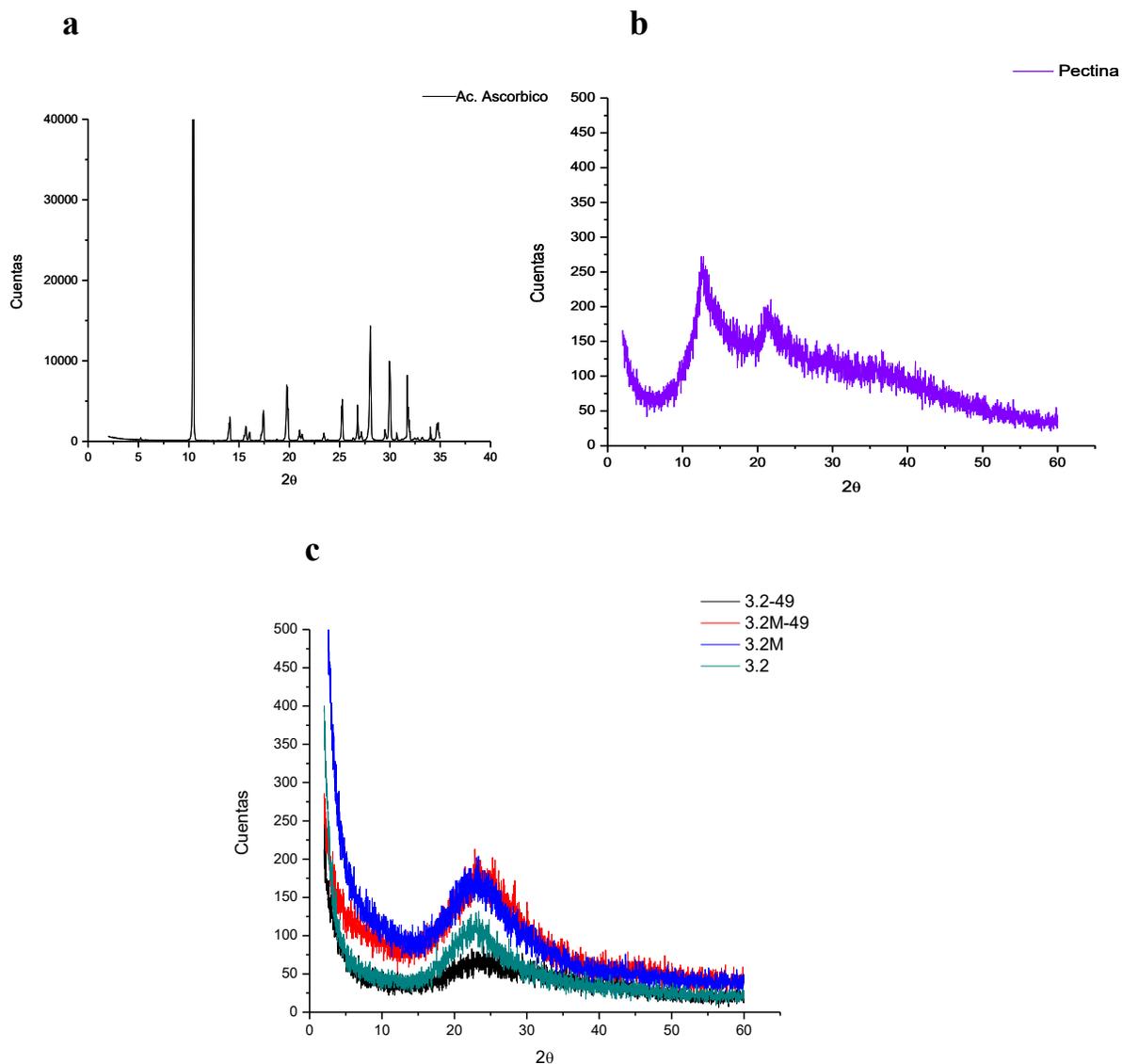
**Figura 1.** Imágenes correspondientes a las matrices híbridas polímero/sílice obtenidas por ESEM: a) xerogel 3.2 y b) 3.2M. Aumento 24000X. La barra indica la escala. La línea rosa indica el diámetro del poro de  $1.81\mu\text{m}$

Las imágenes de ambos xerogeles, sin y con MTMS (Fig. 1 a y b) muestran matrices densas con superficies rugosas. El agregado de MTMS (Fig. 1b) generó una estructura con microagregados y formación de canales, revelando un material de un arreglo más abierto. En cuanto al tamaño de los poros, el xerogel sin MTMS presentaría diámetros del orden de los nanómetros, los cuales no pudieron ser resueltos mediante ESEM (Fig 1a). En cambio, en la Fig. 1b se observa que los diámetros de los poros se encuentran entre 0.8 a 2 micrones.

#### *Análisis de difracción de rayos X*

El difractograma del ácido ascórbico (Fig. 2a) indica claramente el comportamiento cristalino de este compuesto. Algunos de sus picos característicos localizados en  $2\theta$  igual a 10.3, 14.09, 17.3, 25.24 grados han sido reportados también por Desai, 2005. La pectina, en cambio presentó una menor cristalinidad (Fig. 2b), hallándose picos en valores de  $2\theta$

igual a 12.54, 21.48, 28.30 y 35.38 grados (Fig. 2b); valores similares a los obtenidos por Mishra, 2008.



**Figura 2.** Espectros de difracción de rayos X de: a) Ácido Ascórbico, b) Pectina y c) Xerogelos híbridos cargados con AA, con y sin MTMS y sus correspondientes controles.

Los difractogramas de los xerogelos (Fig. 2c) muestran una línea de reflexión máxima A  $2\theta = 23$  grados, característico de la sílice amorfa, no observándose otros picos atribuibles al resto de los componentes. El estudio de rayos X reveló que el AA se encuentra disperso en

estado molecular en el interior de los poros de la matriz híbrida, ya que no se detecta la presencia de sus cristales.

### *Estudio de liberación de AA*

La liberación de AA de algunas de las matrices diseñadas se realizó en medio acuoso a 37°C y 150 rpm, durante cinco horas aproximadamente.

En la Tabla 3 se informan los porcentajes de liberación a un tiempo determinado, 120 min.

**Tabla 3.** Porcentajes de liberación del Ácido Ascórbico para las formulaciones de matrices polímero/sílice diseñadas.

<b>Nomenclatura</b>	<b>% liberación a 120 min<sup>a</sup></b>
2M-49	30.0 ± 0,00
6M-49	17.8 ± 0,07
3.2-61	18.6 ± 0,07
6-61	12.5 ± 0,14

<sup>a</sup> Los porcentajes de liberación se realizaron por duplicado. Se muestran las medias ± SD.

En la Tabla 3 se observa que hay diferencias significativas del 5% en el porcentaje de liberación del AA entre las matrices que poseen o no en su formulación MTMS. Este comportamiento se correlaciona con lo observado en ESEM, ya que la estructura de los xerogeles que contienen MTMS presenta una estructura abierta, permitiendo al AA liberarse más fácilmente.

Por otro lado, se observa que existe un aumento significativo ( $p > 0,05$ ) en el porcentaje de liberación cuando la matriz presenta un 2% de pectina en su composición, comparada con aquellas que tienen un 6% de pectina. Este resultado demostraría que al aumentar la cantidad de pectina en la matriz se reduce la liberación del AA desde la misma.

### **Conclusiones**

El presente estudio muestra que el ácido ascórbico se incorporó en el interior de las matrices híbridas biopolímero-sílice, cuya porosidad interconectada constituye un sistema de transporte para el AA que además regula su liberación. Estos resultados demuestran que las matrices híbridas diseñadas podrían constituir una posible aplicación en el desarrollo de envases para alimentos fortificados o como soporte para liberación controlada de ácido ascórbico.

### **Bibliografía**

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International, Method 967.22, 18<sup>th</sup> Edition. Gaithersburg, Maryland, USA, AOAC International.
- Castelvetto, V., Vita, C. (2004) Nanostructured hybrid materials from aqueous polymer dispersions. *Adv. Coll. Interface Sci.*,108: 167–185.
- Chernev, G.E., Samuneva, B.I., Djambaski, P.R., Salvado I.M., Fernandes, H.V. (2006) Silica hybrid nanocomposites *CEJC* 4(1): 81–91.
- Desai, K.G.H., Park, H.J. (2005) Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation* 22(2): 179–192.
- Haas, K.H., and K. Rose, K. (2003) Hybrid inorganic/organic polymers with nanoscale building blocks: precursor, processing, properties and application. *Rev. Adv. Mat. Sci.* 5: 47–52.
- Livage, J., Coradin, T., Roux, C. (2001) Encapsulation of biomolecules in silica gels. *J. Phys.: Condensation Materials* 13: 673–691.
- Mishra, R.K., Datt, M., Banthia, A.K. (2008) Synthesis and Characterization of Pectin/PVP Hydrogel Membranes for Drug Delivery System. *AAPS PharmSciTech* 9(2): 395–403.
- Pope, E.J. (1999). Gel encapsulated microorganisms: *saccharomyces cerevisiae* – silica gel biocomposites, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*4: 225–229.
- Rios, X., Moriones, P., Echeverría, J., Luquín, A., Laguna, M., Garrido, J. (2011) Characterisation of hybrid xerogels synthesised in acid media using methyltriethoxysilane (MTEOS) and tetraethoxysilane (TEOS) as precursors. *Adsorption* 17: 583–593.
- Shchipunov Y.A., Karpenko, T., Bakunina, I., Burtseva, Y., Zvyagintseva, T. (2004) A new precursor for the immobilization of enzyme inside sol – gel derived hybrid silica nanocomposite containing polysaccharides. *J. Biochem. Biophys. Methods* 58:25–38.
- Sriamornsak, P.,(2003) Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review, *Silpakorn University International Journal* 3: 206–228.