

**PRODUCCIÓN DE MICROESFERAS DE QUITOSANO y  
MICROCÁPSULAS DE POLIURETANO PARA SU  
UTILIZACIÓN COMO *CARRIERS* DE AGENTES  
BIOQUÍMICOS DE INTERÉS PARA LA INDUSTRIA Y LA  
MEDICINA**

**Dra. Mary Lopretti**

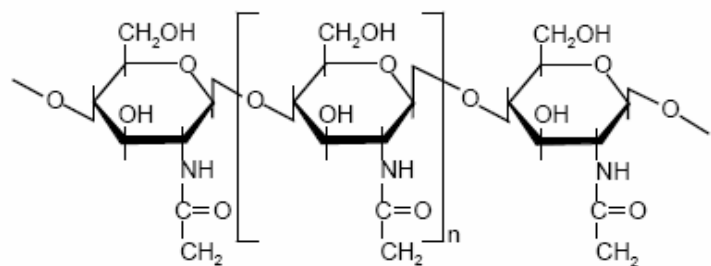
Departamento de Bioprocesos y Biotecnología – LATU - Uruguay



# PRODUCCIÓN DE MICROESFERAS DE QUITOSANO PARA SU UTILIZACIÓN COMO *CARRIERS* DE AGENTES BIOQUÍMICOS DE INTERÉS PARA LA INDUSTRIA Y LA MEDICINA

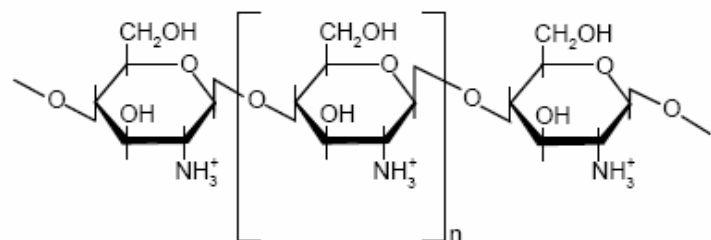
## Introducción

- Los biopolímeros son materiales de gran interés en los campos de la industria y la medicina debido a su disponibilidad y características para distintas aplicaciones, entre las cuales están los biofilms y microcápsulas.
- El quitosano ( $\beta$ -1,4-glucosamina) es un biopolímero policatiónico con excelentes propiedades biológicas, entre ellas su biocompatibilidad, su bioadsorptividad y su poder bacteriostático. Esto lo ha llevado a ser objeto de estudio para aplicaciones tanto en la industria biomédica como la alimenticia.
- Por otro lado, existe la posibilidad de utilizar un polímero sintético, como el poliuretano. Éste compuesto, es el producto de la reacción dos componentes principales, un polioliol y un isocianato



Chitin

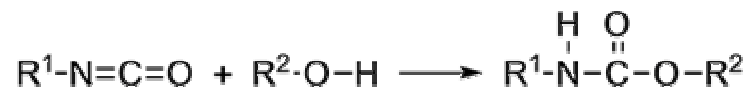
(a)



Chitosan

(b)

Esquema de la estructura de la quitina (a) y del quitosano (b)

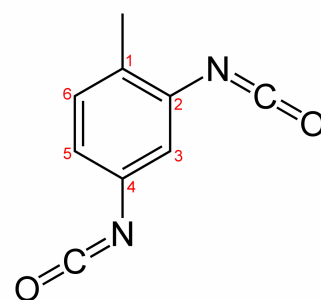


Isocianato

Alcohol

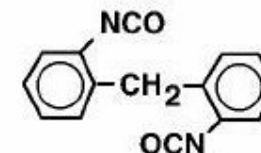
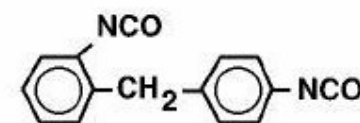
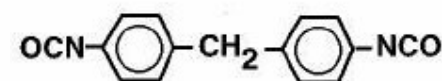
Uretano

(c)



2,2'

(d)



(e)

(c) Esquema de la reacción de formación del uretano.

(d) Estructura de la molécula de 2,4-Diisocianato de tolueno (TDI).

(e) Estructura de la molécula de Diisocianato de difenilmetano, en sus tres formas isoméricas.

- En el presente trabajo se ha realizado la puesta a punto de técnicas que permitan la obtención de microesferas que sirvan como “vehículos” para la entrega localizada y/o descarga controlada de fármacos, ADN, enzimas, protección de probióticos y otras células.

Se realizaron por emulsión, microesferas de quitosano al 3% y utilizando glutaraldehído al 25% y paraformaldehído (PFA) al 30% como agente entrecruzante, así como microcápsulas de poliuretano.

- Las microesferas se decantaron y posteriormente se lavaron con éter de petróleo. Las microcápsulas obtenidas se evaluaron por distintos métodos:
- a) espectrofotometría: para determinar el rendimiento de la microencapsulación.
- b) microscopía confocal (CLSM): para determinar la distribución de carga de una proteína reportera fluorescente dentro de las esferas, y cuantificación de la misma dentro de estos micro vehículos.
- c) citometría de flujo
- d) microscopía electrónica de transmisión: para analizar ultraestructuralmente la configuración interna del polímero y su carga.
- e) microscopía electrónica de barrido: para determinar la topografía tridimensional de las microesferas.
- Además, se estudió la incorporación por las microesferas de proteínas, ADN y fragancias, visualizando su permanencia, estabilidad y liberación.

# Materiales y Métodos

## Producción de microesferas de quitosano (PROTOCOLO 1)

Para formar las microesferas de quitosano, se procedió mediante la técnica de emulsión agua aceite (W/O).

Como fase dispersa, se preparó una solución de Quitosano al 3,0% (wt/vol) en ácido acético al 5%.

Luego la solución de quitosano se filtró utilizando un filtro MN 640 w (Macherey-Nagel).

Para la fase continua, se tomó 1 litro de aceite de girasol en un matríz de 2 litros. Se le adicionó 0,5% (wt/vol) de Span 80. Utilizando una jeringa, se agregaron 40 ml de la solución Quitosano 3,0% por goteo (5ml/min) sobre el aceite, en agitación constante (1000 rpm) a 40 °C.

Luego, se adicionó 20 ml de Glutaraldehído 25% (vol/vol) a los 15, 30, 35 y 60 minutos posteriores al agregado del quitosano, manteniendo la agitación constante (1000 rpm).

Una vez finalizado el agregado del Glutaraldehído, se mantuvieron las mismas condiciones de agitación por 2,5 horas a 40 °C.

Las microesferas se decantaron por 24 horas a temperatura ambiente.

Para la recolección de las microesferas, primero se descartó el aceite, y luego se comenzaron a realizar sucesivos lavados con éter de petróleo a través de un filtro de 0,8 $\mu$ m (Gelman Sciences Inc.) Se dejaron secar a temperatura ambiente.

Se incorporó Limoneno a las microesferas obtenidas con glutaraldehído, así como diversas moléculas; ADN plasmídico y BSA.

# Materiales y Métodos

## Procedimiento para la incorporación de Limoneno y ADN plasmídico en las microesferas de quitosano y glutaraldehído:

- A 10mL de aceite de Maíz, se le adicionó 10mL de Limoneno ( $Abs_{325} = 0.890$ ) (1:1), finalmente se le agregó 10g de microesferas (diámetro; 5-10 $\mu$ m). Se vortexeó la mezcla 20min, se sonicó por 10min, centrifugando a 4000rpm por 2min. Se dejó decantar las microesferas.
- Se disolvió 1mL (13400ng) de ADN plasmídico en 4mL de quitosano diluido en ácido acético 3% (pH 4.5). Se procedió con el **protocolo 1**.

## Procedimiento para la incorporación de BSA en las microesferas de quitosano y paraformaldehído (PFA):

- Se disolvió 50mg de BSA en 3.6mL de quitosano diluido en ácido acético 3% (pH 4.5). Se procedió con el **protocolo 1**, sustituyendo el glutaraldehído por PFA 30% en H<sub>2</sub>O.

# Materiales y Métodos

## Producción de microcápsulas de poliuretano e incorporación conjunta de limoneno<sup>1</sup>

La producción de las microcápsulas de poliuretano se llevó a cabo preparando la fase orgánica en un matraz, utilizando 50ml limoneno y 15 ml de diisocianato de 4,4'-difenilmetano (MDI) líquido.

La fase acuosa se preparó incorporando 4,2g de alcohol polivinílico (PVA) en 250 ml de agua destilada.

Ambas fases se mezclaron y se agitaron a 11000 rpm durante 3 minutos.

Luego, la mezcla se transfirió a un reactor de 1000 ml donde se mantuvo en agitación a 80 °C durante 1 hora.

Paralelamente, se preparó una segunda fase acuosa formada por butanodiol, etanoldiamina, en de 100 ml de agua destilada. Esta segunda fase acuosa se incorporó a la mezcla en el reactor, y se mantuvo la agitación (100rpm) a 80 °C durante 2 horas.

Las microcápsulas se lavaron con una solución de etanol 30% para remover los excesos de reactivo, y se mantuvieron en agua.

<sup>1</sup>Trabajo conjunto Depto. Bioprocesos y Biotecnología del LATU – Instituto Politécnico de Bragança (realizado en Bragança)



# Materiales y Métodos

## *Producción de microesferas de quitosano incorporando limoneno en el mismo proceso de formación<sup>1</sup>*

- La formación de las microesferas de quitosano, se llevó mediante la técnica de emulsión agua-aceite (W/O), pero utilizando una técnica distinta a la descrita en el Protocolo 1.
- Se utilizó como fase acuosa, una solución de lecitina al 1%, mientras que como fase orgánica se utilizó una solución de limoneno (aceite concentrado). Paralelamente, se preparó una solución de quitosano al 2% en ácido acético al 10%.
- En un vaso de bohemia, se colocaron 50 ml de la fase orgánica y 170 ml de la fase acuosa. La mezcla se agitó a 11000 rpm durante 30 segundos.
- Se adicionaron gota a gota, 110 ml de la solución de quitosano al 2%, manteniendo la agitación a baja velocidad.
- Se ajustó el pH a 6.0 con NaOH para producir la precipitación del quitosano. Se mantuvo durante 1 hora en agitación 100 rpm.
- Luego, se añadió gota a gota el glutaraldehído al 25% para reticular el quitosano. La mezcla se mantuvo 2 horas en agitación 100rpm, para luego dejar decantar las microesferas y lavarlas.

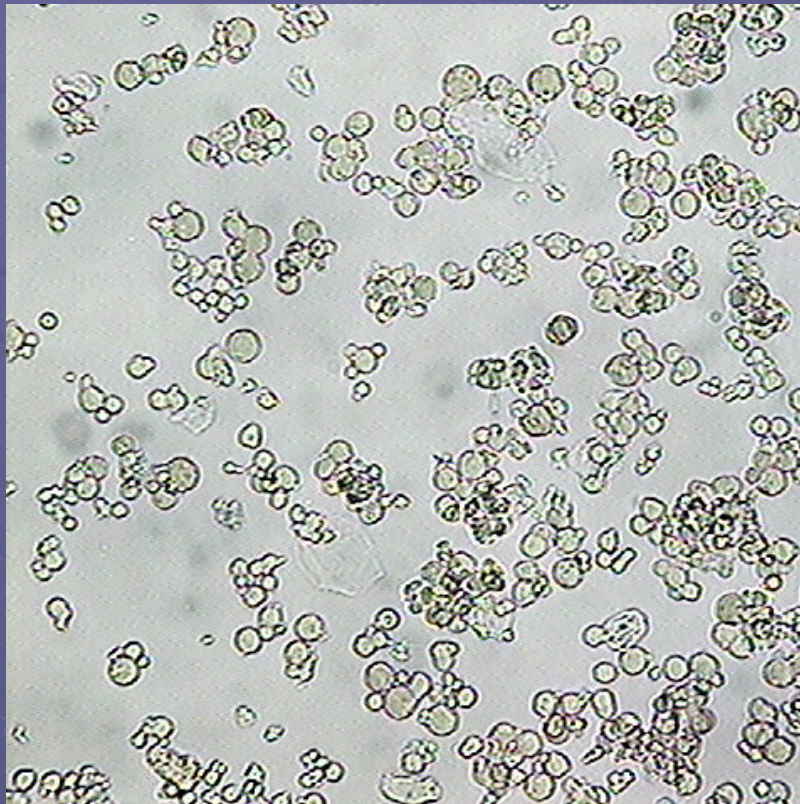
<sup>1</sup>Trabajo conjunto Depto. Bioprocesos y Biotecnología del LATU – Instituto Politécnico de Bragança (realizado en Bragança)

# Materiales y Métodos

## Estabilidad de microesferas y permanencia de Limoneno, BSA y ADN plasmídico en las microesferas de quitosano con paraformaldehído (PFA) y glutaraldehído.

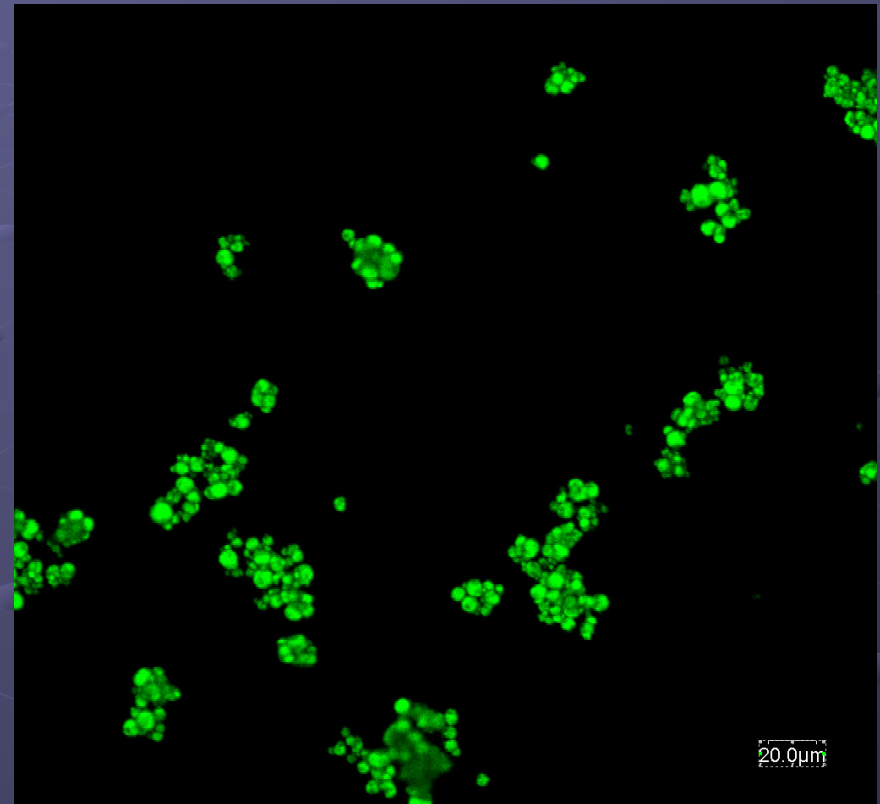
- Se adicionó 0.2g de Microesferas de quitosano con glutaraldehido con 0.075g de Limoneno, a 5mL de H<sub>2</sub>O destilada a pH 3, 5-6 y 9.
- Se adicionó 0.03g de Microesferas de quitosano con PFA que habían incorporado BSA a 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada a pH 3, 5-6 y 9.
- Se adicionó 0.006g de Microesferas de quitosano con glutaraldehido que habían incorporado ADN plasmídico a 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada a pH 3, 5-6 y 9.
- La mezcla se vortexeó y se almacenó a 4°C y 37°C.
- Se realizaron tubos control conteniendo 5mL de H<sub>2</sub>O destilada a pH 3, 5-6 y 9 sin las microesferas.
- Se controló la liberación de Limoneno y BSA de las microesferas midiendo las absorbancias a 280nm para BSA, 325nm para Limoneno y a 260nm para el ADN plasmídico.

## Resultados – Microscopía óptica y Confocal Laser



Microesferas quitosano –  
glutaraldehído-vacías

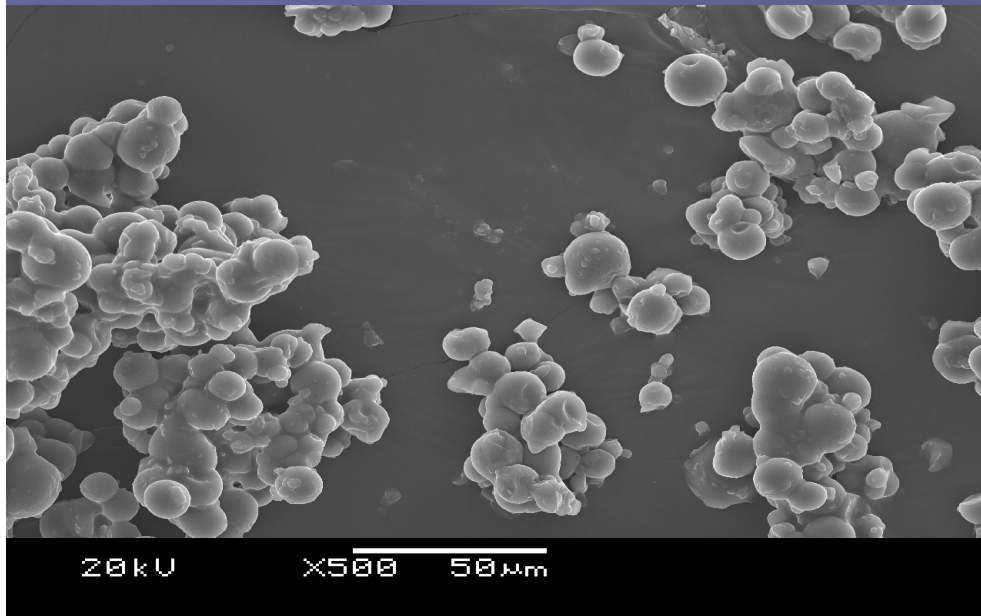
Magnificación: x400



Microesferas quitosano –PFA-  
conteniendo BSA-FITC

Magnificación: x20

# Resultados – Microscopía Electrónica de Barrido

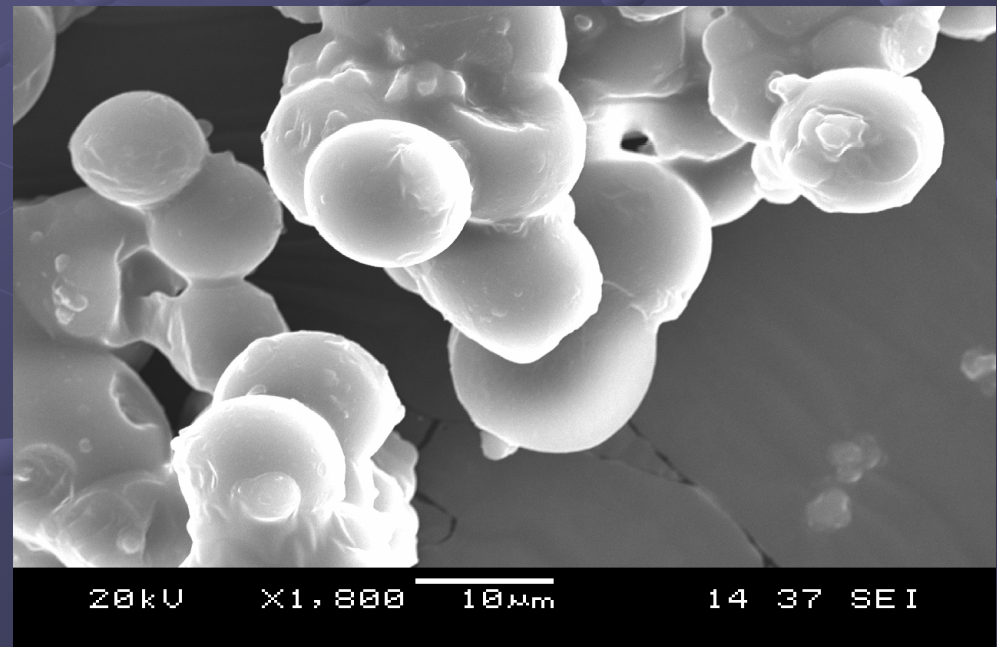


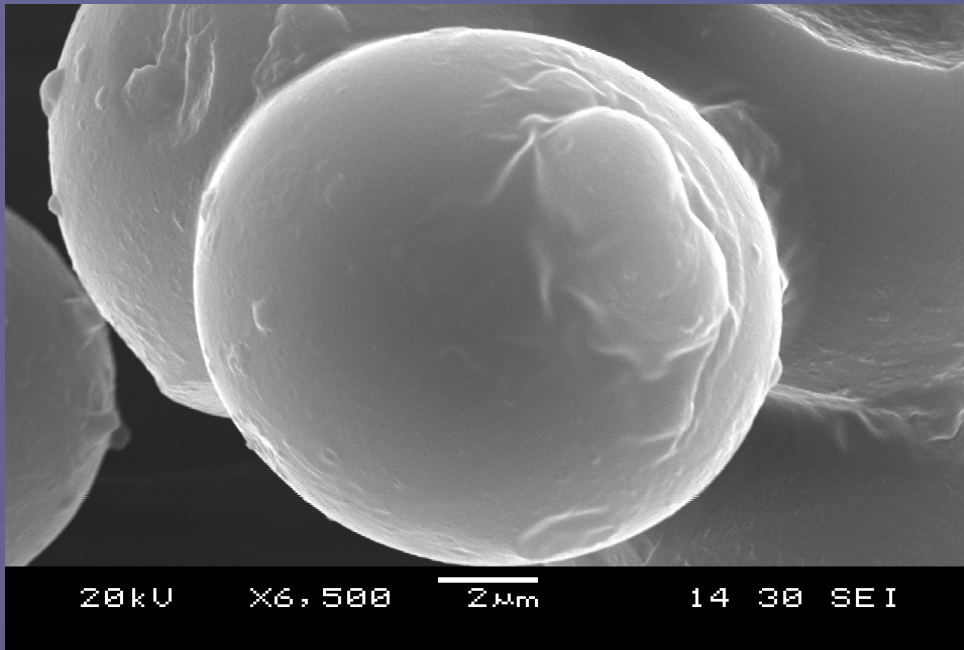
Microesferas quitosano –  
glutaraldehído-vacías

Magnificación: x500

Microesferas quitosano–  
glutaraldehído-vacías

Magnificación: x1800



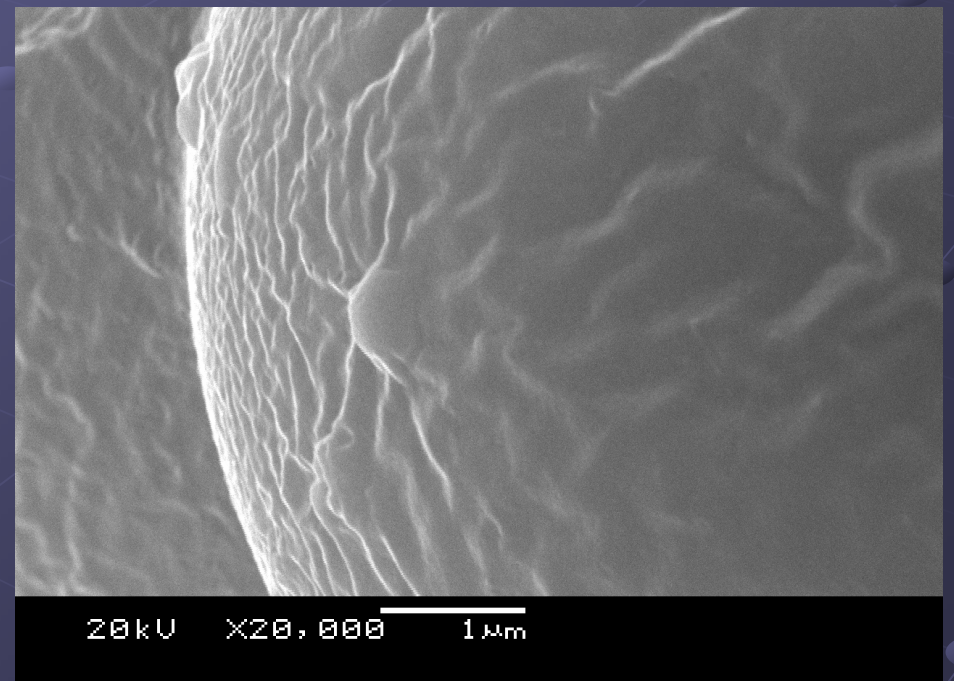


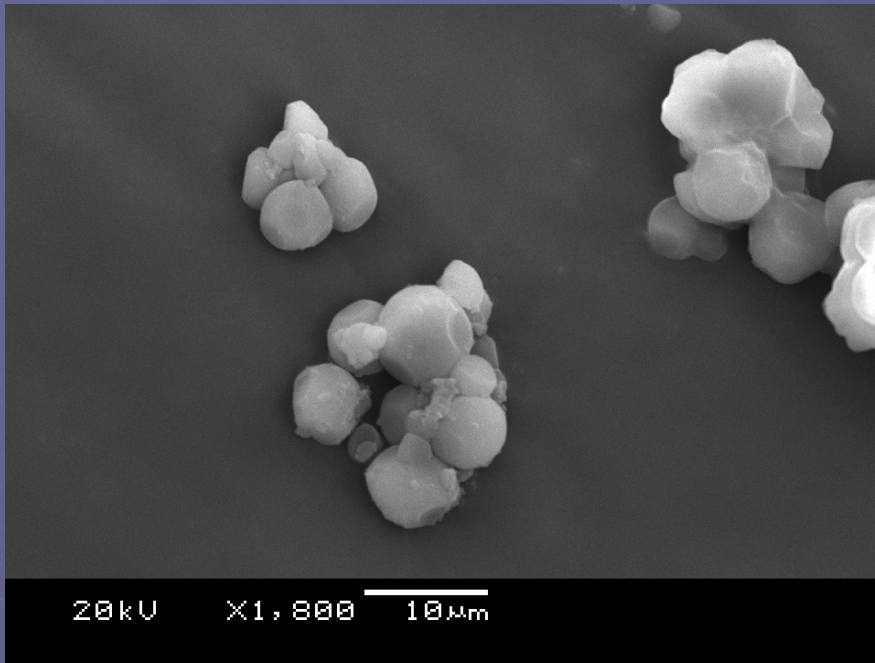
Microesferas quitosano-glutaraldehído-vacías

Magnificación: x6500

Microesferas quitosano-glutaraldehído-vacías

Magnificación: x20000



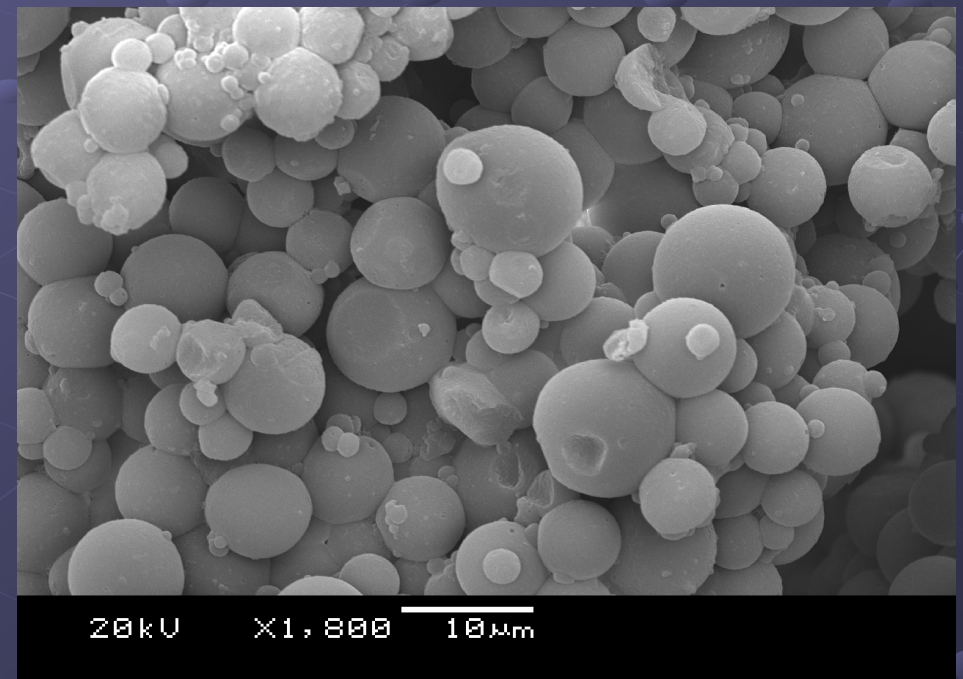


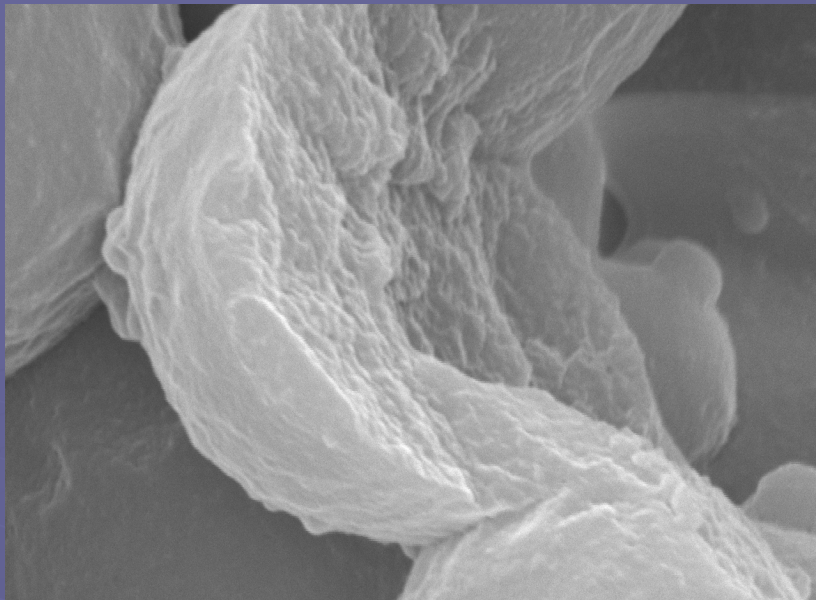
Microesferas quitosano-glutaraldehído-BSA

Magnificación: x1800

Microesferas quitosano-glutaraldehído-ADN plasmídico

Magnificación: x1800





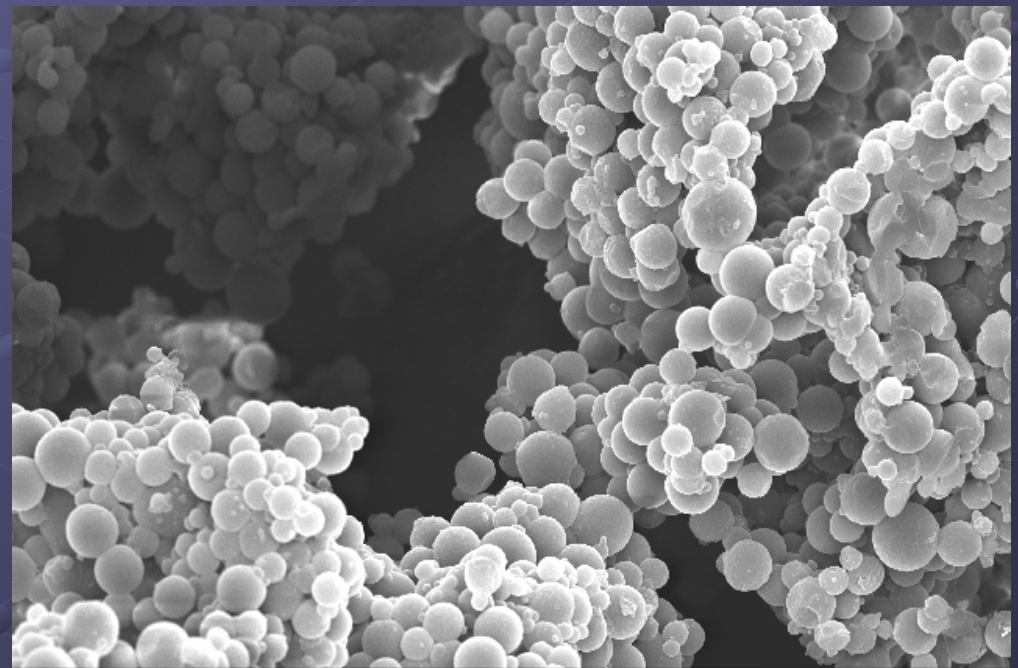
20kV X17,000 1µm

Microesfera quitosano–glutaraldehído-  
ADN plasmídico

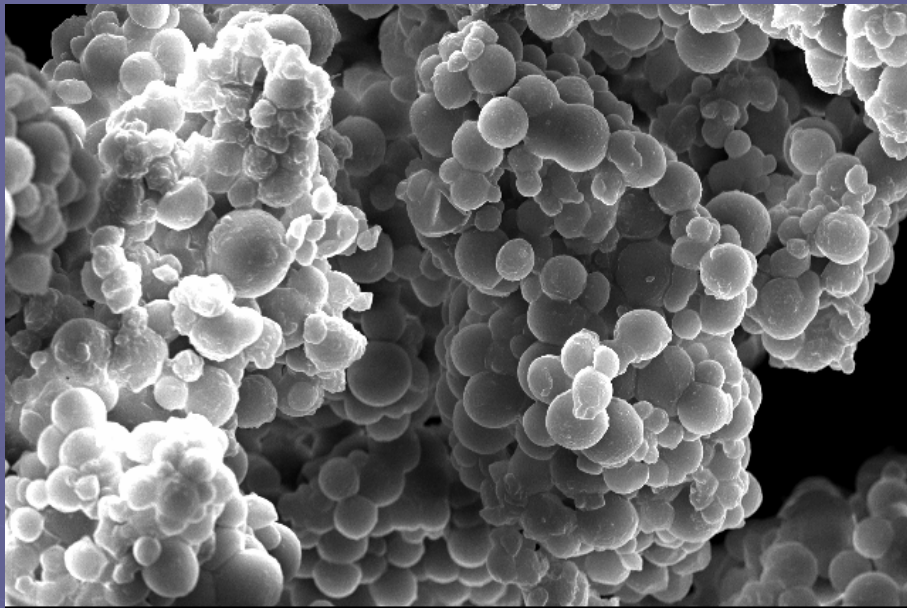
Magnificación: x17000

Microesferas quitosano–glutaraldehído-  
ADN plasmídico

Magnificación: x800



20kV X800 20µm



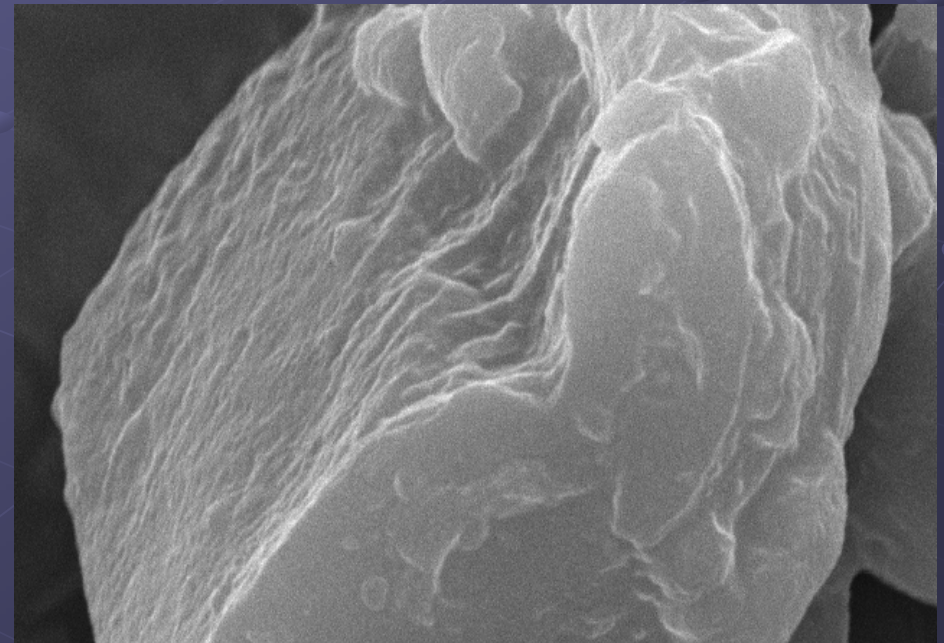
20kV X1,200k 10µm

Microesferas quitosano-  
paraformaldehído (PFA) -BSA

Magnificación: x1200

Microesfera quitosano-glutaraldehído-  
vacía

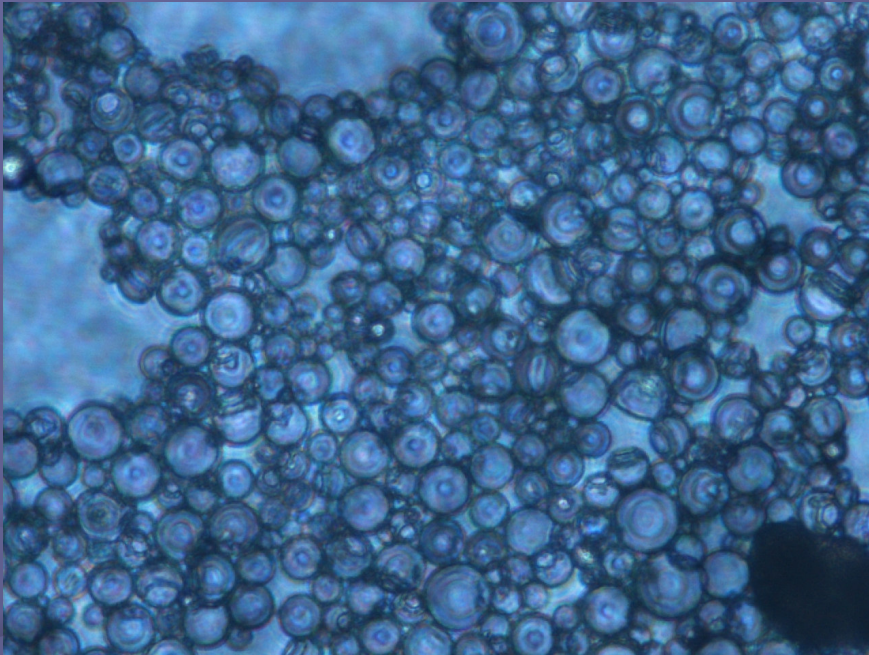
Magnificación: x10000



20kV X10,000 1µm

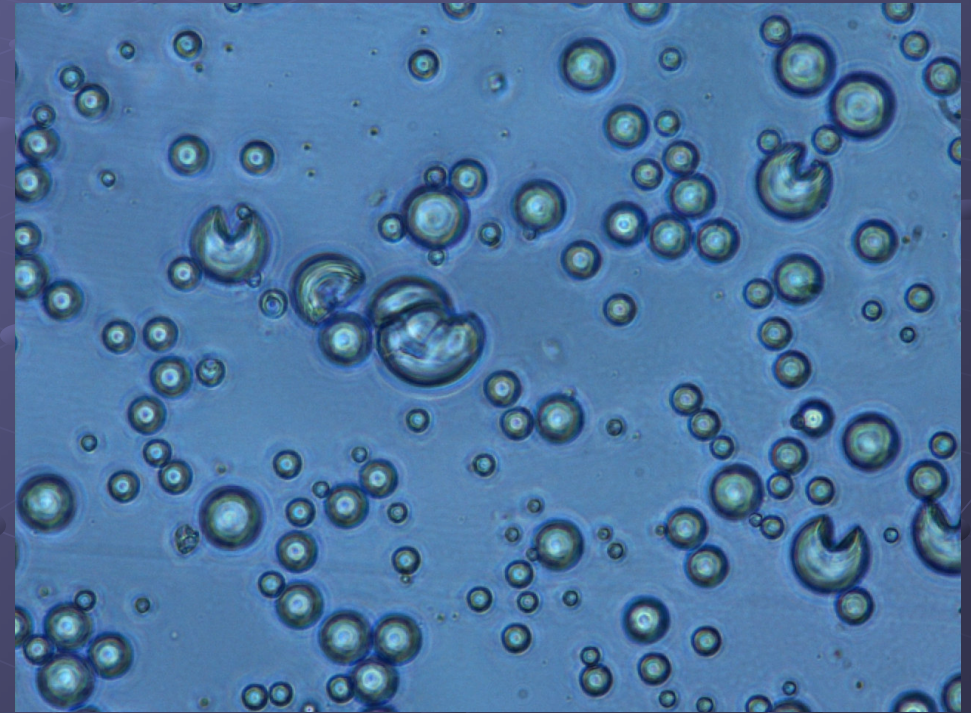


# Microcápsulas de Poliuretano - Microscopía óptica (Portugal)

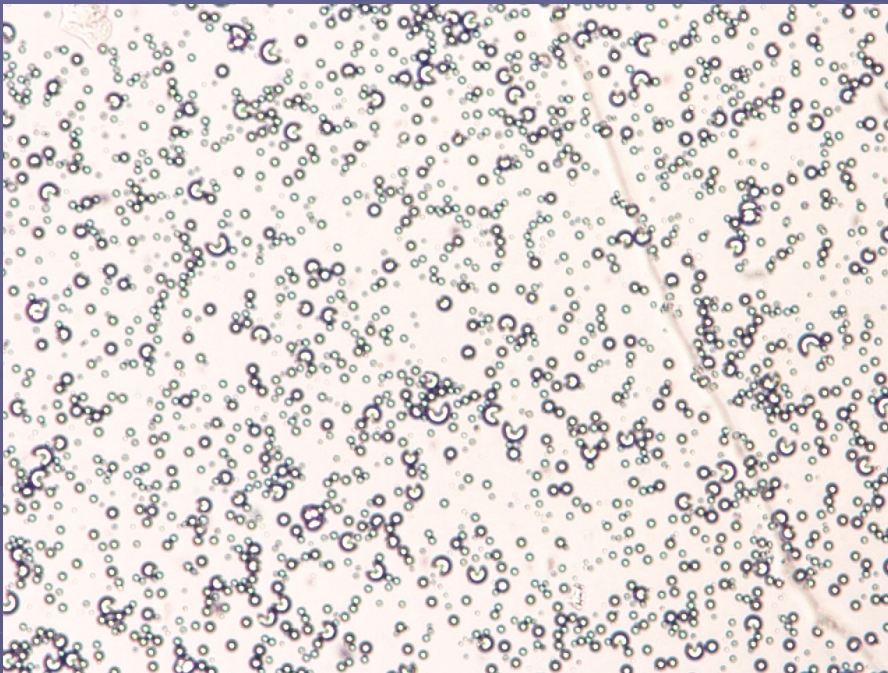


Microcápsulas de poliuretano –  
conteniendo limoneno

Magnificación: x400

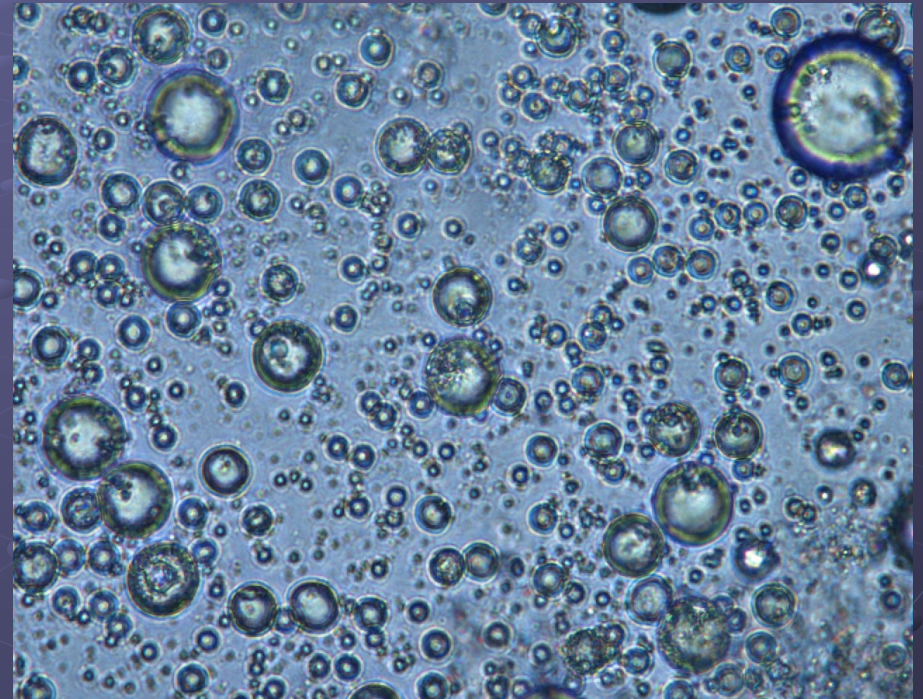


# Microesferas de Quitosano - Microscopía óptica (Portugal)



Microesferas de quitosano –  
conteniendo limoneno

Magnificación: x100



Microesferas de quitosano –  
conteniendo limoneno

Magnificación: x400

# Estudios de Permanencia y Estabilidad

- Permanencia de BSA en microesferas de quitosano con PFA a diferentes PH

Tabla 1: absorbancia a 280nm del sobrenadante de microesferas PFA-BSA- pH 3. 1: a 37°C. 2: a 4°C

	pH 3; 4°C	pH 3; 37°C
día	Abs.280	Abs.280
1	0,0324	0,2339
2	0,0229	0,0672
3	0,0316	0,0339
4	0,0123	0,0558
5	0,0272	0,0613
6	0,0048	0,0271
7	0,0441	0,1102
8	0,0194	0,0607
9	0	0,0083
10	0,1176	0,1955
11	0,0291	0,1834

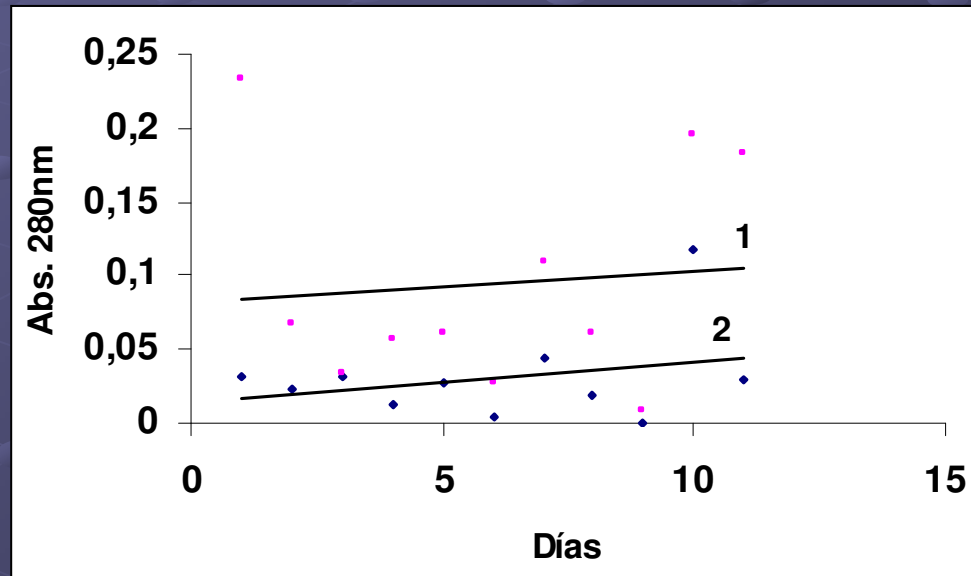


Gráfico 1: absorbancia a 280nm del sobrenadante de microesferas PFA-BSA- pH 3. 1: a 37°C. 2: a 4°C

## - Permanencia de BSA en microesferas de quitosano con PFA a diferentes PH

Tabla 2: absorbancia a 280nm del sobrenadante de microesferas PFA-BSA- pH 5-6. 1: a 4°C. 2: a 37°C.

	pH 5-6; 4°C	pH 5-6 ; 37°C
día	Abs.280	Abs.280
1	0,0324	0,0336
2	0,0102	0,022
3	0,0135	0,0002
4	0,0129	0,0011
5	0,0488	0,0253
6	0,003	0
7	0,0282	0,0029
8	0,0053	0,0012
9	0	0
10	0,0751	0,075
11	0	0,0014

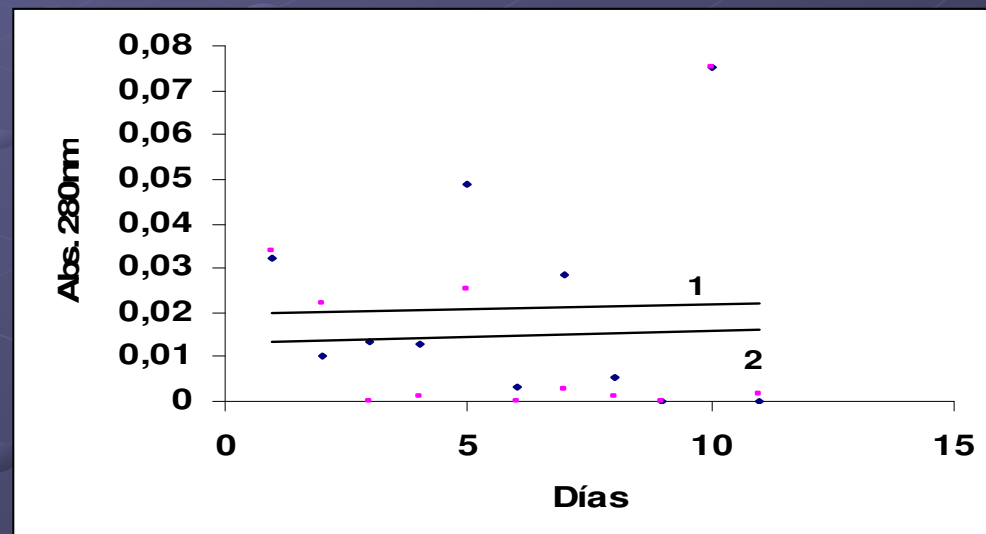


Gráfico 2: absorbancia a 280nm del sobrenadante de microesferas PFA-BSA- pH 5-6. 1: a 4°C. 2: a 37°C.

- Permanencia de BSA en microesferas de quitosano con PFA a diferentes PH

Tabla 3: absorbancia a 280nm del sobrenadante de microesferas PFA-BSA- pH 9. 1: a 4°C. 2: a 37°C.

día	pH 9; 4°C Abs. 280	pH 9 ; 37°C Abs. 280
1	0,0096	0,0002
2	0,0546	0,0029
3	0,0295	0
4	0,0155	0
5	0,0884	0,01
6	0,0142	0
7	0,1003	0,0275
8	0,0989	0
9	0,0082	0
10	0,0966	0,0582
11	0,077	0

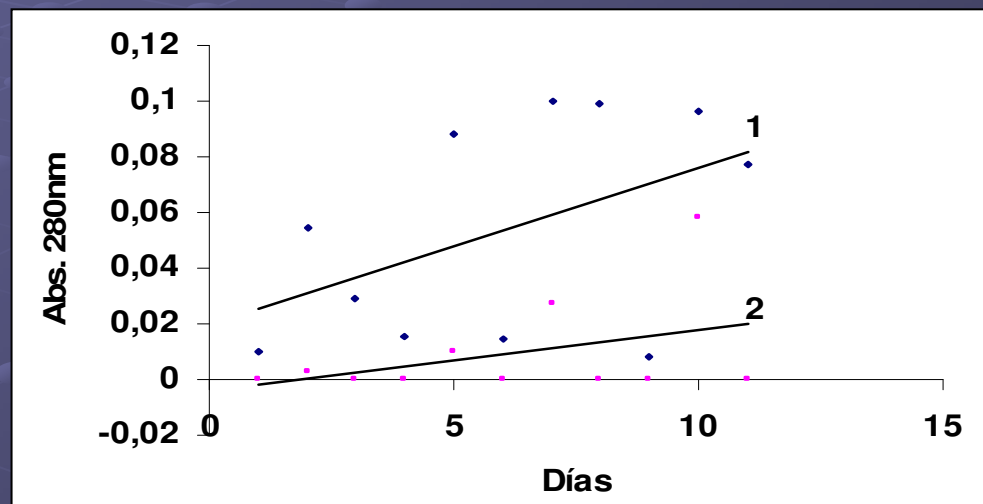


Gráfico 3: absorbancia a 280nm del sobrenadante de microesferas PFA-BSA- pH 9. 1: a 4°C. 2: a 37°C.

- Permanencia de Limoneno en microesferas de quitosano con glutaraldehído a diferentes PH

Gráfico 4: absorbancia a 325nm del sobrenadante de microesferas Glutaraldehído –Limoneno - pH 3. 1: a 37°C. 2: a 4°C.

día	pH 3; 4°C Abs.325	pH 3; 37°C Abs.325
1	0,9588	0,9734
2	1,0551	1,0953
3	0,8668	0,9095
4	0,8725	0,9232
5	0,8494	0,8796
6	0,8189	0,9135
7	0,7608	0,8656
8	0,7286	0,8305
9	0,7514	0,9189
10	0,706	0,8388
11	0,6758	0,9092

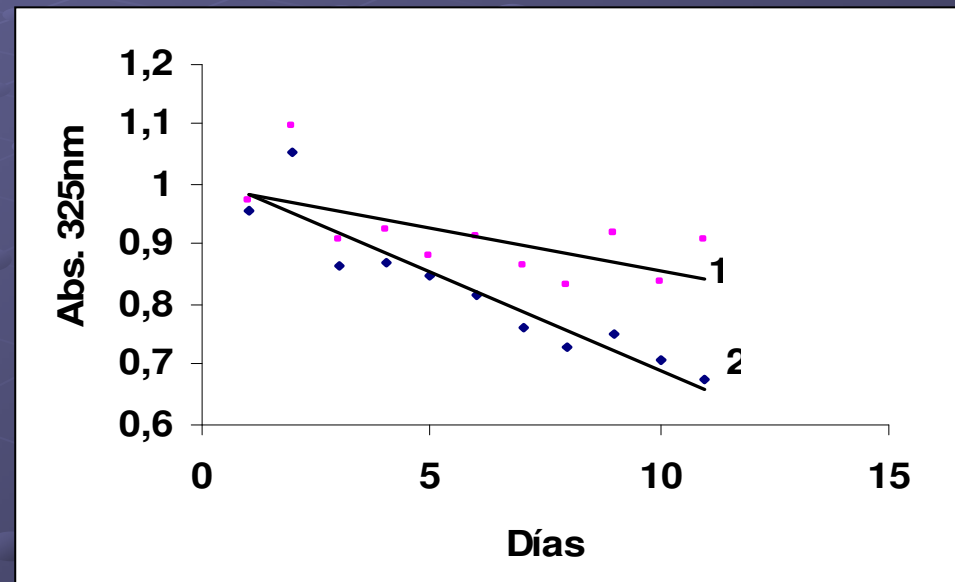


Gráfico 4: absorbancia a 325nm del sobrenadante de microesferas Glutaraldehído –Limoneno - pH 3. 1: a 37°C. 2: a 4°C.

## - Permanencia de Limoneno en microesferas de quitosano con glutaraldehído a diferentes PH

Tabla 5: absorbancia a 325nm del sobrenadante de microesferas de glutaraldehído-Limoneno - pH 5-6. 1: a 37°C. 2: a 4°C.

	pH 5-6; 4°C	pH 5-6 ; 37°C
día	Abs.325	Abs.325
1	0,8102	0,9535
2	0,9017	1,1741
3	0,8406	0,9518
4	0,822	0,9317
5	0,8862	0,911
6	0,8274	0,9306
7	0,807	0,8994
8	0,8013	0,8499
9	0,8711	0,831
10	0,8652	0,8812
11	0,8611	0,8488

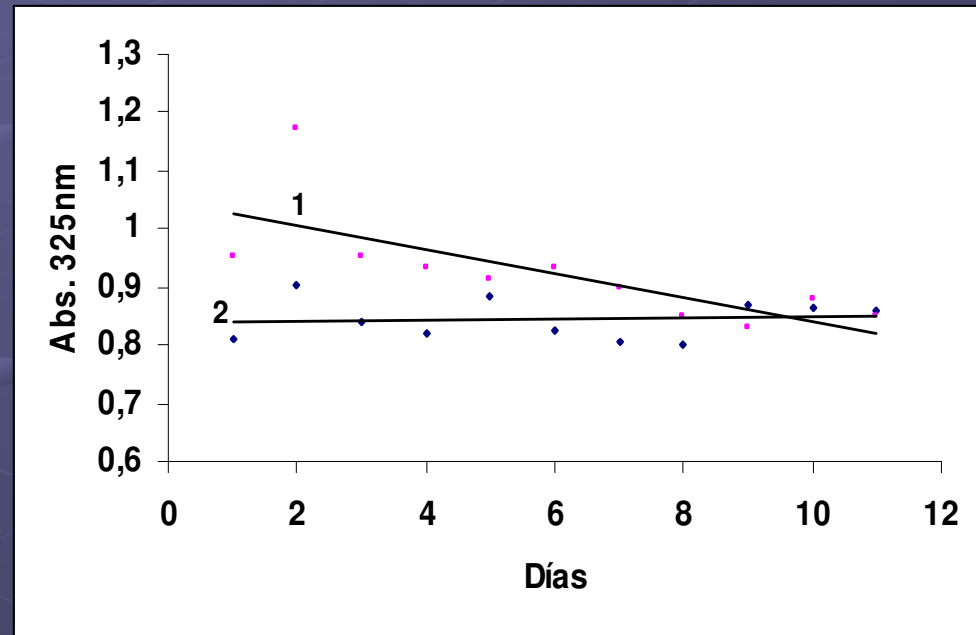


Gráfico 5: absorbancia a 325nm del sobrenadante de microesferas de glutaraldehído-Limoneno - pH 5-6. 1: a 37°C. 2: a 4°C.

- Permanencia de Limoneno en microesferas de quitosano con glutaraldehído a diferentes PH

Tabla 6: absorbancia a 325nm del sobrenadante de microesferas glutaraldehído- Limoneno- pH 9. 1: a 37°C. 2: a 4°C.

	pH 9; 4°C	pH 9 ; 37°C
día	Abs.325	Abs.325
1	0,9787	1,1365
2	0,9978	1,2251
3	0,9439	0,999
4	0,7727	1,0119
5	0,8471	0,9502
6	0,837	1,0082
7	0,7673	0,9323
8	0,7831	0,9158
9	0,8978	0,8993
10	0,8591	0,8918
11	0,823	0,7918

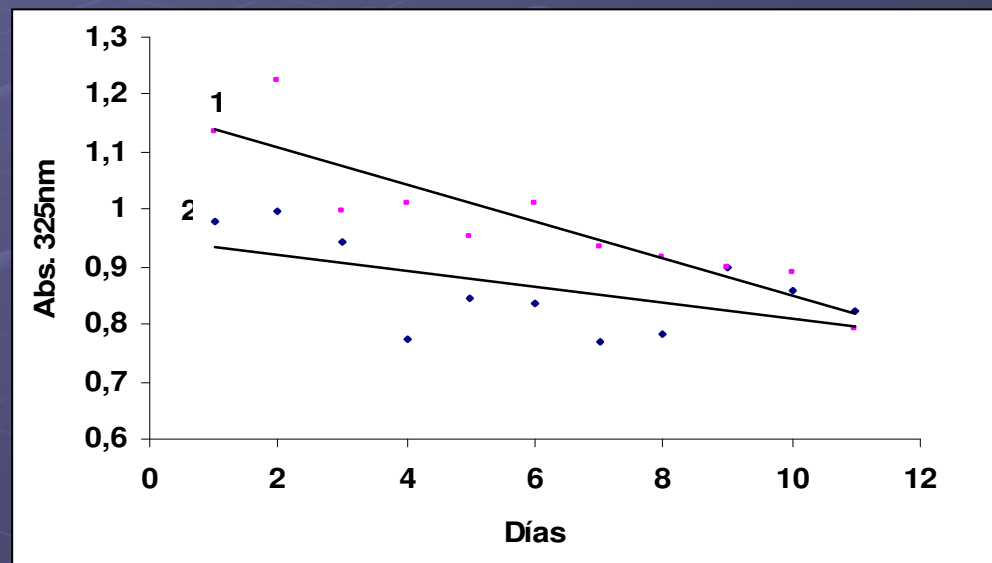


Gráfico 6: absorbancia a 325nm del sobrenadante de microesferas glutaraldehído- Limoneno- pH 9. 1: a 37°C. 2: a 4°C.



## Discusión y conclusiones

- Las micoesferas presentes a pH 3 y 5-6 muestran mayor estabilidad que las micoesferas con BSA a pH básico (pH 9).
- Se observa un mayor aumento de absorbancia a 4°C para las muestras a pH 9 que para las muestras almacenadas a pH 3, viéndose en ésta última un mayor aumento de la absorbancia a 37°C que a 4°C.
- Se observa una disminución progresiva de la absorbancia a pH 3 y 9, a temperatura 4 y 37°C, siendo menor la a pH 5-6 para la muestra que se almacenó a 37°C.
- La muestra que presentaba micoesferas con Limoneno a pH 5-6 y que fue almacenada a 4°C presentó una mayor estabilidad y la absorbancia se mantuvo constante.
- Actualmente se están realizando las medidas de absorbancia a 260nm de las micoesferas preparadas con glutaraldehído - ADN plasmídico, a diferentes pH; 3, 7 y 9, para el posterior análisis de permanencia en las micoesferas.

## Discusión y conclusiones

- De los resultados obtenidos en estos primeros ensayos podemos concluir que se obtuvieron microesferas de quitosano y microcápsulas de poliuretano de entre 2 y 20 micras, promediando las 12 micras.
- Los resultados obtenidos muestran que hubo una buena incorporación de los materiales biológicos testeados por parte de las microesferas.
- En lo que respecta a la liberaciones heterogénea, depende del material microencapsulado.
- El uso de biopolímeros para estos fines parece ser muy adecuado por sus propiedades y su biocompatibilidad, lo cual le da importancia para su uso en humanos. En futuros trabajos se tomará un tipo de asociación microesfera–bioactivo, y se estudiará en profundidad su comportamiento.