

IX Simposio Argentino de Polímeros

SAP 2011

PROCEEDINGS

15-18 de Noviembre, Bahía Blanca



ÍNDICE DE TRABAJOS

Desarrollo y Caracterización de Películas Biodegradables a Base de Almidón de Maíz Nativo y Acetilado Obtenidas por Extrusión y Soplado O.V. López, N.E. Zaritzky, M.A. García	<u>1</u>
Entrecruzamiento Fotoinducido en Copolímeros Basados en Timina. Análisis Quimiométrico S.A. Bortolato, A.L. Barbarini, R.M. Benítez, D.A. Estenoz, D.M. Martino	<u>7</u>
Emulsion Polymerization of Methyl Methacrylate with Iso-Octyl-3-Mercaptopropionate as Chain Transfer Agent L.I. Ronco, R.J. Minari, L. Cian, J.R. Vega, L.M. Gugliotta	<u>12</u>
Estudo da Influência da Razão de Sopro na Estrutura e Propriedades de Filmes Tubulares de PEBD N. Giroto, R.L.R. Ferreira, C.A. Salles, R.C. Santana	<u>18</u>
Evaluation of Paint with Infrared Reflective Pigments E. Coser, C.A. Ferreira, I.H. Grochou, W.M. Sousa	<u>23</u>
Use of Carboxymethylcellulose as Release Modifier of a Medicinal Plant Extract L.C. Gallo, J. Piña, V. Bucalá, D. Allemandi, V. Ramirez Rigo	<u>27</u>
Blendas e Compósitos com Biomassa Fúngica Baseados em Termoplástico de Amido de Mandioca A. Ketzer, C.M. Mählmann, A.L. Rodríguez	<u>32</u>
Problemas de Estabilidad como Limitantes del Modelado de Reactores de Lecho Fluidizado para la Producción de Poliolefinas R.A. Bortolozzi, M.G. Chiovetta	<u>37</u>
Despolimerização por Etileno Glicol e/ou Dietileno Glicol de Poli (Tereftalato de Etileno) T.T. De Moraes, C.M. Mählmann, A.L. Rodríguez	<u>42</u>
Evaluation of Physical Properties of Composites of HDPE and Recycled Eucalyptus Powdered with Different Compatibilizing Agents A.L. Catto, R.M.C. Santana	<u>47</u>
Evaluation of Coupling Agent in Load/Matrix Interaction: Mechanical and Morphological Properties A.L. Catto, R.M.C. Santana	<u>53</u>

Propiedades Mecánicas de Materiales Compuestos Polipropileno/Talco: Efecto de la Morfología de las Partículas L.A. Castillo, S.E. Barbosa, N.J. Capiati	<u>190</u>
Estudio Teórico-Experimental del Dewetting de Films de Poliestireno M.L. Freije, N.A. García, A.D. Pezzutti, D.A. Vega	<u>195</u>
Copolímeros Confinados: Dinámica y Equilibrio A.D. Pezzutti, D.A. Vega, M.A. Villar	<u>201</u>
Evaluación de Propiedades Mecánicas y Permeabilidades a Oxígeno y Vapor de Agua de Películas PLA/PPG M. Leobono, C. Frova, R.M. Zacur, G. Goizueta, D. Ercoli	<u>205</u>
Análisis del Comportamiento en el Tiempo de Películas PLA/PPG M. Leobono, R.M. Zacur, D. Ercoli, G. Goizueta	<u>208</u>
Desarrollo de Películas Activas de Polietileno con Injerto Superficial de Ácido Benzoico A.L. Grafía, S.E. Barbosa	<u>212</u>
Analysis of Intralaminar Hybrid Curaua/Glass Composite J.H.S.A. Júnior, C.C. Angrizani, F.D.R. Amado, S.C. Amico	<u>218</u>
Simulación de Propiedades Medias de Copolímeros de Estireno y α -Metil Estireno Sintetizados por NMP C. Fortunatti, C. Sarmoria, A. Brandolin, M. Asteasuain	<u>222</u>
Recubrimiento de Películas de Polietileno con Partículas Minerales. Análisis de la Eficiencia por SEM-EDX A.L. Grafía, S.E. Barbosa, M.J. Yáñez	<u>228</u>
Novel Hyaluronan-Itaconic Acid-Glutaraldehyde Crosslinked Biofilms J.A. Calles, J.A. Ressia, J.M. Llabot, S.D. Palma, E.M. Vallés	<u>235</u>
Estudio Reológico en Complejos Carbomer-Ciprofloxacino-Sodio como Sistema de Liberación de Fármacos M.L. Chanampa, J.A. Ressia, A.F. Jimenez-Kairuz, E.M. Vallés	<u>239</u>
Producción de "Carriers" Biocompatibles para Aplicaciones en la Industria Farmacéutica A. Olivera, M. Lopretti, F. Barreiro	<u>243</u>
Predicción de Temperatura de Transición Vítrea de Polímeros de Alto Peso Molecular. Nuevo Enfoque en la Generación de Descriptores D. Palomba, G.E. Vázquez, M.F. Díaz	<u>247</u>
Influencia del PVA en MMT Sobre las Propiedades de Superficie de Nanocompuestos de HDPE /MMT _{HDTMA} /PVA M.C. Carrera, E. Erdmann, H.A. Destéfani	<u>253</u>
Funcionalização Superficial Seletiva de Polibutadieno por Excitação de Camada Interna e Exposição a Atmosfera Gasosa Reativa F. Kessler, R. Ramanathan, D.E. Weibel	<u>257</u>

PRODUCCION DE "CARRIERS" BIOCOMPATIBLES PARA APLICACIONES EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

A. OLIVERA†, M. LOPRETTI†, and F. BARREIRO‡

† Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo - Uruguay.

‡ LSRE, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia Ap 1134, 5301-857 Bragança
alvarobq@fcien.edu.uy ; mlopretti@gamail.com ; barreiro@ipb.pt

Resumen

En este trabajo se desarrollaron microesferas de quitosano cargadas con BSA y ADN como prototipos, con el objetivo de estudiar el comportamiento de estos sistemas para la microencapsulación de fármacos y bioactivos. La metodología empleada nos permitió obtener información estructural de estos micro-vehículos, datos sobre la distribución de tamaños por población, sobre la resistencia a bajos valores de pH y estudiar los perfiles de descarga.

Introducción

El quitosano, β -1-4 2-amino-2-deoxi-D-glucosa o D-glucosamina es un polisacárido con excelentes propiedades biológicas. La carga positiva que se produce en medio ácido como resultado de la protonación del grupo amino presente en cada unidad glucosamina, le confiere solubilidad en medio acuoso y es motivo de su actividad biocida (Lárez Velásquez, 2008). Este polímero biocompatible y biodegradable encuentra diversas aplicaciones en el área biomédica como vehículo para la entrega y descarga controlada de fármacos (Agnihotri et al., 2004) (Kato et al., 2003). Estos sistemas son utilizados para distribuir o transportar drogas dentro del organismo, orientados a un órgano, tejido, o grupo de células, permitiendo programar un perfil de descarga del componente microencapsulado, mientras llevan "a salvo" el agente terapéutico para alcanzar una concentración efectiva en el sitio de acción específico. Pueden cargar varios componentes activos, beneficiando la distribución, la retención en el organismo, o incrementando la eficacia del tratamiento mientras suprimen los mecanismos sistémicos o celulares que pueden limitar la respuesta terapéutica de la droga. La presencia de grupos amino facilita la unión de distintos componentes permitiendo la funcionalización de los microvehículos.

La adaptación de esta tecnología a la administración de ácidos nucleicos, tiene la capacidad de superar las barreras extracelulares que limitan la terapia génica. La descarga controlada puede mantener concentraciones elevadas de ADN en el microambiente celular, incrementando así la efectividad del tratamiento. Aunque los vectores virales son utilizados para estos fines, existen riesgos concernientes a la seguridad en su empleo, ejemplos de esto son la recombinación aleatoria y la inducción de una respuesta inmune, encontrando trabas frente a las normas que rigen su utilización en la industria farmacéutica. Si bien existen

otros vectores no virales como la poli-L-lisina, tales sistemas descargan su contenido de forma concertada, lo que resulta en periodos cortos de expresión génica y la necesidad de repetir la administración del fármaco (Aral y Akbuga, 2003). Se ha reportado que plásmidos microencapsulados en quitosano, inducen una muy alta actividad proteica en periodos de 12 semanas post transfección (Kato et al., 2003).

El objetivo de este trabajo se centró en estudiar la compatibilidad y el comportamiento de proteínas y ADN con este tipo de matriz, con la meta de lograr la inserción de estos sistemas en el sector productivo. La metodología y técnicas de análisis empleadas, nos permitieron estudiar la distribución de tamaños por población durante la preparación de estos sistemas, calcular el porcentaje de liberación y determinar la cinética de descarga.

Materiales y Métodos

Producción de microesferas de quitosano

En este trabajo se puso a punto la técnica de entrecruzamiento con glutaraldehído reportada por Thanoo, et al. (1992) (en: Dhawan et al., 2004) con algunas modificaciones. La misma se basa en la formación de una emulsión agua en aceite con la posterior adición de un agente entrecruzante que coagula las microgotas formadas por la fase dispersada. En condiciones de agitación constante a 1100 rpm, se agregó la fase dispersa por goteo lento a una tasa de 5 mL/minuto. Luego se adicionó por goteo, glutaraldehído 25% acuoso grado técnico (Droguería Industrial Saxonn S.A.), en 4 aplicaciones a los 15, 30, 45 y 60 minutos. Se mantuvo bajo las mismas condiciones de agitación por 2.5 horas. Una vez finalizado este proceso, se dejó decantar por 24 horas a temperatura ambiente. Para la

recolección de las microesferas se empleó un sistema de filtración con bomba de vacío. Se utilizó un Kitasato de vidrio y embudo Büchner de porcelana con filtro de 0.8 μm (Gelman Sciences). Se descartó el sobrenadante y se realizaron sucesivos lavados con éter de petróleo. A continuación se realizaron lavados con agua bidestilada Milli-Q para retirar restos del entrecruzante, finalizando nuevamente con éter de petróleo. Se dejaron secar a temperatura ambiente

Preparación de la fase dispersa

Se disolvió quitosano al 2.0% (peso/vol) en ácido acético al 5% acuoso (a partir de ácido acético glacial Merck) en agitación continua durante 24 horas en un agitador magnético Ika Werk. La solución se filtró con bomba de vacío durante 24 horas utilizando un filtro MN 640 w Macherey-Nagel.

Preparación de la fase continua

Se mezclaron en un matraz Erlenmeyer, aceite de girasol y Span 80 al 0.5% (peso/vol) como tensoactivo.

Microencapsulación de ADN

Se agregaron 100 μg de ADN de timo de vaca diluidos en 100 μL de agua Milli-Q a 3.0 mL de quitosano 2% (peso/vol) (peso molecular medio, Aldrich Chemistry) disuelto en ácido acético glacial 5% en agua Milli-Q. Se dio vortex. Se procedió con el protocolo descrito anteriormente.

Microencapsulación de proteínas

Se mezclaron 0.3 mL de BSA 10% en agua Milli-Q con 3.0 mL de quitosano 2% en ácido acético 5% acuoso. Se dio vortex. Se procedió con el protocolo descrito anteriormente.

Para la BSA marcada, se disolvieron 30 mg de BSA marcada con FITC en 3.6 mL de la fase dispersa. Se procedió con el protocolo descrito anteriormente siguiendo algunas modificaciones. Se sustituyó el glutaraldehído por una solución acuosa de paraformaldehído al 30% (J.T. Baker) y se mantuvo todo el proceso en condiciones de oscuridad.

Ensayos de liberación

Se siguió un procedimiento basado en los ensayos de Dini et al. 2003. Se pesaron 50 mg de microesferas cargadas con BSA y 50 mg cargadas con ADN.

Se prepararon 2 batches por separado, resuspendiendo las esferas cargadas con BSA y ADN en 15 mL de buffer fosfato pH 7.4. Se agitaron vigorosamente de forma manual y se retiraron 1.0 ml de cada batch, se centrifugaron durante 20 segundos en una minifuga Beckman Microfuge E. Cada sobrenadante se colocó en cubetas de cuarzo y se midió la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro Varian Cary 50 Tablet UV-Visible Spectrophotometer a 260 nm para el ADN y a 280 nm para la BSA. Esta primer medición se tomó como tiempo 0. Luego de cada medida se

devolvieron las muestras a sus batches originales, los cuales se mantuvieron en agitación constante a 80 rpm en un agitador orbital Labnet Intenational, Inc.Orbit 1000. De esta forma se obtuvieron los datos del total acumulado de sustancia liberada por las microesferas en suspensión. Este procedimiento se repitió cada 10 minutos para obtener datos cinéticos de liberación a corto plazo.

Pruebas de resistencia en medio ácido

Se sometieron microesferas con ácido clorhídrico 10% durante 40 días.

Técnicas de evaluación de los resultados obtenidos

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se procesaron muestras metalizando a vacío con oro-paladio. Se observaron en un microscopio JEOL JSM-5900 LV a una aceleración de voltaje de 20kV en la Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias – UdelaR. Las esferas tratadas en medio ácido y sus controles a pH neutro, se cubrieron con oro/paladio durante 4.5 min en un ION SPUTTER JFC-100 y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6390 del Colegio de Posgraduados (COLPOS), Campus Montecillo, Estado de México – México.

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Se fijaron las muestras con tetróxido de osmio 1% (EMS) en agua Milli-Q, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y acetona. Se infiltraron las muestras con resina epoxi de baja viscosidad (Durcupan, Fluka) y se armaron bloques por inclusión en plano en moldes de silicona.

Se seccionó ultrafino en un ultramicrotomo marca RMC MT-X, se montaron los cortes en grillas de cobre con film de soporte de formvar y se contrastó con acetato de uranio y citrato de plomo. Se observó y capturaron imágenes en un microscopio JEOL JEM-1010 a una aceleración de voltaje de 80kV, con cámara digital acoplada HAMAMATSU DIGITAL CAMERA CCD 4742-95 y software de control AMT ADVANTAGE.

Citometría del Flujo

Se resuspendieron esferas en agua Milli-Q sometiendo estas a vortex y sonicador. Se centrifugó, se obtuvo el sobrenadante y se llevó al citómetro FACSVantage – BD del Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo (SECIF) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Para la clasificación de tamaño por poblaciones, se utilizaron esferas estándar de 6 y 12 μm .

Resultados y discusión

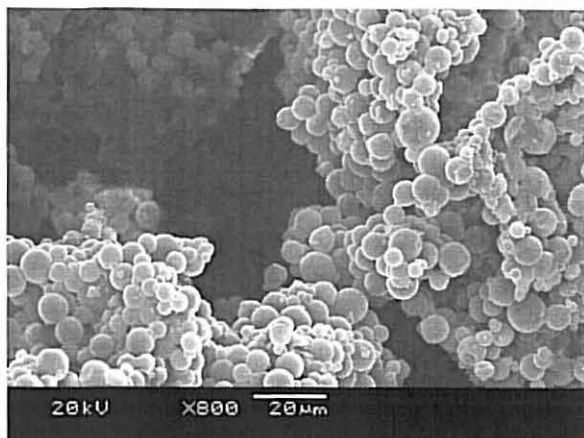
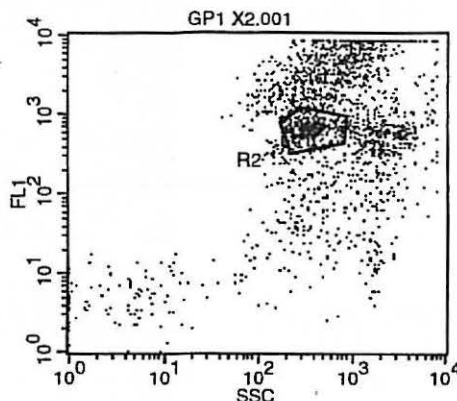


Fig. 1. Micrografía SEM mostrando microesferas de quitosano cargadas con ADN.

Se obtuvieron microesferas entre 1y 20 micras de diámetro (Fig. 1), destacando una población del 45% entre las 6 y 12 micras según los datos aportados por la citometría de flujo (Fig. 2). Los ensayos de liberación y datos cinéticos (Fig. 4 y 5) sobre una producción de 50.0 mg de microesferas cargadas para cada componente, muestran una buena eficiencia de incorporación de los materiales prototipo así como la liberación de casi la totalidad de los mismos en el lapso de tiempo ensayado.



Region Statistics

File: GP1/X2.001 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: GP1 X2 Patient ID: GP1 X2
 Tube: Panel:
 Acquisition Date: 6-Jan-4 Gate: No Gate
 Gated Events: 2000 Total Events: 2000
 X Parameter: FSC (Linear) Y Parameter: FL1 (Log)

Region	Events	X Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
R1	885	308.56	2127.97	970.86	1, 3
R2	355	304.77	639.42	622.64	2, 3

Fig. 2. Se muestran las medidas de citometría de flujo, donde cada punto de la grafica corresponde a un evento, es decir, el pasaje de una partícula o "cluster" de ellas frente al detector. La región R1 presenta el total de eventos y la región R2 delimita una nube con alta densidad de eventos.

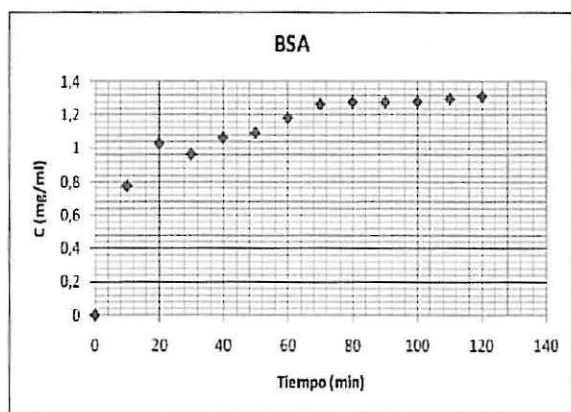


Fig. 3. Perfil de liberación de la BSA microencapsulada

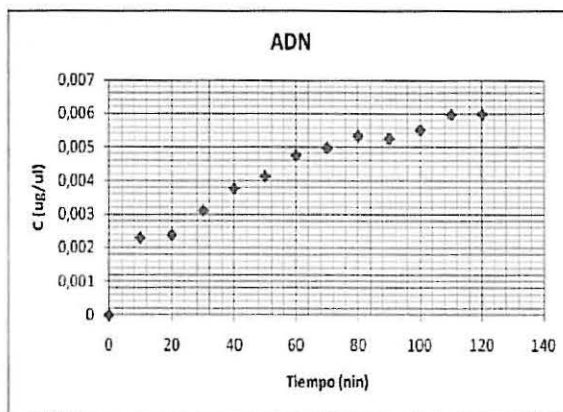
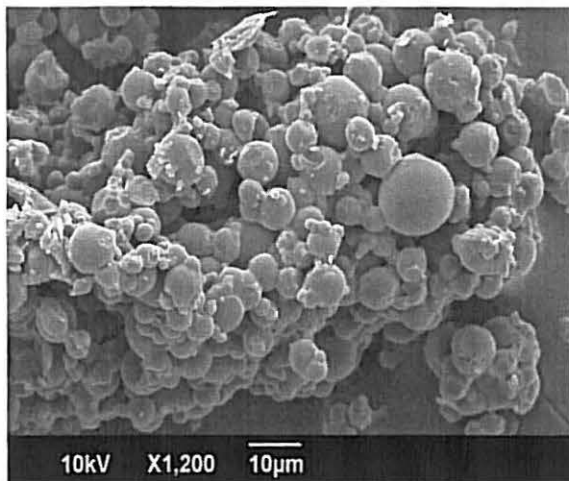


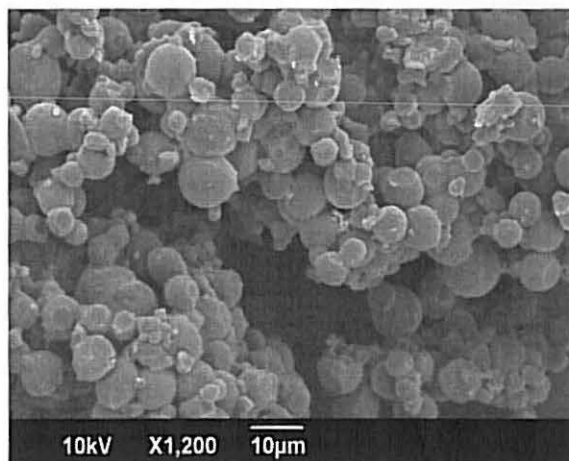
Fig. 4. Perfil de liberación del ADN microencapsulado

La Microscopía Electrónica de Transmisión no nos aportó datos relevantes sobre estructura interna y distribución de carga para estos *carriers*.

El tratamiento en medio ácido mostró la gran resistencia que presentan estos *carriers* a pH bajos, no presentando mayores diferencias estructurales entre las esferas incubadas en ácido clorhídrico y las incubadas en agua destilada a pH neutro (Fig. 8).



Micrografía 1



Micrografía 2

Fig. 5 La micrografía 1 muestra las esferas tratadas con HCl 10% durante 40 días; 2 muestra las esferas control incubadas en agua destilada a pH neutro.

Conclusiones

Se mostró que estos sistemas son compatibles con compuestos de interés en tratamientos médicos (hormonas, biofármacos, etc.). La resistencia que presentan estos *carriers* a bajos valores de pH, permite mantener a salvo el componente microencapsulado

durante su tránsito por el tracto digestivo. El empleo de un polímero con actividad biocida incrementa la protección de los bioactivos. Las características de retención de estas matrices, permiten obtener nuevamente en forma libre todo el agente microencapsulado, posibilitando así la programación de dosis de acción terapéutica. La conjunción de estas propiedades viabilizan su desarrollo y aplicación en la industria farmacéutica.

Si bien este tipo de encapsulación biocompatible permite obtener una liberación gradual del bioactivo en un organismo vivo, fue nuestro objetivo controlarlo en tiempos no muy prolongados, con el fin de estudiar el comportamiento del sistema prototipo. En futuros trabajos, basados en estos resultados, se ensayará la liberación de bioactivos específicos en sus sitios de acción.

Referencias

Cenk Aral, Julide Akbuga, Preparation and *in vitro* transfection efficiency of chitosan microspheres containing plasmid DNA:poly(L-lysine) complexes. *J. Pharm Pharmaceut Sci* 6,(3) 321-326(2003).

Cristóbal Lárez Velásquez, Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *UDO Agrícola* 8, (1) 1-22(2008).

E. Dini, S. Alexandridou, C. Kiparissides, Synthesis and characterization of cross-linked chitosan microspheres for drug delivery applications. *J. Microencapsulation* 20 (3) (2003) 375-385.

Sanju Dhawan, Anil Kumar Singla, Vivek Ranjan Sinha, Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods. *AAPS PharmSciTech* 5, (4) Article 67(2004).

Sunil A. Agnihotri, Nadagouda N. Mallikarjuna, Tejraj M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based-micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Controlled Release* 100 (2004) 5-28.

V. Levi, F.L. Gonzalez Flecha, Reversible fast-dimerization of bovine serum albumin detected by fluorescence resonance energy transfer. *Biochim Biophys Acta* 1599 (1-2) (2002) 141-8.

Yoshinori Kato, Hiraku Onishi, Yoshiharu Machida, Application of Chitin and Chitosan Derivatives in the Pharmaceutical Field. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 4, 303-309(2003).

IX Simposio Argentino de Polímeros

SAP 2011

PROGRAMA

15-18 de Noviembre, Bahía Blanca



Miércoles 16

Auditorio Mayor**Auditorio Menor***Moderador R.J.J. Williams*

9:00 9:40 CP-2 Waterborne Polymer/Montmorillonite Hybrid Latexes: From Latex Morphology to Properties
Jose Ramon Leiza

9:45 10:25 CP-3 Processing of thermoplastic composite materials with special reference to consolidation and impregnation phenomena

Alfonso Maffezzoli

10:20 10:50 Intervalo - Café

*Moderador M.C. Strumia**Moderador G.R. Meira*

10:50 11:20 CI-1 Multifunctional dendritic polyglycerols in nanomedicine

CI-2 Progress in liquid chromatography of synthetic polymers

*Marcelo Calderón**Dusan Berek*

11:25 11:40 T-163 Producción de "carriers" biocompatibles para aplicaciones en la industria farmacéutica

T-050 Structure and dynamics of a polymer melt at adsorbing surfaces

*Álvaro D. Olivera, Mary Lopretti, Filomena Barreiro**Andrés De Virgiliis, Andrey Milchev, V. G. Rostyshvili, T. A. Vilgis*

11:40 11:55 T-085 Rutas sustentables para la esterificación de celulosa en fase sólida: catálisis enzimática y organocatálisis

T-012 Estimación de tamaños de partículas de composición desconocida por dispersión de luz estática

*Ma. Laura Foresti, F. Allevatto, Analía Vázquez**Luis A. Clementi, Jorge R. Vega, Luis M. Gugliotta*

11:55 12:10 T-167 Biodegradation study of lignin-based rigid polyurethane foams

T-043 Synthesis of waterborne acrylic-casein nanoparticles

*Mary Lopretti, Carolina A. Cateto, Ma. Filomena Barreiro, C. Ottati, A. E. Rodrigues, M. N. Belgacem**Nicolás Figueroa, Matías L. Picchio, Roque J. Minari, V. D. González, Mario C. G. Passeggi(h), Jorge R. Vega, Ma. Jesús Barandiaran, Luis M. Gugliotta*

12:10 14:30 Almuerzo
