



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DISEÑO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADO EN PUERTAS MOLECULARES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA
SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: DAVID HERNÁNDEZ

TUTOR ACADÉMICO: ÉDGAR PÉREZ ESTEVE
JOSÉ MANUEL BARAT BAVIERA

TUTOR EXPERIMENTAL: MARÍA RUIZ RICO
AMIRA FERNÁNDEZ RAMOS

Curso Académico:2018-2019

VALENCIA, febrero 2019

DISEÑO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA BASADO EN PUERTAS MOLECULARES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

David Hernández Rosas¹, Amira Fernández¹, María Ruiz Rico¹, José Manuel Barat¹, Édgar Pérez-Esteve¹

RESUMEN

Las partículas de sílice mesoporosa presentan hoy en día un gran número de aplicaciones en el mundo de la nanotecnología, siendo el desarrollo de nuevos sistemas de encapsulación y liberación controlada uno de los principales focos de interés. Los sistemas de encapsulación basados en sílice mesoporosa poseen varios componentes: el soporte poroso inorgánico, el compuesto bioactivo encapsulado y la puerta molecular, la cual permite la liberación sostenida y controlada. El objetivo de este trabajo es desarrollar un sistema liberación controlada en el cual la molécula anclada sobre la superficie, además de actuar como puerta molecular, presente actividad antimicrobiana. Para ello, se han empleado partículas mesoporosas de óxido de silicio MCM-41 cargadas con Rodamina B como molécula encapsulada y quitosano de alto y bajo peso molecular como puerta molecular. Para comprobar las propiedades antimicrobianas del quitosano libre y anclado sobre la superficie de las partículas MCM-41, se llevaron a cabo ensayos de susceptibilidad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*. Los resultados demuestran que el quitosano tiene la capacidad de inhibir la liberación de la Rodamina B a pH ácido y liberarla a pH neutro, demostrando la capacidad del quitosano para actuar como puerta molecular de estímulo pH. Además, los ensayos microbiológicos realizados demuestran que incluso anclado a las partículas, el quitosano posee cierta actividad antimicrobiana. Por tanto, se confirma que el quitosano podría utilizarse en el desarrollo de un sistema de liberación controlada con doble función antimicrobiana ejercida tanto por el cargo como por la puerta molecular.

Palabras clave: encapsulación, mesoporoso, bioactivo, puerta molecular, MCM-41, antimicrobiano, pH, quitosano.

¹ Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, Valencia, España.

ABSTRACT

Nowadays mesoporous silica particles present a large number of applications in the world of nanotechnology, being the development of new encapsulation and controlled release systems one of the main focuses of interest. Mesoporous silica-based encapsulation systems have several components: the inorganic porous support, the encapsulated bioactive compound and the molecular gate, which allows a sustained and controlled release. The objective of this work was to develop a controlled release system in which the molecule anchored on the surface, in addition to act as a molecular gate, presents antimicrobial activity. To this end, mesoporous silica particles MCM-41 loaded with rhodamine B as an encapsulated molecule and chitosan as a molecular gate. The results show that chitosan has the ability to inhibit the release of rhodamine B at acidic pH and release it at neutral pH, demonstrating the ability of chitosan to act as a pH-responsive molecular gate. In addition, the displayed microbiological tests show that chitosan has some antimicrobial activity test against *Escherichia coli*, even anchored to the particles. Therefore, it is confirmed that chitosan could be used in the development of a controlled release system with dual antimicrobial function exerted by both the cargo and the molecular gate.

Keywords: encapsulation, mesoporous, bioactive, functional, porta molecular, MCM-41, antimicrobial, pH, chitosan.

RESUM

Les partícules de sílice mesoporosa presenten avui dia un gran nombre d'aplicacions en el món de la nanotecnologia, sent el desenvolupament de nous sistemes d'encapsulació i alliberament controlat un dels principals focus d'interès. Els sistemes d'encapsulació basats en sílice mesoporosa posseeixen diversos components: el suport porós inorgànic, el compost bioactiu encapsulat i la porta molecular, la qual permet l'alliberament sostingut i controlat. L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un sistema d'alliberament controlat en el qual la molècula ancorada sobre la superfície, a més d'actuar com a porta molecular, presente activitat antimicrobiana. Per a això s'han emprat partícules mesoporoses d'òxid de silici MCM-41 carregades amb Rodamina B com a molècula encapsulada i quitosà com a porta molecular. Els resultats demostren que el quitosà té la capacitat d'inhibir l'alliberament de la Rodamina B a pH àcid i alliberar-la a pH neutre, demostrant la capacitat del quitosà per actuar com a porta molecular d'estímul pH. A més, els assajos microbiològics realitzats demostren que fins i tot ancorat a les partícules, el quitosà posseeix certa activitat antimicrobiana enfront d'*Escherichia coli*. Per tant, es confirma que el quitosà podria utilitzar-se en el desenvolupament d'un sistema d'alliberament controlat amb doble funció antimicrobiana exercida tant pel càrrec com per la porta molecular.

Paraules clau: encapsulació, mesoporós, bioactiu, funcional, molecular gate, MCM-41, antimicrobià, pH, quitosà.

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos antimicrobianos son sustancias químicas capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos cuando estos están presentes en los alimentos, envases alimentarios (superficies que entran en contacto con el alimento o en el ambiente que rodea dicho alimento). El uso de antimicrobianos químicos para evitar el desarrollo de estos microorganismos puede resultar finalmente en el desarrollo de cepas resistentes, haciendo imposible que el tratamiento resulte efectivo. Además, los consumidores están concienciados a cerca de las posibles repercusiones negativas para la salud que conlleva el uso de dichos aditivos químicos, por lo que aumenta la demanda de alternativas naturales, inocuas para la salud del consumidor. En tal sentido, se presentan como alternativa viable las sustancias biológicamente activas que presentan actividad antimicrobiana natural (Ruiz-Rico et al., 2015).

Uno de los principales inconvenientes que surgen cuando se trabaja con sustancias biológicamente activas, como pueden ser aceites esenciales con función antimicrobiana, es su sensibilidad a las condiciones del medio. Además, son altamente volátiles y poseen un aroma muy intenso y penetrante. Estas características imposibilitan que puedan ser utilizados directamente sobre el alimento en muchas aplicaciones, por lo que se hace necesario recurrir al proceso de encapsulación en una matriz adecuada para así controlar la volatilidad, mejorar su estabilidad y reducir el aroma (Nieto et al., 2011).

La encapsulación es el proceso por el cual el componente bioactivo seleccionado se encierra dentro de una estructura. Este proceso permite el desarrollo de alimentos con mejores propiedades sensoriales, aumentando la retención de los sabores; reteniendo malos olores de componentes bioactivos, como los aceites de pescado, que mejoran las propiedades nutricionales del alimento pero que, debido a dichos malos olores, no resultaría viable su adición por otros métodos; incrementando la biodisponibilidad de algunos nutrientes; o previniendo el deterioro microbiano de los alimentos envasados (Pérez-Esteve et al., 2017; Avalos et al., 2016).

Para la encapsulación, una de las posibles soluciones es recurrir a la nanotecnología. La nanotecnología se define como la “tecnología de los materiales y de las estructuras en la que el orden de magnitud se mide en nanómetros, con aplicación a la física, la química y la biología” (R.A.E, mayo 2019). Se trata de una ciencia por lo tanto multidisciplinar, con gran auge hoy en día, que aporta nuevas propiedades de gran interés, tanto en las operaciones de procesado como para los productos finales.

Por lo general, los nanomateriales utilizados en el ámbito alimentario para encapsular se dividen en 3 grupos: los nanomateriales orgánicos, los inorgánicos, y los nanomateriales híbridos orgánico-inorgánico.

El proceso de encapsulación tradicional en tecnología de alimentos tiene como base la utilización de sistemas orgánicos: carbohidratos, lípidos o proteínas. Cada uno de estos sistemas presenta una serie de ventajas asociadas incluyendo su baja toxicidad, por lo que se les considera materiales seguros, eficaces para la encapsulación. Sin embargo, estos

sistemas tradicionales presentan algunas desventajas, como su baja estabilidad estructural durante el procesado y el almacenamiento del alimento, la baja capacidad para controlar la velocidad de liberación o la baja protección que presenta la sustancia encapsulada a su paso por el estómago (Avalos et al., 2016).

En respuesta a dichas limitaciones, se han desarrollado sistemas alternativos para los procesos de encapsulación, como son las partículas de sílice mesoporosa. Dichas partículas, tienen una gran capacidad de carga, una capacidad mucho mayor de protección frente a la degradación de la sustancia encapsulada que los sistemas tradicionales, y además puede conseguirse una liberación dirigida ante un estímulo determinado.

Además, son materiales que presentan una elevada biocompatibilidad, comparten el bajo grado de toxicidad con los sistemas tradicionales, y presentan una elevada adaptabilidad sintética, es decir, se puede controlar el tamaño de partícula, su porosidad y su forma. Por todo ello, las partículas de sílice mesoporosa se presentan como una de las principales vías de trabajo en los procesos de encapsulación (Linás et al., 2013).

Otra de las características de las partículas mesoporosas de óxido de silicio es su facilidad para anclar moléculas orgánicas a su superficie. Estas moléculas orgánicas permiten el acceso al contenido del interior de los poros del material mesoporoso de forma selectiva, solo en respuesta a determinados estímulos específicos. Por este motivo se las conoce como puertas moleculares (Casasús, 2009). De esta manera se puede controlar, en función del tipo de puerta utilizada y de las condiciones del medio, la liberación del contenido que retiene en su interior a voluntad. En la figura 1 se presenta un ejemplo del modo de operación de una puerta molecular.

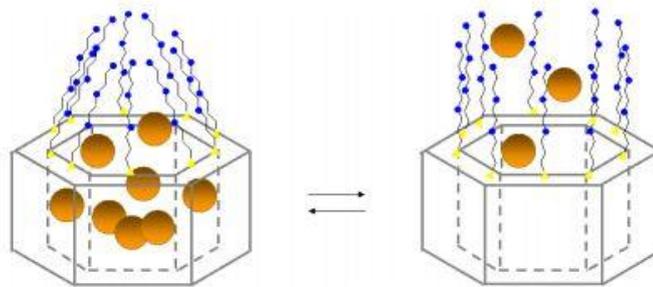


FIGURA 1. Puerta molecular nanoscópica en la superficie de un material mesoporoso (Casasús, 2009).

En febrero de 2003 fue publicado el primer artículo donde se desarrolla esta idea de controlar la apertura y cierre de una puerta molecular en sólidos mesoporosos (Mal et al., 2003). En este sistema, unos derivados fotosensibles de la cumarina son anclados a la superficie de los poros de una matriz tipo MCM-41. Para lograr que las moléculas formen interacciones entre sí, evitando la salida del material encapsulado (puerta cerrada), se aplicaba una radiación a longitudes de onda superiores a 310 nm; mientras que para revertir este proceso de unión y permitir la salida del material encapsulado (puerta abierta), había que aplicar radiaciones a longitudes de

onda de 250 nm. Este es un ejemplo práctico sencillo sobre el funcionamiento y control de las puertas moleculares en sólidos mesoporosos.

Desde ese momento, se han descrito numerosos sistemas de liberación controlada basados en puertas moleculares capaces de liberar controladamente un cargo tras la aplicación de un determinado estímulo externo, ya pueda ser el pH del medio, un enzima específico o la presencia de determinadas bacterias o virus, entre otros, se consigue la liberación del material encapsulado, que estará entonces disponible para llevar a cabo su función biológica (Casasús, 2009). Se ha visto que algunos polímeros que podrían ser utilizados como puerta molecular pueden poseer actividad antimicrobiana. Un ejemplo de este tipo de compuestos podría ser el quitosano, que ha demostrado tener grandes efectos antimicrobianos inhibiendo microorganismos como *E. coli* o *Staphylococcus aureus*, mostrando resultados positivos y de gran eficacia, dependiente a su vez de la concentración y del peso molecular del mismo principalmente (Zheng y Zhu, 2003).

En este contexto, se ha planteado desarrollar un sistema antimicrobiano dual, donde tanto el componente encapsulado como la puerta molecular presenten actividad antimicrobiana. Tras elegir como polímero que pueda actuar como puerta molecular el quitosano, el objetivo de este trabajo es doble. Por una parte, optimizar las condiciones de anclaje del quitosano de alto y bajo peso molecular sobre la superficie de un material mesoporoso MCM-41. Por otra parte, estudiar la capacidad del quitosano para actuar como puerta molecular en respuesta a un estímulo de pH y comprobar que tras la funcionalización sobre la superficie de las partículas MCM-41 el quitosano sigue manteniendo la actividad antimicrobiana.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos y equipos

Los reactivos quitosano de alto y bajo peso molecular, trietanolamina (TEA), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), tetraetil ortosilicato (TEOS), isocianato (3-(trietoxisilil) propil isocianato; ISO), fosfonato (3-(trihidroxisilil) propil metilfosfonato; PO₄), Rodamina B, NaOH, NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄ fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El carboxilato (N-[(3-trimetoxisilil) propil] etilendiamina ácido triacético trisódico; C₃) fue adquirido a través de Fluorochem (Buxton, Reino Unido). El 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) fue adquirido a través de Acrós organics (Geel, Bélgica). El NaCl y el caldo de cultivo de triptona soja (TSB) fueron adquiridos a través de Scharlau (Barcelona, España). El medio de cultivo plate count agar (PCA) fue adquirido a través de Liofilchem (Teramo, Italia).

2.2 Síntesis de MCM-41

Para la síntesis de las micropartículas MCM-41 se siguió la ruta de los atranos, según el protocolo descrito por Ruiz-Rico et al., (2016). Para tal fin, se pesaron 52,4 g de TEA, la cual se dejó en agitación magnética a 300 rpm en el interior de un vaso de precipitados. Mientras tanto, se disolvieron 0,98 g de NaOH en 2 mL de agua destilada y se añadió la disolución al TEA en agitación. Llegados a este punto, la mezcla se calentó hasta 120°C y, una vez alcanzada la temperatura, se enfrió hasta los 70°C. Una vez concluido este primer proceso, se adicionaron a la mezcla 22 mL de TEOS y se llevó hasta una temperatura de 118°C. Se añadieron entonces 9,36 g de CTAB y se enfría hasta 70°C. Llegados a este punto, se añadieron 180 mL de agua destilada y se dejó en agitación durante 1 h a 300 rpm a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se pasó a un autoclave teflón, el cual se introdujo en una estufa a 100°C. Pasado este tiempo, el sólido obtenido se recogió mediante filtración a través de un papel de filtro de y se lavó con agua y etanol. Posteriormente, el sólido se secó a 70°C y se calcinó a 550°C para eliminar el surfactante y obtener el material poroso.

2.3 Cargado de Rodamina B

El proceso de cargado es aquel por el que se incorpora a nuestra partícula mesoporosa la molécula que se quiere encapsular. En este caso, se ha elegido el colorante Rodamina B por su facilidad en el seguimiento de la misma por espectroscopía de fluorescencia durante el experimento para comprobar si el quitosano puede ser utilizado como puerta molecular. Para ello, se disolvieron 38 mg de Rodamina B (RhB) en 7,5 mL de agua destilada. Una vez disuelta, se añadieron a 100 mg de MCM-41 y la mezcla se dejó en agitación durante 24 h a 300 rpm.

2.4 Funcionalización de la superficie

Una vez se obtenido el material MCM-41 cargado con Rodamina B, se procedió a funcionalizar su superficie con 3 grupos funcionales diferentes que permitan anclar covalentemente el quitosano en un paso de síntesis posterior, a fin de demostrar cuál de ellos lleva mejor a cabo su función. Para ello, el sólido MCM-41 cargado con RhB fue suspendido en agua, a cuya mezcla se adicionó cada uno de los siguientes grupos funcionales a una concentración de 8,5 mmol/g: carboxilato (311 μ L), isocianato (210 μ L) y fosfonato (320 μ L), de manera independiente. Las mezclas se mantuvieron en agitación 24 h a 300 rpm.

Finalizado dicho proceso, las mezclas fueron centrifugadas de 10 min a 9500 rpm para eliminar el sobrenadante con el exceso de RhB que no han sido encapsulado y de grupos funcionales que no hayan quedado adheridos al sólido. Para concluir con este proceso, los sólidos obtenidos se dejaron secando 24 h en estufa a 50°C.

2.5 Inmovilización de quitosano sobre la superficie de las partículas MCM-41 funcionalizadas

Una vez funcionalizada la superficie de las partículas MCM-41 con los tres grupos funcionales, se procedió al anclaje covalente del quitosano sobre los mismos. Para ello, en primer lugar, se prepararon 2 disoluciones de quitosano al 1% y 0,5%, correspondientes al quitosano de alto peso molecular y al de bajo peso molecular. El proceso para su preparación consistió en diluir la cantidad apropiada de cada quitosano en ácido acético al 1%. Las disoluciones se dejaron agitando a 300 rpm durante 24 h a temperatura controlada de 50°C.

Una vez preparadas las disoluciones concentradas de quitosano, se llevó a cabo la inmovilización del polímero sobre las diferentes partículas MCM-41 funcionalizadas. Para ello, 50 g de los sólidos se suspendieron en 5 mL de un buffer de acetato a pH 5. A continuación se adicionaron 9,5 mg de EDC y la mezcla se dejó en agitación durante 1 h a 300 rpm. Tras esto, se adicionaron 5 mL de cada disolución de quitosano en su correspondiente muestra, de modo que la relación entre el quitosano y el sólido queda 1:1. Estas suspensiones se dejaron en agitación durante 4 h a 300 rpm.

Concluido el proceso de agitación, se realizaron sucesivas centrifugaciones de 10 min a 9500 rpm, eliminando al final de cada una el sobrenadante y utilizando agua ajustada a pH 2 (condiciones en las que la puerta molecular debería mantenerse cerrada, impidiendo así la salida no deseada del contenido encapsulado) para continuar con los lavados hasta conseguir un sobrenadante incoloro, que indica que se ha eliminado todo el material no encapsulado. Para terminar, los sólidos se secaron durante 12h a 50°C.

2.6 Caracterización de los sólidos

El proceso de caracterización trata de asegurar que los sólidos han sido sintetizados y funcionalizados correctamente. Se llevó a cabo mediante tres técnicas: la difracción de rayos X, la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y el análisis del potencial zeta.

Para la difracción de rayos X se utilizó un difractómetro Bruker D8 (Madrid, España), que contiene un ánodo de cobre (Cu), emitiendo radiación $\text{CuK}\alpha$ de longitud de onda (λ) de 0.154 nm.

Para el TEM se utilizó un microscopio JEOL JEM-1010 de (Madrid, España). Para el desarrollo de la prueba, se disolvió una pequeña cantidad de muestra (en torno a 1 mg) en un disolvente orgánico como el clorometano, se sonicó en un baño de ultrasonidos durante un minuto y se depositó una gota sobre los discos portaobjetos. Una vez evaporado el disolvente, se incorporó al equipo para su observación.

Por último, para el análisis del potencial zeta se utilizó un equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments (Malvern, Reino Unido). Las muestras fueron suspendidas en agua destilada en una concentración de 1 mg/mL y se sonicaron durante 1 min para facilitar la homogeneización. Cada medida fue realizada por triplicado y a temperatura ambiente, calculándose

así el potencial zeta a partir de los valores de movilidad de las partículas, aplicando el modelo de Smoluchowski.

2.7 Liberación controlada de la Rodamina B

Con cada uno de los seis sistemas de encapsulación preparados se realizaron pruebas de liberación con tampón fosfato salino (PBS) ajustado a tres valores de pH: pH 2, pH 5 y a pH 7,5, ajustados con NaOH y HCl, según proceda.

Una vez preparadas las 3 disoluciones de PBS, se tomaron 5 mg de cada uno de los sólidos, que corresponden a los dos tipos de quitosano de alto y bajo peso molecular para cada uno de los grupos funcionales de estudio. A continuación, se añadieron 10 mL de las correspondientes disoluciones tamponadas de PBS y las suspensiones se dejaron en agitación a 300 rpm durante 24 h. A determinados tiempos (5 min, 1 h, 3 h, 5 h y 24 h) se tomaron alícuotas de 1 mL, las cuales se filtraron a través de un filtro PTFE de 0,45 μm . Para finalizar con el experimento, se determinó la cantidad de Rodamina B liberada por los sólidos mediante la cuantificación de la banda de emisión de fluorescencia a 580 nm (excitación a 554 nm), utilizando un equipo Jasco FMP-825 (Madrid, España).

2.8 Análisis de la actividad antimicrobiana del quitosano

La actividad antimicrobiana del quitosano tanto anclado como libre, fue determinada mediante el método de macrodilución. Para ello, se preparó PBS como medio de incubación y caldo TSB y placas de PCA para el crecimiento del microorganismo. Todo este material fue autoclavado a 121°C durante 15 min.

El estudio se llevó a cabo con la cepa de referencia *E. coli* K12 (CECT 433), obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Valencia, España). Para la preparación del inóculo se tomó una colonia de *E. coli* K12, previamente crecida en PCA, con un asa de siembra y se introdujo en un tubo de 10 mL de TSB, el cual fue incubado durante 24 h a 37°C con el objetivo de obtener un inóculo con una densidad de 10^9 células/mL.

Para el experimento, se utilizaron concentraciones crecientes de quitosano de ambos pesos moleculares (50, 200, 400 y 600 ppm) en matraces Erlenmeyer con 15 mL de la disolución de PBS mediante la adición de distintos volúmenes de las disoluciones de quitosano al 1% y 0,5% para el quitosano de alto y bajo peso molecular, respectivamente, o la adición de distintas cantidades de los sólidos funcionalizados con el quitosano. A continuación, se adicionaron 10 μL del inóculo en cada matraz y los matraces se incubaron a 37°C en agitación orbital (150 rpm) durante 24 h. Tras la incubación, se prepararon diluciones decimales de cada matraz y se sembraron 100 μL de las mismas en PCA por duplicado.

Finalmente, tras la incubación de las placas durante 24 h a 37°C, se llevó a cabo el recuento de UFC, que posteriormente se transformaron logarítmicamente para su representación gráfica como \log_{10} UFC/mL.

En el ensayo se incluyeron controles negativos de cada una de las condiciones (PBS con quitosano libre o partículas no funcionalizadas) para detectar posibles contaminaciones; y controles positivos (PBS con inóculo) para establecer el recuento microbiano en ausencia de tratamiento.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de los sistemas de encapsulación y liberación

La funcionalización es un proceso de pretratamiento por el cual se consiguen diferentes propiedades físicas o químicas en la superficie del sólido. De este modo, podemos proceder posteriormente a la unión de la puerta molecular, encerrando así la Rodamina B en el interior de los poros del material.

Tras la síntesis y el proceso de funcionalización de nuestra partícula MCM-41 es necesario llevar a cabo una caracterización utilizando métodos estándar como son la microscopía electrónica de transmisión, los rayos X, o la determinación del potencial zeta, a fin de verificar que el material resultante de dichos procesos tenía las características requeridas.

La Figura 2 muestra diferentes micrografías tomadas con un microscopio electrónico de transmisión del material MCM-41 desnudo de partida. En la figura se pueden observar las características morfológicas de las partículas MCM-41. Por una parte, las partículas presentan unas dimensiones aproximadas de $1 \times 1,5 \mu\text{m}$. A su vez, la presencia de franjas blancas dentro de la partícula confirma la porosidad de las mismas. Estos poros, tal y como cabría esperar, se presentan de forma unidireccional y con un reparto uniforme por todo el volumen de la partícula. Además, el diámetro de poro medido está comprendido entre 2-3 nm, de acuerdo con lo reportado por [Pérez-Esteve et al., \(2016\)](#).

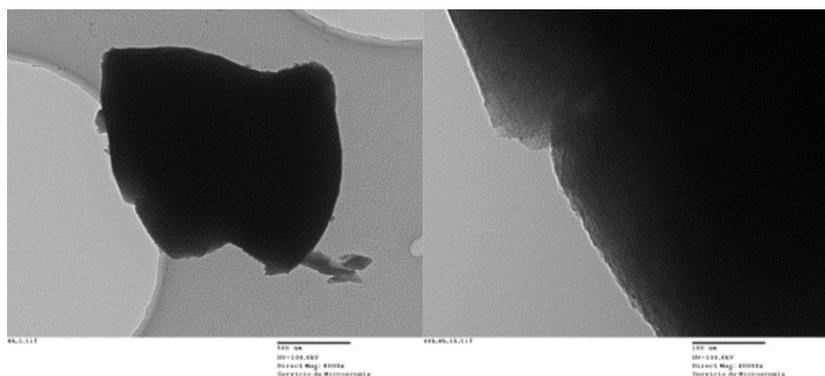


FIGURA 2. Micrografía tomada con un microscopio electrónico de transmisión donde se observa la morfología (izquierda) y porosidad (derecha) de la partícula MCM-41 desnuda.

La Figura 3 muestra micrografías de la partícula MCM-41 una vez funcionalizada con quitosano de bajo (a) y alto peso molecular (b). La comparación de la Figura 2 y la Figura 3, así como la comparación de las columnas a y b de la figura 3 entre sí permiten concluir que el proceso de

funcionalización con quitosano no modifica ni el aspecto general de la partícula ni la estructura porosa del material MCM-41 para ninguno de los dos pesos moleculares ensayados.

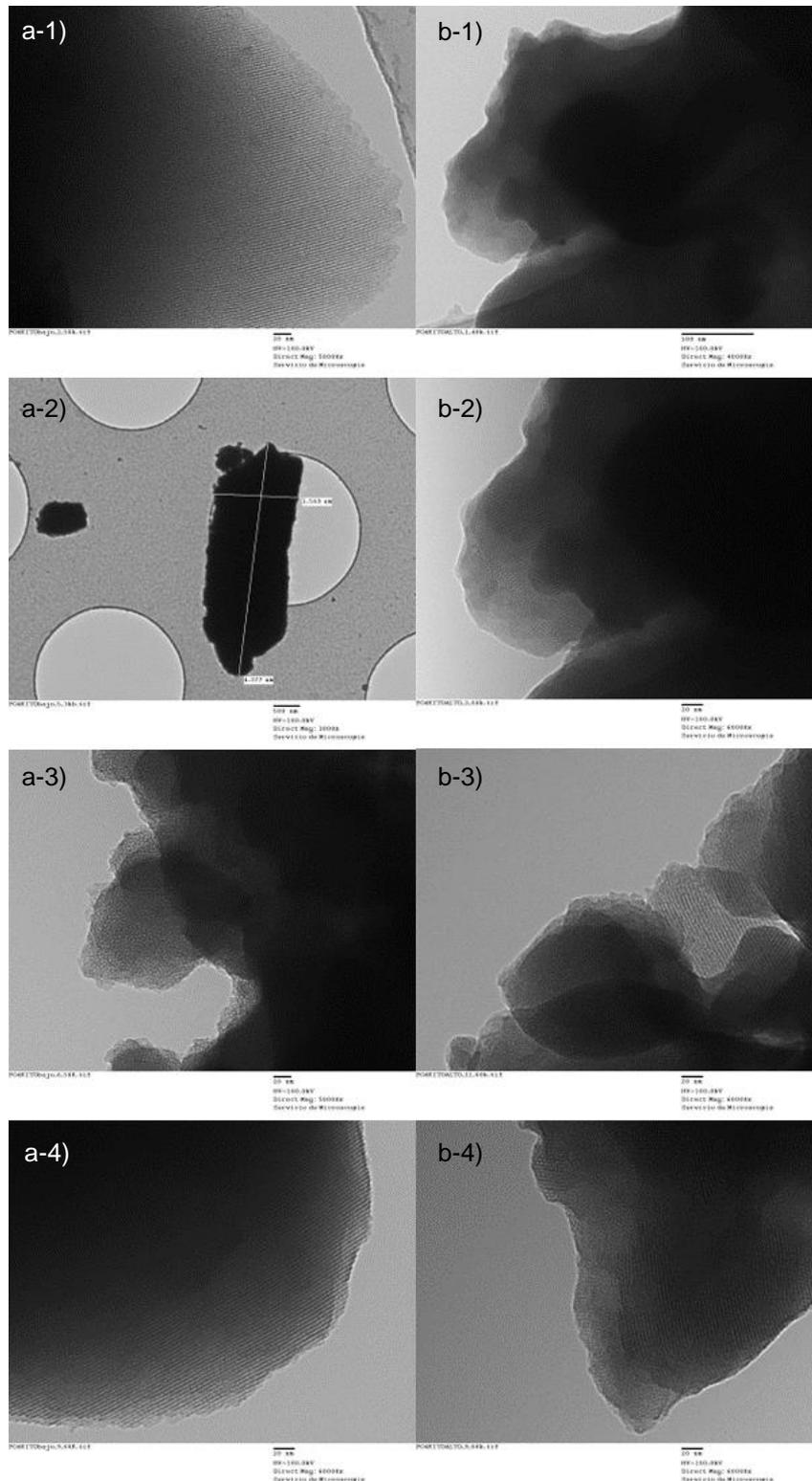


FIGURA 3. MCM-41 funcionalizado con fosfonato y con puerta molecular de quitosano de bajo peso molecular (columna a) y de alto peso molecular (columna b).

Las partículas también fueron caracterizadas por difracción de rayos X. La Figura 4 muestra la resolución de una difracción de rayos X realizada sobre la partícula MCM-41 desnuda de partida y sobre la partícula funcionalizada con grupo funcional fosfonato unido a quitosano de alto y bajo peso molecular. Como se puede observar, la partícula desnuda presenta un pico sobresaliente alrededor de los 2,5 grados Theta que confirma la ordenación hexagonal de la partícula MCM-41. Este mismo pico puede apreciarse igualmente en el caso de las partículas funcionalizadas con ambos tipos de quitosano, por lo que queda demostrado que el proceso de funcionalización no reduce los niveles de porosidad iniciales de la partícula desnuda.

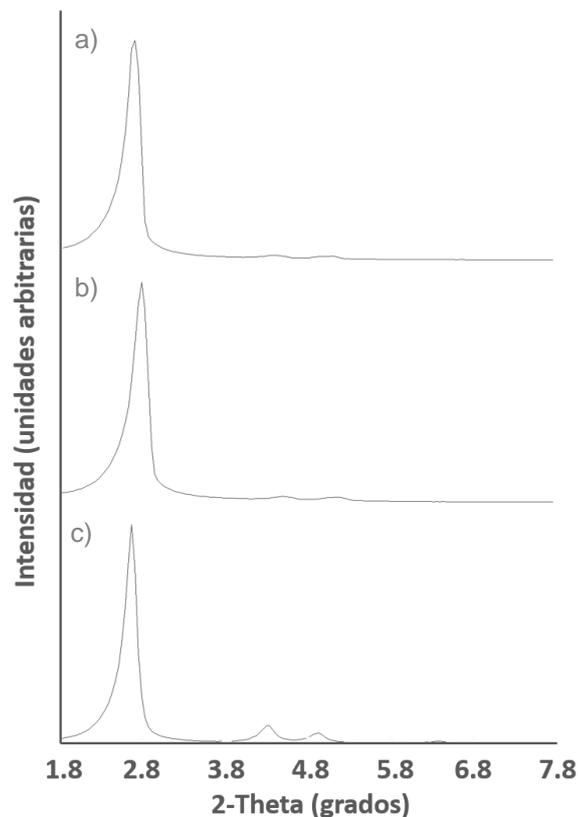


FIGURA 4. Difractograma de Rayos X de la partícula funcionalizada con grupo funcional fosfonato y quitosano de alto (a) y bajo (b) peso molecular (b) y sobre la partícula desnuda (c).

Para determinar la efectividad de la funcionalización, las partículas se caracterizaron por potencial zeta. El potencial zeta es una propiedad de los materiales que indica la estabilidad de una partícula, a través de la medida del potencial electrocinético en sistemas coloidales (Batalla et al., 2014). Indica el potencial electrostático que es necesario aplicar para atravesar la capa de iones que rodea nuestra partícula y desestabilizarla (Sandoval et al., 2000). Como se puede apreciar en la Figura 5 los valores de potencial zeta de la MCM-41 son siempre negativos. Tras la funcionalización con el grupo funcional, el potencial zeta se hace más negativo en el caso de fosfonato y carboxilato y positivo en el caso de isocianato. Por último, tras el anclado

con el quitosano (el cual posee grupos NH_3^+ en su estructura), el potencial se aproxima a 0 o se hace totalmente positivo según la longitud de la cadena del quitosano). Estos cambios en el potencial zeta de las partículas tras cada paso del proceso de síntesis de las mismas, confirma la efectividad del mismo.

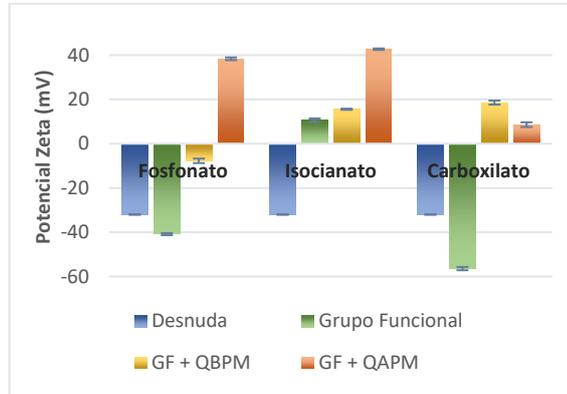


FIGURA 5. Potencial zeta de las partículas sintetizadas antes de la funcionalización (azul), tras el anclado del grupo funcional (naranja), y tras el anclado del quitosano de bajo (gris) o alto (amarillo) peso molecular sobre el grupo funcional.

3.2 Cinéticas de liberación

La Figura 6 muestra las cinéticas de liberación de Rodamina B desde las partículas MCM-41 cargadas con Rodamina B y funcionalizadas con quitosano de alto y bajo peso molecular a través de un grupo funcional de carboxilato.

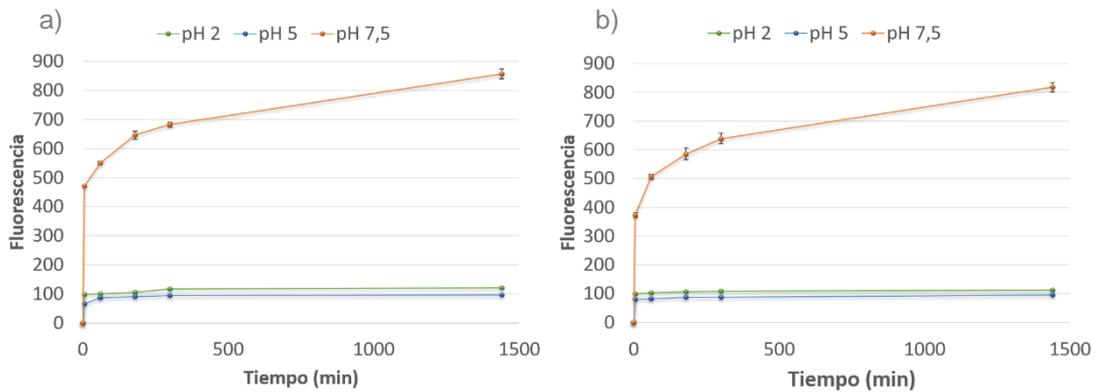


FIGURA 6. Comparativa entre la cinética de liberación de RhB con carboxilato como grupo funcional y con quitosano de alto peso molecular (gráfica a) y quitosano de bajo peso molecular (gráfica b).

En este gráfico podemos observar que la puerta molecular, ya sea utilizando quitosano de alto o de bajo peso molecular, inhibe la salida de la Rodamina B en los ensayos de liberación realizados a pH 2 y pH 5. En ambos ensayos, se presentan valores de fluorescencia de aproximadamente 100 y 110 para las curvas de liberación a pH 2 y pH 5 respectivamente. Además, dichos valores son prácticamente constantes desde la primera medida realizada tras los 5 primeros minutos de liberación. Esto indica que

durante todo el protocolo no se libera más Rodamina B al medio que la presente desde el momento inicial, remarcando la idea de que la puerta permanece cerrada a dichos valores de pH.

En cambio, las curvas de liberación a pH 7,5 muestran que la puerta queda abierta, liberando la Rodamina B al medio de forma progresiva a lo largo del ensayo. En el caso en que se utiliza quitosano de alto peso molecular, observamos como los valores de fluorescencia crecen hasta alcanzar un máximo aproximadamente 850 a las 24 h de estudio. Tras los primeros 5 min, los valores de fluorescencia aumentan hasta valores de 480 (56,5% del total); y a las 5 h del experimento ya había alcanzado valores de 690 (81% del total) lo cual nos indica que esta puerta molecular libera rápidamente su contenido al medio.

En el caso en que se utiliza quitosano de bajo peso molecular como puerta, los valores máximos de liberación no distan mucho del alto peso molecular, alcanzando valores de aproximadamente 810 a las 24 h de estudio. Tras los primeros 5 min, los valores de fluorescencia alcanzan valores de 380 (47% del total); y tras 5 h toma valores de 630 (78% del total). Estos valores, a pesar de no presentar una gran diferencia con respecto a los alcanzados con el alto peso molecular, sí demuestran una liberación algo más sostenida en el tiempo, liberando el contenido más lentamente al medio.

La Figura 7 muestra las cinéticas de liberación desde las partículas MCM-41 cargadas con Rodamina B y funcionalizadas con quitosano de alto y bajo peso molecular a través de un grupo funcional de isocianato.

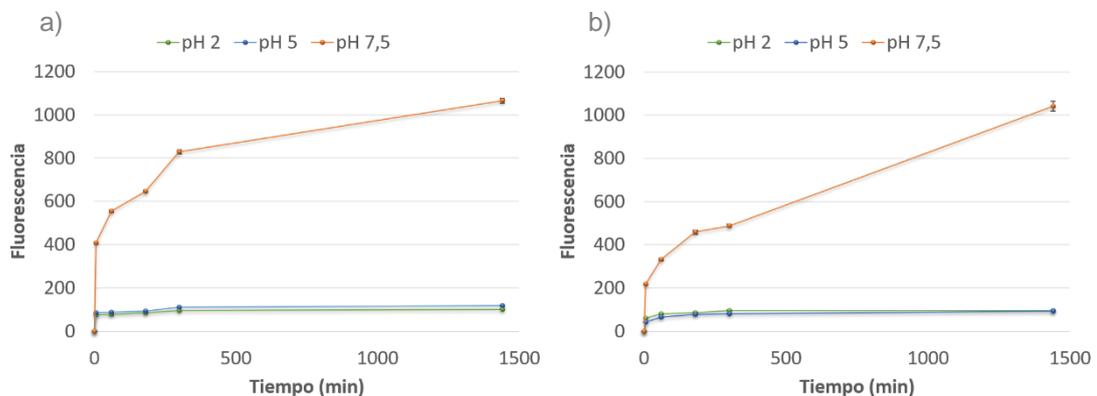


FIGURA 7. Comparativa entre la cinética de liberación de RhB con isocianato como grupo funcional y con quitosano de alto peso molecular (gráfica a) y quitosano de bajo peso molecular (gráfica b).

Como podemos observar, al igual que en el caso anterior en que se usaba carboxilato como grupo funcional, los valores de fluorescencia a pH 2 y pH 5, alcanzando valores de alrededor de 100 en el uso de ambas puertas moleculares. Igualmente se muestran prácticamente constantes desde el inicio del protocolo de liberación, por lo que también podemos concluir que la puerta parece permanecer cerrada a estos valores de pH y que no se libera más Rodamina B al medio durante el proceso.

En lo que respecta a las curvas de liberación a pH 7,5, observamos, igual que en el caso anterior, valores crecientes de liberación con el tiempo. En el

caso de la puerta molecular de quitosano de alto peso molecular, observamos el máximo de liberación a las 24 h de estudio con un valor de fluorescencia de alrededor de 1050. Tras los primeros 5 min de ensayo, se muestran valores de fluorescencia de 400 (38% del total) y tras 5 h, presenta valores de 820 (78% del total). Vistos dichos resultados, se puede deducir que este sistema tiene una velocidad de liberación de Rodamina B al medio menor a la de los casos anteriores.

Cuando utilizamos la puerta molecular de quitosano de bajo peso molecular, el valor máximo alcanzado tras las 24 h de estudio es prácticamente idéntico al de la otra puerta molecular, de 1030 aproximadamente. Tras los primeros 5 min, alcanzamos valores de 210 (20,4% del total) y tras las primeras 5 h se alcanzan valores de aproximadamente 500 (48,5% del total). Según estos resultados, comprobamos que la velocidad de liberación es menor y más progresiva utilizando esta puerta molecular que el quitosano de alto peso molecular.

La Figura 8 muestra las cinéticas de liberación desde las partículas MCM-41 cargadas con Rodamina B y funcionalizadas con quitosano de alto y bajo peso molecular a través de un grupo funcional de fosfonato.

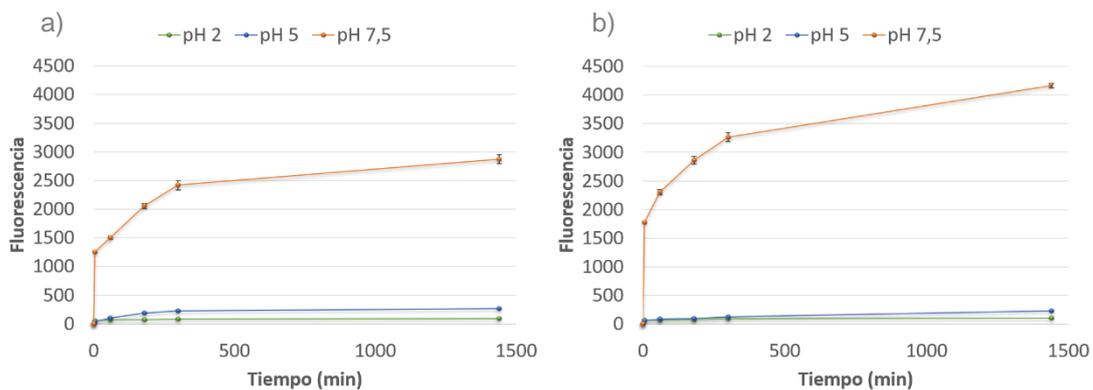


FIGURA 8. Comparativa entre la cinética de liberación de RhB con fosfonato como grupo funcional y con quitosano de alto peso molecular (gráfica a) y quitosano de bajo peso molecular (gráfica b).

En este caso, utilizando el fosfonato como grupo funcional, podemos observar que, en ambos ensayos, los niveles de liberación a pH 2 son iguales a los de los casos anteriores, tomando valores de fluorescencia de aproximadamente 100. En el caso de los ensayos a pH 5 en cambio, se observa cierto incremento, tomando valores algo superiores a los de los ensayos anteriores (en torno a 250); sin embargo, siguen suponiendo valores muy bajos con respecto al total liberado en condiciones de puerta abierta (menores del 10%), igual que en los casos anteriores. Podemos por tanto concluir que a pH 2 y pH 5 las condiciones son de puerta cerrada, impidiendo la liberación al medio del contenido en todas las situaciones de estudio.

Con respecto a las curvas de liberación a pH 7,5, seguimos la misma tendencia que en los casos anteriores, con valores crecientes de liberación a lo largo del tiempo. En el caso de la puerta molecular de quitosano de alto peso molecular, observamos que, tras los primeros 5 min de ensayo, se

muestran valores de fluorescencia de 1800 (43,4% del total) y tras 5 h, presenta valores de 3250 (78,3% del total). Continúa con una tendencia similar a la de los otros casos, aunque con una velocidad de liberación de Rodamina B al medio algo menos acusada que en el primer caso y muy similar a la del caso anterior. El máximo de liberación a las 24 h de estudio con un valor de fluorescencia muy superior al de los ensayos anteriores, de alrededor de 4150.

Cuando utilizamos la puerta molecular de quitosano de bajo peso molecular, el valor máximo alcanzado tras las 24 h de estudio es notablemente más bajo comparado con la otra puerta. Alcanzamos un máximo de 2900 aproximadamente, también muy superior al máximo alcanzado en los otros ensayos. Esta diferencia notable con respecto al quitosano de alto peso molecular puede deberse a que la concentración de quitosano de bajo peso molecular utilizada para el desarrollo del experimento es la mitad de la concentración utilizada para el quitosano de alto peso molecular; aunque en los ensayos con los otros grupos funcionales no parece un factor influyente, en este caso parece que el fosfonato consigue mayores índices de unión de la puerta, por lo que la cantidad disponible de quitosano en el medio puede, en este caso, resultar un factor influyente.

Tras los primeros 5 min, alcanzamos valores de 1400 (48% del total) y tras las primeras 5 h se alcanzan valores de aproximadamente 2400 (83% del total). En este caso, la velocidad de liberación es superior al de la puerta molecular de alto peso molecular, contradiciendo lo visto en los casos anteriores, aunque se muestran muy parejas ambas cinéticas.

Tras analizar los resultados observados en este apartado, podemos afirmar que la liberación responde a un estímulo de pH, donde a pH bajo (2 y 5) la puerta permanece cerrada; mientras que a pH de 7,5 tenemos condiciones de puerta abierta, pudiendo establecer un sistema de liberación controlada. Según estos parámetros, este sistema podría ser interesante por ejemplo para liberación controlada de fármacos en el intestino, ya que el pH del estómago es de 2, donde el sistema permanecería cerrado, y el pH del intestino es de 7,5, donde se permitiría la apertura, liberando el fármaco al medio. Por ejemplo, en el caso de la giardiasis intestinal, donde el parásito *Giardia intestinales*, provoca afecciones como diarreas con dolor abdominal, duodenitis y yeyunitis, este sistema podría ayudar a transportar el tratamiento (consistente en nitroimidazoles) hasta el intestino (Rivera et al., 2002), donde se provocaría la liberación del mismo por las condiciones del medio.

3.3 Análisis comparativo de las cinéticas de liberación de los distintos sistemas de funcionalización

A fin de poder evaluar el grado de liberación de la Rodamina B a lo largo del tiempo, y comparar la cinética de liberación de los 3 sistemas en condiciones de puerta abierta (pH 7,5) de forma más clara, se ajustan los resultados al modelo Higuchi. Este modelo, basado en los procesos de difusión de las leyes de Fick, ha demostrado ser efectivo a la hora de

describir la cinética de liberación de fármacos desde matrices porosas insolubles (Pérez-Esteve et al., 2016).

La figura 9 muestra las cinéticas de liberación ajustadas a un modelo Higuchi desde las partículas MCM-41 cargadas con Rodamina B y funcionalizadas con quitosano de alto y bajo peso molecular a través de tres grupos funcionales diferentes: carboxilato, isocianato y fosfonato.

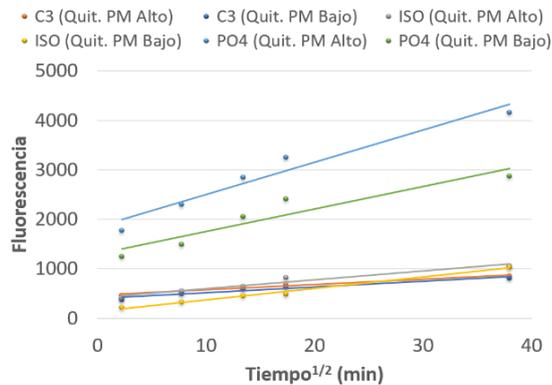


FIGURA 9. Cinética de liberación de RhB de las 6 situaciones de estudio según el modelo Higuchi.

Observamos una clara diferencia en cuanto a los niveles de liberación al comparar el sistema que utiliza fosfonato como grupo funcional con respecto a los que usan carboxilato e isocianato. Las cinéticas de liberación pertenecientes a este sistema son mucho más pronunciadas que en los otros sistemas, consiguiendo mayor liberación desde los primeros minutos de liberación, hasta conseguir un máximo aproximadamente 4 veces superior al de los otros sistemas. En los sistemas que utilizan carboxilato e isocianato, en cambio, los niveles de liberación son mucho más reducidos. Presentan cinéticas de liberación muy similares entre ambos sistemas, con valores máximos muy aproximados, si bien algo mayores en el caso del sistema de isocianato y, dado que las pendientes de las rectas son también muy parejas, la velocidad de liberación de Rodamina B al medio tampoco marca una diferencia significativa entre ambos.

Si comparamos los dos tipos de puerta molecular dentro de cada sistema, en el sistema de fosfonato, existe una diferencia notable entre ambas. El quitosano de alto peso molecular consigue un máximo de fluorescencia unas 1000 unidades superior al del quitosano de bajo peso molecular; en cambio, en el caso del carboxilato y el isocianato no se observan grandes cambios entre uno y otro, aunque el quitosano de alto peso molecular consigue en ambos casos un mayor nivel de liberación.

Dado que todos los sistemas tienen la misma cantidad de quitosano inicial, podemos deducir que, dicha cantidad no representa un factor limitante en el proceso de pegado de la puerta, sino que depende mayormente de las características fisicoquímicas de la propia puerta y del grupo funcional, observándose así niveles mucho menores de pegado en los sistemas de carboxilato e isocianato. Podemos descartar entonces, la hipótesis de que la diferencia apreciable en el caso del fosfonato entre el

quitosano de alto y bajo peso molecular se debe a la concentración inicial utilizada de quitosano para cada caso.

En base a estos resultados, podemos concluir que la mejor combinación para un sistema de puertas moleculares controladas por pH sería fosfonato como grupo funcional y quitosano de alto peso molecular como puerta. Esto puede deberse al mayor tamaño de la puerta, que facilita el proceso de encapsulación de Rodamina B en la MCM-41, por lo que resulta más eficiente el procedimiento ya que conseguiríamos mejores niveles de encapsulación y, por tanto, los mayores niveles de liberación observados tras la apertura.

3.4 Actividad antimicrobiana del quitosano libre

La Figura 10 muestra los recuentos microbianos de *E. coli* en ausencia de tratamiento y tras el tratamiento con quitosano libre de bajo y alto peso molecular.

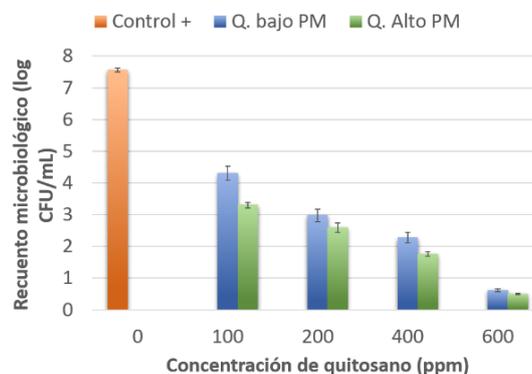


FIGURA 10. Recuentos (log UFC/mL) de *E. coli* tras incubación durante 24 con diferentes concentraciones de quitosano de bajo y alto peso molecular libre.

Una vez vistos los resultados, podemos afirmar que el quitosano posee actividad antimicrobiana, reduciendo más de 3 órdenes logarítmicos el microorganismo con la concentración más baja del estudio (50 ppm) con respecto al control. También observamos una reducción progresiva a medida que aumenta la concentración de quitosano y de aproximadamente la misma magnitud tanto en el caso del quitosano de bajo peso molecular como en el de alto peso molecular. Este último, presenta además los mayores niveles de inhibición microbiana, mostrando una inhibición total de la bacteria a una concentración de 600 ppm.

Según estos datos, el quitosano de alto peso molecular sería más adecuado en sistemas en los que se requiera un mayor grado de inhibición tras la apertura de la puerta molecular, pero la diferencia de inactivación entre ambos modelos es muy reducida. Dado que en nuestro estudio la puerta de quitosano de alto peso molecular muestra los mayores niveles de liberación del material encapsulado al medio, y también los mayores niveles de inhibición microbiana para el quitosano libre, se perfila a priori como la opción más atractiva para este proceso.

3.5 Actividad antimicrobiana del quitosano inmovilizado

Finalmente, para saber si el sistema podría desarrollar una doble función antimicrobiana es necesario comprobar si, una vez anclada la puerta a la partícula, esta sigue manteniendo su función antimicrobiana. La Figura 11 representa los valores de inhibición del microorganismo tras el tratamiento con la partícula MCM-41 funcionalizada con grupo funcional fosfonato y quitosano de alto y bajo peso molecular.

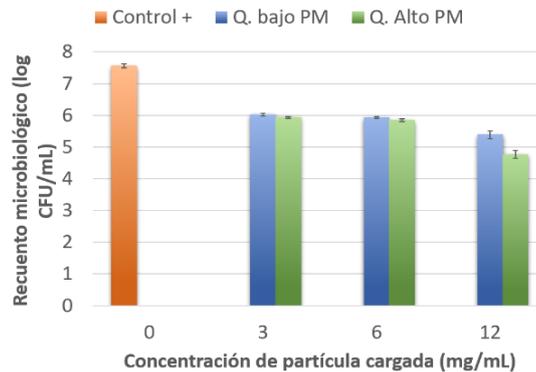


FIGURA 11. Recuentos (log UFC/mL) de *E. coli* tras incubación durante 24 con diferentes concentraciones de quitosano de bajo y alto peso molecular anclados a la superficie de partículas MCM-41.

Apreciamos que la inhibición microbiana se ve ampliamente reducida con respecto a la obtenida en el ensayo realizado con el quitosano libre. Esto puede deberse a que el quitosano, al quedar anclado a la partícula, vea limitada su función antimicrobiana. Sin embargo, la inhibición es apreciable desde la menor concentración utilizada en el estudio, y aumenta con la concentración. El tratamiento con quitosano inmovilizado produce una reducción de alrededor de 1-2 órdenes logarítmicos del microorganismo.

En vista de los resultados, podemos concluir que la función antimicrobiana se mantiene cuando se ancla el quitosano a la partícula, pudiendo desarrollarse entonces un sistema de encapsulación con doble función antimicrobiana, a pesar de que se podrían buscar nuevas vías de síntesis que conduzcan a un soporte donde se mantenga la actividad antimicrobiana del quitosano libre.

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha demostrado la capacidad del quitosano para actuar tanto como puerta molecular capaz de librar su carga (Rodamina B) en función del pH del medio de manera controlada y sostenida y por otra parte su capacidad antimicrobiana una vez unido a la superficie del sólido MCM-41. Además, se ha comprobado que el anclado del quitosano de alto peso molecular a través del grupo funcional fosfonato consigue los mayores resultados de liberación. La actividad antimicrobiana también es mayor cuando se utiliza quitosano de alto peso molecular.

REFERENCIAS

- Avalos Fúnez, A., Haza Duaso, A., Morales Gómez, P. Nanotecnología en la industria alimentaria I: Aplicaciones. Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 2016 10 (2): 1-17.
- Batalla Mayoral, J., Cuadros Moreno, A., San Martín-Martínez, E. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. Centro de investigación Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional. 2014.
- Casasús Lis, R. Diseño de puertas moleculares controladas a nivel nanoscópico. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 2009.
- Linás, M.C., Sánchez-García, D. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. 2013.
- Mal, N.K., Fujiwara, M., Tanaka, Y. Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica, Nature. 2003.
- Nieto Peña, A. Aplicaciones biomédicas de materiales mesoporosos de sílice y de carbón. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 2011.
- Pérez-Esteve, É., Ruiz-Rico, M., Martínez-Máñez, R., Manuel Barat, J. Mesoporous silica particles as encapsulation and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals. 2017.
- Pérez-Esteve, É., Ruiz-Rico, M., de la Torre, C., Villaescusa, L.A., Sancenón, F., Marcos, M.D., Amorós, P., Martínez-Máñez, R., Barat, J.M. Encapsulation of folic acid in different silica porous supports: A comparative study. Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València. 2016.
- Real Academia Española. Definición de nanotecnología [en línea]. Dirección URL: <<http://www.rae.es/>>. [Consulta: 16 Abr. 2019].
- Rivera, M., A. de la Parte, M., Hurtado, P., Magaldi, L., Collazo, M. Giardiasis intestinal. Mini-Revisión. 2002.
- Ruiz-Rico, M., Daubenschütz, H., Pérez-Esteve, É., Marcos, M.D., Amorós, P., Martínez-Máñez, R., Barat, J.M. Protective effect of mesoporous silica particles on encapsulated folates. Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València. 2016.
- Ruiz-Rico, M., Fuentes, C., Pérez-Esteve, É., Jiménez-Belenguer, A.I., Quiles, A., Marcos, M.D., Martínez-Máñez, R., Barat, J.M. Bactericidal activity of caprylic acid entrapped in mesoporous silica nanoparticles. 2015.
- Sandoval Yoval, L., Montellano Palacios, L., Piña Soberanis, M., Sánchez Guzmán, L.O. Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. 2000.
- Zheng, L.Y., Zhu, J.F. Study on microbial activity of chitosan with different molecular weights. Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University. 2003.