



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Farmacia - Magíster en Ciencias Farmacéuticas

**Desarrollo de un sistema microparticulado para la
administración oral de un antígeno contra
Piscirickettsia salmonis.**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

JOSÉ ANDRÉS VILLAGRA CUSEVICH
QUÍMICO FARMACÉUTICO
2015

Prof. Guía y Patrocinante: Dr. Carlos von Plessing R.

Departamento de Farmacias, Facultad de Farmacia.

Universidad de Concepción.

ÍNDICE

| | |
|--|------------|
| ÍNDICE | i |
| ÍNDICE DE IMÁGENES | iv |
| ÍNDICE DE TABLAS | vi |
| ABREVIATURAS | vii |
| Resumen | 1 |
| 1 Introducción | 2 |
| 1.1 Industria Salmonera en Chile. | 2 |
| 1.2 <i>Piscirickettsia salmonis</i> y Síndrome rickettsial del salmon. | 3 |
| 1.3 Vacunas. | 4 |
| 1.4 Micropartículas. | 7 |
| 1.4.1 Ácido Algínico | 9 |
| 1.4.2 Poloxámeros | 9 |
| 1.4.3 Ácido poliláctico-co-glicólico | 10 |
| 1.4.4 Polivinil Alcohol | 11 |
| 2 Hipótesis y Objetivos | 13 |
| 2.1 Hipótesis | 13 |
| 2.2 Objetivo Principal | 13 |
| 2.3 Objetivos específicos | 13 |
| 3 Materiales y reactivos | 14 |
| 3.1 Equipos y Materiales | 14 |

| | |
|---|------------------|
| 3.2 Reactivos | 15 |
| 3.3 Programas y Software | 15 |
| <u>4 Método</u> | <u>16</u> |
| 4.1 Ensayos preliminares de elaboración de micropartículas cargadas con albúmina sérica bovina (BSA) por Secado por atomización. | 16 |
| 4.1.1 Micropartículas de PLGA-PVA | 18 |
| 4.1.2 Micropartículas de Alginato-Poloxámero | 19 |
| 4.2 Elaboración preliminar de micropartículas cargadas con molécula peptídica con actividad inmunogénica. | 20 |
| 4.3 Determinación de factores relevantes en la respuesta por medio de un diseño experimental de screening. | 21 |
| 4.4 Análisis granulométrico para determinación del tamaño de partícula de las muestras. | 23 |
| 4.5 Cuantificación de proteína desde muestras de micropartículas y perfiles de disolución. | 24 |
| 4.5.1 Método de Bradford. | 24 |
| 4.5.2 Método del Ácido Bicinconínico | 24 |
| 4.6 Optimización de la metodología de elaboración de las micropartículas cargadas con la molécula peptídica, por medio de un modelo de superficie-respuesta. | 26 |
| 4.7 Estudio de cesión de la molécula peptídica desde las micropartículas a sistemas de fluidos digestivos simulados. | 29 |
| <u>5 Resultados y Discusión.</u> | <u>30</u> |
| 5.1 Elaboración de micropartículas | 30 |
| 5.2 Microscopía electrónica de barrido de micropartículas cargadas con péptido/proteína. | 30 |
| 5.3 Diseño factorial para determinación de factores influyentes en las respuestas. | 34 |

| | |
|---|------------------|
| 5.3.1 Tamaño de partícula. | 35 |
| 5.3.2 Agregación. | 36 |
| 5.3.3 Recuperación. | 37 |
| 5.4 Curva de calibración para cuantificación de proteínas por método de BCA. | 38 |
| 5.5 Optimización de la metodología de elaboración de las micropartículas cargadas con la molécula peptídica, por medio de un modelo de superficie-respuesta. | 40 |
| 5.5.1 Gráficos de efectos principales | 42 |
| 5.5.2 Optimización de múltiples respuestas. | 43 |
| 5.6 Elaboración de micropartículas cargadas con una molécula peptídica, según las condiciones óptimas obtenidos por el diseño experimental. | 44 |
| 5.7 Estudio de cesión de la molécula peptídica desde las micropartículas a sistemas de fluidos digestivos simulados. | 46 |
| <u>6 Conclusiones</u> | <u>48</u> |
| <u>7 Bibliografía</u> | <u>49</u> |

ÍNDICE DE IMÁGENES

| | |
|--|----|
| Figura 1: Principales especies cultivadas en acuicultura en Chile. | 2 |
| Figura 2: Piscirickettsia salmonis (imagen de microscopía electrónica)..... | 4 |
| Figura 3: IgM e IgT en peces, distribución y estructura de estas en los diferentes compartimientos de los peces ⁵ | 6 |
| Figura 4: Estructura general de Micropartículas..... | 8 |
| Figura 5: Estructura química del ácido algínico ³ | 9 |
| Figura 6: Estructura química de los poloxámeros ² | 10 |
| Figura 7: Estructura del PLGA ⁴ | 10 |
| Figura 8: Estructura del PVA ² | 11 |
| Figura 9: Esquema del Equipo Mini Spray Dryer B-290 y sus distintos componentes..... | 16 |
| Figura 10: Esquema de elaboración de micropartículas de PLGA-PVA..... | 18 |
| Figura 11: Esquema de elaboración de micropartículas de Alginato-Poloxámero. | 19 |
| Figura 12: Imagen de microscopía óptica de una muestra de micropartículas de ALG-PLX a1000x..... | 23 |
| Figura 13: Método de Bradford para la cuantificación de proteínas y sustancias peptídicos.. | 24 |
| Figura 14: Placa microtituladora usada en el análisis de muestras por reacción con kit BCA. | 26 |
| Figura 15: Micropartículas PLGA-PVA cargadas con péptido al 1%. A la izquierda vista a 3000x. A la derecha vista a 10000x. | 31 |
| Figura 16: Micropartículas Alginato-Poloxámero cargadas con péptido al 1%. A la izquierda vista a 2000x. A la derecha vista a 3000x. | 31 |
| Figura 17: Micropartículas Alginato-Poloxámero cargadas con péptido al 2%. A la izquierda vista a 2000x. A la derecha vista a 3000x. | 32 |
| Figura 18: Micropartículas ALG-PLX cargadas con péptido al 10%. A la izquierda vista a 1000x. A la derecha vista a 3000x. | 32 |
| Figura 19: Diagrama de Pareto para la variable Tamaño de partícula, los distintos factores y sus interacciones. | 35 |

| | |
|---|----|
| Figura 20: Diagrama de Pareto para la variable Agregación, los distintos factores y sus interacciones..... | 36 |
| Figura 21: Diagrama de Pareto para la variable Recuperación, los distintos factores y sus interacciones. | 37 |
| Figura 22: Curva de calibración de BSA para la determinación de proteína por método BCA. | 39 |
| Figura 23: Gráficos de efectos principales para a) Tamaño de partícula; b) Carga..... | 42 |
| Figura 24: Gráficos de superficie-respuesta para las variables de Carga y Tamaño de partícula, con concentración de sólidos = 2g/100mL..... | 44 |
| Figura 25: Microscopía electrónica de Barrido de las micropartículas de ALG-PLX obtenidas por secado por atomización (Aumento 2000X) | 45 |
| Figura 26: Estudio de cesión de molécula peptídica (MP) desde las micropartículas de ALG-PLX en medios Ácido y Básico..... | 46 |



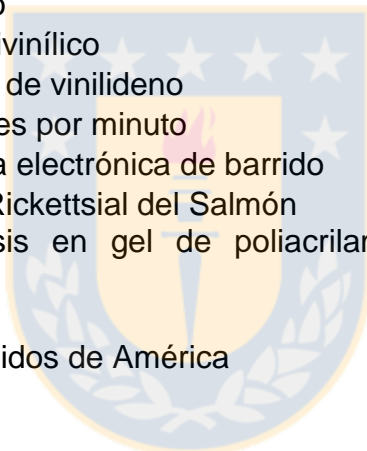
ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Condiciones de los experimentos del diseño factorial. | 22 |
| Tabla 2: Condiciones de los experimentos del diseño Central Compuesto centrado en la caras, para lo optimización de parámetros en equipo spray dryer..... | 28 |
| Tabla 3: Resultados de las variables estudiadas en el diseño factorial..... | 34 |
| Tabla 4: Estadígrafos de la curva de calibración de BSA..... | 39 |
| Tabla 5: Resultados de las variables estudiadas en el diseño central compuesto centrado en las caras. | 40 |
| Tabla 6 (continuación): Resultados de las variables estudiadas en el diseño central compuesto centrado en las caras..... | 41 |
| Tabla 7: Factores óptimos iniciales, previo ajuste del diseño..... | 43 |
| Tabla 8: Factores óptimos finales..... | 43 |



ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| μL | microlitros |
| μm | micrómetros |
| ALG | Alginato |
| BCA | Ácido Bicinconínico |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| g | gramos |
| ISA | Anemia Infecciosa del Salmón |
| mL | mililitros |
| mm | milímetros |
| MP | Molécula Peptídica |
| PLGA | ácido poli láctico-co-glicólico |
| PLX | Poloxámero |
| PVA | Alcohol Polivinílico |
| PVDF | Polifluoruro de vinilideno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SEM | Microscopía electrónica de barrido |
| SRS | Síndrome Rickettsial del Salmón |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| US\$ | Dólares |
| USA | Estados Unidos de América |



Resumen

En el presente trabajo se desarrolló un sistema microparticulado para una molécula peptídica con capacidad inmunogénica en peces, que permita su posterior incorporación en pellets de alimentación, a fin de mejorar las características de estabilidad y sesión de este en el tubo digestivo de peces de cultivo.

Se estudiaron formulaciones basadas en diversos biopolímeros, siendo seleccionados para las formulaciones finales, el Alginato sódico y Poloxámero. Además se evaluó la incorporación de agentes antiagregantes como la trehalosa. Las micropartículas fueron elaboradas por secado por atomización (Spray Drying) en el equipo Büchi Mini Spray Dryer B-290. Se modificaron factores como la proporción de componentes de la matriz polimérica, velocidad de flujo, concentración de soluciones a atomizar, y diámetro de boquilla de nebulización, a fin de controlar las variables de tamaño de partícula, agregación y recuperación de sólidos, evidenciadas en análisis por microscopía óptica y electrónica de barrido. Una vez seleccionados los factores con mayor influencia sobre las variables analizadas se realizó un diseño de experimento, central compuesto centrado en las caras, con 2 puntos centrales y 2 bloques, por medio del software STATGRAPHICS Centurion, para obtener las condiciones óptimas para la preparación de micropartículas ya cargadas con la molécula inmunogénica, priorizando un mayor porcentaje de carga y la minimización del tamaño de las partículas. El análisis del diseño de experimento, arrojó los parámetros de elaboración óptimos para la obtención de micropartículas con tamaños inferiores a los 5 μm , esféricas y con una baja agregación.

La preparación final elaborada a partir de los parámetros óptimos obtenidos por el diseño experimental, fue posteriormente llevada a un estudio de liberación en medios de pH 2,7 y 8,0, simulando las condiciones gástricas e intestinales respectivamente. Se observó que las micropartículas liberan el contenido de molécula peptídica encapsulada en el medio intestinal, protegiéndola del medio gástrico, y permitiendo que esta sea liberada en el sitio adecuado para ser presentado a células del sistema inmune de mucosas, e iniciar el proceso de inmunización.

1 Introducción

1.1 Industria Salmonera en Chile.

La industria salmonera en nuestro país es actualmente uno de los principales sectores exportadores. Durante el primer trimestre del año 2014, el salmón atlántico representó el 47,9 % del total de exportaciones del sector pesquero en nuestro país, significando ingresos por US\$1.292 millones, seguido del salmón del pacífico, alcanzando un porcentaje del total de exportaciones de un 14 %⁶, lo que representa un 3,7 % del total de exportaciones de nuestro país, el 10 % del total de la exportación de alimentos y ubicando a Chile como el segundo mayor productor mundial de salmones, por debajo de Noruega. Las principales especies cultivadas en Chile son: Salmón atlántico (*Salmo salar*), Salmón del pacífico o Salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)(Figura 1).



Figura 1: Principales especies cultivadas en acuicultura en Chile
a) Salmón Atlántico, b) Salmón Coho, c) Trucha arcoíris¹.

En el curso de los últimos años una serie de enfermedades han afectado importantemente la producción⁷. Entre ellas las infecciones por virus ISA, el síndrome rickettsial del salmón, enfermedad bacteriana del riñón, enfermedad bacteriana de las agallas, infestaciones por parásitos del género *Caligus*, etc^{8,9}.

Además de las pérdidas económicas ocasionadas por la baja en la producción y mortandad en los peces, los costos asociados a farmacoterapia de estas enfermedades son muy altos. Conjuntamente, el uso indiscriminado de antibióticos, antiparasitarios y otros agentes terapéuticos produce desconfianza sobre el modelo productivo nacional frente a otros mercados, asociado además a la aparición de resistencias a estos agentes.

1.2 *Piscirickettsia salmonis* y Síndrome rickettsial del salmon.

En la actualidad, las infecciones por *Piscirickettsia salmonis* (Figura 2), significan una parte importante del control de infecciones en plantas de cultivo en Chile. Corresponde a una bacteria Gram negativa, intracelular facultativa¹⁰ (puede desarrollar ciclos tanto intra como extracelulares dependiendo de las condiciones del medio en el que se encuentre), fue descubierta en el año 1989, en un salmón Coho en el sur de Chile, siendo reconocida como el primer organismo tipo *Rickettsia* patógeno en peces¹¹. Afecta a un importante número de granjas de cultivo de salmón en nuestro país, distribuyéndose principalmente entre las regiones de Los Lagos y Aysén. Durante Enero del 2013, el servicio nacional de pesca presentó un nuevo programa para el control de esta enfermedad en salmones, enfocándose a la prevención y detección temprana de focos de infección¹². Debido a la importancia que reviste actualmente esta patología, la idea de desarrollar una vacuna para su control toma más fuerza.

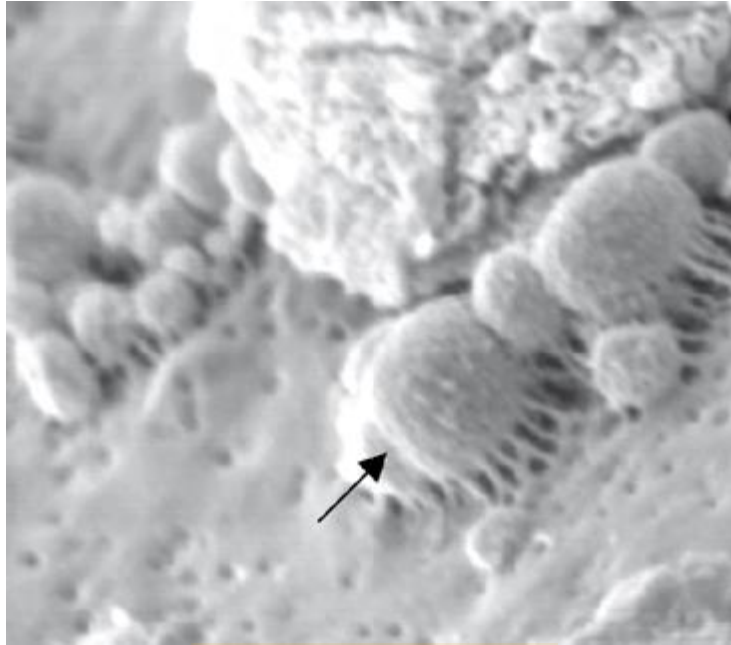


Figura 2: Piscirickettsia salmonis (imagen de microscopía electrónica).

1.3 Vacunas.

La utilización de esquemas preventivos de tratamiento frente a estas patologías, supone la mejor alternativa, abaratando costos y disminuyendo las pérdidas. En este punto surge la utilización de vacunas que generen una respuesta inmunológica posterior.

Las vacunas son preparados que incorporan en su interior sustancias capaces de generar una respuesta biológica por parte del sistema inmune del organismo al cual es administrada. De esta forma se produce la liberación de anticuerpos frente a la sustancia expuesta o antígeno, que es parte de componentes estructurales o funcionales del agente infeccioso que se quiere combatir. Así, frente a una posterior exposición a este, el sistema inmune responde con mayor rapidez y efectividad a la presencia del patógeno¹³.

Actualmente existen vacunas de administración inyectable para diversas enfermedades. Sin embargo, su vía de administración implica inyectar a cada ejemplar, limitándose solo a aquellos que cumplen ciertos criterios de tamaño, además de generar stress en los peces y tener una tasa de mortandad asociada.

La administración de vacunas por vía oral es una medida útil para generar memoria inmune en los peces¹⁴. El sistema inmune en peces considera la presencia de un sistema inmune de mucosas. En los peces no existen ganglios linfáticos, placas de Peyer, ni tejidos linfoides asociados a mucosas¹⁵. Sin embargo, el sistema inmune innato, donde los macrófagos forman parte importante, es capaz de hacer frente a los primeros estadios de la infección. Estos son capaces de fagocitar los agentes patógenos, para posteriormente actuar como células presentadoras de antígenos a linfocitos T, activándolos por medio del complejo mayor de histocompatibilidad. A su vez, los linfocitos B expuestos a estos antígenos son capaces posteriormente de generar anticuerpos contra estos, favoreciendo procesos posteriores del control de la infección. A su vez, una vez se logran activar linfocitos T citotóxicos, estos pueden controlar la proliferación de patógenos intracelulares, al identificar y destruir células infectadas¹⁵.

Especial relevancia revisten las principales formas de anticuerpos presentes en peces teleósteos, IgM e IgT⁵. Mientras que la IgM se asocia a una mayor participación en la respuesta inmune sistémica a nivel plasmático, IgT estaría involucrada en la respuesta inmune a nivel de mucosas, debido a que se suele encontrar muchísimo más concentrada a este nivel¹⁶.

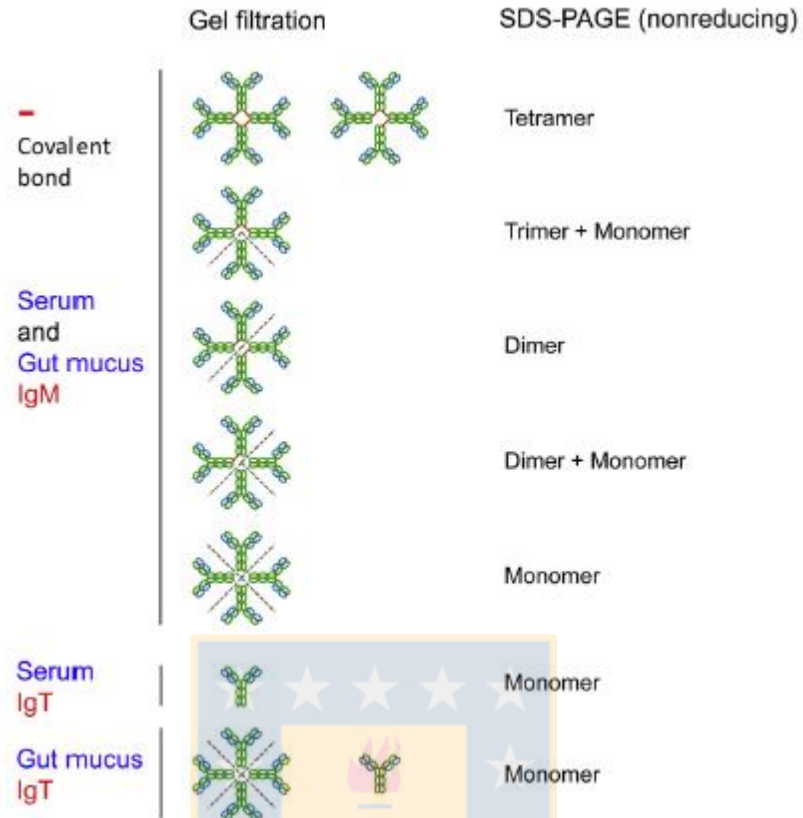


Figura 3: IgM e IgT en peces, distribución y estructura de estas en los diferentes compartimientos de los peces, estudiadas por cromatografía de filtración en gel y SDS-PAGE⁵.

Sin embargo, los componentes con actividad inmunogénica utilizados en vacunas, como péptidos y proteínas suelen ser inestables frente a ciertas condiciones de pH, temperatura, actividad enzimática, entre otros, como las condiciones observadas en el tracto digestivo. Es por ello que deben desarrollarse sistemas de administración de estos que permitan mantener la estabilidad de estas moléculas como su actividad inmunogénica¹⁷.

En base a la problemática que reviste para el sector acuícola la propagación de infecciones por *Piscirickettsia salmonis* y la necesidad de generar esquemas preventivos de tratamiento, se desarrolló una molécula con capacidad inmunogénica para la obtención de una vacuna, desarrollada por el trabajo conjunto de EWOS Innovation Chile y la Universidad Austral de Chile. Sin embargo para que

esta molécula cumpla su objetivo terapéutico, es necesario aportar un vehículo que le otorgue estabilidad frente a las condiciones del sistema digestivo del pez una vez sea administrada por vía oral. Además es necesario que este pueda ser incorporado durante el proceso de aceitado de los pellets de alimentación, ya que en otras etapas de su elaboración se alcanzan temperaturas tan altas que podrían afectar drásticamente la estructura y actividad de estas moléculas activas. Por esto es que el sistema debe presentar un tamaño de partícula adecuado para poder ingresar al interior del pellet de alimentación a través de los poros de este.

Las micropartículas son una alternativa válida¹⁸. Estas permiten la incorporación del principio activo al interior de una matriz, que puede variar en composición, pudiendo presentar perfiles de liberación controlados según las características del vehículo^{13, 19}, permitiendo que las moléculas activas sean liberadas directamente en el sitio de acción, así evitando problemas de estabilidad de estas frente a medios adversos como por ejemplo el medio gástrico^{18, 20-22}.

1.4 Micropartículas.

Las micropartículas son partículas de tamaños micrométricos, menores a 1 mm, compuestas principalmente por una matriz que puede ser grasa, proteica o polimérica que incorpora en su interior el fármaco. Cuando estas partículas alcanzan diámetros inferiores a 1µm se denominan nanopartículas.

Según las características de estas partículas tenemos

- Microesferas: El fármaco se encuentra al interior de la matriz de la partícula.
- Microcápsulas: El fármaco se encuentra al interior de un núcleo que puede ser sólido, líquido o gaseoso y que a su vez se encuentra retenido al interior de la matriz de la partícula.

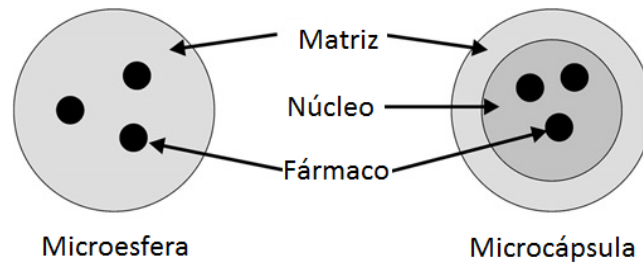


Figura 4: Estructura general de Micropartículas.

Los componentes estructurales de la matriz de las partículas pueden ser muy variados^{2, 13}:

- Grasas: Cera de carnauba, alcohol estearílico, ácido esteárico. Funden a determinadas temperaturas y en el organismo son erosionadas por lipasas en el tracto digestivo, liberando el fármaco en su interior.
- Proteínas: Gelatina, albúmina y colágeno. Son degradadas por acción de enzimas proteolíticas.
- Polímeros: Gran variedad de componentes. Los hay naturales, semisintéticos y sintéticos.
 - o Naturales: Alginato²³, Dextrano, goma arábiga y quitosano.
 - o Semisintéticos: Derivados de la celulosa, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, acetobutirato de celulosa.
 - o Sintéticos: Gran variedad. Destacan principalmente los copolímeros del ácido láctico y ácido glicólico (PLGA) y derivados del ácido acrílico.
- Partículas metálicas: En el rango de los nanómetros, principalmente partículas de oro.

La utilización de unas u otras dependerá de la sustancia a administrar, su vía de administración, compatibilidad con la matriz, etc.

Para la elaboración de micropartículas, algunas de las principales sustancias utilizadas con estos fines, debido a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, son:

1.4.1 Ácido Algínico

Es un polímero natural, compuesto de una mezcla de ácidos poliurónicos, principalmente ácido D-manurónico y ácido L-glucurónico (Figura 5). Su peso molecular varía según la relación entre estos ácidos presentes y del largo de las cadenas poliméricas, encontrándose entre los 20.000 y 240.000 Da. Se extrae principalmente de algas pardas. Tiene la capacidad de formar geles al ser expuesto a ciertos iones, como los iones Ca^{+2} . Es soluble en agua, pero insoluble en medio ácido, lo que aporta una ventaja si se desea controlar la liberación de activos en el medio gástrico.

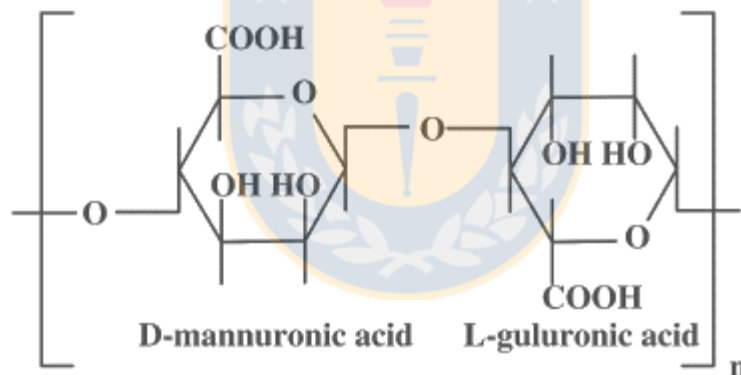


Figura 5: Estructura química del ácido algínico³.

1.4.2 Poloxámeros

Son una serie de copolímeros formados por unidades de óxido de etileno y óxido de propileno, en relaciones variables que aportan, diferencias fisicoquímicas como en las propiedades de las diversas presentaciones.

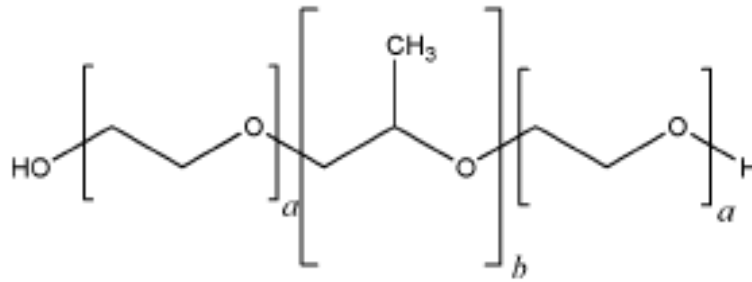


Figura 6: Estructura química de los poloxámeros. *a* y *b* son valores variables de cada forma de poloxámero².

Los poloxámeros tienen propiedades tensioactivas: los segmentos polioxi-etileno son hidrofílicos y los segmentos polioxi-propileno son hidrofóbicos. La capacidad tensioactiva de estos depende de la relación entre las distintas unidades monoméricas que componen el polímero.

1.4.3 Ácido poliláctico-co-glicólico

También conocido como PLGA, es un polímero sintético formado por unidades de ácido glicólico y ácido láctico. Las características de este polímero varían según la proporción en la que se encuentren estos dos componentes presentes. Además, los extremos terminales de sus cadenas poliméricas pueden ser modificados para alterar aún más sus características, pudiendo esto afectar de distintas maneras las formas de liberación de activos desde la matriz del polímero. Es insoluble en agua, y soluble en acetona y diclorometano.

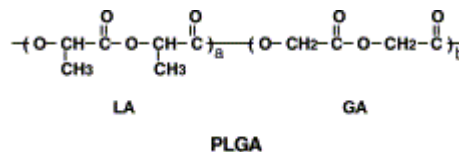


Figura 7: Estructura del PLGA⁴.

1.4.4 Polivinil Alcohol

Es un polímero sintético, soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos como diclorometano. Su uso es principalmente como agente estabilizador de emulsiones, por lo que apoyará la formación de emulsiones w/o para la preparación de micropartículas de PLGA.

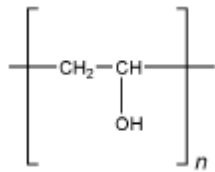


Figura 8: Estructura del PVA²



Por todo lo visto anteriormente, se propone elaborar un sistema microparticulado capaz de incorporar una molécula peptídica (MP) con actividad inmunogénica en peces, para posteriormente incorporarlo en el alimento a la forma de pellet y así tratar diversas patologías. El método seleccionado para la elaboración de las micropartículas es el secado por atomización o spray drying, por su mayor facilidad de escalamiento a nivel industrial¹⁹. Se probarán diversas formulaciones a fin de determinar la más acorde para la incorporación final del péptido seleccionado.



2 Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

El desarrollo de un sistema microparticulado para la incorporación de una molécula peptídica con actividad inmunogénica permite desarrollar vacunas de administración oral en salmones para prevenir y controlar la aparición de ciertas enfermedades infecciosas en peces de cultivo, como el Síndrome Rickettsial del Salmón.

2.2 Objetivo Principal

- Desarrollar sistemas microparticulados cargados con una molécula peptídica con actividad inmunogénica para la elaboración de una vacuna de administración oral para salmones contra *Piscirickettsia salmonis*.

2.3 Objetivos específicos

- Evaluar la utilización de diversos polímeros para la obtención de sistemas microparticulados.
- Elaborar micropartículas cargadas con albúmina bovina por secado por atomización.
- Determinar los factores que influyen de manera significativa en las características de las micropartículas.
- Desarrollar y optimizar una metodología por secado por atomización para la elaboración micropartículas cargadas con la molécula peptídica con actividad inmunogénica.
- Caracterizar morfológica y fisicoquímicamente las micropartículas obtenidas.
- Realizar estudios de cesión del péptido desde las micropartículas cargadas.

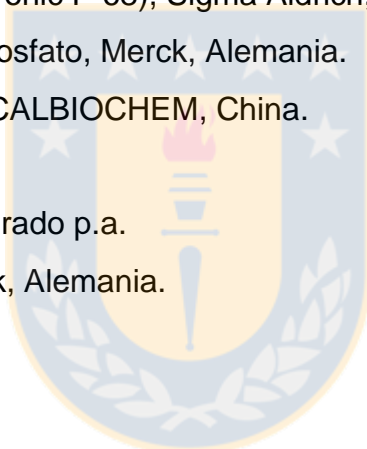
3 Materiales y reactivos

3.1 Equipos y Materiales

- Mini Spray Dryer B-290, Büchi, Alemania.
- Equipo de Disolución TDT-08L, Electrolab, India.
- Balanza analítica ES 220A, Precisa, Suiza.
- Lector Multi-modal Synergy 2, Biotek, USA.
- Purificador de Agua ELGA Purelab Classic, ELGA-Veolia, USA.
- Microscopio óptico Primo Star, Zeiss, Alemania.
- Cámara fotográfica digital EOS Rebel T3, Canon, Taiwán.
- pHmetro VWR Modelo 8005 con Electrodo Ag/AgCl, VWR Scientific, USA.
- Microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM 6380 LV, Jeol Ltd. Japón.
- Agitador magnético MR Hei-Standar, Heidolph, Alemania.
- Agitador magnético 2ML, REMI, India.
- Agitador magnético Multistirrer 15, Velp Scientifica, Italia.
- Micropipetas Transferpette 20-200 y 100-1000 μ L, Brand, Alemania.
- Agitador Vórtex Reax Top, Heidolph, Alemania.
- Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 mL.
- Vasos de precipitado de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Filtros de Jeringa de PVDF 0,45 μ m de tamaño de poro y 13mm de diámetro, Millipore.
- Parafilm M, Bemis, USA.
- Materiales fungibles varios

3.2 Reactivos

- Albúmina sérica bovina, Sigma Aldrich, USA.
- Alginato de Sodio, Sigma Aldrich, Reino Unido.
- Quitosano de bajo peso molecular, Sigma Aldrich, China.
- Ácido poliláctico-co-glicólico Purasorb, 75:25 y 50:50, PURAC, Holanda.
- Alcohol Polivinílico 4-88, Merck, Alemania.
- Kit de Ácido Bicinconínico para análisis de proteínas, Sigma Aldrich, USA.
- Kit de ensayo Bradford para determinación de proteínas, Thermo Scientific, USA.
- Poloxámero 188 (Pluronic F-68), Sigma Aldrich, USA.
- Potasio dihidrogeno fosfato, Merck, Alemania.
- Trehalosa dihidrato, CALBIOCHEM, China.
- Péptido a incorporar.
- Alcohol etílico puro, grado p.a.
- Diclorometano, Merck, Alemania.
- Agua nanopura.



3.3 Programas y Software

- STATGRAPHIC Centurion XVI, Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA.
- Programa EOS utility, versión 2.10.2.0, 2011, Canon Inc.
- GraphPad Prism, versión 6.01, GraphPad Software Inc, USA.

4 Método

4.1 Ensayos preliminares de elaboración de micropartículas cargadas con albúmina sérica bovina (BSA) por Secado por atomización.

Se elaboraron distintos sistemas microparticulados por secado por atomización, utilizando el equipo Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Figura 9).

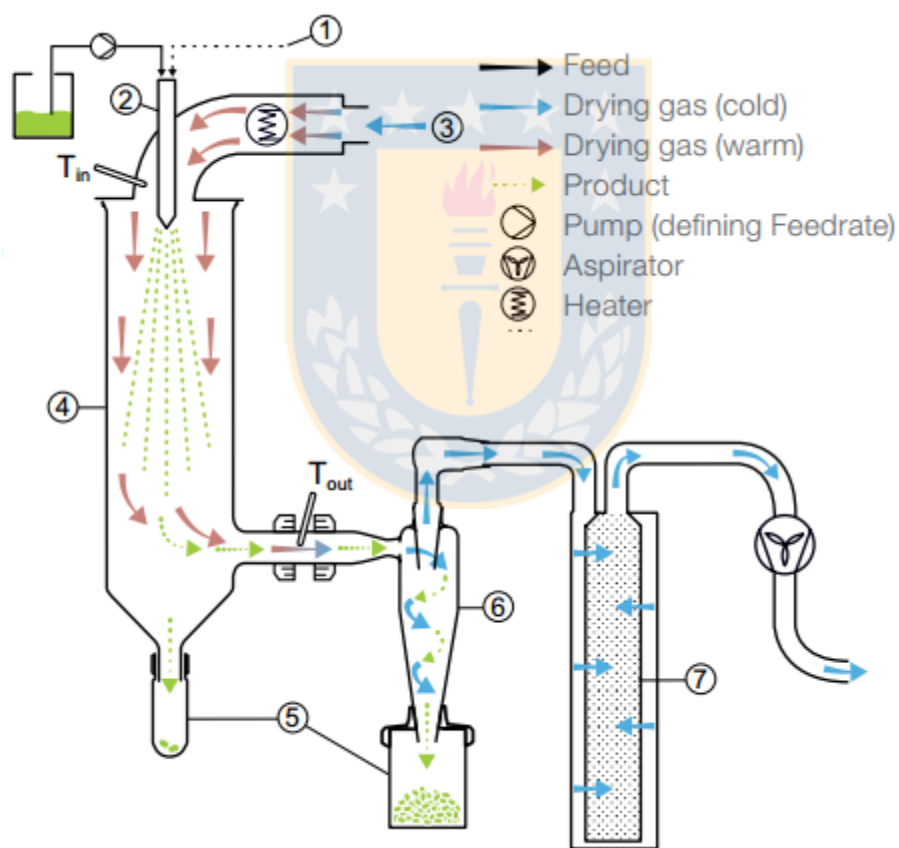


Figura 9: Esquema del Equipo Mini Spray Dryer B-290 y sus distintos componentes:
1) Ingreso del gas, 2)Boquilla de nebulización, 3)Gas de secado, 4) Cámara de secado,
5) Vasos recolectores, 6) Ciclón, 7) Filtro.

La metodología de secado por atomización funciona al hacer circular por el sistema la solución a micronizar, la que es rápidamente calentada por aire y posteriormente nebulizada por medio de aire comprimido hacia la cámara de secado del equipo. Por medio de la realización de vacío al sistema, las gotas recién secadas en la cámara junto con el solvente evaporado se movilizan hacia la zona del ciclón. Por gravedad las micropartículas se recolectan en el vaso recolector al final del ciclón, llegando posteriormente al filtro aquellas partículas de menor tamaño que no fueron retenidas en puntos anteriores del sistema. El solvente evaporado es eliminado del sistema hacia el exterior por medio de la bomba aspiradora.

De la formulación se modificaron parámetros como composición de la matriz, proporción de los componentes, método de disolución de las sustancias, tiempos de agitación entre otros. Los parámetros que se controlaron en el equipo Spray dryer fueron la temperatura de entrada, potencia de aspiración, bombeo de la muestra y diámetro de boquilla.

Los principales componentes utilizados en la elaboración de las micropartículas fueron sustancias con características de biocompatibilidad, de baja o nula toxicidad y biodegradables, como Alginato de sodio (ALG), Poloxámero 188 (PLX), Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), Alcohol Polivinílico (PVA) y Quitosano. Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como agente proteico, previo a la incorporación del péptido final.

Las micropartículas se estudiaron por microscopía óptica, donde se evaluó la recuperación de las muestras y la adhesión a las paredes internas del equipo de secado, entre otros factores.

De las preparaciones analizadas, se seleccionaron inicialmente, para seguir evaluando sus características, las siguientes:

4.1.1 Micropartículas de PLGA-PVA

Para la elaboración de micropartículas de PLGA-PVA se procedió de la siguiente manera (Figura 10), basado en trabajos de otros investigadores^{20, 22, 24}.

- Se disolvieron en 10 mL de agua nanopura 100 mg de PVA y 100 mg de sustancia peptídica (BSA) con agitación magnética.
- Por separado se disolvieron en 200 mL de diclorometano, 2 g de PLGA relación 50:50, con agitación magnética.
- Se incorporó la fase acuosa sobre la fase orgánica y se agitó por medio de equipo homogeneizador de alta velocidad a 8000 rpm por 5 minutos, a fin de formar emulsión w/o.
- La emulsión obtenida fue llevada a equipo Spray dryer para realizar secado por atomización y obtener las micropartículas. Las condiciones de trabajo del equipo fueron:
 - Temperatura de entrada: 65°C
 - Aspirador: 50 %
 - Bomba: 12 %
 - Boquilla: 0,7 mm.

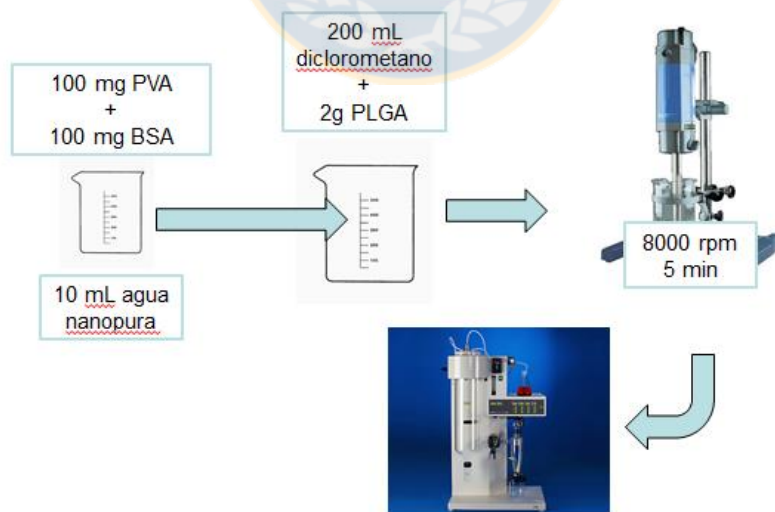


Figura 10: Esquema de elaboración de micropartículas de PLGA-PVA.

4.1.2 Micropartículas de Alginato-Poloxámero

Para la elaboración de micropartículas de ALG-PLX se procedió de la siguiente manera (Figura 11), tomando como referencia otros trabajos previos^{23, 25}.

- Se disolvieron 450 mg de ALG (como alginato sódico) en 100 mL de agua nanopura, conjuntamente con la sustancia peptídica (BSA) en cantidades variables según % de la carga que se desea obtener, en agitación magnética constante.
- Por separado se disuelven 450 mg de poloxámero 188 (PLX) en 100 mL de agua nanopura con agitación magnética.
- Se agrega la solución de PLX a la solución de ALG-proteína.
- Se homogeniza con agitación magnética.
- La solución obtenida se llevó a equipo Spray dryer para realizar secado por atomización y obtener las micropartículas. Las condiciones de trabajo del equipo fueron:
 - Temperatura de entrada: 110 °C
 - Aspirador: 80 %
 - Bomba: 15 %
 - Boquilla: 0,7 mm

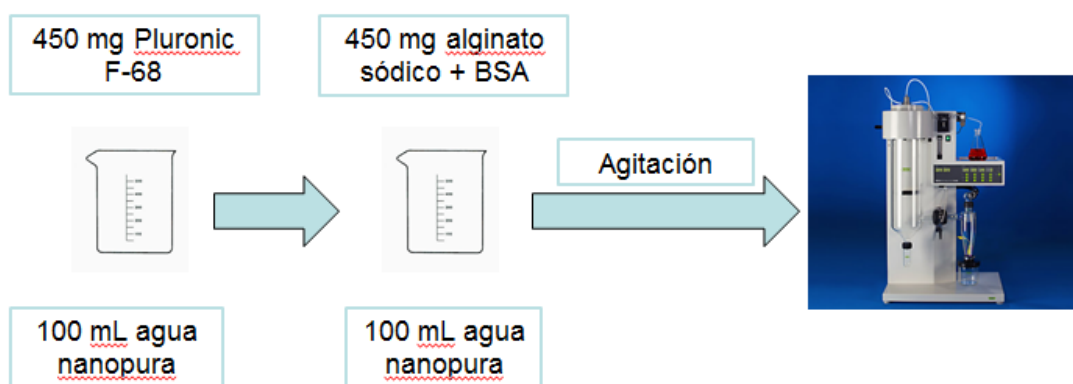


Figura 11: Esquema de elaboración de micropartículas de Alginato-Poloxámero.

4.2 Elaboración preliminar de micropartículas cargadas con molécula peptídica con actividad inmunogénica.

Una vez decididas las formulaciones más apropiadas para la incorporación de la MP, se procede a la elaboración de micropartículas cargadas. Estas se realizaron según las mismas condiciones de elaboración que aquellas cargadas con BSA. Se realizaron micropartículas de PLGA-PVA con una concentración de la MP de 1 % del total de masa de polvo. Esta fue incorporada a la formulación a la forma de solución, con una concentración de 2,56 mg/mL de proteína, diluyendo la solución inicial de 21,3 mg/mL. En las micropartículas de AGL-PLX se prepararon micropartículas cargadas al 1, 2 y 10 % de péptido, de la masa total de polvo.



4.3 Determinación de factores relevantes en la respuesta por medio de un diseño experimental de screening.

Para determinar qué factores afectan en mayor medida las características de las micropartículas, se realizó un diseño experimental de screening factorial 2^k , donde se evaluaron los siguientes parámetros:

- Variables respuesta analizadas:
 - Tamaño de partícula: Expresado como el promedio estadístico del tamaño de 200 partículas (como diámetro) desde la muestra analizada, expresado en μm .
 - Agregación: Definido por un score visual: 0: No se observa agregación significativa de las partículas de la muestra, 1: Se observa una importante agregación de las partículas de la muestra.
 - Recuperación: Expresado como % del total de sólidos recuperado en el ciclón del equipo spray dryer.

- Factores Continuos: 3 niveles
 - Proporción de componentes de la matriz: Expresado como porcentaje de ALG en relación a PLX, donde PLX es (100 -% ALG). Niveles: 95-72,5-50 %.
 - Velocidad de flujo en el equipo spray dryer: Expresado como % de bombeo de la bomba peristáltica del equipo spray dryer. Niveles: 10-15-20 %.
 - Concentración de las soluciones de trabajo: Expresado como g de sólidos totales disueltos en 100 mL de solución. Niveles: 1-1,5-2 g/100 mL.

- Factores discontinuos: 2 niveles
 - Diámetro boquillas de nebulización: 0,5 y 0,7 mm

De esta manera, y por medio del Software STATGRAPHIC Centurion XVI, se obtuvo la siguiente secuencia de experimentos a realizar (Tabla 1), debiendo elaborarse 16 lotes de micropartículas. Por medio del análisis de los diagrama de Pareto, se determinará qué factores influyen significativamente en cada una de las características de las micropartículas evaluadas y el proceso de elaboración de estas.

Tabla 1: Condiciones de los experimentos del diseño factorial.

| Experimento | Proporción ALG:PLX (% ALG) | Flujo (% Bombeo) | Concentración sólidos (g/100 mL) | Boquilla (mm) |
|-------------|----------------------------|------------------|----------------------------------|---------------|
| 1 | 95 | 20 | 1 | 0,5 |
| 2 | 50 | 20 | 2 | 0,5 |
| 3 | 50 | 10 | 1 | 0,7 |
| 4 | 50 | 20 | 1 | 0,7 |
| 5 | 95 | 10 | 2 | 0,7 |
| 6 | 95 | 20 | 2 | 0,5 |
| 7 | 95 | 20 | 1 | 0,7 |
| 8 | 50 | 10 | 1 | 0,5 |
| 9 | 50 | 20 | 1 | 0,5 |
| 10 | 95 | 10 | 2 | 0,5 |
| 11 | 95 | 10 | 1 | 0,5 |
| 12 | 50 | 10 | 2 | 0,5 |
| 13 | 50 | 10 | 2 | 0,7 |
| 14 | 95 | 10 | 1 | 0,7 |
| 15 | 50 | 20 | 2 | 0,7 |
| 16 | 95 | 20 | 2 | 0,7 |

4.4 Análisis granulométrico para determinación del tamaño de partícula de las muestras.

Para el análisis del tamaño de partícula de las muestras de polvo obtenidas por spray drying, se utilizó el microscopio óptico Primo Star (Zeiss, Alemania). Visualizando el polvo seco sobre un portaobjeto, se tomaron fotografías, haciendo uso de la cámara fotográfica acoplada (Canon EOS Rebel T3). Posteriormente las fotografías se analizaron con el software AxioVision, para determinar el diámetro de las micropartículas. Para cada muestra se midieron 200 partículas y se fijó como valor de tamaño, la media obtenida de todas las mediciones.

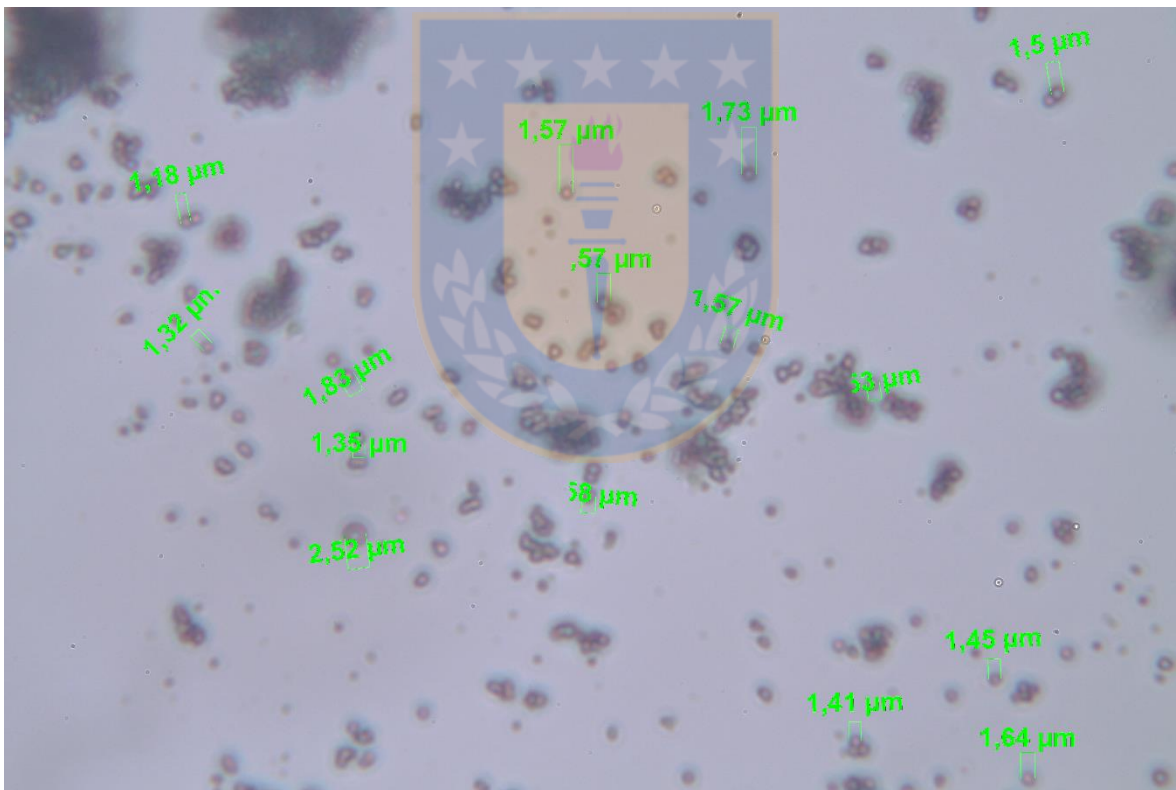


Figura 12: Imagen de microscopía óptica de una muestra de micropartículas de ALG-PLX a 1000x. Se observan algunas determinaciones del diámetro de partícula.

4.5 Cuantificación de proteína desde muestras de micropartículas y perfiles de disolución.

Se buscó un método que permitiese la cuantificación de la molécula peptídica encapsulada desde las micropartículas, ya sea en muestras de micropartículas disueltas como en medios de disolución desde muestras de estudios de cesión de la proteína. Para esto se probaron dos métodos.

4.5.1 Método de Bradford.

Consiste en la incorporación de reactivo Comassie Blue G-250, de color marrón, a las muestras. El reactivo se fija a las proteínas presentes, produciendo un viraje del color hacia el azul, para posteriormente medir la absorbancia de la muestra a 595 nm ²⁶ (Figura 13). Previamente se realiza una curva de calibración con BSA, con viales estandarizados de la proteína, incorporados en el mismo kit de análisis.



Figura 13: Método de Bradford para la cuantificación de proteínas y sustancias peptídicos. Al aumentar la concentración de proteínas (de izquierda a derecha) la intensidad del complejo coloreado azul aumenta.

4.5.2 Método del Ácido Bicinconínico

Presenta mayor sensibilidad y menor cantidad de interferencias asociadas²⁷. Consiste nuevamente en un método colorimétrico. La muestra conteniendo los componentes peptídicos (proteínas) se somete a reacción con una solución

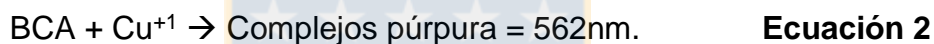
compuesta por: 50 partes de Reactivo BCA A, una solución de BCA en medio alcalino (hidróxido de sodio 0,1N) y 1 parte de Reactivo BCA B, una solución de sulfato de cobre (CuSO₄) al 4 %.

Los iones de cobre reaccionan con las proteínas reduciéndose según:



Las zonas de las proteínas que permiten la reducción del Cu⁺² son los enlaces peptídicos, la cisteína, cistina, triptófano y tirosina²⁸.

Posteriormente el reactivo BCA, interacciona con el cobre reducido en medio alcalino, obteniéndose un complejo coloreado de color púrpura (Ecuación 2) que es posteriormente cuantificado por espectrofotometría visible²⁹.



La cantidad de proteína en la muestra se determina en relación a la absorbancia de la muestra respecto a una curva de calibración de niveles conocidos de BSA, que es aportada junto con el kit de BCA.

El análisis colorimétrico se realizó en placas microtituladoras de 96 pocillos. A 25 microlitros (μL) de muestra se le incorporan 200 μL de la solución de BCA. Las muestras se dejan incubar en un horno a temperatura constante de 37°C durante 30 minutos³⁰. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se leen en Lector Multi-modal Synergy 2 (Biotek, USA) (Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción) donde se mide la absorbancia de las muestras y los distintos niveles de la curva de calibración. En la Figura 14 se puede observar una placa microtituladora con muestras analizadas por esta metodología.

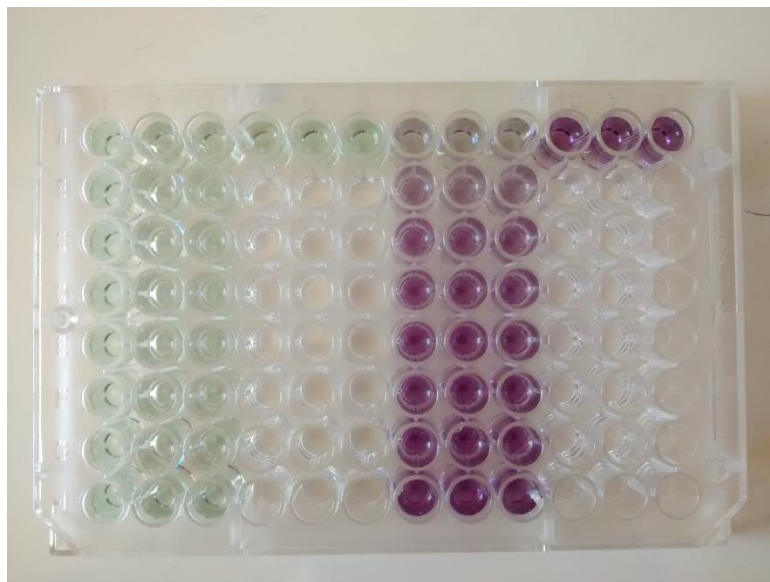


Figura 14: Placa microtituladora usada en el análisis de muestras por reacción con kit BCA. Se observa un viraje desde el color verde, correspondiente a las menores concentraciones de proteínas hacia el color púrpura que según la intensidad de este representa mayores concentraciones de proteínas.

4.6 Optimización de la metodología de elaboración de las micropartículas cargadas con la molécula peptídica, por medio de un modelo de superficie-respuesta.

Una vez seleccionados los factores con mayor influencia sobre las variables analizadas, se realizó un diseño de experimento central compuesto centrado en las caras, con 2 puntos centrales y 2 bloques, por medio del software STATGRAPHICS Centurion XVI (Tabla 2), para obtener las condiciones óptimas para la preparación de micropartículas, en esta ocasión ya cargadas con la molécula inmunogénica, priorizando un mayor porcentaje de carga y la minimización del tamaño de las partículas. En este diseño de experimento se evaluaron:

- Variables respuesta analizadas:
 - Tamaño de partícula: Expresado como el promedio estadístico del tamaño de 200 partículas desde la muestra analizada, medido en μm .
 - Carga: Expresado como % de proteína en la muestra o lote de micropartículas.
- Factores: Cada uno en 3 niveles
 - Proporción de componentes de la matriz: Expresado como porcentaje de ALG en relación a PLX, donde PLX es (100 -% ALG). Niveles: 95-72,5-50 %.
 - Velocidad de flujo en el equipo spray dryer: Expresado como % de bombeo de la bomba peristáltica del equipo spray dryer. Niveles: 10-15-20 %.
 - Concentración de las soluciones de trabajo: Expresado como g de sólidos totales disueltos en 100 mL de solución. Niveles: 1-1,5-2 g/100 mL.

Las micropartículas se elaboraron a partir de soluciones al 2 % de ALG y PLX, separadas, las que se mezclaban según la proporción indicada en cada experimento del diseño. Una vez homogeneizadas se les agregó solución de la molécula peptídica suficiente para incorporar un 10 % de la MP en el total de sólidos. La concentración de cada solución era variable dependiendo de lo aportado por los encargados de su producción (Universidad Austral). Posteriormente se adicionó trehalosa suficiente para un 5 % del total de sólidos. Se dejaba en agitación durante una hora y se llevaba al Spray dryer. Para cada experimento se prepararon soluciones equivalentes a 1 g de total de sólidos.

Tabla 2: Condiciones de los experimentos del diseño Central Compuesto centrado en la caras, para lo optimización de parámetros en equipo spray dryer.

| Experimento | Bloque | Proporción ALG:PLX (% ALG) | Flujo (% Bombeo) | Concentración sólidos (g/100 mL) |
|-------------|--------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| 1 | 1 | 95 | 10 | 1 |
| 2 | 1 | 50 | 20 | 2 |
| 3 | 1 | 72,5 | 15 | 1,5 |
| 4 | 1 | 72,5 | 10 | 1,5 |
| 5 | 1 | 95 | 10 | 2 |
| 6 | 1 | 95 | 15 | 1,5 |
| 7 | 1 | 72,5 | 15 | 1,5 |
| 8 | 1 | 50 | 20 | 1 |
| 9 | 1 | 50 | 15 | 1,5 |
| 10 | 1 | 50 | 10 | 2 |
| 11 | 1 | 72,5 | 15 | 2 |
| 12 | 1 | 50 | 10 | 1 |
| 13 | 1 | 72,5 | 15 | 1 |
| 14 | 1 | 95 | 20 | 1 |
| 15 | 1 | 72,5 | 20 | 1,5 |
| 16 | 1 | 95 | 20 | 2 |
| 17 | 2 | 95 | 10 | 1 |
| 18 | 2 | 50 | 20 | 2 |
| 19 | 2 | 72,5 | 15 | 1,5 |
| 20 | 2 | 72,5 | 10 | 1,5 |
| 21 | 2 | 95 | 10 | 2 |
| 22 | 2 | 95 | 15 | 1,5 |
| 23 | 2 | 72,5 | 15 | 1,5 |
| 24 | 2 | 50 | 20 | 1 |
| 25 | 2 | 50 | 15 | 1,5 |
| 26 | 2 | 50 | 10 | 2 |
| 27 | 2 | 72,5 | 15 | 2 |
| 28 | 2 | 50 | 10 | 1 |
| 29 | 2 | 72,5 | 15 | 1 |
| 30 | 2 | 95 | 20 | 1 |
| 31 | 2 | 72,5 | 20 | 1,5 |
| 32 | 2 | 95 | 20 | 2 |

El análisis del diseño experimental considera la obtención de los gráficos de efectos principales y superficie-respuesta y la obtención de la combinación de niveles de factores que maximiza la función de deseabilidad, es decir la condición óptima para la elaboración de micropartículas, según los parámetros que consideramos esperados.

4.7 Estudio de cesión de la molécula peptídica desde las micropartículas a sistemas de fluidos digestivos simulados.

Ya una vez seleccionada la formulación final, se procedió a evaluar la liberación de la MP desde la formulación a medios simulados de contenido gástrico e intestinal. Para eso, se utilizó el equipo de Disolución TDT-08L (Electrolab, India). En 3 vasos del equipo se incorporó 500 mL de Buffer Fosfato 0,05 M a pH 2,7, simulando el pH gástrico de los salmones y a los otros 3, 500 mL de Buffer Fosfato 0,05 M a pH 8,0, simulando el pH intestinal. A cada uno de los vasos se les agregó 1,6 g de micropartículas correspondientes a la formulación final obtenida por el proceso de optimización de parámetros del diseño de experimentos central compuesto. Se dejó en agitación con sistema de paleta a 100 rpm por un tiempo total de 6 horas. Se tomaron alícuotas de 2 mL, con reposición de volumen del medio, a los tiempos: 5 min, 30 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. Posteriormente las muestras fueron cuantificadas sin diluir por metodología BCA explicada anteriormente. Finalmente se graficó la cantidad total liberada en relación al tiempo en ambos medios.

5 Resultados y Discusión.

5.1 Elaboración de micropartículas

Para la elaboración de las micropartículas de PLGA-PVA, fue necesaria la utilización de solventes orgánicos (diclorometano), debido a las características de solubilidad del PLGA. El PLGA es el componente principal de la matriz polimérica de estas micropartícula. Al realizarse una emulsión simple se forman gotas entre la fase acuosa, donde se encuentra el componente peptídico (BSA) y el PVA, que actúa como tensioactivo y estabilizador de los glóbulos de la emulsión. Al pasar esta emulsión simple por el equipo de secado, las gotas formadas tienen un componente mayoritario de solvente orgánico y PLGA y gotas interiores del medio acuoso. Al evaporarse los solventes de la emulsión, se forman las micropartículas de PLGA con la proteína al interior.

En la elaboración de las micropartículas del ALG-PLX, el medio de disolución fue exclusivamente acuoso, lo que requirió utilizar mayores temperaturas de secado en el equipo spray dryer. El principal componente estructural de la matriz es el Alginato, que forma una entramado donde se aloja al interior la MP. Conjuntamente, debido a su punto de fusión (52 °C) el PLX funde a las temperaturas de trabajo del equipo spray dryer, favoreciendo el relleno de espacios de las micropartículas una vez formadas, mejorando las características de superficie.

5.2 Microscopía electrónica de barrido de micropartículas cargadas con péptido/proteína.

El análisis de las características de las micropartículas se realizó por microscopía electrónica de barrido, en el Laboratorio de microscopía electrónica de la Universidad de Concepción. Se presentan las microscopías obtenidas (Figura 15-Figura 17)

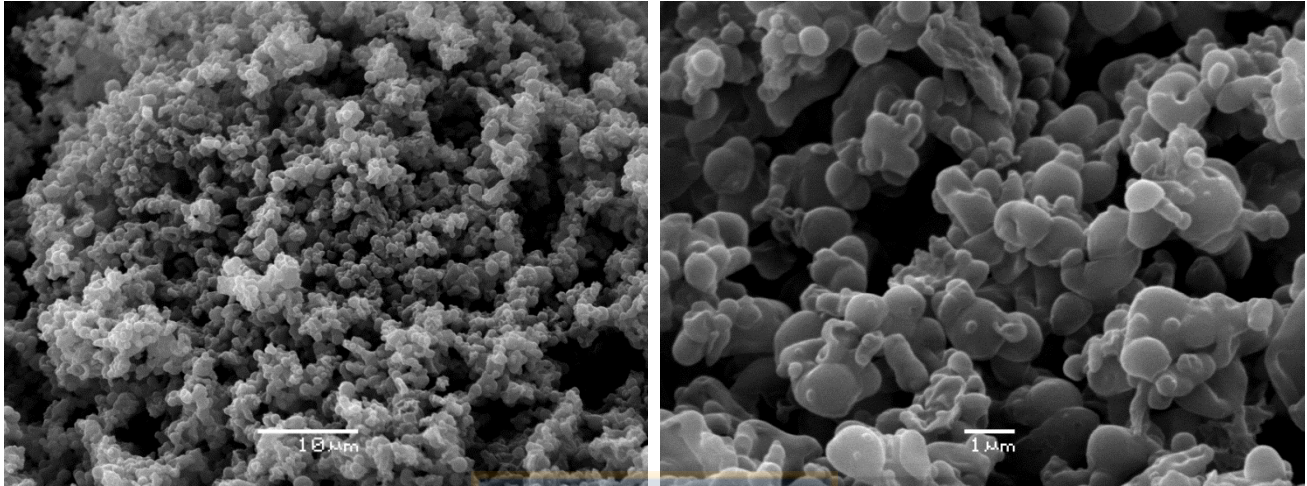


Figura 15: Micropartículas PLGA-PVA cargadas con péptido al 1 %. A la izquierda vista a 3000x. A la derecha vista a 10000x.

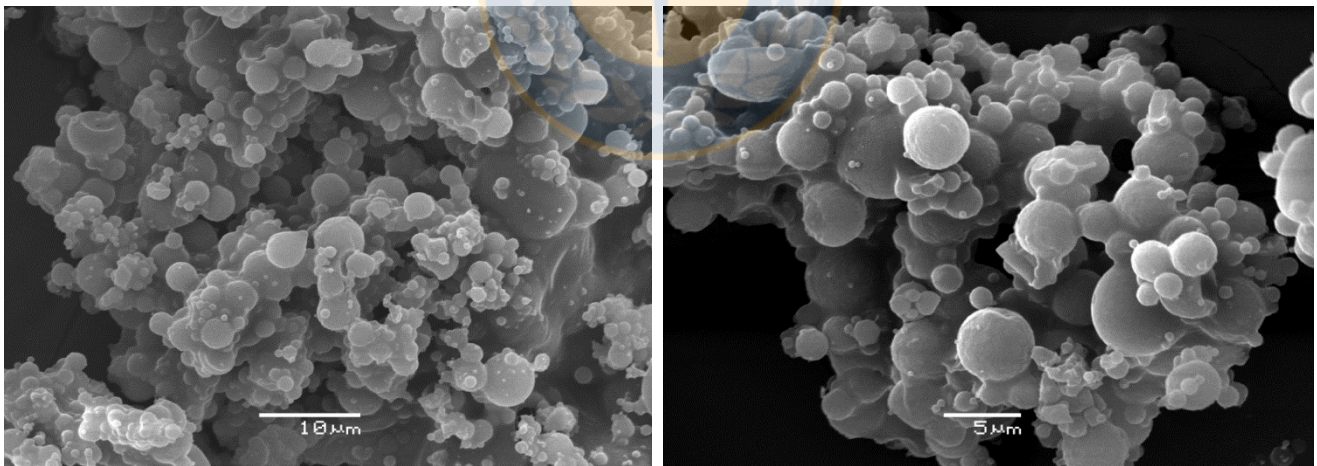
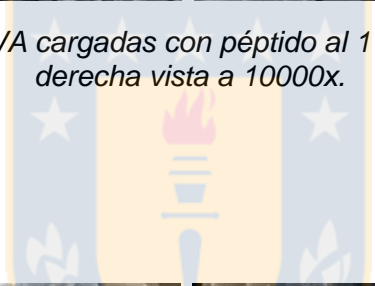


Figura 16: Micropartículas Alginato-Poloxámero cargadas con péptido al 1 %. A la izquierda vista a 2000x. A la derecha vista a 3000x.

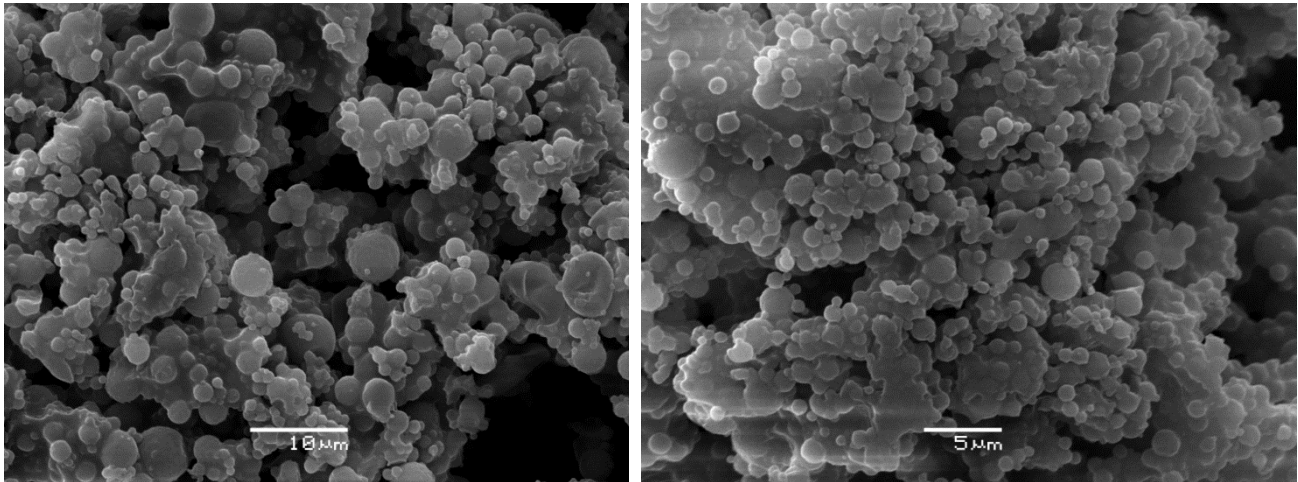


Figura 18: Micropartículas Alginato-Poloxámero cargadas con péptido al 2 %. A la izquierda vista a 2000x. A la derecha vista a 3000x.

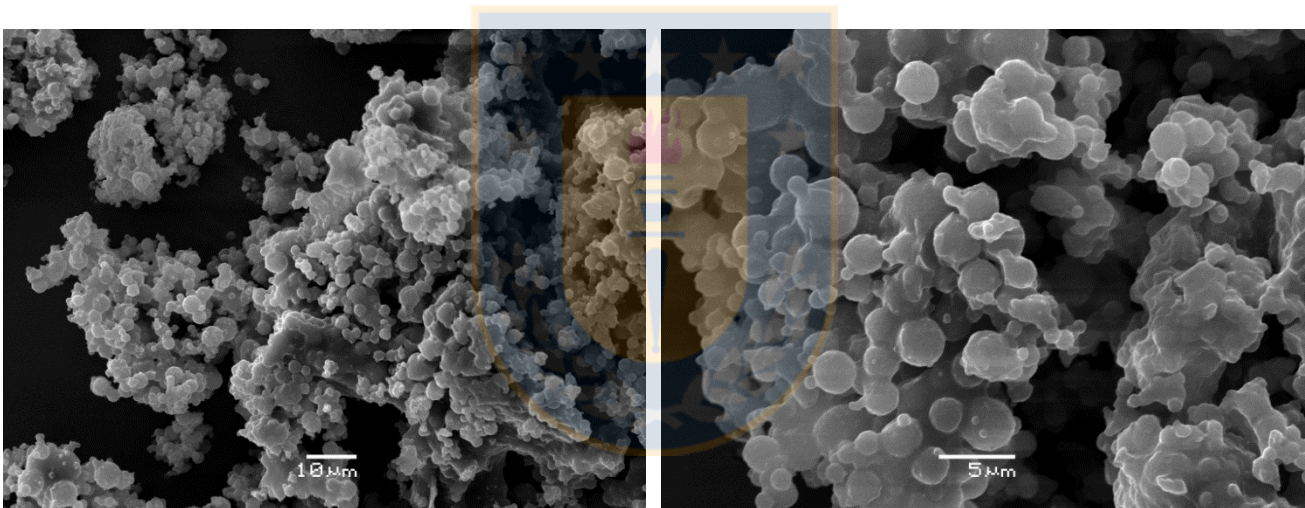


Figura 17: Micropartículas ALG-PLX cargadas con péptido al 10 %. A la izquierda vista a 1000x. A la derecha vista a 3000x.

Se observaron menores tamaños de partícula en las micropartículas de PLGA-PVA, lo que se asocia a la utilización de solventes orgánicos, que por medio de evaporación más rápida del solvente en la cámara de secado generan una contracción del tamaño de la micropartícula final.

En las micropartículas de ALG-PLX se observó aglomeración de micropartículas, lo cual se asociaría a niveles altos de PLX. Fue necesario modificar

la relación de esta sustancia en nuevas preparaciones a fin de disminuir la agregación de partículas. Otro factor que favoreció la agregación y la potencia del haz de electrones del microscopio, que en ocasiones mostraba alteraciones en tiempo real de la forma de las micropartículas, desde formas esféricas a irregulares.

A partir de estos resultados preliminares se tomaron las siguientes decisiones:

- Se continuó exclusivamente con las formulaciones de ALG-PLX. Se descartó así la utilización de las preparaciones de PLGA-PVA debido a varios factores, como el uso de cantidades considerables de solventes orgánicos, los cuales además pueden significar la presencia de niveles traza de estos en las preparaciones finales, desnaturalización de las proteínas, en este caso la MP, y los altos costos asociados a su preparación, principalmente por el diclorometano y el PLGA.
- Se decidió la incorporación de un nuevo componente a la formulación de ALG-PLX, con acción antiagregante. Se realizaron ensayos preliminares con lactosa, para finalmente decantarse por el uso de Trehalosa, un disacárido conformado por dos unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha, \alpha-1, 1$. La selección de este agente se determinó porque permite disminuir la agregación de la formulación y diversos estudios indican que ayuda a estabilizar moléculas proteicas en las formulaciones en las cuales se incorpora este³¹⁻³³, se decidió incorporar un 0,5 % de trehalosa del total de sólidos a cada preparación.
- También fue necesario la modificación y optimización de parámetros en el proceso de secado por atomización, por lo que el desarrollo de un modelo de experimento podría indicar las condiciones óptimas de trabajo para obtener micropartículas con las características deseadas para la formulación.

5.3 Diseño factorial para determinación de factores influyentes en las respuestas.

Se elaboraron los lotes del diseño factorial y se evaluaron las variables de cada uno de los lotes según los métodos expuestos anteriormente. Así en la Tabla 3, se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 3: Resultados de las variables estudiadas en el diseño factorial.

| Experimento | Tamaño (μm) | Agregación | Recuperación (%) |
|-------------|--------------------------|------------|------------------|
| 1 | 2,2 | 0 | 44 |
| 2 | 2,5 | 1 | 20 |
| 3 | 1,6 | 0 | 20 |
| 4 | 1,4 | 0 | 30 |
| 5 | 1,8 | 0 | 45 |
| 6 | 2,8 | 0 | 35 |
| 7 | 1,4 | 0 | 20 |
| 8 | 1,8 | 0 | 15 |
| 9 | 2 | 1 | 24 |
| 10 | 2,2 | 0 | 37 |
| 11 | 1,6 | 0 | 44 |
| 12 | 1,6 | 0 | 22 |
| 13 | 1,5 | 1 | 35 |
| 14 | 1,4 | 0 | 45 |
| 15 | 2,8 | 1 | 20 |
| 16 | 5 | 0 | 15 |

El análisis de los datos por el Software Statgraphic Centurion, otorgó los Diagramas de Pareto para cada una de las respuestas estudiadas.

5.3.1 Tamaño de partícula.

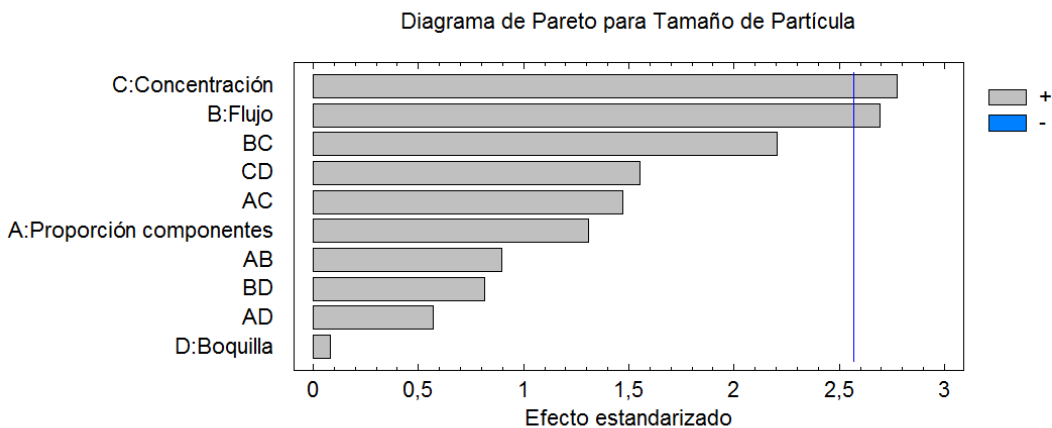


Figura 19: Diagrama de Pareto para la variable Tamaño de partícula, los distintos factores y sus interacciones. En gris el factor influye de forma directamente proporcional sobre la respuesta y en el azul de forma inversamente proporcional.

Para la respuesta tamaño de partícula (Figura 19) se determinaron como factores influyentes en la respuesta (aquella barras que sobrepasan la línea azul, equivalente a la significancia expresada en valor p) las variables de concentración y flujo, en ambos casos de forma directamente proporcional. Este resultado cumple con lo esperado, ya que al aumentar la concentración de sólidos en la solución, existen más componentes sólidos por tamaño de gota, menor solvente a evaporar y se obtienen micropartículas de mayor tamaño. De la misma manera con el flujo, a mayor cantidad de material nebulizado en relación al tiempo, se nebulizan mayores cantidades de solución, se obtienen gotas de mayor tamaño y mayor cantidad de sólidos totales, aumentando el tamaño de partícula.

5.3.2 Agregación.

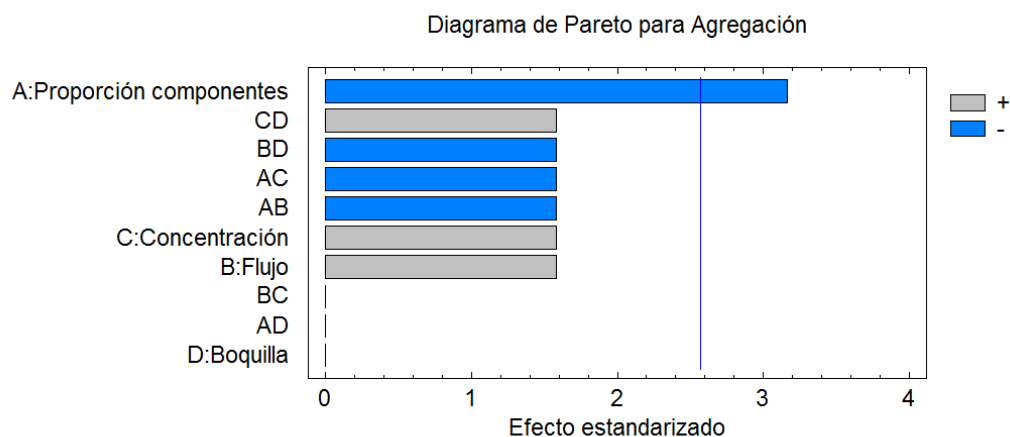


Figura 20: Diagrama de Pareto para la variable Agregación, los distintos factores y sus interacciones. En gris el factor influye de forma directamente proporcional sobre la respuesta y en el azul de forma inversamente proporcional.

Para esta respuesta, solo el factor Proporción de los componentes, expresado en % de ALG influyó en esta. Así al aumentar el porcentaje de Alginato en relación al PLX, se disminuyó la agregación. Se tiene entonces que cantidades mayores de PLX aumentan la agregación de las micropartículas, debido a sus características de adhesividad, por lo que este componente debe ser controlado en la formulación, a fin de evitar este fenómeno.

5.3.3 Recuperación.

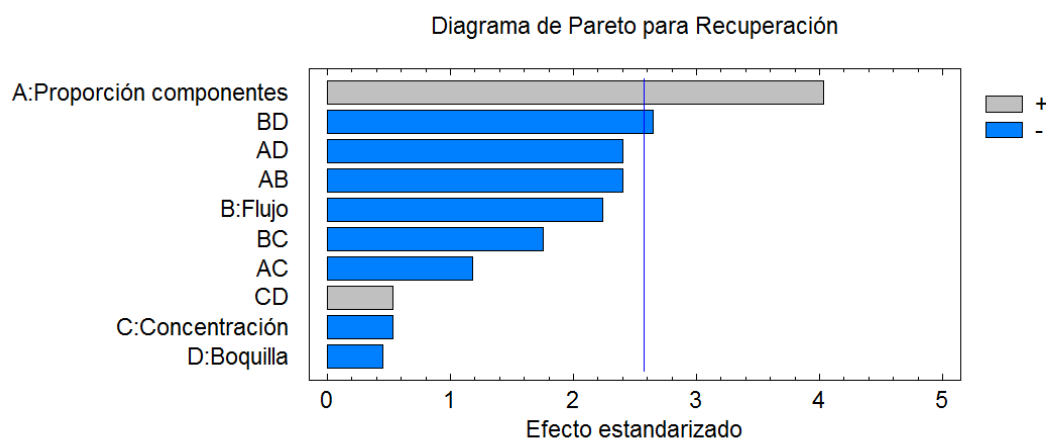


Figura 21: Diagrama de Pareto para la variable Recuperación, los distintos factores y sus interacciones. En gris el factor influye de forma directamente proporcional sobre la respuesta y en el azul de forma inversamente proporcional.

La recuperación del total de sólidos en el equipo se vio afectada principalmente por la proporción de los componentes de la matriz polimérica. Así, debido a las características de adhesividad de PLX, a menores cantidades de este, mayor resultó ser la recuperación total de sólidos. Por lo cuál debería ser necesario limitar la proporción de este componente sin afectar las propiedades de mucoadhesividad esperada de las micropartículas. También se observó una interacción influyente entre la boquilla y el flujo de bombeo, de carácter inversamente proporcional.

En base a los resultados obtenidos en este diseño de screening, se determinó seguir estudiando los siguientes parámetros en un diseño de superficie respuesta para obtener un análisis de optimización de la formulación: Proporción de los componentes, flujo y concentración de sólidos de la solución.

5.4 Curva de calibración para cuantificación de proteínas por método de BCA.

En primera instancia se buscó cuantificar las proteínas presentes en las micropartículas por el método de Bradford. Sin embargo, este método presentó incompatibilidad con componentes de las micropartículas (detergentes y tensioactivos actúan como interferentes), y además no resultó compatible con los análisis en buffer fosfato, ya que interfiere en la reacción el pH básico³⁴.

Por este motivo, se debió realizar la cuantificación de las proteínas presentes por medio de un método con menores incompatibilidades, seleccionándose finalmente la cuantificación por el método del ácido bicinconínico, descrito previamente.

Para la posterior cuantificación de la MP desde las micropartículas y las soluciones de los estudios de liberación, se desarrolló una curva de calibración de BSA a los niveles 200, 400, 600, 800 y 1000 $\mu\text{g/mL}$, según instrucciones del kit de análisis de proteínas por BCA.

Se obtuvo de esta manera la siguiente curva de calibración (Figura 22).

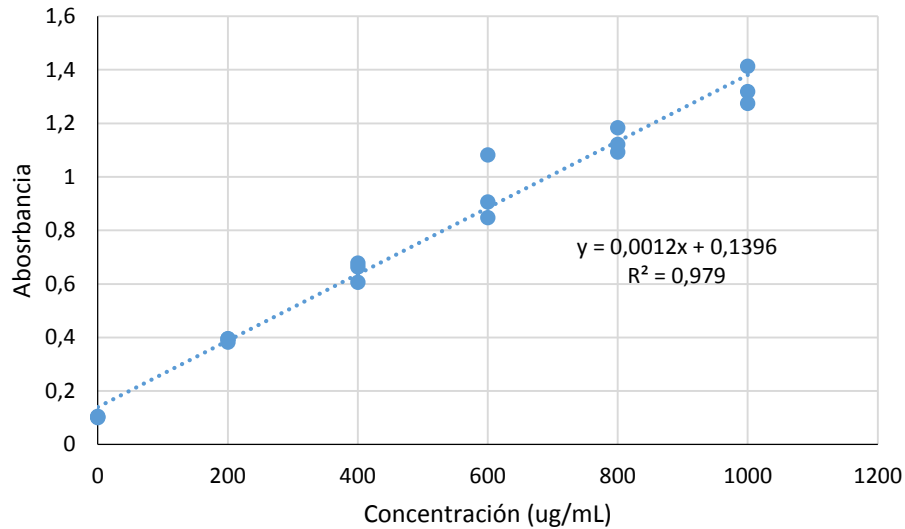


Figura 22: Curva de calibración de BSA para la determinación de proteína por método BCA.

El análisis con Graphpad, determinó los siguientes estadígrafos de la curva

Tabla 4: Estadígrafos de la curva de calibración de BSA.

| | |
|------------------------------------|-----------------------------|
| Ecuación de la recta | $Y = 0,001241 * X + 0,1396$ |
| Intervalo de 95% de confianza de m | 0,001144 - 0,001337 |
| Intervalo de 95% de confianza de n | 0,08129 - 0,1978 |
| R^2 | 0,979 |
| F | 747,1 |
| P-Value | < 0,0001 |

El valor de R^2 cercano a la unidad indica un alto grado de linealidad del sistema. El valor de F, con un P-Value asociado menor a 0,0001 indica que la pendiente de la curva de calibración es significativamente distinta de cero.

5.5 Optimización de la metodología de elaboración de las micropartículas cargadas con la molécula peptídica, por medio de un modelo de superficie-respuesta.

Se elaboraron los distintos lotes del diseño y midiendo tamaño de partícula y carga de estas según los métodos explicados anteriormente, se obtuvieron los siguientes valores (Tabla 6).

Tabla 5: Resultados de las variables estudiadas en el diseño central compuesto centrado en las caras.

| Experimento | Bloque | Tamaño (μm) | Carga (%) |
|-------------|--------|--------------------------|-----------|
| 1 | 1 | 2,09 | 7,51 |
| 2 | 1 | 2,17 | 7,95 |
| 3 | 1 | 2,13 | 7,76 |
| 4 | 1 | 2,20 | 7,92 |
| 5 | 1 | 2,93 | 8,44 |
| 6 | 1 | 1,86 | 9,45 |
| 7 | 1 | 1,85 | 8,26 |
| 8 | 1 | 2,17 | 8,29 |
| 9 | 1 | 2,05 | 7,48 |
| 10 | 1 | 1,80 | 8,65 |
| 11 | 1 | 2,28 | 8,29 |
| 12 | 1 | 2,04 | 8,93 |
| 13 | 1 | 2,15 | 8,21 |
| 14 | 1 | 2,46 | 7,93 |
| 15 | 1 | 2,39 | 8,07 |
| 16 | 1 | 2,19 | 8 |

Tabla 6 (continuación): Resultados de las variables estudiadas en el diseño central compuesto centrado en las caras.

| Experimento | Bloque | Tamaño (μm) | Carga (%) |
|-------------|--------|--------------------------|-----------|
| 17 | 2 | 1,68 | 8,34 |
| 18 | 2 | 2,17 | 7,88 |
| 19 | 2 | 1,92 | 8,42 |
| 20 | 2 | 3,17 | 7,65 |
| 21 | 2 | 2,81 | 9,18 |
| 22 | 2 | 2,28 | 7,57 |
| 23 | 2 | 1,85 | 8,85 |
| 24 | 2 | 2,14 | 9,49 |
| 25 | 2 | 1,98 | 8,76 |
| 26 | 2 | 1,82 | 8,13 |
| 27 | 2 | 3,17 | 8,88 |
| 28 | 2 | 2,29 | 7,75 |
| 29 | 2 | 2,43 | 6,15 |
| 30 | 2 | 2,06 | 8,32 |
| 31 | 2 | 1,91 | 8,71 |
| 32 | 2 | 2,35 | 8,17 |

A partir del análisis de estos datos por medio de Software, se obtuvieron los siguientes gráficos.

5.5.1 Gráficos de efectos principales

Para las respuestas estudiadas, se obtuvieron los siguientes gráficos.

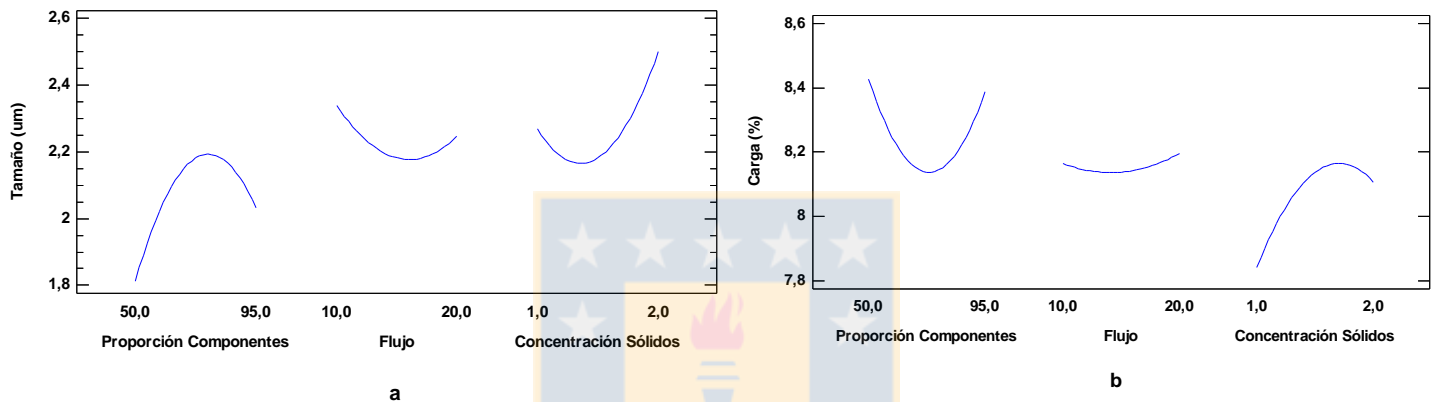


Figura 23: Gráficos de efectos principales para a) Tamaño de partícula; b) Carga

Se observan significativas variaciones del tamaño de partícula obtenido al modificar individualmente las tres variables estudiadas.

Para la carga de las partículas, se puede observar que esta varía de manera significativa con las modificaciones de la proporción de los componentes de la matriz polimérica y la concentración de sólidos de las soluciones nebulizadas. Sin embargo, las modificaciones del flujo de bombeo, parecen generar variaciones de menor significancia en esta respuesta.

5.5.2 Optimización de múltiples respuestas.

Por medio del software, fue posible determinar, los valores de los variables necesarios para lograr una formulación óptima donde se minimice el tamaño de partícula y se aumente la carga, obteniendo los siguiente óptimos.

Tabla 7: Factores óptimos iniciales, previo ajuste del diseño.

| Factor | Bajo | Alto | Óptimo |
|-------------------------------------|------|------|--------|
| Proporción de componentes (% ALG) | 50 | 95 | 50 |
| Flujo (%) | 10 | 20 | 15 |
| Concentración de sólidos (g/100 mL) | 1 | 2 | 1,5 |

Sin embargo, debido a que en todos los lotes experimentales, las determinaciones de tamaño se mantuvieron en valores adecuados para el uso de estas micropartículas, se determinó modificar la respuesta esperada del tamaño, maximizándola, ajustando el diseño experimental. Esto también se vio en base a que el óptimo inicial, presentaba el nivel más alto de poloxámero, lo que podría mermar la recuperación de sólidos totales y favorecer la agregación de las partículas.

Así se obtuvieron los factores óptimos finales de la formulación.

Tabla 8: Factores óptimos finales.

| Factor | Óptimo |
|-------------------------------------|--------|
| Proporción de componentes (% ALG) | 95 |
| Flujo (%) | 10 |
| Concentración de sólidos (g/100 mL) | 2 |

Por medio del software Estadístico Modde 5.0, se generaron los gráficos de superficie respuesta para el diseño experimental ajustado, para las respuestas Carga y tamaño, variando la Proporción de componentes y Flujo, y manteniendo la concentración de sólidos.

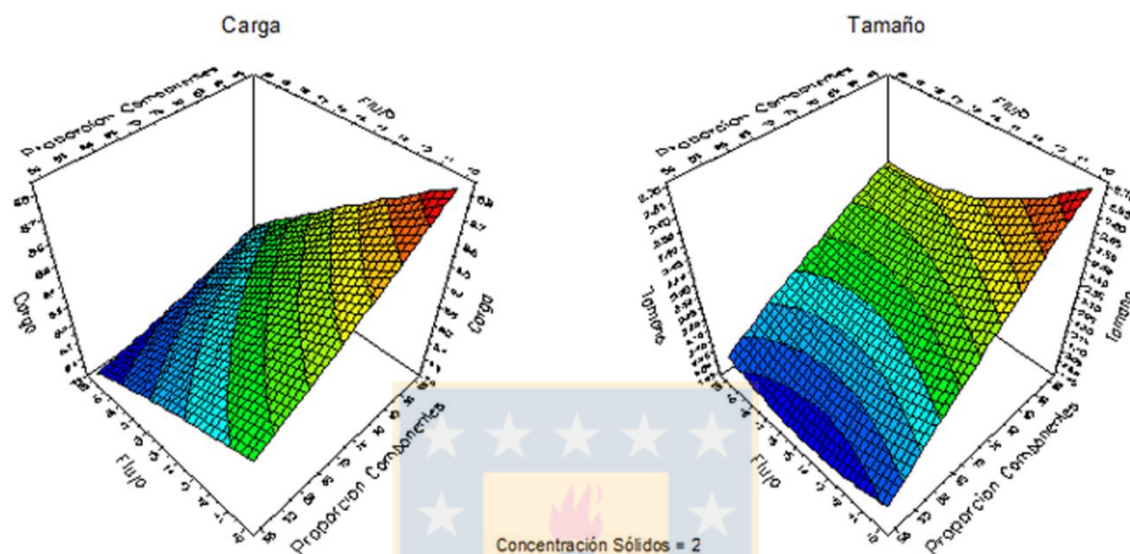


Figura 24: Gráficos de superficie-respuesta para las variables de Carga y Tamaño de partícula, con concentración de sólidos = 2 g/100 mL.

5.6 Elaboración de micropartículas cargadas con una molécula peptídica, según las condiciones óptimas obtenidos por el diseño experimental.

Ya con las condiciones óptimas obtenidas para la realización de las micropartículas, se realizó un lote mayor de micropartículas. Para eso el procedimiento fue el siguiente:

- Se mezclaron con agitación constante 500 mL de solución de ALG al 2 % con 26,3 mL de solución de PLX al 2 %.
- A este se le agregó 23,1 mL de solución equivalente a 1g de MP (concentración 43,1 mg/mL).
- Se agregó 0,5 g de Trehalosa.
- Se dejó agitar por 1 hora.
- Se pasó por equipo Spray dryer para su secado y obtención de las micropartículas.

Las micropartículas obtenidas se analizaron por SEM, obteniendo la siguiente imagen

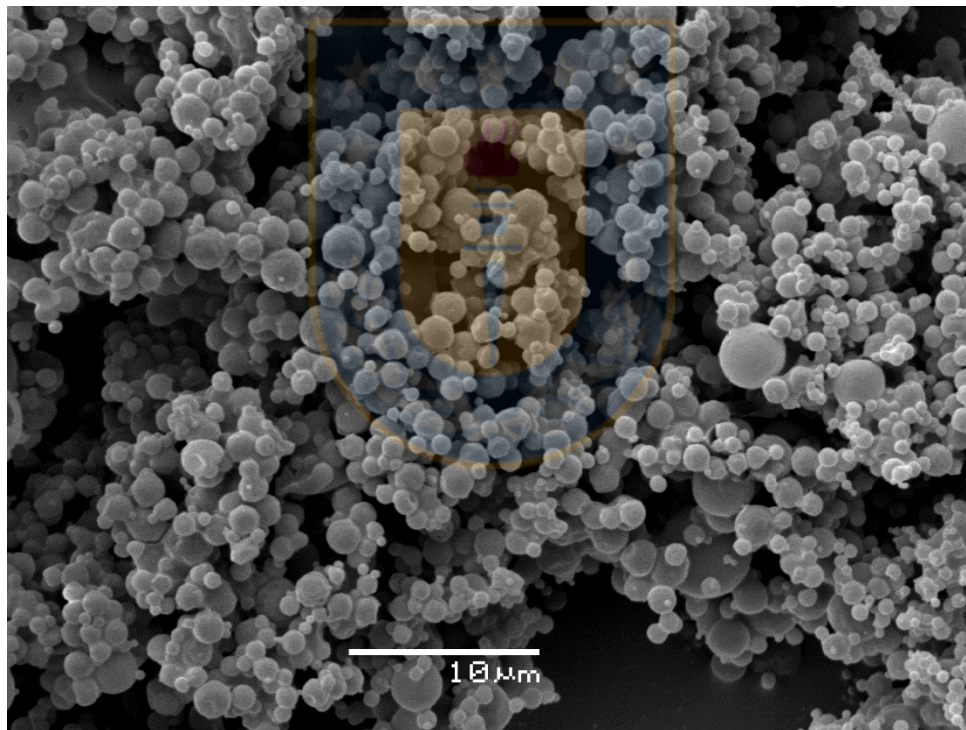


Figura 25: Microscopía electrónica de Barrido de las micropartículas de ALG-PLX obtenidas por secado por atomización (Aumento 2000X)

Se obtuvieron micropartículas esféricas, de superficie lisa, con una baja agregación y un tamaño óptimo para su incorporación posterior a sistemas de alimentación para peces en forma de pellets.

Se determinó la carga de MP de las micropartículas por análisis BCA, obteniendo una carga de 9 %.

5.7 Estudio de cesión de la molécula peptídica desde las micropartículas a sistemas de fluidos digestivos simulados.

Finalmente se realizó el estudio de cesión de la MP desde las micropartículas obtenidas, donde se obtuvieron los siguientes resultados.

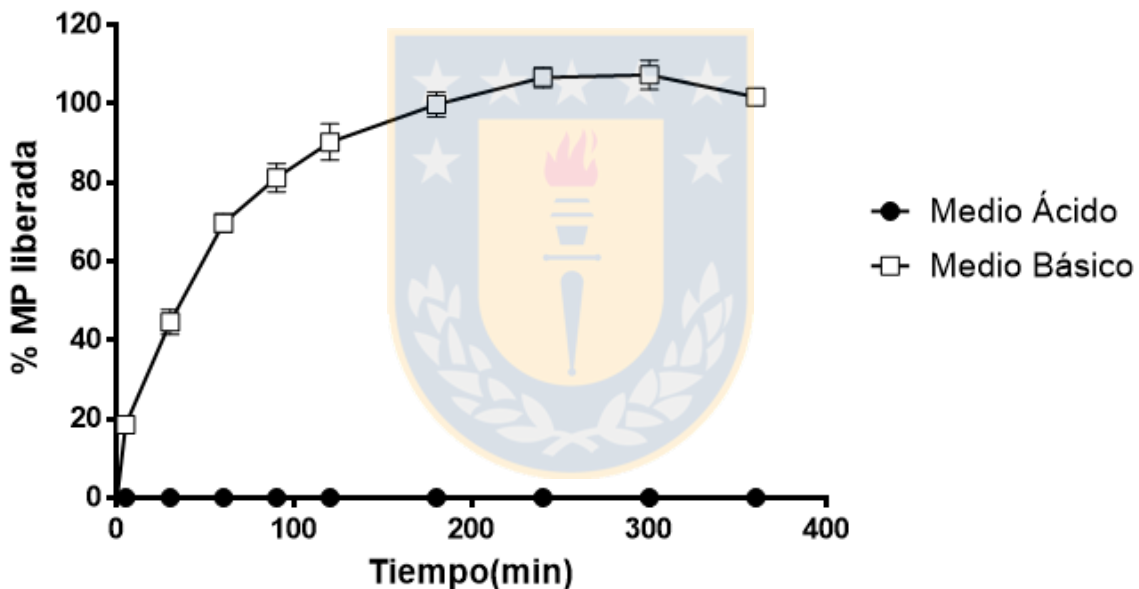


Figura 26: Estudio de cesión de molécula peptídica (MP) desde las micropartículas de ALG-PLX en medios Ácido y Básico.

Se puede observar claramente, como las micropartículas, al estar compuestas principalmente por Alginato sódico, no se disuelven y no liberan el contenido de MP al medio, suponiendo una protección frente al medio ácido estomacal observado en peces. Sin embargo en medio básico, ocurre una liberación gradual de la molécula, debido principalmente a la disolución de la matriz polimérica, hasta alcanzar la total disolución de las micropartículas y liberación total de la

sustancia en este medio dentro de las primeras 4 horas, cumpliendo con las expectativas para presentar esta molécula a células del sistema inmune de mucosas presentes en el medio intestinal del salmón, y así iniciar el proceso de desarrollo de respuesta inmune. Esto se explica debido a que al encontrarse las micropartículas a pH por debajo del valor de pKa del Alginato de sodio (3,2 y 4 para el ácido glucurónico y ácido manurónico respectivamente), como en el medio ácido gástrico, la mayoría de los grupos carboxílicos de la molécula se encuentran a la forma de COOH. Esto reduce la repulsión electrostática de las cadenas de polímero y se conforman enlaces puente de hidrógeno entre estas, conformando una estructura más compacta y que retarda la liberación de las moléculas activas. Sin embargo, a mayores valores de pH, como el medio intestinal, los grupos carboxílicos se encuentran ionizados (COO⁻), lo que produce repulsión electrostática entre las cadenas de Alginato, expandiendo la red polimérica y aumentando los espacios libres en la matriz, favoreciendo así la liberación de las moléculas activas^{35, 36}.

Los resultados obtenidos dan una aproximación inicial de cómo sería la cesión de la MP en un medio biológico, sin embargo para confirmarlo será necesario la posterior realización de otros estudios *in vitro* e *in vivo*, la incorporación de las micropartículas en pellets de alimentación y estudios de inmunogenicidad.

6 Conclusiones

De acuerdo a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos se concluye

Se elaboraron micropartículas cargadas con BSA, por medio de secado por atomización. Estas se realizaron en base a PLGA-PVA y ALG-PLX. Se decidió continuar trabajando con estas últimas, ya que pueden ser elaboradas solo utilizando agua como medio disolvente, evitando el uso de solventes orgánicos, más tóxicos y que pudiesen alterar la MP por desnaturalización.

Se realizó un diseño factorial que permitió determinar las principales factores que afectan las características de tamaño de partícula, agregación y recuperación de sólidos totales, seleccionándose como factores determinantes en la respuesta el porcentaje de sólidos de las soluciones, la velocidad de bombeo o flujo y la proporción de los componentes.

Posteriormente por medio de un diseño de experimento central compuesto centrado en las caras, se determinaron las condiciones óptimas para la elaboración de las micropartículas, fijándose para su elaboración una relación 95:5 de ALG:PLX en la composición de la matriz, el porcentaje de flujo al 10 % y concentraciones de sólidos de las soluciones de 2 %. A partir de estas condiciones se obtuvieron micropartículas esféricas, de superficie lisa y con una baja agregación, y una carga de proteína de 9 %.

Finalmente, se realizó un estudio de cesión de la MP desde la matriz polimérica a medios de pH controlados, simulando pH gástrico e intestinal de salmón, observándose como las micropartículas se disuelven exclusivamente en medio alcalino, logrando la entrega total de la sustancia activa dentro de las primeras 4 horas, resultados que apoyan el uso de estas micropartículas para la incorporación de estas en pellets de alimentación para estudios posteriores.

7 Bibliografía

1. SalmonChile. 2013, [Acceso Marzo 2013]. Disponible en: <http://www.salmonchile.cl/frontend/index.asp>.
2. Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Owen, S.C., Association, A.P. Handbook of Pharmaceutical Excipients, Pharmaceutical Press, 2006.
3. Soares, J.P., Santos, J.E., Chierice, G.O., Cavalheiro, E.T.G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt, *Eclética Química*, 2004, 29, 57-64.
4. Iwasaki, Y., Sawada, S.-i., Ishihara, K., Khang, G., Lee, H.B. Reduction of surface-induced inflammatory reaction on PLGA/MPC polymer blend, *Biomaterials*, 2002, 23, 3897-3903.
5. Zhang, Y.A., Salinas, I., Oriol Sunyer, J. Recent findings on the structure and function of teleost IgT, *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31, 627-34.
6. Departamento de Análisis Sectorial, S.d.P.y.A., Gobierno de Chile INFORME SECTORIAL DE PESCA Y ACUICULTURA, Julio 2014.
7. La plaga del salmón. La Nación 2007, [Acceso Marzo 2013]. Disponible en: http://www.lanacion.cl/prontus_noticias/site/artic/20070407/pags/20070407173833.html.
8. Carvajal, J., González, L., George-Nascimento, M. Native sea lice (Copepoda: Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile, *Aquaculture*, 1998, 166, 241-246.
9. Boxshall, G., Bravos, S. On the identity of the common Caligus (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen systems in southern Chile, *Contributions to Zoology*, 2000, 69, 137-146.
10. Gómez, F., Henríquez, V., Marshall, S. Additional evidence of the facultative intracellular nature of the fish bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis*, *Archivos de medicina veterinaria*, 2009, 41, 261-267.
11. Fryer, J.L.L., C. N.; Garcés, L. H.; Larenas, J. J.; Smith, P. A. Isolation of a Rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile., *Fish Pathology*, 1990, 25, 107-114.
12. Sernapesca presentó nuevo programa sanitario de vigilancia y control en la salmonicultura. [Acceso Enero 2013]. Disponible en: http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=

13. van der Walle, C.F., Olejnik, O. Peptide and Protein Delivery, Academic Press, 2011.
14. Igartua, M., Hernández, R.M., Esquisabel, A., *et al.* Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres, *Journal of Controlled Release*, 1998, 56, 63-73.
15. Penagos, G., Barato, P., Iregui, C. Sistema Inmune y vacunación en peces, *Acta biol. Colomb.*, 2009, 14, 3-24.
16. Zhang, Y.A., Salinas, I., Li, J., *et al.* IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity, *Nat Immunol*, 2010, 11, 827-35.
17. Sarti, F., Perera, G., Hintzen, F., *et al.* In vivo evidence of oral vaccination with PLGA nanoparticles containing the immunostimulant monophosphoryl lipid A, *Biomaterials*, 2011, 32, 4052-4057.
18. Saez, V., Hernández, J.R., Peniche, C. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas, *Biotecnología Aplicada*, 2007, 24, 98-107.
19. Baras, B.t., Benoit, M.-A., Poulain-Godefroy, O., *et al.* Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers, *Vaccine*, 2000, 18, 1495-1505.
20. Murillo, M., Gamazo, C., Goñi, M.M., Irache, J.M., Blanco-Príeto, M.J. Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis, *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 242, 341-344.
21. Hosseini, M.H., Akhlaghi, M., Moazzeni Jula, G. Experimental vaccine against lactococcosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Archives of Razi Institute*, 2011, 66, 51-57.
22. Altun, S., Kubilay, A., Ekici, S., Didinen, B.I., Diler, Ö. Oral vaccination against Lactococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using Sodium Alginate and Poly (lactide-co-glycolide) carrier, *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas*, 2010, 16(B), 211-217.
23. Moebus, K., Siepmann, J., Bodmeier, R. Novel preparation techniques for alginate-polyoxamer microparticles controlling protein release on mucosal surfaces, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 45, 358-366.
24. Fredriksen, B.N., Sævareid, K., McAuley, L., *et al.* Early immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after immunization with PLGA

- nanoparticles loaded with a model antigen and β -glucan, *Vaccine*, 2011, 29, 8338-8349.
25. Moebus, K., Siepmann, J., Bodmeier, R. Alginate-poloxamer microparticles for controlled drug delivery to mucosal tissue, *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 72, 42-53.
 26. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, 248-254.
 27. Walker, J. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation, Humana Press, 2002.
 28. Wiechelman, K.J., Braun, R.D., Fitzpatrick, J.D. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation, *Anal Biochem*, 1988, 175, 231-7.
 29. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem*, 1985, 150, 76-85.
 30. Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit: Product Information, *Sigma-Aldrich Inc.*
 31. Maury, M., Murphy, K., Kumar, S., Mauerer, A., Lee, G. Spray-drying of proteins: effects of sorbitol and trehalose on aggregation and FT-IR amide I spectrum of an immunoglobulin G, *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 59, 251-61.
 32. Kaushik, J.K., Bhat, R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose, *J Biol Chem*, 2003, 278, 26458-65.
 33. Jain, N.K., Roy, I. Effect of trehalose on protein structure, *Protein Sci*, 2009, 18, 24-36.
 34. Compton, S.J., Jones, C.G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Analytical Biochemistry*, 1985, 151, 369-374.
 35. George, M., Abraham, T.E. pH sensitive alginate-guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 335, 123-129.
 36. Mohy Eldin, M.S., Kamoun, E.A., Sofan, M.A., Elbayomi, S.M. l-Arginine grafted alginate hydrogel beads: A novel pH-sensitive system for specific protein delivery, *Arabian Journal of Chemistry*, 2015, 8, 355-365.