

Encapsulación de ficocianina en una matriz polimérica de quitosano-TPP por gelación ionotrópica Encapsulation of phycocyanin in a chitosan-TPP polymer matrix by ionotropic gelation

M. E. García-Callejas ^a, S. Z. Meza-Herrera ^b, J. U. García-Pérez ^c,

M. A. Camacho-González ^a, N. Y. Martínez-Palma ^{a,*}

^a Departamento de procesos industriales, Universidad Tecnológica de Tecámac, 55740, Tecámac, Estado de México, México.

^b Departamento de ciencias químico-biológicas, Universidad Tecnológica de Tecámac, 55740, Tecámac, Estado de México, México.

^c Departamento de control y sistemas ciberfísicos, Centro de Investigación e Innovación Tecnológica-IPN, 02250, Azcapotzalco, Ciudad de México, México.

Resumen

La ficocianina es una proteína presente en Spirulina, posee diferentes actividades biológicas como capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral e inmunomoduladora que la hacen un biocompuesto con potencial para tratar enfermedades, sin embargo, presenta problemas de estabilidad y disponibilidad al ser administrada en sistemas biológicos. En este proyecto se planteó encapsular ficocianina en nanocápsulas esféricas de quitosano para protegerla de pH, temperatura y condiciones fisiológicas que comprometen su actividad biológica. Se empleó la técnica de gelación ionotrópica y tripolifosfato (TPP) como agente reticulante. Se probaron diferentes relaciones de quitosano y TPP, así como también de proteína. Los mejores resultados se obtuvieron con la relación 9:1 y 10% de concentración de proteína, obteniendo 12.6 y 33.21% de carga y eficiencia de asociación respectivamente, por medio de espectroscopía FTIR se pudo verificar la interacción entre los grupos amino del quitosano y fosfato del TPP, la solución de partículas presentó una carga superficial de -37.3 mV y un porcentaje de polidispersión de 84.4.

Palabras Clave: gelación ionotrópica, quitosano, nanopartículas, ficocianina.

Abstract

Phycocyanin is a protein present in Spirulina, it has different biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, antitumor and immunomodulatory capacity that make it a biocompound with potential to treat diseases, however, it presents stability and availability problems when administered in biological systems. In this project, it was proposed to encapsulate phycocyanin in spherical nanoparticles to protect it from pH, temperature and physiological conditions that compromise its biological activity. The ionotropic gelation technique and tripolyphosphate (TPP) were used as a cross-linking agent. Different ratios of chitosan and TPP, as well as protein, were tested. The best results were obtained with the 9:1 ratio and 10% protein concentration, obtaining 12.6 and 33.21% charge and association efficiency respectively. Through FTIR spectroscopy, the interaction between the amino groups of chitosan and phosphate could be verified. of the TPP, the particle solution presented a surface charge of -37.3 mV and a polydispersity percentage of 84.4.

Keywords: ionotropic gelation, chitosan, nanoparticles, phycocyanin.

1. Introducción

Las enfermedades crónicas como afecciones cardiacas, accidentes cerebrovasculares, cáncer, diabetes, y padecimientos pulmonares tienen una alta prevalencia tanto en

los países en desarrollo como en los desarrollados, se estima que son responsables del 70% de muertes en todo el mundo y se cree que esta cifra aumentara en los siguientes años, su incremento se asocia principalmente con cuatro factores de riesgo: consumo de tabaco, inactividad física, consumo

*Autor para la correspondencia: nmartinezp@uttecamac.edu.mx

Correo electrónico: mary_s2817@outlook.com (María Elena García-Callejas), sharonzumher@gmail.com (Sharon Zurisadai Meza-Herrera), johanuriel75@gmail.com (Johan Uriel García-Pérez), acamachog@uttecamac.edu.mx (Mónica Araceli Camacho-González) y nmartinezp@uttecamac.edu.mx (Nikte Yoliztli Martínez-Palma).

excesivo de alcohol y dieta poco saludable (WHO, 2015). Afortunadamente se han establecido estrategias de prevención a través de la ingesta de compuestos bioactivos, los cuáles han demostrado mediante evidencia científica ser eficaces en la prevención y tratamiento de diversos padecimientos (Rangel et al., 2015).

Una de las fuentes de obtención de estos compuestos son las algas y una de la que se ha estudiado con mayor relevancia es la Spirulina, ya que además de poseer macro y micronutrientes en cantidades considerables posee compuestos como β -caroteno, equinonona, zeaxantina, 3-hidroxiquinona, compuestos fenólicos, clorofila, ficocianina entre otros (Bortolini et al., 2022).

La ficocianina (FC) es una proteína que pertenece a la familia de las ficobiliproteínas, posee un característico color azul intenso, es soluble en agua y presenta fluorescencia. En los últimos años se ha probado mediante diversos estudios que posee actividad anticancerígena, antioxidante, antiinflamatoria, neuroprotectiva, hepatoprotectiva, inmunomoduladora y potencial antidiabético (Ashalou et al., 2021). Sin embargo, la FC como tratamiento pierde estabilidad durante su administración debido al pH, la luz y temperaturas superiores a 30°C por lo que su vida media es corta, lo cual compromete su actividad biológica (Chaiklahan et al., 2012). En los últimos años, la nanotecnología se ha visto involucrada en diferentes desafíos dentro del área de la farmacología, en especial en la administración de fármacos donde se han utilizado nanoestructuras con el fin de proteger a los compuestos activos.

Una forma de encapsular compuestos de interés en forma de nanopartículas es por medio de gelación ionotrópica, donde el quitosano se disuelve en una solución acuosa de ácido acético dando lugar a la protonación de los grupos amino. Estos grupos amino protonados convierten al quitosano en un polícatión capaz de interactuar con el TPP, una molécula aniónica multivalente, a través de interacciones electrostáticas (Kaloti et al., 2010).

Las nanopartículas poliméricas de quitosano-TPP destacan debido a su naturaleza fisicoquímica y propiedades de funcionalización con ligandos específicos que pueden ser reconocidos por receptores que se encuentran en la superficie de las células diana, además por su capacidad de atravesar barreras biológicas como la hematoencefálica, mucosa gastrointestinal y piel así como también por su habilidad para alcanzar compartimentos intracelulares y por el control de la liberación de la molécula activa en su lugar de acción (Naranjos et al., 2011).

Por lo tanto, el objetivo principal de este proyecto fue la obtención de nanopartículas poliméricas cargadas con FC, se evaluaron diferentes relaciones de quitosano: TPP con el fin de obtener la mejor eficiencia de asociación y encapsulación. De ser posible la encapsulación de la FC por medio de gelación ionotrópica, está proteína podría conservar su actividad biológica al ser administrada ampliando su uso en el área de la medicina como terapia de prevención o tratamiento de diversos padecimientos.

2. Materiales y metodología

2.1. Materiales

La FC en polvo fue obtenida por este mismo equipo de trabajo en un proyecto anterior en el que se optimizaron sus condiciones de extracción. El quitosano (QS) de bajo peso molecular ($\geq 75\%$ desacetilación), tripolifosfato (TPP) y glicerol ($\geq 99\%$ de pureza) fueron comprados en Sigma Aldrich, USA.

2.2. Metodología

Obtención de nanopartículas de quitosano cargadas con ficocianina

Las nanopartículas fueron obtenidas por el método de gelación ionotrópica descrito por Chuah et al., en el 2013 implementando algunas modificaciones. La concentración empleada de TPP fue de 0.34 mg/mL y se mantuvo constante a lo largo de la experimentación, mientras que la concentración de quitosano se varió para probar diferentes relaciones de QS:TPP (15:1, 13:1, 9:1, 7:1 Y 15:1), de igual forma la concentración de FC adicionada se varió en un 8, 10 y 12 % m/v. El quitosano se disolvió por 30 min en una solución de ácido acético al 1% a la cuál previó a la adición se le ajustó el pH a 5.0 con NaOH, el TPP se disolvió en agua destilada. Se colocaron 10 mL de solución de quitosano (según la concentración a probar) en un vaso de precipitados y posteriormente se adiciono la ficocianina hasta su completa disolución, posteriormente se agregaron por goteo 10 mL de la solución de TPP, al finalizar, para estabilizar el sistema la agitación se mantuvo a 1200 rpm por 30 min más. La solución obtenida se centrifugo a 10 000 rpm por 30 min colocando 15 μ L de glicerol en el fondo del tubo falcón. El precipitado obtenido se secó a temperatura ambiente para posteriormente pesarlo.

Evaluación de la eficiencia de asociación y carga de ficocianina

Por medio de espectrofotometría UV-VIS, se evaluó la absorbancia a 615 y 652 nm de la solución de quitosano-FC antes de la síntesis y del sobrenadante recuperado tras centrifugar la solución de nanopartículas obtenidas después de adicionar el TPP. Posteriormente por medio de la ecuación (1) descrita por Liangqian en el 2018 se calculó la concentración inicial (C_i) y final (C_f) de ficocianina, finalmente los valores de concentración se sustituyeron en las ecuaciones (2) y (3) para calcular la eficiencia de asociación (E_{asc}) y carga de ficocianina (Ca).

$$C_i, C_f = \frac{A_{615} - 0.474(A_{652})}{5.34} \quad (1)$$

$$E_{asc} = \frac{C_i \text{ de FC} - C_f \text{ de FC}}{C_i \text{ de FC}} \times 100 \quad (2)$$

$$Ca = \frac{C_i \text{ de FC} - C_f \text{ de FC}}{W_{nps}} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

E_{asc} : Eficiencia de asociación de las nanopartículas

Ca: Carga de ficocianina

Ci: Concentración inicial de ficocianina

Cf: Concentración final de ficocianina

Wnp: Peso de las nanopartículas

A615: Absorbancia a 615 nm

A652: Absorbancia a 652 nm

Caracterización de las nanopartículas

Para verificar la formación de las nanopartículas de quitosano se obtuvieron los espectros de los polvos de TPP, FC y QS de manera independiente, así como también de una mezcla de estos y de las np's de quitosano cargadas con FC. La determinación se realizó en un espectrofotómetro FTIR (Perkin Elmer, USA).

El tamaño e índice de polidispersión de las nanopartículas cargadas con ficocianina se determinó por medio de la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) con ayuda de un equipo Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, United Kingdom), se utilizó agua desionizada como medio dispersante, la estabilidad de las nanopartículas poliméricas se midió el potencial Z también con el equipo descrito anteriormente.

La morfología de las nanopartículas en polvo obtenidas después del proceso de secado fue analizada utilizando un microscopio electrónico de barrido (JEOL, JCM-6000 BENCHTOP SEM). Las muestras se montaron de manera uniforme sobre una cintilla adhesiva de carbono acoplada a un porta muestras para SEM.

3. Resultados y discusión

3.1 Eficiencia de asociación y carga de las nanopartículas

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para la eficiencia de asociación (Easc) y carga de ficocianina (Ca) para las nanopartículas que se obtuvieron variando la relación de QS:TPP y concentración de FC. De manera general se puede observar que independientemente de la concentración de FC empleada, con las relaciones de QS:TPP de 9:1 y 7:1 se obtuvieron mejores resultados en cuanto a la eficiencia de asociación y carga de ficocianina. Siendo la mejor la de 9:1 con una concentración de 10% m/v de FC, donde se obtuvo un 33.21% y 12.6% para eficiencia de asociación y carga de ficocianina respectivamente. Xu et al. en el 2002 reportaron una eficiencia de asociación de 28% en nanopartículas cargadas con albumina de suero bovino.

La mayor eficiencia de asociación obtenida con una concentración intermedia (9:1) de quitosano:TPP se puede asociar con lo reportado en otros trabajos, donde se observó que la eficiencia de asociación aumenta con el incremento de la concentración de quitosano, pero a concentraciones mayores de 3% la eficiencia de asociación disminuye debido al incremento de la viscosidad de la solución de quitosano (Cho et al., 2014).

Tabla 1: Eficiencia de asociación (Easc) y carga (Ca) de las nanopartículas obtenidas

Concentración de FC (%m/v)	Relación QS:TPP	Easc (%)	Ca (%)
12	15:1	2.41 ± 0.89	0.19 ± 0.20
	13:1	21.41 ± 2.3	3.05 ± 0.71
	9:1	24.57 ± 1.3	3.66 ± 0.45
	7:1	29.77 ± 1.7	6.62 ± 0.51
	5:1	16.18 ± 0.9	1.94 ± 0.20
10	15:1	15.77 ± 2.1	1.67 ± 0.21
	13:1	25.36 ± 3.1	5.09 ± 3.64
	9:1	33.21 ± 1.1	12.6 ± 0.32
	7:1	30.97 ± 2.4	9.34 ± 0.87
	5:1	24.04 ± 0.9	3.64 ± 1.14
	15:1	23.42 ± 1.4	1.83 ± 0.95
	13:1	24.88 ± 2.7	2.76 ± 0.74
8	9:1	33.42 ± 2.2	7.51 ± 1.02
	7:1	20.62 ± 1.8	1.62 ± 1.10
	5:1	26.58 ± 0.7	5.6 ± 1.42

*Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones con su desviación estándar

3.2 Espectroscopia FTIR

En la Figura 1 se muestran los espectros FTIR obtenidos para los componentes individuales, tripolifosfato (1), quitosano (2), ficocianina (3), para la mezcla física de los componentes (4) y también para las nanopartículas obtenidas en las que se varió la concentración de quitosano en un 8, 10 y 12 % m/v.

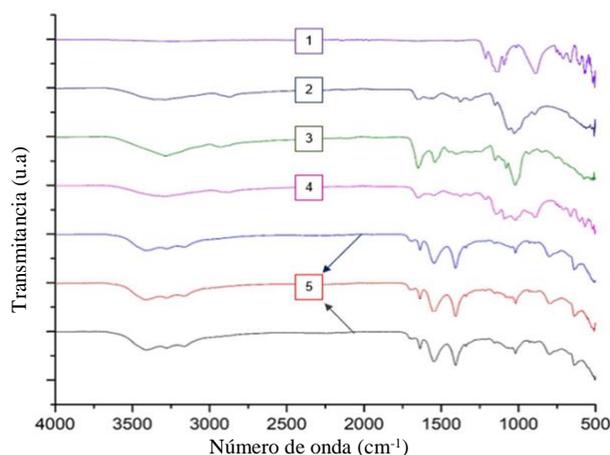


Figura 1: Espectros FTIR de TPP (1), QS (2), FC (3), TPP-QS-FCC (4), np's cargadas con FC a diferentes concentraciones (5)

De los espectros se puede observar que la FC tiene un pico máximo correspondiente a los grupos hidroxilo, uno en 1462 cm^{-1} que se relaciona con el grupo carbonilo, ácidos carboxilos y amidas, a 1461 cm^{-1} el del grupo isopropilo y uno en 850 cm^{-1} debido a los enlaces C-H de sistemas aromáticos o heterociclos (al, 2016). En el caso del quitosano, los principales son un pico en 1530 cm^{-1} debido a la flexión N-H (amina primaria en desacetilación), una banda a 1320 cm^{-1} contribución de las amidas terciarias, un pico en 1654 cm^{-1} por

amidas primarias y el enlace N-H y uno más a 1080 cm^{-1} por la extensión C-O (Noa, 2017). Al combinarse el TPP, QS Y FC con el quitosano se observa que el pico relacionado con las aminas a 1653 cm^{-1} desaparece por la interacción entre TPP:CS, el pico a 1632 cm^{-1} se debe a la vibración de flexión de la amina de quitosano, se da un nuevo pico a 1540 cm^{-1} por la vibración de tensión del grupo de las aminas protonadas, hay picos entre 1206 cm^{-1} y 1151 cm^{-1} debido al enlace P=O y R-O-P-O, a 889 cm^{-1} se da el enlace P-O-P y se observa un corrimiento en el pico del grupo amínico, desplazándose de 3376 cm^{-1} a 3212 cm^{-1} indicando la interacción interna en este grupo por un puente de hidrógeno entre la amina y el oxígeno del polifosfato. El hecho de que los picos sean más atenuados en el producto de la síntesis a diferencia de la mezcla de polvos (TPP-QS-FC), puede interpretarse como la interacción que se dio entre los componentes del sistema al formar las nanopartículas.

3.3 Potencial Z, tamaño de partícula e índice de polidispersión

La caracterización fisicoquímica de la solución de nanopartículas que obtuvieron un mayor porcentaje de eficiencia de asociación y de carga de FC se realizó por la técnica de potencial Z y DLS, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados obtenidos de la caracterización de las np's cargadas con FC por las técnicas de potencial Z y DLS

Relación QS:TPP	9:1
Concentración FC	10% m/v
Índice de polidispersión	0.712
% Polidispersión	84.4
Potencial Z	-37.9 mV

El potencial Z es un parámetro relacionado con la estabilidad coloidal de las partículas (Chern et al., 2004), una carga superficial alta (positiva o negativa) provoca la repulsión de cargas y evita la agregación en virtud de menos colisiones y atracciones iónicas, se ha definido empíricamente que el potencial Z estable en suspensión acuosa es mayor de $\pm 30\text{ mV}$ (Hartig et al., 2007).

Por otro lado, aunque la solución es estable, el grado y el índice de polidispersión indican que no se tiene un solo conjunto de tamaño de nanopartículas, ya que valores del índice de dispersión cercanos a la unidad indican que la muestra presenta variedad de tamaños (Lancheros et al., 2014).

En la Figura 2 se presenta la distribución de tamaños de la solución de np's cargadas con FC, se observan dos grupos, uno con un diámetro promedio de $70.89 \pm 12.38\text{ nm}$ y otro de $477.7 \pm 102.4\text{ nm}$, lo que confirma la polidispersión de la solución. Además, el área bajo la curva indica que las que predominan son las de mayor tamaño.

El tamaño es uno de los determinantes más importantes a la hora de evaluar su accesibilidad en el cuerpo a través de las mucosas o el tejido epitelial (Panyam y Labhasetwar, 2003).

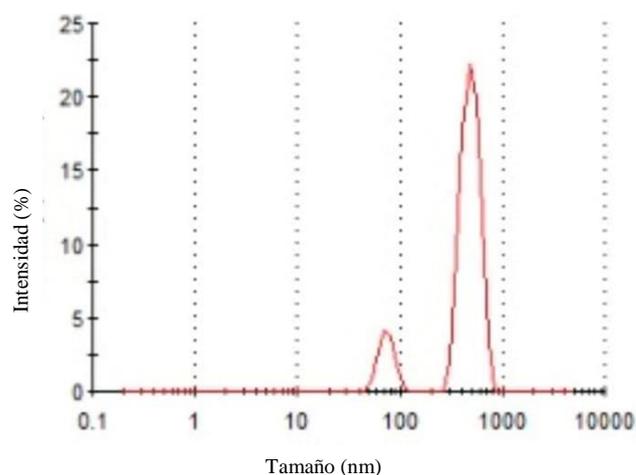


Figura 2.- Distribución de tamaños de la solución acuosa de nanopartículas cargadas de FC, relación de QS:TPP 9:1 y 10% de concentración de FC

Las nanopartículas más pequeñas ($\sim 100\text{ nm}$) han demostrado tener una adsorción arterial tres veces superior en comparación con nanopartículas más grandes ($\sim 275\text{ nm}$) debido a que las nanopartículas pequeñas fueron capaces de penetrar a través de las capas submucosas, mientras que las nanopartículas de mayor tamaño permanecieron localizadas predominantemente en el revestimiento epitelial (Desai et al., 1996). Por lo tanto, será necesario establecer mejoras en la metodología. El tiempo de agitación durante la síntesis, pH, grado de desacetilación y peso de quitosano son factores que se pueden modular para disminuir el tamaño de partícula (Vaefizar et al., 2013).

3.4 Morfología de las nanopartículas

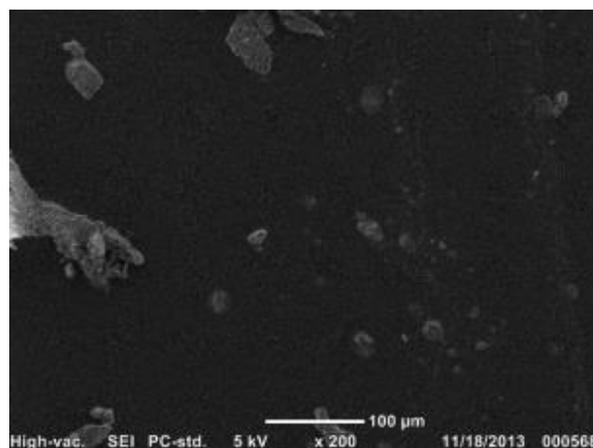


Figura 3.- Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las nanopartículas cargadas con FC.

En la Figura 3 muestra la micrografía de las nanopartículas obtenidas, cabe mencionar que no fue posible observar la morfología esférica característica de las nanopartículas debido a que en este caso la muestra se encontraba como polvo y el proceso de eliminación de agua pudo haber provocado la formación de agregados.

4. Conclusión

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede establecer que fue posible la incorporación de ficocianina en una matriz polimérica de quitosano y TPP, teniendo que la relación de TPP:QS y la concentración de FC con la que se obtuvo una mayor eficiencia de asociación (encapsulación) y carga de FC fue 9:1 y 10 % m/v respectivamente. Si bien, la solución de estas nanopartículas es estable se tienen dos conjuntos de tamaño uno de los cuales supera los 100 nm, situación que limita su aplicación en el área médica. Por lo tanto, se están buscando alternativas para garantizar un tamaño de partícula menor a 100 nm y reducir el índice de polidispersión. Actualmente nuestro equipo de trabajo está empleando un diseño experimental para optimizar las condiciones de síntesis de las nanopartículas cargadas con ficocianina y lograr las características físicas, químicas y morfológicas necesarias para darles la utilidad planteada en esta investigación.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología y el Fondo para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Estado de México por medio del programa Financiamiento para Investigación de Mujeres Científicas con el proyecto con clave FICDTEM-2021-102. Agradecemos su apoyo.

Referencias

- Ashaolu, T. J., Samborska, K., Lee, C. C., Tomas, M., Capanoglu, E., Tarhan, Ö., & Jafari, S. M. (2021). Phycocyanin, a super functional ingredient from algae; properties, purification characterization, and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2320-2331.
- Bortolini, D. G., Maciel, G. M., Fernandes, I. D. A. A., Pedro, A. C., Rubio, F. T. V., Brancod, I. G., & Haminiuk, C. W. I. (2022). Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina* spp.: Current status and future trends. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 100134.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., & Bunnag, B. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, 47(4), 659-664.
- Chuah, L. H., Billa, N., Roberts, C. J., Burley, J. C., & Manickam, S. (2013). Curcumin-containing chitosan nanoparticles as a potential mucoadhesive delivery system to the colon. *Pharmaceutical development and technology*, 18(3), 591-599.
- Desai, M. P., Labhasetwar, V., Amidon, G. L., & Levy, R. J. (1996). Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharmaceutical research*, 13, 1838-1845.
- Lancheros, R. J., Beleño, J. Á., Guerrero, C. A., & Godoy-Silva, R. D. (2014). Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC). *Universitas Scientiarum*, 19(2), 162-168.
- Liangqian Jiang, Y. W. (7 de Abril de 2018). Ficocianina: un fármaco potencial para el tratamiento del cáncer. Recuperado el 4 de Mayo de 2022, de <http://www.binmeibio-es.com/info/phycocyanin-a-potential-drug-for-cancer-treat-25689783.htm>
- Naranjos-Ramírez, N., Torres-Cantú, D. I., Castillo-Rodríguez, V. I., Galindo-Rodríguez, S. A., Chávez-Montes, A., Castro-Ríos & Martínez-Barbosa, M. E. (2011). Preparación de nanopartículas poliméricas con aplicación farmacéutica usando técnicas basadas en emulsificación. *Revista Mexicana de Física*, 57(2), 41-43.
- Noa, S. C. (2017). Derivatización del quitosano para la obtención del carbomeximetilquitosano (OCMQ) y su caracterización vía espectroscopía infrarroja (FTIR) y resonancia magnética nuclear (RMN). Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín.
- Panyam, J., & Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced drug delivery reviews*, 55(3), 329-347.
- Kaloti, M., & Bohidar, H. B. (2010). Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan–sodium tripolyphosphate solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 165-173.
- Rangel-Huerta, O.D.; Pastor-Villaescusa, B.; Aguilera, C.M.; Gil, A. A systematic review of the efficacy of bioactive compounds in cardiovascular disease: Phenolic compounds. *Nutrients* 2015, 7, 5177–5216.
- Vaezifar, S., Razavi, S., Golozar, M. A., Karbasi, S., Morshed, M., & Kamali, M. (2013). Effects of some parameters on particle size distribution of chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation method. *Journal of Cluster Science*, 24, 891-903.
- World Health Organization. *Noncommunicable Diseases Progress Monitor 2015*; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2015
- Xu, Y., & Du, Y. (2003). Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 250(1), 215-226.