

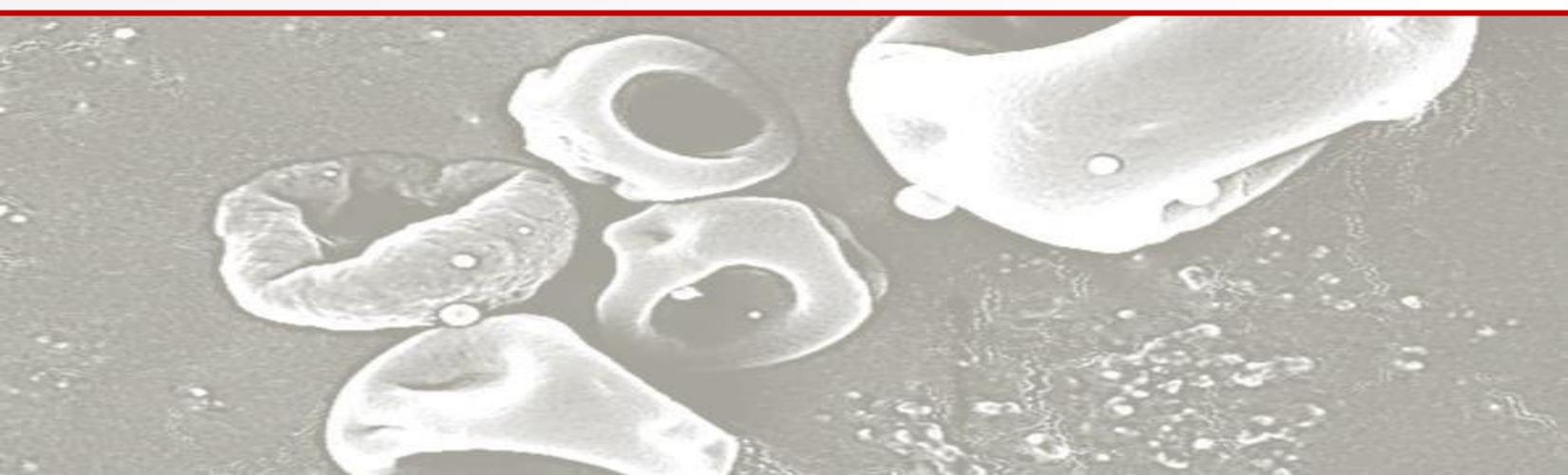


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

Tesis Doctoral

**Evaluación de la Actividad de Compuestos
Bioactivos Microencapsulados en
Quitosano en Modelos de Inflamación
Intestinal**

Noelia L. Vanden Braber



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Tesis Doctoral

Evaluación de la Actividad de Compuestos
Bioactivos Microencapsulados en Quitosano en
Modelos de Inflamación Intestinal

Noelia L. Vanden Braber

El presente trabajo de tesis corresponde a la carrera de Doctorado Cooperativo de la Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Córdoba, fue realizado en el I. A. P. de Ciencias Básicas y Aplicadas-Universidad Nacional de Villa María y en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-Departamento de Bioquímica Clínica-Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Córdoba.

Directores de tesis: Dra. Mariana A. Montenegro
Dra. Silvia G. Correa

Comisión Asesora:

Dra. Carina Porporatto

Dra. M. Gabriela Paraje

Dr. Walter A. Massad

“Un poco de ciencia aleja de Dios; mucha ciencia nos aproxima a Él.”

Louis Pasteur – Químico (1822-1895)

*“Tuyo es el día, tuya también es la noche; Tú estableciste la luna y el sol.
Tú fijaste todos los términos de la tierra; el verano y el invierno Tú los formaste.”*

Salmos 74:16-17

A mamá...

Agradecimientos

A Dios, por la vida maravillosa con que a diario me premia, por Jesús...

A mis abuelos, por el amor incondicional con el que me sostienen. A toda mi familia, por su apoyo y comprensión; uno puede entender hacia donde va cuando sabe, realmente, de donde viene.

A Noe, mi hermana del corazón, por estar a mi lado en cada paso que doy y permitirme estar a su lado, siempre.

A la Dra. Mariana Montenegro, por entregarme su confianza al dirigir este ciclo de mi formación. No fue fácil, no lo es aún, pero seguimos creciendo, juntas, y la recompensa es abundante. Un grupo se sustenta con la reciprocidad y es lo que has puesto como base de nuestro trabajo. Una excelente persona detrás de una gran docente.

A la Dra. Silvia Correa, por asumir el reto de dirigirme como tesista. Hoy, conociéndote mejor, puedo entender que fui uno entre tantos retos. Gracias por tu paciencia, por educarme con tanta perseverancia y hacerme sentir siempre parte del todo, gracias por la literatura y cada una de las charlas compartidas.

A la Dra. Carina Porporatto, por estar siempre a mi disposición, por compartir conmigo su conocimiento acerca de la inmunología.

A los Dres. Walter Massad y M. Gabriela Paraje por tratarme con calidez en las reuniones de seguimiento, brindándome la confianza que permite visualizar los errores y crecer a partir de ellos.

Al Dr. Claudio Borsarelli, por abrirme las puertas de su laboratorio incondicionalmente y confiar en mi capacidad de trabajo.

A los Dres. Guillermo Montich y Raquel Vico por permitirme trabajar en sus laboratorios con completa comodidad, gracias por su cordialidad.

A los Dres. Daniel Allemandi y Juan Llabot y al Lic. Alejandro Paredes, por cooperar en el diseño y la obtención de las microcápsulas, gracias por los almuerzos y las rutinas compartidas.

A las Dras. Luciana Bohl e Ivanna Novotny Núñez, por la incondicional paciencia y los incontables aportes a mi falta de conocimiento y formación en las ciencias biológicas. Sin ustedes no hubiese llegado al modelo *in vivo*. Gracias por su amistad...

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar esta etapa de mi formación.

Al I. A. P. de Ciencias Básicas y Aplicadas y a la UNVM por atender de manera tan cuidadosa mi formación de posgrado y tomar por bandera el desarrollo académico, científico y tecnológico en pos de las futuras generaciones.

A la UTN – Facultad Regional Villa María, por brindarme un espacio dónde comenzar con el trayecto experimental de mi posgrado.

A mis primeros compañeros: Emi, Virgi, Laura y Bernardo... Por los momentos compartidos, los ensayos realizados y el hermoso recuerdo que han dejado en mi corazón.

A mis actuales compañeros: Lao, Carla, Mica, Gabi, Janu, Joaco, Mari y Yani; por hacer de cada jornada un privilegio en mi vida. A toda la gente que forma el CIT VM, ¡GRACIAS!

Al Laboratorio 104 de CIBICI, por hacerme un lugarcito y compartir conmigo su rutina. Gracias al grupo de la Dra. Correa: Bibiana, Lisa y Nicolás, por compartir conmigo su formación y acompañarme en experimentos que fueron un gran desafío para mí.

A Paula, Andi, Anto y Lore... Tanta caminata y persistimos. Nada sería lo mismo sin ustedes de fondo; por soportarme estos años, yendo y viniendo, ¡GRACIAS!

Muchísimas Gracias...

Las enfermedades inflamatorias intestinales son de curso crónico y representan un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma colon-rectal. Los mecanismos por los que se inicia y perpetúa el daño inflamatorio en intestino se estudian empleando modelos experimentales como el de colitis inducida por la administración de dextrán sulfato de sodio (DSS). Numerosa evidencia clínica y experimental demuestra que la inflamación crónica se asocia con una exacerbada producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), tales como radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (HO^{\bullet}), oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que inducen un grado de estrés oxidativo crítico en la patofisiología de la inflamación intestinal. Una forma de reducir los efectos del estrés oxidativo es mediante el consumo o administración de compuestos bioactivos tales como flavonoides, que poseen capacidad antioxidante y efectos benéficos directos sobre la salud por su actividad anticancerígena, antitumoral y anti-inflamatoria. Desafortunadamente, estos compuestos son inestables y poco solubles en medios biológicos; una forma de estabilizarlos y vehicularlos es mediante la microencapsulación. Uno de los biopolímeros más empleados en la microencapsulación de compuestos bioactivos es el quitosano (Ch), un polisacárido mucoadhesivo, parcialmente desacetilado, derivado de la quitina, con numerosas aplicaciones en medicina y alimentación debido a que carece de toxicidad y alergenicidad, es biocompatible y biodegradable. Sin embargo, su empleo en medios biológicos se ve limitado por la reducida solubilidad a pH fisiológico, por lo que la funcionalización de la molécula con sustituyentes hidrofílicos se convierte en una alternativa viable para resolver tal inconveniente.

En este contexto, se planteó como objetivo del presente trabajo, el estudio de la actividad de flavonoides microencapsulados en matrices de Ch en un modelo de colitis inducida por DSS.

Para tal fin la metodología propuesta se estructuró en tres etapas:

1) Funcionalización de Ch con glucosamina mediante reacción de *Maillard*. Caracterización de Ch funcionalizado (ChF) mediante la determinación de grado de desacetilación, peso molecular, solubilidad a pH 7,4 y evaluación mediante espectroscopía UV-Vis y en el infrarrojo. Finalmente, se determinó la actividad antioxidante *in vitro* de Ch y ChF, mediante la evaluación de las eficiencias de desactivación de las EROS: $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , y $O_2(^1\Delta_g)$.

2) Microencapsulación de flavonoides en matrices de Ch nativo y ChF. Se obtuvieron microcápsulas (MC) de quercetina y genisteína, mediante la técnica de secado por aspersión

(*Spray-Drying*). Las mismas fueron caracterizadas mediante la determinación de eficiencias y rendimientos de microencapsulación, morfología por microscopía electrónica de barrido, evaluación de liberación controlada de flavonoide bajo condiciones gastrointestinales simuladas, y capacidad antioxidante *in vitro* (comparativa entre de MC con y sin flavonoide y flavonoide en estado puro) mediante la desactivación de las EROS antes mencionadas.

3) Aplicación de MC de quercetina y genisteína en ChF en un modelo murino de colitis generada con DSS. A los animales bajo tratamiento se los evaluó clínicamente durante 10 días, posterior a su sacrificio se llevó a cabo el análisis histológico de colon, la evaluación de la actividad anti-inflamatoria a través del ensayo de citoquinas y quimioquinas, la determinación de la actividad de mieloperoxidasa y N-acetilglucosaminidasa como indicadores de la infiltración de neutrófilos y macrófagos, respectivamente. Finalmente, se llevó a cabo la evaluación del estrés oxidativo mediante la determinación de la actividad de superóxido dismutasa y catalasa y la presencia de malondialdehído como producto de peroxidación lipídica de membrana.

Se logró producir un derivado de Ch con solubilidad a pH fisiológico mejorada y capacidad antioxidante conservada, apto para la microencapsulación por *Spray-Drying* de flavonoides y su aplicación específica en un modelo murino de colitis. Se obtuvieron partículas gastro-resistentes con propiedades de liberación controlada que mejoraron la biodisponibilidad de los flavonoides en intestino, específicamente en colon, y actuaron aminorando los síntomas clínicos inducidos por el consumo de DSS, atenuando la inflamación y cooperando en el restablecimiento del balance de las especies oxidantes.

SUMMARY

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic disease and represents a risk factor for the development of colorectal carcinoma. The mechanisms by which inflammatory intestinal damage begins and perpetuates are studied using experimental models such as induced colitis by administration of dextran sulfate sodium (DSS). Considerable clinical and experimental evidence shows that chronic inflammation is associated with an exacerbated production of reactive oxygen species (ROS) including: superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical (HO^{\bullet}), singlet molecular oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$) and hydrogen peroxide (H_2O_2), that induce a severe level of oxidative stress in the pathophysiology of intestinal inflammation. One way to reduce the effects of oxidative stress is by the consumption or administration of bioactive compounds such as flavonoids that have antioxidant capacity and direct beneficial effects on health due to its anti-carcinogenic, anti-tumor and anti-inflammatory activity. Unfortunately, these compounds are unstable and sparingly soluble in biological media and a way of stabilize and transport them is through microencapsulation. One of the most commonly employed biopolymers in microencapsulation of bioactive compounds is chitosan (Ch), a mucoadhesive polysaccharide, partially deacetylated, derived from chitin with numerous applications in medicine and food due to it has no toxicity and allergenicity and it is also biocompatible and biodegradable. However, its use in biological media is limited because of the poor solubility at physiological pH, so the functionalization of the molecule with hydrophilic substituents becomes a viable alternative to solve such inconvenient.

In this context, the main objective of the present work was the study of the activity of microencapsulated flavonoids in Ch matrixes in a model of DSS-induced colitis.

To do so, the proposed methodology was structured in three stages:

1) Functionalization of Ch with glucosamine by Maillard reaction, characterization of functionalized Ch (FCh) through determination of deacetylation degree, molecular weight, solubility at pH 7.4 and evaluation by means of UV-Vis spectroscopy and in the IR. Finally, the antioxidant activity *in vitro* of FCh and Ch was determined by the evaluation of efficiencies of deactivation of ROS: $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , and $O_2(^1\Delta_g)$.

2) Microencapsulation of flavonoids in matrices of native and functionalized Ch. Microcapsules of quercetin and genistein were obtained through Spray-Drying technique. These microcapsules were characterized by determination of efficiencies and yields of microencapsulation,

morphology by Scanning Electron Microscopy, evaluation of controlled release of flavonoid under simulated gastrointestinal conditions and antioxidant capacity *in vitro* (comparison of microencapsulated flavonoid, empty microcapsule and pure flavonoid) by deactivation of ROS mentioned above.

3) Application of microcapsule of quercetin and genistein in FCh in a murine model of DSS-induced colitis for 10 days. Mice were clinically evaluated on a daily basis during treatment and, after their sacrifice, a series of studies were carried out: histological analysis of colon, evaluation of anti-inflammatory activity through the assay of chemokines and cytokines, determination of the activity of myeloperoxidase and N-acetylglucosaminidase as indicators of infiltration of neutrophils and macrophages, respectively, and finally, evaluation of oxidative stress by activity determination of superoxide dismutase and catalase and malondialdehyde presence as product of lipid peroxidation of the membrane.

It was possible to produce a Ch derivative with better solubility at physiological pH and preserved antioxidant capacity, suitable for microencapsulation of flavonoids through Spray-Drying and for its specific application in a murine model of colitis. As a result, the obtained gastro-resistant particles with controlled release properties, improved bioavailability of flavonoids in the intestine, specifically in the colon, and acted lessening clinical symptoms induced by DSS consumption, mitigating inflammation and cooperating on the restoration of the balance of oxidant species.

ABREVIATURAS

η_{red}	Viscosidad reducida
η_{sp}	Viscosidad específica
% D	Porcentaje de desactivación
α	Grado de disociación
ε	Coefficiente de extinción molar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CE ₅₀	Concentración efectiva para desactivar el 50 % de una especie reactiva
Ch	Quitosano
ChF	Quitosano funcionalizado
ChFL	Quitosano funcionalizado de peso molecular bajo
ChFM	Quitosano funcionalizado de peso molecular medio
ChL	Quitosano nativo de peso molecular bajo
ChM	Quitosano nativo de peso molecular medio
CI	Colitis indeterminada
CU	Colitis ulcerosa
DE	Desviación estándar
DPPH	Radical 1-difenil-2-picril-hidrazilo
DSS	Dextrán sulfato de sodio
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EM	Eficiencia de microencapsulación
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FFA	Alcohol frufurílico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

FT-IR	Espectroscopía infrarroja transformada de <i>Fourier</i>
G	Genisteína
GDA	Grado de desacetilación
H&E	Tinción hematoxilina-eosina
HMF	Hidroximetilfurfural
HO [·]	Radical hidroxilo
IFN- γ	Interferón γ
IE	Índice de enfermedad
IEL	Linfocitos intraepiteliales
IL-	Interleuquina
IR	Infrarrojo
k_q	Constante de velocidad para la desactivación física de oxígeno molecular singlete
k_r	Constante de velocidad para la desactivación reactiva de oxígeno molecular singlete
k_t	Constante de velocidad para la desactivación total de oxígeno molecular singlete
LD ₅₀	Dosis letal 50
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MC	Microcápsula
MC _{Ch}	Microcápsula de quitosano nativo de peso molecular medio como material de pared
MC _{ChF}	Microcápsula de quitosano funcionalizado de peso molecular medio como material de pared
MC _G	Microcápsula con genisteína
MCP-1	Proteína quimiotractante de monocitos 1
MC _Q	Microcápsula con quercetina
MC _V	Microcápsula vacía
MDA	Malondialdehído

MF	Monoformazan
MPO	Mieloperoxidasa
NAG	N-acetilglucosaminidasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NF-κB	Factor nuclear κB
ON	Óxido nítrico
NOD	Dominio de oligomerización nuclear
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
O ₂ (¹ Δ _g)	Oxígeno molecular singulete
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Amortiguador fosfato salino
PM	Peso molecular
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
Q	Quercetina
<i>Q</i>	<i>Quencher</i>
RM	Rendimiento de microencapsulación
ROO [•]	Radicales alquil-peroxilo
SEC	Cromatografía líquida de exclusión
SEM	Microscopía de barrido electrónico
SOD	Superóxido dismutasa
SV	<i>Stern-Volmer</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a trolox
TCA	Ácido tricloroacético
Th	Linfocitos T <i>helper</i>
TMB	Tetrametilbenzidina

TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TLR	Receptor tipo <i>toll</i>
TPP	Tripolifosfato de sodio

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
Referencias	5
PARTE I – Fundamentación Teórica	6
Capítulo 1 – Estrés Oxidativo	7
1.1. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno (EROS) en sistemas biológicos	8
1.2. Red antioxidante	9
1.3. Estrés oxidativo	10
1.3.1. Oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$)	12
1.3.2. Estrés oxidativo e influencia de la dieta	13
1.4. Referencias	14
Capítulo 2 – Antioxidantes Naturales: Flavonoides	16
2.1. Estructura química y funcionalidad de flavonoides	17
2.1.1. Flavonas y flavonoles	18
2.1.2. Propiedades físicas y espectroscopía UV-Vis	19
2.2. Principales propiedades de flavonoides	20
2.2.1. Capacidad antioxidante	20
2.2.2. Capacidad anticancerígena, anti-inflamatoria y desintoxicante	21
2.3. Biodisponibilidad de flavonoides	23
2.4. Referencias	25
Capítulo 3 – Estabilización y Vehiculización de Compuestos Bioactivos	28
3.1. La microencapsulación como herramienta de vehiculización	29
3.1.1. Materiales de pared	30
3.2. Técnicas de microencapsulación	32
3.2.1. Eficiencia de microencapsulación	33
3.3. Mecanismos de liberación del componente activo	34
3.4. Referencias	36
Capítulo 4 – Quitosano	38
4.1. Obtención y estructura química de quitosano (Ch)	39
4.2. Principales propiedades y aplicaciones de quitosano (Ch)	42
4.2.1. Biocompatibilidad	42
4.2.2. Capacidad antioxidante	42

4.2.3. Actividad anti-inflamatoria e inmunoestimulante	43
4.2.4. Actividad antimicrobiana	44
4.2.5. Otras actividades biológicas	44
4.2.6. Aplicaciones de quitosano (Ch) en formulaciones alimentarias	44
4.3. Referencias	46
Capítulo 5 – Enfermedad Inflamatoria Intestinal	50
5.1. Anatomía y fisiología de intestino	51
5.2. Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)	54
5.2.1. Factores de riesgo interno	56
5.2.2. Estrés oxidativo en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII)	58
5.2.3. Tratamientos frecuentes	59
5.3. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII)	59
5.4. Referencias	61
PARTE II – Desarrollo Experimental	63
Capítulo 6 – Caracterización y Funcionalización de Quitosano	64
6.1. Introducción	65
6.2. Materiales y Métodos	67
6.2.1. Reactivos	67
6.2.2. Métodos	67
6.2.2.1. Obtención de quitosano funcionalizado (ChF) mediante reacción de Maillard	67
6.2.2.2. Caracterización de los derivados de quitosano (ChF) por espectrometría de absorción en el Infrarrojo	68
6.2.2.3. Determinación del grado de desacetilación (GDA) por titulación potenciométrica	68
6.2.2.4. Determinación del peso molecular (PM) viscosimétrico y por cromatografía líquida de exclusión (SEC)	69
6.2.2.5. Solubilidad a pH fisiológico	70
6.2.2.6. Desactivación de radical hidroxilo (HO^{\bullet})	71
6.2.2.7. Desactivación de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	72
6.2.2.8. Desactivación de oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$)	73
6.2.3. Análisis estadístico	75
6.3. Resultados y Discusión	76
6.3.1. Caracterización espectroscópica de los derivados solubles de quitosano (ChF) por reacción de Maillard	76
6.3.2. Grado de desacetilación (GDA), peso molecular (PM) y solubilidad a pH fisiológico	78

6.3.3. Desactivación de radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	81
6.3.4. Desactivación de oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$)	83
6.4. Conclusión	87
6.5. Referencias	88
Capítulo 7 – Microencapsulación de Flavonoides mediante Secado por Aspersión	92
7.1. Introducción	93
7.2. Materiales y Métodos	97
7.2.1. Reactivos	97
7.2.2. Métodos	97
7.2.2.1. Microencapsulación de quercetina (Q) y genisteína (G) mediante secado por aspersión	97
7.2.2.2. Eficiencia y rendimiento de microencapsulación	98
7.2.2.3. Morfología de microcápsulas (MC)	99
7.2.2.4. Ensayos de liberación controlada	99
7.2.2.5. Desactivación de radical hidroxilo (HO^{\bullet})	100
7.2.2.6. Desactivación de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	100
7.2.2.7. Desactivación de oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$)	101
7.2.3. Análisis estadístico	102
7.3. Resultados y Discusión	103
7.3.1. Caracterización de microcápsulas (MC)	103
7.3.2. Desactivación de radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	106
7.3.3. Desactivación de oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$)	108
7.4. Conclusión	112
7.5. Referencias	113
Capítulo 8 – Aplicación en Modelo Murino de Colitis Generada con DSS	117
8.1. Introducción	118
8.2. Materiales y Métodos	122
8.2.1. Ratones	122
8.2.2. Reactivos	122
8.2.3. Métodos	122
8.2.3. Modelo de colitis ulcerosa (CU) generada con DSS. Tratamiento con quercetina (Q) y genisteína (G) microencapsuladas en derivado soluble de quitosano (ChF)	122
8.2.3.2. Análisis histológico	123

8.2.3.3. <i>Preparación de homogenatos de colon</i>	123
8.2.3.4. <i>Medición de citoquinas y quimioquinas</i>	124
8.2.3.5. <i>Actividad de mieloperoxidasa (MPO)</i>	124
8.2.3.6. <i>Actividad de N-acetilglucosaminidasa (NAG)</i>	124
8.2.3.7. <i>Actividad de superóxido dismutasa (SOD)</i>	125
8.2.3.8. <i>Actividad de catalasa</i>	125
8.2.3.9. <i>Peroxidación lipídica: malondialdehído (MDA)</i>	125
8.2.3.10. <i>Marcación de microcápsulas (MC_v) con FITC</i>	126
8.2.4. <i>Análisis estadístico</i>	126
8.3. Resultados y Discusión	127
8.3.1. <i>Seguimiento clínico</i>	127
8.3.2. <i>Análisis Histológico</i>	129
8.3.3. <i>Citoquinas y quimioquinas</i>	131
8.3.4. <i>Actividad de mieloperoxidasa (MPO) y N-acetilglucosaminidasa (NAG)</i>	134
8.3.5. <i>Estrés oxidativo</i>	135
8.3.6. <i>Tratamiento con genisteína (G) libre</i>	137
8.3.7. <i>Marcación de microcápsulas (MC_v) con FITC</i>	139
8.4. Conclusión	142
8.5. Referencias	143
CONCLUSIONES	148
Perspectivas a futuro	151
Presentaciones a congresos	151
Publicaciones	152
Patentes	153
Distinciones	153

Figura 1.1.: Condición patológica producto del estrés oxidativo.....	12
Figura 2.1.: Estructura química general de los flavonoides.....	18
Figura 2.2.: Espectro de absorbancia de flavonoides.....	19
Figura 3.1.: Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas.....	30
Figura 4.1.: (A) Quitina 100 % acetilada. (B) Quitosano (Ch).....	39
Figura 4.2.: Isoformas de quitina.....	40
Figura 5.1.: Anatomía de la mucosa intestinal y su sistema inmune.....	51
Figura 5.2.: Características histológicas de enfermedad de <i>Crohn</i> (EC) y colitis ulcerosa (CU).....	55
Figura 6.1.: Espectroscopía UV-Vis de la reacción de Maillard.....	76
Figura 6.2.: Espectros de absorbancia en el IR de las moléculas de quitosano nativo (Ch) y sus derivados (ChF).....	77
Figura 6.3.: Curva de titulación potenciométrica de quitosano (Ch).....	79
Figura 6.4.: Variación de la viscosidad reducida ($\eta_{reducida}$) en función de la concentración de quitosano (Ch).....	80
Figura 6.5.: Desactivación (% D) de (A) radical hidroxilo ($HO\cdot$) y (B) anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por quitosano (Ch).....	81
Figura 6.6.: Pendientes normalizadas de desactivación (% D) de (A) radical hidroxilo ($HO\cdot$) y (B) anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en función del peso molecular (PM) de quitosano (Ch).....	82
Figura 6.7.: Desactivación total de oxígeno molecular singulete ($O_2 (^1\Delta_g)$) por quitosano (Ch).....	84
Figura 6.8.: Perfil de consumo de oxígeno por quitosano (Ch) mediante fotosensibilización en estado estacionario de $[Ru(bpy)_3^{2+}]$ en amortiguador fosfato 0,1 M. (A) pH 4,7. (B) pH 5,8.....	86
Figura 7.1.: Esquema del proceso de secado por aspersión (<i>Spray-Drying</i>).....	94
Figura 7.2.: Micrografías SEM de microcápsulas (MC) con quercetina (Q).....	104
Figura 7.3.: Ensayos de liberación controlada de quercetina (Q) desde microcápsulas (MC).....	105
Figura 7.4.: Desactivación (% D) de (A) radical hidroxilo ($HO\cdot$) y (B) anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por microcápsulas (MC).....	106

Figura 7.5.: Perfil de consumo de oxígeno por microcápsulas (MC) con quercetina (Q) (curvas linealizadas) mediante fotosensibilización en estado estacionario de $[Ru(bpy)_3^{2+}]$ en condiciones gástricas simuladas.....	109
Figura 7.6.: Consumo de quercetina (Q) monitoreado a 366 nm (curvas normalizadas).	110
Figura 7.7.: Bandas de absorbancia (normalizadas) de quercetina (Q) (a) $[Ru(bpy)_3^{2+}]$ (b) e intensidad (normalizada) del LED Blue (c).....	110
Figura 8.1.: Representación esquemática del mecanismo de la colitis inducida por DSS.....	119
Figura 8.2.: Gráficos de índice de enfermedad (IE) y relación longitud/peso de colon.....	127
Figura 8.3.: Fotografía de colon luego del sacrificio.	128
Figura 8.4.: Pérdida de peso en tratamientos con flavonoides microencapsulados.	129
Figura 8.5.: Micrografías de tinciones hematoxilina-eosina (H&E) (400x).	130
Figura 8.6.: Citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias.	132
Figura 8.7.: Citoquina anti-inflamatoria IL-10.	133
Figura 8.8.: Actividad de mieloperoxidasa (MPO) y n-acetilglucosaminidasa (NAG).	134
Figura 8.9.: Actividad de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa.....	136
Figura 8.10.: Peroxidación lipídica: malondialdehído (MDA).	137
Figura 8.11.: Pérdida de peso en tratamiento con genisteína (G) libre.	138
Figura 8.12.: Micrografías de tinciones hematoxilina-eosina (H&E) (400x). Tratamiento con genisteína (G) libre.....	138
Figura 8.13.: Tratamiento con genisteína (G) libre.....	139
Figura 8.14.: Citometría de flujo.....	141

Tabla 6.1.: Caracterización de quitosano (Ch) y sus derivados (ChF).....79

Tabla 6.2.: Valores de pendientes de desactivación (μM^{-1}) y valores extrapolados de concentración efectiva de quitosano (Ch) para la desactivación del 50 % (CE_{50}) de radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).....82

Tabla 6.3.: Constantes de desactivación total (k_t) y reactiva (k_r) de oxígeno molecular singlete ($\text{O}_2 (^1\Delta_g)$) por quitosano (Ch).....85

Tabla 7.1.: Rendimiento y eficiencia de microencapsulación de quercetina (Q) y genisteína (G) en matrices de quitosano (Ch).....103

Tabla 7.2.: Tamaño de microcápsulas (MC) con quercetina (Q).105

Tabla 7.3.: Valores extrapolados de concentración efectiva de quercetina (Q) para la desactivación del 50 % (CE_{50}) de radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).106

Tabla 7.4.: Reactividad de microcápsulas (MC) frente a oxígeno molecular singlete ($\text{O}_2 (^1\Delta_g)$). Valores de pendientes iniciales de desactivación a partir de curvas linealizadas.109

Tabla 8.1.: Índices de enfermedad (IE) en ratones tratados con genisteína (G) libre.138

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal de mamíferos está continuamente expuesto a numerosos microorganismos como así también a toxinas provenientes del ambiente o presentes en los alimentos consumidos, lo que lo convierte en una zona de alta vulnerabilidad. Dos de las más importantes enfermedades inflamatorias intestinales, la enfermedad de *Crohn* y la colitis ulcerosa, se caracterizan por ser inflamaciones crónicas del intestino con etiología multifactorial.

^[1] Los mecanismos por los que se inician y perpetúan este tipo de patologías no son conocidos completamente y se estudian empleando modelos experimentales como el de colitis inducida por la administración de dextrán sulfato de sodio (DSS).^[2]

Numerosa evidencia clínica y experimental ha demostrado que la inflamación intestinal se asocia con una exacerbada producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), de alta reactividad química, que incluyen radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), y moléculas no radicalarias como el oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que inducen un grado de estrés oxidativo crítico en la patofisiología de la inflamación intestinal.^[3]

El consumo de fitonutrientes con propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, como los flavonoides, es de gran interés para la modulación de la inflamación desde la dieta.^[4] Sin embargo, su empleo en estado puro para la formulación de alimentos nutraceuticos y funcionales no asegura su arribo a colon, ya que su absorción ocurre a nivel de estómago e intestino delgado.^[5]

La microencapsulación constituye una estrategia de vehiculización para estas sustancias lábiles en condiciones de procesamiento y almacenamiento de alimentos (temperatura, luz, oxígeno, pH) y de digestión (pH, presencia de enzimas digestivas, etc.).^[6]

El **objetivo general** del presente trabajo de tesis fue estudiar la actividad de compuestos bioactivos microencapsulados en matrices de quitosano (Ch), en modelos de inflamación intestinal.

Los **objetivos específicos** comprendieron:

- Funcionalizar Ch nativo para obtener un producto soluble (ChF) a pH fisiológico, capaz de vehiculizarse en matrices acuosas.
- Microencapsular flavonoides con Ch y ChF. Evaluar la morfología de las partículas obtenidas y la eficiencia de microencapsulación.
- Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los compuestos bioactivos puros, microencapsulados y de los materiales de pared Ch y ChF, en soluciones acuosas, evaluando la reactividad y mecanismos de desactivación de EROS.
- Evaluar la actividad anti-inflamatoria y antioxidante de los flavonoides microencapsulados en un modelo de colitis inducida con DSS.

El trabajo que se expone a continuación está organizado en dos secciones principales:

- **Parte I: Fundamentación Teórica.** Compreendida por cinco capítulos de revisión bibliográfica en sustento de los resultados experimentales obtenidos.
 - **Capítulo 1:** Estrés Oxidativo. Define la condición patológica asociada al estrés oxidativo, las especies reactivas involucradas, la red antioxidante fisiológica capaz de mantener el balance “redox” de la célula y el organismo, como así también, la cooperación necesaria para dicha red desde la ingesta de nutrientes esenciales específicos.
 - **Capítulo 2:** Antioxidantes Naturales. Flavonoides. Expone la funcionalidad química y caracterización espectroscópica de los flavonoides, define los diferentes tipos de compuestos que constituyen esta familia de fitonutrientes, explica las principales propiedades bioactivas asociadas a los mismos y la problemática asociada a su biodisponibilidad y alta reactividad en estado puro.
 - **Capítulo 3:** Estabilización y Vehiculización de Compuestos Bioactivos. Presenta a la microencapsulación como estrategia para vehiculizar compuestos bioactivos, expone los principales materiales de pared utilizados para tal fin, como así también, las técnicas más empleadas y los factores que condicionan la eficiencia del proceso en un marco general.

- **Capítulo 4:** Quitosano. Caracteriza a este biopolímero en cuanto a su obtención desde quitina, estructura química, propiedades funcionales y diversas aplicaciones en formulaciones alimentarias, a los fines de emplearlo como material de pared en el diseño de micropartículas capaces de sortear el sistema digestivo y llegar a colon.
- **Capítulo 5:** Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Repasa la anatomía y fisiología de intestino, define a la enfermedad inflamatoria intestinal en relación a los factores de riesgo interno y al importante vínculo entre procesos inflamatorios y oxidativos involucrados. Expone la epidemiología de la patología en cuanto a la incidencia y prevalencia de la enfermedad.
- **Parte II: Desarrollo Experimental.** Comprendida por tres capítulos en donde se expone en detalle la experiencia de campo abordada, en concordancia al plan de trabajo delimitado por los objetivos específicos anteriormente detallados. Cada capítulo experimental abarca lo propio a materiales y métodos requeridos para ese segmento en particular, como así también el detalle y la discusión de sus resultados. A su vez, cada capítulo se introduce y concluye de acuerdo a la especificidad del tema tratado: reacción de *Maillard* como mecanismo reactivo para la funcionalización de Ch (**Capítulo 6**), secado por aspersion como técnica para la microencapsulación de flavonoides en Ch y ChF (**Capítulo 7**) y colitis generada a partir del suministro de DSS como modelo para la aplicación de los flavonoides microencapsulados (**Capítulo 8**).

Referencias

1. Xavier, R. J. & Podolsky, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427–434 (2007).
2. Chassaing, B.; Aitken, J. D.; Malleshappa, M. & Vijay-Kumar, M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr. Protoc. Immunol.* **15.25**, 1–14 (2014).
3. Bouma, G. & Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 521–533 (2003).
4. Murakami, A.; Ashida, H. & Terao, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett.* **269**, 315–325 (2008).
5. Hollman, P. C.; Bijlsman, M. N.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. P.; de Vries, J. H. & Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic. Res.* **31**, 569–573 (1999).
6. Pool, H.; Quintanar, D.; Figueroa, J.; Marinho Mano, C.; Bechara, J. E. H.; Godínez, L. A. & Mendoza, S. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. *J. Nanomater.* doi: 10.1155/2012/145380 (2012).

PARTE I – FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

CAPÍTULO 1 – ESTRÉS OXIDATIVO

1.1. Radicales libres y especies reactivas de oxígeno (EROS) en sistemas biológicos

En sentido estricto, un radical libre representa cualquier especie química, de existencia independiente, que posee uno o más electrones desapareados (o sea, un número impar) girando en sus orbitales externos. Esta configuración, muy inestable, le confiere la propiedad de ser una especie química altamente reactiva y de corta vida. Se ha observado que la magnitud de esta reactividad se correlaciona inversamente con la vida media y con la capacidad de difusión en el medio celular. ^[1]

Los radicales libres más frecuentes están centrados funcionalmente en oxígeno y, debido a la relevancia del mismo en los procesos aeróbicos, estos radicales están presentes en la mayoría de las reacciones metabólicas normales, pudiéndose incrementar por efectos exógenos. ^[2]

Las EROS están conformadas por $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , radicales derivados de compuestos orgánicos: peroxilo y alcoxilo; también se incluyen compuestos reactivos tales como H_2O_2 , ácido hipocloroso (HClO), $O_2(^1\Delta_g)$, hidroperóxidos y metabolitos epóxidos. ^[3]

El oxígeno molecular (dioxígeno) tiene una configuración electrónica única y es en sí mismo un radical. La adición de un electrón al oxígeno molecular forma el radical $O_2^{\bullet-}$. ^[4] El $O_2^{\bullet-}$ se considera la primera especie de la cadena que, al interactuar con otras moléculas, dará lugar al resto de EROS, categorizadas como secundarias. ^[5]

En los organismos vivos eucariotas las EROS tienen origen intracelular actuando tanto dentro como fuera de la célula. La producción de $O_2^{\bullet-}$ ocurre mayormente en la mitocondria. La cadena transportadora de electrones mitocondrial es la principal fuente de ATP en las células de mamíferos. ^[6] El radical $O_2^{\bullet-}$, generado en los Complejos I y III de la cadena transportadora de electrones, es capaz de atravesar la membrana interna mitocondrial y llegar al citosol. ^[3]

El radical HO^{\bullet} es altamente reactivo, tiene un tiempo de vida medio de 10^{-9} s *in vivo* ^[7], por lo tanto, reacciona en las inmediaciones de su sitio de formación mitocondrial. El HO^{\bullet} puede ser generado fuera de la mitocondria por la reacción de *Fenton*. En condiciones fisiológicas, las concentraciones de hierro están balanceadas. Sin embargo, en condiciones de estrés, el exceso de $O_2^{\bullet-}$ estimula la liberación de hierro desde moléculas, como *clusters* de enzimas [4Fe-4S], que lo contienen. ^[5,8] El Fe^{2+} liberado puede participar en la reacción de *Fenton* y generar radical HO^{\bullet} fuera de la mitocondria (Ec. 1).



A su vez, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ participa en la reacción de *Haber-Weiss*, dando Fe^{2+} (Ec. 2) lo cual se relaciona de manera directa con la reacción de *Fenton* para luego dar HO^\bullet .



Finalmente, los peroxisomas son los encargados de producir H_2O_2 , siendo los sitios de mayor consumo de O_2 de la célula. ^[9] Esta organelas contienen catalasa, enzima encargada de descomponer los excesos de H_2O_2 en condiciones fisiológicas de modo que no dañe el medio circundante. Son los peroxisomas quienes mantienen el delicado equilibrio en la producción neta de EROS. El estado “redox” de una célula se mantiene dentro de un rango estrecho en condiciones similares a la manera en que un sistema biológico regula su pH. Un cambio de 30 mV significa un cambio de 10 veces en la relación entre especies oxidantes y reductoras. ^[10]

1.2. Red antioxidante

Para asegurar un adecuado balance de EROS, las células están provistas de antioxidantes intracelulares que logran la supresión de las especies reactivas. El sistema enzimático antioxidante incluye superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa. ^[6] El sistema no enzimático abarca compuestos bioactivos esenciales, sólo incorporados desde su ingesta, como el ácido ascórbico o vitamina C, el α -tocoferol o vitamina E, carotenoides, flavonoides, etc.; y el glutatión, un compuesto no esencial, sintetizado a partir de diversos aminoácidos. ^[11]

Entre los sistemas antioxidantes endógenos, la enzima SOD constituye la primera línea de defensa mediante la catálisis de la reacción de eliminación del $\text{O}_2^{\bullet-}$. Como producto de su acción se forma H_2O_2 que luego es escindido por la enzima catalasa, en agua y oxígeno (Ec. 3). SOD presenta dos isozimas, una de ellas contiene zinc y cobre, y se ubica en el citoplasma; la otra contiene manganeso y se localiza en mitocondrias; su biosíntesis se ve fuertemente regulada por la concentración del sustrato $\text{O}_2^{\bullet-}$. ^[11]



La enzima catalasa es una hemoproteína de gran actividad que se encuentra, principalmente, en peroxisomas y mitocondrias. La acción de descomponer el H_2O_2 es compartida con la glutatión peroxidasa, activándose catalasa, en peroxisomas, cuando la concentración de H_2O_2 es elevada. Glutatión peroxidasa es una selenoproteína que, en células animales, se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. En presencia de glutatión como agente reductor, cataliza la reducción del H_2O_2 , y otros hidroperóxidos orgánicos, en agua y alcohol, respectivamente. ^[12]

1.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo constituye una alteración producida por un desequilibrio entre la generación de EROS y la defensa antioxidante, pudiendo conducir a un estado de daño. ^[2] Como el daño oxidativo puede atribuirse a una deficiencia de sustancias protectoras, se establece una estrecha relación entre el estrés oxidativo y el estatus nutricional. ^[13] En contraparte, algunos estudios muestran que la ingesta de oligoelementos (minerales y vitaminas) no logra reconstituir el balance “redox” del sistema celular, lo cual se atribuye al condicionamiento de otros factores sobre la capacidad antioxidante; como por ejemplo el óxido nítrico (ON) que es un inhibidor endógeno de glutatión peroxidasa y catalasa. ^[11]

En procesos infecciosos, los fagocitos (monocitos, neutrófilos y macrófagos) pueden endocitar bacterias, virus o células del huésped previamente infectadas y mediante una descarga o estallido oxidativo (conocido también como estallido respiratorio) compuesto principalmente por $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HClO y ON, destruyen al patógeno invasor. Esta respuesta fisiológica eventual, se convierte en un riesgo sustancial en respuestas inflamatorias crónicas, en donde la sobreproducción de EROS sobrepasa la defensa antioxidante de manera permanente, agravando las lesiones de los tejidos involucrados (**Figura 1.1.**) ^[14]

Una variedad de citoquinas y factores de crecimiento son capaces de generar EROS en células no fagocíticas al unirse a sus receptores específicos. Los receptores de factores de crecimiento son tirosina quinasas (enzimas intervinientes en la fosforilación de residuos de tirosina mediante el consumo de ATP) que juegan un rol clave en la transmisión de la información desde el exterior de la célula hacia el citoplasma y el núcleo. La información es transmitida mediante la activación

de las vías de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).^[3] Otros ejemplos involucran los receptores de citoquinas como factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interferón γ (IFN- γ) o interleuquina (IL) -1 β .^[15] En general, se acepta que las EROS generadas por estos ligandos pueden actuar como segundos mensajeros y mediar importantes funciones celulares tales como la proliferación y la muerte celular programada.^[16] Esta vías, en patologías crónicas, también derivan en daño tisular por estrés oxidativo.

La mayoría de las macromoléculas biológicas pueden ser oxidadas por los radicales libres, sin embargo, las más expuestas son los lípidos. Se ha precisado que la peroxidación lipídica en los sistemas biológicos puede ocurrir bajo control enzimático o no enzimático; esta última forma es la que se relaciona con el estrés oxidativo y el daño celular. El malondialdehído (MDA) es el producto final de la serie de reacciones en cadena que representa la peroxidación lipídica y su evaluación ilustra la magnitud del daño asociado al estrés oxidativo. Las proteínas, péptidos y aminoácidos también constituyen un blanco para las EROS, aunque su deterioro está supeditado a la degradación lipídica, dado que los lípidos son componentes de la membrana celular y por ende, al degradarse, dejan el contenido citosólico expuesto.^[17]

El ácido desoxirribonucleico (ADN) también constituye un blanco de ataque de las EROS, principalmente el ADN mitocondrial.^[14] Este ADN, por su localización, se encuentra expuesto a un flujo constante y elevado de EROS, además carece de histonas en su estructura lo que le resta estabilidad. Por otra parte, se ha observado que sus mecanismos de reparación son menos eficientes.^[11] En general, dentro de las alteraciones que puede sufrir el ADN, se describe la oxidación de desoxirribosas, ruptura y entrecruzamiento de las cadenas y la modificación de bases nitrogenadas, principalmente. Sin embargo, estas alteraciones serán significativas en la medida que sean intensas y capaces de eludir los sistemas de reparación antes de la replicación.
[3,9]

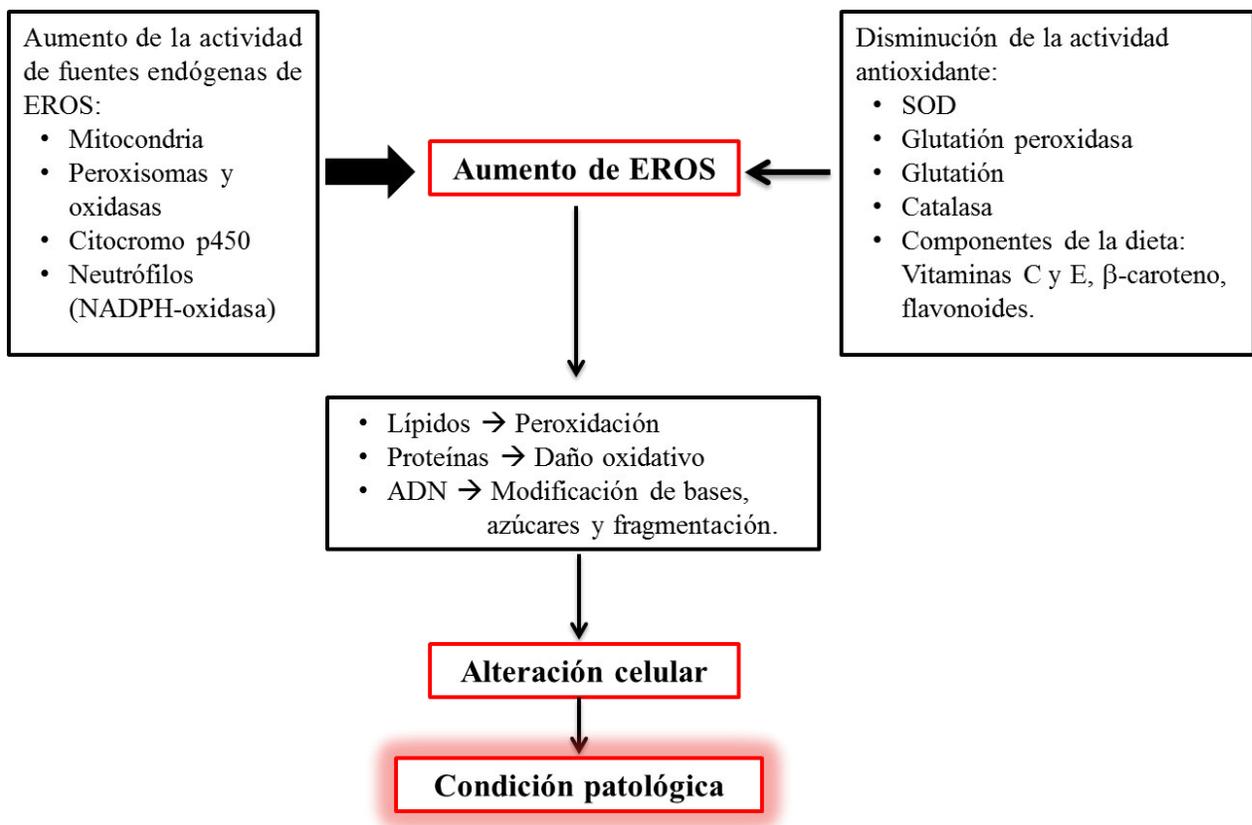


Figura 1.1.: Condición patológica producto del estrés oxidativo.
Adaptado de *Bandyopadhyay. (1999).*

1.3.1. Oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$)

El $O_2(^1\Delta_g)$, dada la multiplicidad de espín definida por la regla de *Hund*, es una forma energéticamente excitada del oxígeno molecular triplete, con dos electrones apareados en el orbital molecular de mayor energía π^* (orbital anti-enlazante). Es menos estable que el oxígeno triplete en estado basal, conteniendo una energía adicional de 22,5 kcal/mol. ^[18] Dicho exceso de energía puede traducirse en la emisión de un fotón cuando $O_2(^1\Delta_g)$, o un grupo carbonilo excitado (producto de la reacción de $O_2(^1\Delta_g)$ con $C=C$), retornan a su estado fundamental. ^[19]

En el estado oxidativo fisiológico hay activación de enzimas pro-oxidantes. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa se encuentra principalmente en leucocitos polimorfonucleares (PMN). NADPH-oxidasa genera $O_2^{\bullet-}$ que dismuta a H_2O_2 y éste es quien reacciona con $O_2^{\bullet-}$, HClO o cloraminas para formar $O_2(^1\Delta_g)$. ^[20]

$O_2 (^1\Delta_g)$ actúa en diversas células como mensajero y señal que activa numerosos agentes intervinientes en los canales iónicos de la célula, modulando el balance “redox” de la misma. [21,22] Fuera de este contexto, $O_2 (^1\Delta_g)$ es una poderosa especie reactiva dirigida contra múltiples patógenos (microorganismos, virus, células tumorales, trombos, etc.) y actúa en el reclutamiento de células inmunes para llevar a cabo respuestas inflamatorias. [23] Tatsukawa y col. (1999) [24] demostraron que el principal agente oxidante en fagosomas de neutrófilos (PMN) es $O_2 (^1\Delta_g)$, generado tras la síntesis de HClO mediante la activación de la enzima mieloperoxidasa (MPO).

1.3.2. Estrés oxidativo e influencia de la dieta

La dieta, sin duda, es un factor de gran importancia en la modulación del estrés oxidativo. La acción de diferentes compuestos bioactivos presentes en diversos alimentos de origen natural puede ser directa, por medio de la desactivación de los radicales libres y especies reactivas no radicalarias, o indirecta, a través de la activación de sistemas enzimáticos con capacidad para la supresión de EROS. En ambos casos, cabe resaltar que parte de los estudios científicos referentes al efecto de nutrientes, alimentos y patrones dietéticos sobre el estrés oxidativo, describen resultados beneficiosos sobre los diferentes marcadores y sus implicaciones sobre la salud humana. [25]

1.4. Referencias

1. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1–14 (1984).
2. Miller, J. K.; Brzezinska-Slebodzinska, E. & Madsen, F. C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* **76**, 2812–2823 (1993).
3. Valko, M. Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M. & Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
4. Miller, D. M.; Buettner, G. R. & Aust, S. D. Transition metals as catalysts "autoxidation" reactions of dennis. *Free Radic. Biol. Med.* **8**, 95–108 (1990).
5. Valko, M.; Morris, H. & Cronin, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 1161–1208 (2005).
6. Cadenas, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors* **6**, 391–397 (1997).
7. Pastor, N.; Weinstein, H.; Jamison, E. & Brenowitz, M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J. Mol. Biol.* **304**, 55–68 (2000).
8. Liochev, S. I. & Fridovich, I. The role of $O_2^{\cdot-}$ in the production of HO^{\cdot} : *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 29–33 (1994).
9. Valko, M. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* **266**, 37–56 (2004).
10. Schafer F. Q. & Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1191–1212 (2001).
11. Chaudière, J. & Ferrari-Iliou, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 949–962 (1999).
12. Chihuailaf, R.; Contreras, P. A.; Wittwer, F. G. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. México* **33**, 265–283 (2002).
13. Morrissey, P. A. & Brien, N. M. O. Dietary antioxidants in health and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **6946**, 463–472 (1998).
14. Bandyopadhyay, U.; Das, D. & Banerjee, R. K. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr. Sci.* **77**, 658–666 (1999).
15. Sundaresan, M. Yu, Z. X.; Ferrans, V. J.; Sulciner, D. J.; Gutkind, J. S.; Irani, K.; Goldschmidt-

- Clermont, P. J. & Finkel, T. Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem. J.* **318**, 379–82 (1996).
16. Chapple, I. L. C. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J. Clin. Periodontol.* **24**, 287–296 (1997).
 17. Romero, F. J.; Bosch-Morell, F.; Romero, M. J.; Jareño, E. J.; Romero, B.; Marín, N. & Romá, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health Perspect.* **106**, 1229–34 (1998).
 18. Montenegro, M. A. Reactividad de oxígeno singlete frente a sustancias naturales presentes en alimentos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Santiago del Estero (2004).
 19. Stief, T. W. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med. Hypotheses* **60**, 567–572 (2003).
 20. Stief, T. W. & Light, S. O. The antithrombotic factor singlet oxygen/light ($^1\text{O}_2/h\nu$). *Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis* **6**, 22–30 (1999).
 21. Gorman, A. A. & Rodgers, M. A. J. Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *J. Photochem. Photobiol. B.* **14**, 159–176 (1992).
 22. Grether-Beck, S.; Olaizola-Horn, S.; Schmitt, H.; Grewe, M.; Jahnke, A.; Johnson, J. P.; Briviba, K.; Sies, H. & Krutmann, J. Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14586–14591 (1996).
 23. Suzuki, M.; Asako, H.; Kubes, P.; Jennings, S.; Grisham, M. & Granger, D. N. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc. Res.* **42**, 125–138 (1991).
 24. Tatsuzava, H.; Maruyama, T.; Hori, K.; Sano, Y. & Nakano, M. Singlet Oxygen ($^1\Delta_g\text{O}_2$) as the principal oxidant in myeloperoxidase-mediated bacterial killing in neutrophil phagosome. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **262**, 647–650 (1999).
 25. Barbosa, K.; Bressan, J.; Zulet, M. & Martínez, J. Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. *An. Sist. Sanit. Navar.* **31**, 259–280 (2008).

CAPÍTULO 2 – ANTIOXIDANTES NATURALES: FLAVONOIDES

2.1. Estructura química y funcionalidad de flavonoides

Las sustancias fitoquímicas son productos orgánicos constituyentes de alimentos de origen vegetal (frutas, hortalizas y alimentos derivados de ellas) que no son nutrientes, dado que su aporte calórico es insignificante, pero pueden proporcionar al alimento propiedades funcionales que van más allá de las nutricionales propiamente dichas. Dentro de este término genérico, se incluyen sustancias de diversas familias químicas, como son los polifenoles y carotenoides.^[1,2]

Los compuestos fenólicos forman un amplio grupo de sustancias con diferentes estructuras químicas y actividad, que son constituyentes importantes de las plantas. Están presentes, generalmente, en forma de glucósidos en los extractos de las frutas, hierbas, vegetales y cereales. Los polifenoles, entre los que se incluyen los flavonoides, presentan una amplia variedad de actividades biológicas, incluyendo actividad anticancerígena, anti-inflamatoria, antihipertensiva, estrogénica, y efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares. En especial, estos componentes pueden ejercer efecto antioxidante por el secuestro de radicales libres, la donación de moléculas de hidrógeno, la remoción de moléculas de $O_2^{\cdot-}$ y la quelación de metales de transición; estas propiedades son atribuidas principalmente a los grupos hidroxilo ($-OH$) presentes en su anillo estructural.^[3]

Los flavonoides constituyen una amplia familia de compuestos que, a su vez, incluyen varios grupos entre los que tienen especial interés: antocianos, flavanos, flavonoles, flavonas, flavanonas, chalconas e isoflavonas. Estructuralmente, los flavonoides se caracterizan por poseer un esqueleto C6-C3-C6, derivan del benzo- γ -pireno presentando un esqueleto estructural general como se observa en la **Figura 2.1**. Estos compuestos se diferencian entre sí por el grado de insaturación y sustituyentes del anillo C. Se pueden distinguir entre compuestos que poseen un grupo ceto ($C=O$) en el heterociclo: flavonas, flavonoles, flavanonas (dihidroflavonas) y chalconas; y los que no lo poseen: flavanoles y antocianidinas. La existencia de un grupo $-OH$ en posición 3 es otra característica común a antocianidinas, flavanoles y flavonoles. Dentro de cada uno de estos grupos, los compuestos se diferencian entre sí por los sustituyentes en el anillo B y por los sustituyentes de los diferentes $-OH$ de la molécula (metilos, azúcares y/o ácidos orgánicos, más habitualmente).^[4]

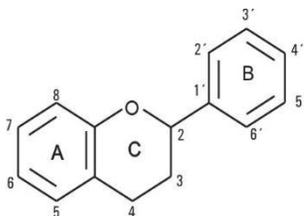


Figura 2.1.: Estructura química general de los flavonoides.

2.1.1. Flavonas y flavonoles

Ambos tipos de compuestos poseen un grupo C=O en posición 4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3 del anillo C; los flavonoles presentan, además, un grupo –OH en C3. Habitualmente, ambos se encuentran en los tejidos vegetales, principalmente, bajo la forma de glicósidos (glucósidos, galactósidos, ramnósidos, rutinósidos o glucuronósidos). La posición más frecuente implicada en la glicosilación es la 3, aunque también puede darse en 5 y 7. El azúcar más predominante es la glucosa. ^[5]

Las flavonas no se encuentran habitualmente en frutas pero sí en cereales y muchas plantas herbáceas. Los glicósidos de las flavonas están presentes en verduras y hortalizas; participan en cierta medida en las características sensoriales de los vegetales. En altas concentraciones, o formando complejos con metales, pueden contribuir a la coloración de plantas.

Los flavonoles se encuentran repartidos abundantemente en todos los alimentos de origen vegetal, y las pieles u hollejos de las frutas son particularmente ricos en estos compuestos. Los más conocidos son quercetina, kaempferol y miricetina y se presentan, comúnmente, en forma de glicósidos. Al igual que las flavonas, en altas concentraciones, proporcionan un ligero color amarillo a los tejidos vegetales. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en plantas superiores, aunque los flavonoles son predominantes en las frutas. Es destacable el contenido elevado de derivados de quercetina en cebollas. ^[6]

Las isoflavonas son un grupo que estructuralmente difieren de las flavonas en la posición del anillo B en la molécula, que en este caso está unido por el carbono C3. Son compuestos con actividad estrogénica que se encuentran, principalmente, en legumbres. La soja es una fuente reconocida de daidzeína y genisteína. ^[3]

2.1.2. Propiedades físicas y espectroscopía UV-Vis

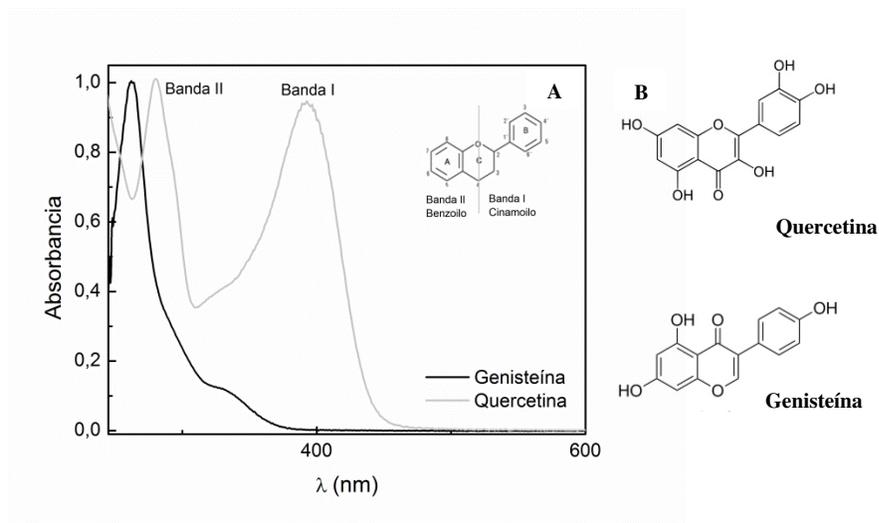


Figura 2.2.: Espectro de absorción de flavonoides.

(A) Espectro de absorción normalizado para quercetina y genisteína en amortiguador fosfato 0,025 M pH 6,8. Inserto: Estructura química general de flavonoides. (B) Estructura química de quercetina y genisteína.

Las propiedades físicas dependen del tipo de flavonoide y de la forma en que se presenta (aglicona o glicósido). Los glicósidos y las antocianinas son solubles en agua y etanol. Las agliconas altamente hidroxiladas son solubles en etanol, metanol, isopropanol y n-butanol, mientras que las poco hidroxiladas son solubles en éter etílico, acetato de etilo y acetona. Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas en tanto que los altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, lo que permite identificarlos. ^[5]

Los sistemas conjugados de los anillos aromáticos les confieren las propiedades de absorción de luz y los colores característicos a algunos tipos de flavonoides tales como: flavonas, flavonoles y antocianinas. Los espectros de absorción UV-Vis presentan, por lo general, dos bandas características, denominadas Banda I y Banda II (**Figura 2.2.**). La Banda I está asociada con la absorción del anillo B (sistema cinamoilo) y la Banda II con la absorción del anillo A (sistema benzoilo). ^[7]

La posición de las bandas depende del tipo de molécula. Como puede observarse en la **Figura 2.2.**, para isoflavonas, como genisteína, la Banda I a 275 nm se convierte en un hombro,

adjudicable a la posición del anillo B en C3. Un parámetro de identificación y cuantificación de flavonoides es, por lo tanto, la obtención de los espectros de absorción UV-Vis.^[7]

2.2. Principales propiedades de flavonoides

2.2.1. Capacidad antioxidante

Como se expuso en el **Capítulo 1**, un número importante de especies altamente reactivas como $O_2(^1\Delta_g)$, HO^\bullet , $O_2^{\bullet-}$, ON y radicales libres alquil-peroxilo (ROO^\bullet) se producen regularmente en nuestro organismo. Estos pueden dañar a lípidos, proteínas y ADN e intervenir en procesos de patogénesis y envejecimiento.^[8]

La ingesta de flavonoides junto con otros antioxidantes naturales de eficacia comprobada, como las vitaminas C y E y carotenoides, coadyuvan en esos procesos de defensa. De forma general, los sistemas de defensa fisiológica frente al daño generado por estos radicales se clasifican en dos categorías^[9]:

- Antioxidantes Tipo I: actúan interrumpiendo la cadena de reacciones oxidativas a través de la donación de electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres generados en el transcurso de las diferentes reacciones, transformándolos en especies termodinámicamente más estables.
- Antioxidantes Tipo II: denominados preventivos, actúan por diversos mecanismos que incluyen complejación con metales, secuestro de oxígeno, descomposición de hidroperóxidos, absorción de radiación UV o desactivación de EROS.

Los flavonoides son antioxidantes Tipo I, resultando en la formación de un radical libre fenoxilo, por la donación de un hidrógeno, estabilizado por deslocalización del electrón desapareado en el anillo aromático.^[5,10]

La configuración de los grupos $-OH$ del anillo B es la más influyente en la capacidad para desactivar especies radicalarias de oxígeno y nitrógeno. El grupo 3'4'-catecol (1,2-bencenodiol) en el respectivo anillo, es una estructura fuertemente activa frente a radicales libres como así también para quelar metales.^[5,11] El heterociclo que da lugar al anillo C contribuye a la capacidad antioxidante a través del grupo $-OH$ en C3 y por constituir el nexo entre los anillos aromático A y B.^[12,13] El doble enlace $C2=C3$ en el anillo C otorga una marcada reactividad, con la

consecuente adición de la especie reactiva; este efecto fue observado específicamente frente a O_2 ($^1\Delta_g$).^[1,14]

A lo largo del tiempo, se ha podido confirmar que quercetina, el flavonoide más abundante en la naturaleza, es también el de mayor actividad antioxidante en vías metal y no-metal inducidas.^[11,15] Su potencial actividad se atribuye a que posee tres grupos activos frente a especies oxidantes: grupo 3'4'-catecol, doble enlace C2=C3 y grupo -OH en C3. Estudios realizados por Burda y col. (2001)^[13], sugieren que esta consistente actividad se ve liderada por el grupo -OH en C3 ya que imparte una geometría particular a la molécula, otorgándole mayor estabilidad al radical fenoxilo formado^[12], y por el doble enlace C2=C3.

Quercetina posee una capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) de 4,7 en comparación al valor de 2,1 de luteolina, flavonoide que carece del grupo -OH en C3.^[16] Este valor de TEAC para quercetina contrasta con un valor de 2,9 para la isoflavona genisteína, molécula en que la isomerización se adjudica a la unión del anillo B en C3, restando la posibilidad de unir el -OH mencionado y confirmando el aporte de este grupo a la actividad antioxidante. A su vez, cabe destacar que el doble enlace C2=C3 sumado a la presencia del grupo C=O en C4 duplica el TEAC para quercetina respecto de (+)-catequina, la cual no presenta C2=C3.^[16]

Generalmente, las moléculas de glúcidos se unen a los flavonoides a través del C3 y C7 disminuyendo, considerablemente, su capacidad antioxidante. Esto es consistente con el impedimento estérico que le imparten a la molécula para reaccionar con las diferentes especies reactivas.^[1,5,13,16]

2.2.2. Capacidad anticancerígena, anti-inflamatoria y desintoxicante

El mecanismo propuesto para explicar el efecto preventivo del cáncer a partir del consumo de flavonoides involucra, multidireccionalmente, una serie de actividades como^[6]: remoción de radicales libres^[10], inhibición de enzimas que promueven la carcinogénesis^[17-19] e interacción con los receptores de estrógeno^[20,21], factores de transcripción^[22] y otras proteínas^[23].

Quercetina ha sido estudiada en numerosos modelos animales y líneas celulares, observándose un efecto anti-proliferativo en células cancerígenas^[24] de pulmón, colon^[25], endometrio, etc. Presenta, su vez, un efecto inmunosupresor sobre la activación de células dendríticas al reducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias y los niveles de expresión de antígenos del complejo

mayor de histocompatibilidad clase II y moléculas co-estimuladoras ^[26]. Genisteína ha demostrado ser un inhibidor específico de la proteína tirosina quinasa, impidiendo la síntesis de ADN, ARN y/o proteínas vitales en células tumorales mediada por la actividad de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal. ^[17,18]

Genisteína y quercetina inhiben la inducción, estimulada por el factor de necrosis tumoral (TNF), de moléculas de adhesión celular derivadas del endotelio vascular. También interrumpen el comienzo de la cascada de señalización inflamatoria mediada por el factor nuclear κ B (NF- κ B) al impedir la fosforilación de la subunidad $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ del NF- κ B. Esto se traduce en una actividad anti-inflamatoria notable. ^[27,28]

En concomitancia, Messina y col. (1994) ^[20], tras un estudio comparativo entre datos experimentales de modelos animales, líneas celulares y resultados de un seguimiento epidemiológico de la dieta poblacional, mostraron que países de elevado consumo de alimentos derivados de la soja (China y Japón), única fuente de genisteína en la dieta humana, presentan un bajo riesgo de contraer cáncer de colon, pulmón y próstata.

Ha sido analizada la importancia de la dieta en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. ^[29,30] La visión actual hace foco sobre ligandos del receptor aril hidrocarburo, presente en diversas células linfoides y cuyo rol se asocia, principalmente, a las células linfoides innatas del intestino delgado. Los flavonoides constituyen parte de estos ligandos y se ha confirmado que dietas carentes de los mismos, como así también de vitamina D y A, resultan en un menor número de linfocitos intraepiteliales (IEL), interrupción de la función barrera del epitelio, producción exacerbada de citoquinas pro-inflamatorias y reducción del tejido linfoide organizado (*cryptopatches*) y folículos linfoides aislados en colon. ^[30]

Se ha comprobado a su vez, que quercetina protege el tejido de los riñones del efecto tóxico de antibióticos como la gentamicina. ^[31] La hipótesis certera para este efecto sugiere que este tipo de antibiótico estimula la generación de EROS que podrían ser desactivados por la presencia del flavonoide. En conclusión, los flavonoides han mostrado ser de gran importancia para la fisiología del individuo y el hecho de no poder ser sintetizados por el propio organismo los convierte, en la actualidad, en compuestos bioactivos esenciales sólo incorporables a partir de la dieta. ^[4]

2.3. Biodisponibilidad de flavonoides

Es muy importante destacar que los polifenoles más comunes en la dieta humana no son, necesariamente, los más activos en el organismo ya sea por su baja actividad intrínseca o porque son poco absorbidos en intestino, altamente metabolizados y/o rápidamente eliminados. ^[3]

El metabolismo de flavonoides sigue un camino común a la totalidad de nutrientes. Las agliconas pueden ser absorbidas en el estómago e intestino delgado. Sin embargo, la forma más frecuente de encontrar a los flavonoides en los alimentos de origen natural es como ésteres, glicósidos o polímeros incapaces de ser aprovechados en su forma nativa. Estas sustancias, primeramente, deben ser parcialmente hidrolizadas por enzimas intestinales o la misma flora que habita en el colon. Cuando la flora está involucrada, la eficiencia de absorción y aprovechamiento usualmente disminuye ya que la microbiota suele degradar las agliconas a sustancias de menor tamaño y sin actividad. ^[32,33]

Durante el curso de la absorción, los flavonoides son conjugados en el intestino delgado y el hígado. Este proceso generalmente incluye metilación, sulfatación y glucuronidación. Estos procesos son comunes en la desintoxicación metabólica y facilitan la eliminación urinaria y biliar de xenobióticos al aumentar su hidrofilia. Los mecanismos de conjugación son altamente eficientes por lo que es poco probable que los flavonoides, en dosis nutricionales, lleguen a concretar alguna de sus actividades benéficas. ^[33]

Dado que la absorción en colon ocurre con menos facilidad, ya sea por la menor superficie expuesta para el proceso como así también por una densidad de transporte considerablemente disminuida por la presencia de *mucus*, los flavonoides glicosilados se absorben con mayor dificultad que las agliconas y los glucosilados. Hollman y col. (1999) ^[34] y Graefe y col. (2001) ^[35] demostraron que la biodisponibilidad de rutina (quercetina-3-rutinosa) es sólo del 15 al 20 % de la que posee quercetina- 4'-glucosa.

Los diferentes glucósidos de quercetina son, incluso, absorbidos en intestino delgado ^[36] y su arribo a colon, en las formas naturales más abundantes, es prácticamente improbable. Las isoflavonas glicosiladas presentes en la soja y sus derivados, siguen el mismo comportamiento. ^[37]

La principal desventaja de utilizar flavonoides de manera terapéutica o en el diseño de alimentos funcionales y/o nutraceuticos radica en que su forma más activa es la aglicona, siendo ésta la menos soluble en agua y medios de pH fisiológico.

En conclusión, los flavonoides constituyen un grupo de biomoléculas de excelentes propiedades que no pueden explotarse en su totalidad ya que son lábiles en condiciones ambientales (luz, oxígeno, temperatura) y en el propio tracto digestivo donde sufren severas modificaciones que alteran su potencial actividad. ^[38]

2.4. Referencias

1. Gonzalo, J. C. R. & Alonso, M. G. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Aliment. Nutr. y Salud* **9**, 31–38 (2002).
2. Muñoz, A. & Ramos, F. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Rev. Horiz. Médico* **7**, 23–31 (2007).
3. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727–747 (2004).
4. Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* **96**, 67–202 (2002).
5. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572–584 (2002).
6. Formica, J. V. & Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 1061–1080 (1995).
7. Mabry, T.; Markham, K. R. & Thomas, M. B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Estados Unidos: Springer-Verlag (1970). Capítulo V. 41–103.
8. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M. & Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
9. Gonzalez, E. A. Reactividad química de flavanonas presentes en cítricos: su relación con aplicacines industriales y nutraceuticas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Santiago del Estero (2005).
10. Bors, W.; Heller, W.; Michel, C. & Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **186**, 343–355 (1990).
11. Jurasekova, Z.; Torreggiani, A.; Tamba, M.; Sanchez-Cortes, S. & Garcia-Ramos, J. V. Raman and surface-enhanced Raman scattering (SERS) investigation of the quercetin interaction with metals: Evidence of structural changing processes in aqueous solution and on metal nanoparticles. *J. Mol. Struct.* **918**, 129–137 (2009).
12. Russo, N.; Toscano, M. & Uccella, N. Semiempirical molecular modeling into quercetin reactive site: structural, conformational, and electronic features. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3232–3237 (2000).
13. Burda, S. & Oleszek, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2774–2779 (2001).
14. Morán Vieyra, F. E.; Boggetti, H. J.; Zampini, I. C.; Ordoñez, R. M.; Isla, M. I.; Alvarez, R. M. S.;

- De Rosso, V.; Mercadante, A. Z. & Borsarelli, C. D. Singlet oxygen quenching and radical scavenging capacities of structurally-related flavonoids present in *Zuccagnia punctata* Cav. *Free Radic. Res.* **43**, 553–64 (2009).
15. Jurasekova, Z.; Domingo, C.; Garcia-Ramos, J. V & Sanchez-Cortes, S. Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 12802–12811 (2014).
 16. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. & Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933–956 (1996).
 17. Akiyama, T.; Ishida, J.; Nakagawa, S.; Ogawara, H.; Watanabe, S.; Itoh, N.; Shibuya, M. & Fukami, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**, 5592–5595 (1987).
 18. Natarajan, K.; Manna, S. K.; Chaturvedi, M. M. & Aggarwal, B. B. Protein tyrosine kinase inhibitors block tumor necrosis factor-induced activation of nuclear factor- κ B, degradation of I κ B α , nuclear translocation of p65, and subsequent gene expression. *Arch. Biochem. Biophys.* **352**, 59–70 (1998).
 19. Moon, Y. J.; Wang, X. & Morris, M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. Vit.* **20**, 187–210 (2006).
 20. Messina, M. J.; Persky, V.; Setchell, K. D. R. & Barnes, S. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr. Cancer* **21**, 113–131 (1994).
 21. Setchell, K. D. R. & Cassidy, A. Symposium on Phytochemicals: biochemistry and Physiology Dietary Isoflavones : Biological Effects and Relevance to Human Health. *Am. J. Nutr. Sci.* **0022-3166/99**, 758–767 (1999).
 22. Chen, J. C.; Ho, F. M.; Chao, P. D. L.; Chen, C. P.; Jeng, K. C. G.; Hsu, H. B.; Lee, S. T.; Wen, T. W. & Lin, W. W. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I κ B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur. J. Pharmacol.* **521**, 9–20 (2005).
 23. Murakami, A.; Ashida, H. & Terao, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett.* **269**, 315–325 (2008).
 24. Nathiya, S.; Durga, M. & Devasena, T. Quercetin, encapsulated quercetin and its application- A review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **6**, 20–26 (2014).
 25. Ranelletti, F. O.; Ricci, R.; Larocca, L. M.; Maggiano, N.; Capelli, A.; Scambia, G.; Beneditti-Panici, P.; Mancuso, S.; Rumi, C. & Piantelli, M. Growth inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumours. *Int. J. Cancer* **50**, 486–492 (1992).
 26. Huang, R.-Y.; Yu, Y.-L.; Cheng, W.-C.; OuYang, C.-N.; Fu, E. & Chu, C.-L. Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function. *J. Immunol.* **184**, 6815–21 (2010).

27. Comalada, M.; Camuesco, D.; Sierra, S.; Ballester, I.; Xaus, J.; Gálvez, J. & Zarzuelo, A. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *Eur. J. Immunol.* **35**, 584–592 (2005).
28. Ruiz, P. A.; Braune, A.; Hölzlwimmer, G.; Quintanilla-Fend, L. & Haller, D. Quercetin inhibits TNF-induced NF- κ B transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* **137**, 1208–1215 (2007).
29. Veldhoen, M. & Brucklacher-Waldert, V. Dietary influences on intestinal immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 696–708 (2012).
30. Mowat, A. M. & Agace, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* (2014). doi:10.1038/nri3738
31. Abdel-Raheem, I. T.; Abdel-Ghany, A. A. & Mohamed, G. A. Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 61–67 (2009).
32. Ross, J. A. & Kasum, C. M. Dietary flavonoids bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 19–34 (2002).
33. Williamson, G. & Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II.Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 243S–255S (2005).
34. Hollman, P. C.; Bijlsman, M. N.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. P.; de Vries, J. H. & Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic. Res.* **31**, 569–573 (1999).
35. Graefe, E. U.; Wittig, J.; Mueller, S.; Riethling, A. K.; Uehleke, B.; Drewelow, B.; Pforte, H.; Jacobasch, G.; Derendorf, H. & Veit, M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J. Clin. Pharmacol.* **41**, 492–499 (2001).
36. Hollman P. C.; de Vries J. H. M.; van Leeuwen, S. D.; Mengelers, M.J.B. & Katan, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 1276–1282 (1995).
37. Hutchins, A. M.; Slavin, J.L. & Lampe, J. W. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *Journal Am. Diet Assoc.* **95**, 551 (1995).
38. Zheng, Y.; Haworth, I. S.; Zuo, Z.; Chow, M. S. S. & Chow, A. H. L. Physicochemical and structural characterization of quercetin- β - cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.* **94**, 1079–1089 (2005).

CAPÍTULO 3 – ESTABILIZACIÓN Y VEHICULIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

3.1. La microencapsulación como herramienta de vehiculización

La microencapsulación es una técnica a través de la cual un componente activo (fase interna o material *core*), que puede estar conformado por gotas de una sustancia líquida, partículas de un componente sólido, burbujas de una sustancia gaseosa o microorganismos, es atrapado en una matriz polimérica (agente encapsulante o material de pared).^[1-3]

En la industria alimentaria determinados compuestos se microencapsulan por las siguientes razones^[4,5]:

- Vehicular sustancias de poca afinidad con la fase que lo contendrá.
- Reducir la reactividad del material interno frente a factores ambientales (luz, oxígeno, temperatura, humedad, etc.).
- Modificar las características físicas del material original de modo que se posibilite una mejor manipulación.
- Enmascarar el *flavor* (sabor y aroma) del material interno.
- Diluir la fase interna cuando se requieren pequeñas cantidades de la misma en la formulación final (oligonutrientes y/o compuestos bioactivos).
- Disminuir el grado de transferencia del material interno hacia el medio que lo rodea.
- Ayudar a que sustancias lábiles resistan condiciones de procesamiento y empaque protegiendo sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia.
- Proteger compuestos bioactivos frente a condiciones fisiológicas de digestión gastrointestinal, mejorando su absorción y liberación en sitios de acción específica.

El tamaño de las microcápsulas está comprendido entre unos pocos micrones y algunos milímetros. Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la fase interna y del material de pared y de la técnica empleada para la formulación se puede obtener distinta morfología de partícula (**Figura 3.1.**): partículas esféricas compuestas de un centro uniforme rodeado de una lámina de material de pared, estructura multi-pared, partículas irregulares, estructura multi-núcleo y del tipo matricial, cuyo material activo se encuentra altamente disperso en la matriz polimérica.^[6-8]

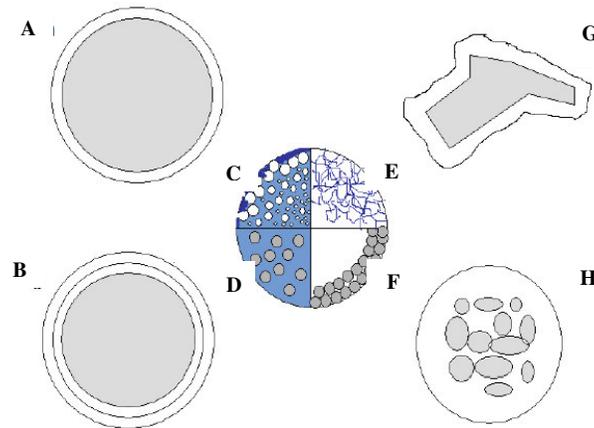


Figura 3.1.: Morfología de los diferentes tipos de microcápsulas. (A) Partícula simple. (B) Partícula multipared. (C-D-E-F) Partículas matriciales. (G) Partícula Irregular. (H) Partícula multinúcleo. Adaptado de *Gibbs y col. (1999)* y *Vehring (2007)*.

3.1.1. Materiales de pared

La composición del material de pared es la principal determinante de las propiedades funcionales de la microcápsula que, para ser ideal, debería presentar las siguientes características [1].

- Propiedades reológicas adecuadas.
- Habilidad para dispersar o emulsificar el material activo y estabilizar la emulsión o suspensión producida.
- No reaccionar con el material encapsulado durante el procesamiento y almacenamiento prolongado.
- Capacidad de conservar el material activo dentro de la estructura formada.
- Proveer una máxima protección del material activo respecto de las condiciones ambientales (oxígeno, calor, luz, humedad, etc.).
- Solubilidad en solventes aceptados en la industria alimentaria.
- Económico y de grado alimenticio.

Los carbohidratos son, y han sido, los materiales más utilizados como recubrimiento en la microencapsulación. Entre ellos se encuentra el almidón y sus derivados modificados, maltodextrinas, pectinas, alginatos, etc. Los polisacáridos son considerados buenos agentes

encapsulantes dado que exhiben una baja viscosidad a elevada concentración de sólidos, aportando muchos de ellos, actividad interfacial, lo cual mejora la eficiencia de microencapsulación por la estabilidad que brindan a las emulsiones y suspensiones de los agentes activos. ^[9]

Las pectinas son un tipo de heteropolisacáridos formados por una mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados que constituyen el 30 % del peso seco de la pared celular primaria de células vegetales. En presencia de agua forman geles y son capaces de producir emulsiones estables a bajas concentraciones. Las propiedades emulsificantes de las pectinas se deben a residuos de proteína que hay en su cadena polimérica y a la elevada presencia de grupos acetilo. ^[5] Los alginatos son hidrocoloides, extraídos de algas, que puede reaccionar con los iones de Ca^{2+} y formar un gel estable capaz de microencapsular por gelificación un activo presente en el medio; son polímeros de 12.000 a 180.000 Da compuestos de ácidos D-manurónico y L-gulurónico conectados por enlaces β 1→4. ^[6] El uso de polisacáridos en los que la unión de monómeros esté determinada por enlaces β 1→4 se ha ampliado como redituables materiales de pared, dado que estos enlaces no pueden ser digeridos por el organismo humano y permiten una mejorada absorción de compuestos bioactivos en intestino mediante la colaboración de la microbiota. ^[4,9]

Las gomas son utilizadas en la microencapsulación por sus propiedades formadoras de film y emulsificantes. La goma acacia, generalmente llamada goma arábica, es un polímero de ácido D-glucurónico, L-ramnosa, D-galactosa y L-arabinosa con un 2 % de proteínas que le confieren la mencionada capacidad emulsificante. ^[10] Dentro de las proteínas, las más comúnmente empleadas son la gelatina y las proteínas de leche o suero de leche que, en combinación con azúcares simples o maltodextrinas, logran buenas propiedades de pared. Sin embargo, su capacidad reactiva frente a grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) hace que su uso sea muchas veces excluído. ^[6,11]

3.2. Técnicas de microencapsulación

Existe una variada serie de técnicas para encapsular diferentes compuestos en el diseño de aditivos alimentarios. Los métodos generalmente se clasifican en químicos, fisicoquímicos y físico-mecánicos.^[3] Los métodos químicos son ampliamente utilizados a escala de laboratorio, abarcan la polimerización interfacial e *in situ* del material de pared.^[1]

Los métodos físico-mecánicos son los más difundidos. El **secado por aspersión** (*Spray-Drying*) es una de las técnicas más antiguas y utilizada a nivel industrial, en la cual un líquido (suspensión o emulsión del material de pared y agente activo) es atomizado en contacto con un gas, generalmente aire, a altas temperaturas lo cual permite la evaporación del solvente instantáneamente. El secado por aspersión es una operación unitaria económica, flexible y permite plantear procesos continuos a gran escala que brinda partículas de buena calidad, matriciales, con un tamaño promedio de 40 μm .^[5] La **refrigeración por aspersión** (*Spray-Cooling*) es utilizada en la encapsulación con sustancias de bajo punto de fusión, como aceites vegetales, donde se pretende obtener una partícula hidrófoba capaz de vehiculizarse en matrices lipídicas.^[12] Dentro de este grupo se encuentra también la técnica de **lecho fluidizado**, donde una solución de material de recubrimiento se pulveriza, en contra corriente con aire caliente, sobre un lecho de partículas del componente activo; la evaporación del solvente es instantánea.^[1,3,11,12]

La **gelificación iónica** es un método fisicoquímico (electrostático) que permite la obtención de partículas por interacción de cargas opuestas. El tamaño de las microcápsulas y sus características pueden ajustarse a través de los valores de pH, la concentración iónica, la relación material de pared/compuesto activo y el tipo de material de pared. Se utiliza para encapsular sustancias hidrofílicas.^[9] La manera de llevar el procedimiento a gran escala es a través de la extrusión, donde una solución continua de polímero (generalmente alginato), conteniendo el componente activo a recubrir (usualmente emulsionado), es goteada sobre una solución gelificante de Ca^{2+} . Si en lugar de Ca^{2+} se emplea otro polímero de carga opuesta para llevar a cabo la interacción y conformación de la estructura envolvente, la técnica pasa a denominarse coacervación y suele ser representada en combinaciones de proteínas, como la gelatina, y polisacáridos, como la goma arábiga o el alginato. Las microcápsulas obtenidas son del tipo simple o multi-pared.^[4] Otro método fisicoquímico empleado es la inclusión molecular, generalmente en ciclodextrinas, las cuales poseen grupos hidrófobos en su interior e hidrofílicos en su exterior, pudiendo alojar

dentro de su estructura compuestos afines, los cuales son rodeados y protegidos, adquiriendo la capacidad de vehiculizarse en medios acuosos conforme a la cantidad de monómeros de glucosa que comprenda el ciclo. ^[9] Algo similar representa el **atrapamiento en liposomas**, microvesículas esféricas compuestas por bicapas paralelas de fosfolípidos. Esta propiedad de los fosfolípidos de adoptar la configuración en bicapas en una fase acuosa, se debe a que son moléculas anfifílicas, es decir, poseen un extremo polar o hidrofílico, que se orienta hacia la fase acuosa, y un extremo no polar o hidrofóbico, que rechaza la fase acuosa y se orienta hacia el interior de la bicapa. ^[1]

La elección del método a utilizar para microencapsular, generalmente se ve determinada por la naturaleza física del material *core*.

3.2.1. Eficiencia de microencapsulación

La eficiencia de microencapsulación es definida como la concentración de material *core* que se encuentran en el núcleo o matriz de la microcápsula, en relación a la concentración total, es decir, respecto de lo presente en el núcleo o matriz, como así también en la superficie. ^[3]

La eficiencia de microencapsulación puede ser afectada por diversos factores, que se detallan a continuación ^[13]:

- Concentración del polímero.

La eficiencia de microencapsulación aumenta con concentraciones crecientes del polímero. ^[14] El efecto de la concentración del polímero puede ser interpretada de dos maneras. En primer lugar, cuando el polímero se encuentra en altas concentraciones se deposita más rápido en la superficie de la fase dispersa, previniendo la difusión del compuesto activo ^[15]. En segundo lugar, incrementa la viscosidad de la suspensión o emulsión y retarda la difusión del material *core* dentro de las gotas del polímero encapsulante. ^[16]

- Relación entre la fase dispersa y fase continua.

El tamaño de partícula y la eficiencia de microencapsulación se incrementan con el aumento del volumen y concentración de la fase continua, es decir, de la solución de material de pared. ^[14]

- Velocidad de eliminación del solvente.

La metodología empleada y la velocidad de remoción del solvente influyen en la velocidad de solidificación del compuesto activo, como así también en la morfología de las micropartículas resultantes. ^[14] El solvente se puede eliminar de la emulsión mediante evaporación o extracción en fase continua. La velocidad de eliminación del disolvente puede ser controlada por la temperatura de evaporación y por el volumen del medio de dilución.

- Solubilidad del compuesto activo en la fase continua.

Una pérdida de material *core* puede ocurrir en la fase continua de material de pared cuando la fase dispersa permanece en un estado transicional semi-sólido o emulsionado. Si la solubilidad del compuesto activo en el solvente de la fase continua es más alta que en el de la fase dispersa, difundirá fácilmente y dificultará su entrapamiento en la micropartícula. ^[16]

- Peso molecular del material de pared.

Según estudios realizados por Fu y col. (2005) ^[17], a medida que desciende el peso molecular del polímero, la eficiencia de microencapsulación disminuye y la liberación del compuesto activo se incrementa.

3.3. Mecanismos de liberación del componente activo

El revestimiento de las microcápsulas puede ser fracturado por fuerzas mecánicas como la presión o el cizallamiento. Cuando el mecanismo de liberación pretende ser mecánico, la masticación es una de las herramientas más efectivas para llevarlo a cabo. La liberación mediada por fractura del material de pared es inmediata pero sucede sólo al momento de aplicar la fuerza necesaria. ^[11]

La mayoría de las microcápsulas tienen paredes finas que pueden actuar como una membrana semipermeable. Debido al tamaño de las partículas, el área superficial expuesta es elevada por unidad de peso, por lo tanto, con frecuencia, la liberación controlada se logra a través de un proceso de difusión. La difusión es un movimiento de material *core* impulsado por un gradiente de concentración; depende del tamaño, la forma y la polaridad de las moléculas de penetración. ^[18]

La integridad del recubrimiento puede ser alterada, también, por disolución del material de pared en un disolvente apropiado o por aplicación de temperatura. Los revestimientos solubles en agua pueden disolverse fácilmente mediante el aumento de la humedad en los sistemas que los contienen; aquellos recubrimientos insolubles en agua pueden fundirse térmicamente, lo cual se utiliza comúnmente para las cápsulas que presentan lípidos como material de pared. ^[11]

Es importante destacar que, si bien siempre prima uno de estos métodos, nunca acontece un sólo mecanismo. Finalmente, una vez que las microcápsulas son ingeridas la liberación puede ser mediada por la biodegradación enzimática en intestino delgado, o a través de la microbiota en colon, para dispensar el activo y favorecer su absorción. ^[19]

3.4. Referencias

1. Desai, K. G. H. & Jin Park, H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technol.* **23**, (2005).
2. Champagne, C. P. & Fustier, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 184–190 (2007).
3. Jyothi, N. V. N.; Prasanna, P. M.; Sakarkar, S. N.; Prabha, K. S.; Ramaiah, P. S. & Srawan, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J. Microencapsul.* **27**, 187–197 (2010).
4. Nedovic, V.; Kalusevic, A.; Manojlovic, V.; Levic, S. & Bugarski, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* **1**, 1806–1815 (2011).
5. Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A. & Saurel, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res. Int.* **40**, 1107–1121 (2007).
6. Gibbs, B. F.; Kermasha, S.; Alli, I. & Mulligan, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **50**, 213–224 (1999).
7. Estevinho, B. N.; Rocha, F.; Santos, L. & Alves, A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. *Trends Food Sci. Technol.* **31**, 138–155 (2013).
8. Vehring, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying. *Pharm. Res.* **25**, 999–1022 (2008).
9. de Vos, P.; Faas, M. M.; Spasojevic, M. & Sikkemaa, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. J. ChemTech Res.* **20**, 292–302 (2010).
10. Dickinson, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocoll.* **17**, 25–39 (2003).
11. Shahidi, F. & Han, X. Q. Encapsulation of food ingredients. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **33**, 501–547 (1993).
12. Gouin, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 330–347 (2004).
13. Yeo, Y. & Park, K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 1–12 (2004).
14. Mehta, R. C.; Thanoo, B. C. & DeLuca, P. P. Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(d,l-lactide-co-glycolide). *J. Control. Release* **41**, 249–257 (1996).
15. Rafati, H.; Coombes, A. G. A.; Adler, J.; Holland, J. & Davis, S. S. Protein-loaded poly (DL-

- lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics. *J. Control. Release* **43**, 89–102 (1997).
16. Bodmeier, R. & McGinity, J. W. Solvent selection in the preparation of poly(DL-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *Int. J. Pharm.* **43**, 179–186 (1988).
 17. Fu, X.; Ping, Q. & Gao, Y. Effects of formulation factors on encapsulation efficiency and release behaviour in vitro of huperzine A-PLGA microspheres. *J. Microencapsul.* **22**, 705–14 (2005).
 18. Zuidam, N. J. & Nedovic, V. A. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. Estados Unidos: Springer New York. (2013).
 19. Lesmes, U. & McClements, D. J. Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.* **20**, 448–457 (2009).

CAPÍTULO 4 – QUITOSANO

4.1. Obtención y estructura química de quitosano (Ch)

Quitina y quitosano (Ch) son polímeros naturales definidos como amino-polisacáridos de aplicaciones múltiples pero altamente específicas. ^[1] Estos biopolímeros se destacan, principalmente, por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, su carencia de toxicidad, actividad antimicrobiana, antioxidante, inmuno-estimulante y prebiótica. ^[1-7]

Quitina posee una estructura 100 % acetilada, compuesta en su totalidad por monómeros de N-acetilglucosamina unidos por enlaces β 1 \rightarrow 4 (**Figura 4.1.**), por lo que, al igual que la celulosa, es una sustancia incapaz de ser aprovechada por el tracto gastrodigestivo humano, adoptando la definición de fibra alimentaria. ^[6] Se obtiene de animales invertebrados (exoesqueleto de crustáceos en su mayoría), hongos y levaduras. ^[8] La insolubilidad de la misma se debe a su estructura semicristalina conferida por el establecimiento de puentes hidrógeno inter e intramoleculares que dan lugar a tres polimorfismos principales, α -, β - y γ - (**Figura 4.2.**). La forma más abundante en la naturaleza es la α -, en la que las cadenas poliméricas adyacentes se disponen de manera antiparalela, lo que facilita establecer uniones intermoleculares más estrechas y dificulta el acceso a los grupos funcionales, convirtiéndola en la menos reactiva de las isoformas. β -quitina, conforma una unidad monoclinica de cadenas dispuestas de modo paralelo, donde los impedimentos estéricos exponen la estructura de modo más reactivo ya que sus enlaces puente hidrógeno intermoleculares se constituyen de manera más débil dando lugar a un “hinchamiento semicristalino” en agua u otros solventes orgánicos. ^[9] La tercer isoforma, γ -, es considerada un subtipo de α -quitina, donde la disposición de las cadenas se da de manera intercalada, dos de modo paralelo y uno antiparalelo. ^[9]

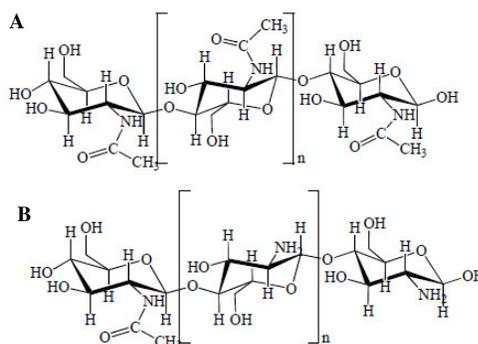


Figura 4.1.: (A) Quitina 100 % acetilada. (B) Quitosano (Ch).

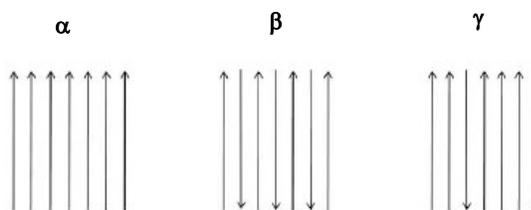


Figura 4.2.: Isoformas de quitina.

Quitina es un biopolímero químicamente estable, completamente insoluble en solventes orgánicos e inorgánicos. ^[4,8] Se extrae del exoesqueleto de crustáceos a través de un tratamiento ácido que permite disolver el carbonato cálcico (50 % de la composición del mismo), seguido de una extracción alcalina para disolver el contenido proteico y, posteriormente, una despigmentación que remueve las astaxantina presente para blanquear el polvo obtenido. ^[10] Un simple tratamiento con NaOH al 20 % (p/v), seguido de un intenso lavado con agua, permite convertir la α -quitina en β -quitina, lo cual mejora la reactividad para la obtención de Ch. ^[1] Este último puede ser producido a través de un proceso de desacetilación por hidrólisis alcalina (NaOH o KOH al 30-50 % (p/v)) o enzimática (a través de desacetilasas del hongo *Mucor rouxii*), de los grupos acetoamidos de quitina. ^[3,11]

Galed y col. (2005) ^[12], demostraron que la reacción de obtención de Ch no depende de la procedencia de quitina, es decir, de la especie de crustáceos desde la cual se obtiene. Ahora bien, si la misma proviene de una obtención a escala industrial, su grado de pureza es menor a aquella que se obtiene a escala piloto o laboratorio, y la misma arroja Ch con mayor grado de desacetilación (GDA) dada la alteración de su estructura semicristalina, por la presencia de las mencionadas impurezas, lo que facilita la reacción del álcali y la obtención del mismo. ^[13]

Ch tiene tres grupos funcionales reactivos, un grupo amino ($-\text{NH}_2$) o aceto-amido y también dos grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) primarios y uno secundario en C2 y C3, respectivamente (**Figura 4.1.**). ^[2] El grupo funcional $-\text{NH}_2$ se convierte en el potencial sitio reactivo para la obtención de moléculas derivadas que ofrezcan nuevas o mejoradas aplicaciones ^[5,9,14], como así también es el grupo le confiere la capacidad de disolverse a pH debajo de 6, ya que Ch posee un $\text{p}K_a$ de alrededor de 6,3. Por debajo de dicho valor de pH los grupos $-\text{NH}_2$ se protonan y convierten a Ch en un electrolito policationico soluble en medios acuosos, en tanto que la transición soluble-insoluble ocurre alrededor de su valor de $\text{p}K_a$. ^[15,16] El grado de protonación depende del pH y el $\text{p}K_a$ del ácido donde se pretende solubilizarlo ^[15,16], como así también del GDA de Ch pero no del peso molecular (PM) del mismo. ^[17] Ch a bajos valores de pH forma sales de amonio cuaternario

y por ésto, ácidos como el acético, el fórmico y el láctico pueden disolverlo. El mejor solvente para Ch es el ácido fórmico pero el solvente más utilizado es el ácido acético al 1 % (v/v) con un pH alrededor de 4. La solubilidad también depende de la concentración de iones (fuerza iónica) en la solución, puede ocurrir el efecto *salting out* cuando las concentraciones de ácido son elevadas, obteniéndose como producto sales de Ch y el ácido involucrado. Dichas sales se disuelven directamente en agua una vez aisladas, y es este efecto el que explica la insolubilidad de Ch en ácidos fuertes como sulfúrico y fosfórico. El ácido clorhídrico a concentración 1 M ya genera dicho comportamiento dando clorhidrato de Ch. El aumento de la concentración de ácido acético no brinda soluciones menos viscosas debido a la baja constante de disociación del mismo, que no permite la protonación suficiente de los grupos $-\text{NH}_2$. Ahora bien, esto no impide que a concentraciones elevadas del mismo, en ayuda de temperatura, se formen sales acetato de Ch. [1,15,16]

Dada su creciente aplicación en rubros multivariados [5] y las desventajas propias del Ch como elevada viscosidad a bajas concentraciones y escasa solubilidad a pH neutro [3], es que el desarrollo de derivados por diversos mecanismos ha sido tema de numerosos estudios y consecuentes publicaciones. En efecto, lograr un derivado soluble a pH neutro, amplía el espectro de uso de Ch y hace de su demanda un círculo no poco redituable, atendiendo a que deriva de un subproducto de la industria alimenticia que provee del segundo polisacárido más abundante en la tierra después de la celulosa, la quitina. [8]

Dentro de las reacciones que pueden llevarse a cabo con los grupos $-\text{NH}_2$ de Ch para obtener moléculas funcionales, se encuentran la acetilación, cuaternización, reacciones de alquilación con aldehídos y cetonas para dar bases de *Schiff*, quelación de metales, etc. Los grupos $-\text{OH}$, por su parte, también plantean posibles quimismos como la O-acetilación y puentes hidrógeno con moléculas polares. [1,5]

Sin bien, desde el año 2000, países como Japón y Corea, incluyeron a Ch como alimento funcional dentro de sus marcos regulatorios, recién en 2003 la Comisión del Codex Alimentario lo incluyó en su listado de aditivos alimentarios, en tanto que la Unión Europea lo hizo en 2015, incluso luego de que la FDA (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*) en Estados Unidos lo haya avalado como GRAS (por sus siglas en inglés, *Generally Recognized as Safe*). [3,18] Esto permite comenzar a dar impulso a las aplicaciones de este polisacárido en el diseño de

alimentos funcionales y nutracéuticos ya que ha mostrado versatilidad para potenciar, a través de diferentes funcionalizaciones, sus propias características naturales.

4.2. Principales propiedades y aplicaciones de quitosano (Ch)

4.2.1. Biocompatibilidad

Como Ch no puede ser degradado por enzimas del sistema gastrodigestivo humano se convierte en una sustancia no absorbible. Su dosis letal 50 (LD₅₀) es de 16 g/kg, muy similar a los valores de glucosa y sal de mesa probados en modelos murinos. [3,19]

Shipper y col. (1996) [20] han demostrado que la toxicidad de Ch es GDA dependiente. Valores de GDA por encima del 35 % no mostraron toxicidad, pero por debajo de dicho porcentaje los efectos tóxicos evaluados fueron dosis dependiente. Notaron también una independencia del PM sobre dichos efectos. [19]

Ch muestra mejor cito-compatibilidad que quitina. Shipper y col. (1997) [21] utilizando la línea celular Caco-2, demostraron que Ch puede interactuar con la membrana celular reorganizando las proteínas asociadas a las uniones estrechas (*tight junctions*) y facilitar transportes paracelulares de drogas encapsuladas. Esta característica también se definió como GDA dependiente, dado que a mayor cantidad de grupos -NH₂, mayor es la carga positiva potencial que Ch puede transportar. Dicha carga además le otorga la capacidad de interactuar con la membrana citoplasmática de las células, como así también con la glicoproteína mucina que conforma el *mucus* asociado a las superficies epiteliales de la mucosa. [22-24] Lehr y col. (1992) [25] sugieren que las fuerzas de unión electrostática de Ch con el *mucus* podrían estar determinadas por el PM, ya que a mayor PM la posibilidad de establecer fuerzas de arraigue a la capa glicoproteica se ve favorecida.

4.2.2. Capacidad antioxidante

Ch ha mostrado una importante actividad antioxidante al desactivar especies radicalarias como 1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), ROO[•], HO[•] y O₂^{•-} [26-29], como así también al prevenir la reacción de *Fenton* quelando iones metálicos [29-31]. Incluso, más recientemente, se ha demostrado su capacidad de desactivar O₂(¹Δ_g). [32]

A través de los sucesivos estudios acerca de la capacidad de Ch para actuar frente a EROS se ha encontrado una importante relación entre dicha actividad con el GDA y el PM. ^[2,3,6] La dependencia con el GDA se explica a través de la formación de macro radicales estables a partir de los grupos $-\text{NH}_2$ ^[33,34], aunque, Tanaka y col. (1993) ^[35] y Kosaraju y col. (2010) ^[36], han probado al bloquear por reacción de Maillard los grupos $-\text{NH}_2$ con glucosa, que los $-\text{OH}$ presentes en la cadena polisacárida de Ch también suman a la actividad antioxidante del polímero, principalmente al quelar iones de Fe^{2+} .

Respecto del PM, la dependencia se muestra sujeta a una relación indirecta, a menor PM una mayor accesibilidad a los grupos reactivos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$, favorecido por un menor establecimiento de puentes hidrógeno, da lugar a una mayor capacidad para desactivar EROS, pero esto ha mostrado una diferencia significativa cuando se trató de oligosacáridos, los cuales rondan valores de 5 a 10 kDa, en comparación a Ch de PM medio. ^[2,30,31]

4.2.3. Actividad anti-inflamatoria e inmunoestimulante

Nishimura y col. (1984) ^[37] fueron los primeros en demostrar el efecto inmuno-estimulante de Ch frente a infecciones *in vivo* con *Escherichia coli*, como así también una actividad supresora del crecimiento tumoral ^[38]. Ellos concluyeron que Ch con un GDA del 70 % actuaba como inmuno-regulador activando macrófagos peritoneales y células *natural killer*. La biocompatibilidad de Ch podría, en una primera instancia, estimular células inflamatorias de la inmunidad innata, como macrófagos; sin embargo, a través del receptor de manosa, los macrófagos pueden internalizar residuos de N-acetilglucosamina de Ch y desplazar la activación hacia la vía anti-inflamatoria de arginasa por un mayor metabolismo de L-arginina. ^[37,40] Porporatto y col. (2004) ^[41] demostraron que, luego de la primera activación como barrera inmediata en una co-administración del antígeno colágeno tipo II y Ch, se inducen mediadores anti-inflamatorios capaces de modular la respuesta inmune. Posteriormente, fue comprobado que Ch *per se* estimula la producción de IL-10 de manera local, en placas de *Peyer*, y sistémica, en bazo, disminuyendo la producción de IL-2 en este último órgano. ^[42] De manera dosis dependiente, la expresión de ARN_m de interleuquinas IL-10, IL-4 y factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) fue mayor en placas de *Peyer* cuando mayor fue la cantidad de Ch suministrado. Este tipo de perfil define, finalmente, inducción de tolerancia oral. ^[42,43]

4.2.4. Actividad antimicrobiana

Ch puede ejercer actividad antimicrobiana mediante cuatro aristas esenciales. ^[44] En primer término, por recubrimiento de las células a través de una capa impermeable que impide el transporte de nutrientes. Se corresponde con la característica de la viscosidad que Ch imparte a los sistemas en los que se incorpora y a través de la cual ejerce un efecto envolvente de los microorganismos en suspensión en dicho sistema ^[45,46]; segundo, por interacción electrostática con componentes de la superficie celular que alteran la fisiología normal de la célula ^[47]; estas interacciones han sido sustancialmente diferentes atendiendo al GDA y PM del Ch. Ch de PM elevado se comporta como un aislante físico de la célula bacteriana, no así el de bajo PM, que es capaz de ingresar a la misma e interferir en transportes citoplasmáticos vitales. Según sea mayor o menor su GDA, mayor o menor será su carga $-\text{NH}_3^+$, respectivamente, y según la misma su capacidad de interactuar de modo electrostático con la superficie de la célula bacteriana. Ahora bien, esta capacidad no puede desprenderse del pH del medio ya que si el mismo está por encima del pK_a de Ch, su actividad antimicrobiana estará significativamente disminuida. ^[19,47]

El tercer mecanismo de esta actividad es la quelación de nutrientes necesarios para el desarrollo celular, como Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} , cofactores enzimáticos indispensables ^[48]; y la cuarta, la unión al ADN que inhibe la síntesis de ARN_m y la consecuente traducción a proteínas vitales. Esta característica es completamente PM dependiente, porque según sea el tamaño de la cadena polisacárida ésta podrá penetrar la membrana plasmática y la nuclear, seguidamente. ^[49]

4.2.5. Otras actividades biológicas

Adicionalmente, Ch ha demostrado un efecto removedor o adsorbente de toxinas y metales pesados dañinos en intestino ^[2], como así también un potencial bifidogénico en la regulación de la microbiota intestinal. ^[7] Asimismo, Nam y col. (2001) ^[50] han comprobado la actividad antimutagénica de oligosacáridos de Ch frente a diferentes químicos.

4.2.6. Aplicaciones de quitosano (Ch) en formulaciones alimentarias

Como se ha mencionado a principio de este capítulo, Ch ofrece una amplia gama de aplicaciones únicas, en su mayoría, de gran valor agregado para la industria alimentaria, entre ellas: preservación del deterioro microbiano, formación de films biodegradables, empleo en

formulaciones funcionales como fibra alimentaria y, de modo indirecto, el empleo como material de recubrimiento de diversos componentes bioactivos y microorganismos probióticos para el diseño de aditivos funcionales y nutraceuticos. ^[1,3,19] Otra interesante aplicación de utilidad industrial, es el uso de Ch como soporte para la inmovilización de enzimas ^[51] que permite, a su vez, crear innovadores biosensores, y el entrapamiento de microorganismos para el tratamiento de aguas residuales en perlas de tamaño macroscópico. ^[32]

A) Empleo para la obtención de recubrimientos comestibles.

Ch se ha convertido en uno de los biopolímeros más estudiados de las últimas décadas por su excelente capacidad formadora de film, que no sólo permite obtener un recubrimiento biodegradable sino que también provee de una barrera antimicrobiana al material recubierto. ^[6,52,53] Para la obtención de films el ácido acético ha mostrado los resultados más desfavorables, dada la baja elongación y la dureza de las películas obtenidas. Frente a esta aplicación demostraron mejores características los recubrimientos obtenidos desde ácido cítrico, málico o láctico, aunque no puede independizarse la calidad del film del PM de Ch y del método de secado para su obtención. ^[54]

Dadas las características hidrófilas de Ch, las películas no muestran una completa impermeabilidad del material recubierto, no sólo no evitan el paso a la humedad ambiente, sino tampoco al oxígeno, lo cual depende del GDA. A valores elevados de GDA se observa mayor permeabilidad al vapor de agua, aunque también, mayor elongación. ^[55] Es por esto, que se combina a Ch con diferentes compuestos bioactivos para la obtención de recubrimientos funcionales mejorados respecto de las propiedades originales del biopolímero. ^[6]

B) Aplicación en la microencapsulación y distribución de compuestos bioactivos/nutrientes.

Por todas las propiedades discutidas con anterioridad, Ch se convierte en un apropiado material de pared para la obtención de micro y nanoesferas de liberación controlada capaces de sortear condiciones gástricas y, por las características propias del material encapsulante, en las cuales se potencien las características del material bioactivo encapsulado. ^[19] Esta aplicación se vuelve extensiva a microorganismos probióticos, dada la protección que ofrece frente a condiciones gástricas, permitiendo el arribo del material de carga en intestino. ^[56]

4.3. Referencias

1. Pillai, C. K. S.; Paul, W. & Sharma, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog. Polym. Sci.* **34**, 641–678 (2009).
2. Xia, W.; Liu, P.; Zhang, J. & Chen, J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocoll.* **25**, 170–179 (2011).
3. Aranaz, I.; Mengibar, M.; Harris, R.; Paños, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G. & Heras, A. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr. Chem. Biol.* **3**, 203–230 (2009).
4. Ravi Kumar, M. N.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H. & Domb, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.* **104**, 6017–6084 (2004).
5. Ravi Kumar, M. N. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **46**, 1–27 (2000).
6. Luo, Y. & Wang, Q. Recent advances of chitosan and its derivatives for novel applications in food science beverages. *J. Food Process. Beverages* **1**, 1–13 (2013).
7. Lee, H. W.; Park, Y. S.; Jung, J. S. & Shin, W. S. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus sp.* *Anaerobe* **8**, 319–324 (2002).
8. Muzzarelli, R. A. A. Chitin and its derivatives: new trends of applied research. *Carbohydr. Polym.* **3**, 53–75 (1983).
9. Mourya, V. K. & Inamdar, N. N. Chitosan-modifications and applications: opportunities galore. *React. Funct. Polym.* **68**, 1013–1051 (2008).
10. Acosta, N.; Jitinez, C.; Boraut, V. & Heras, A. Extraction and characterization from crustaceans of chitin. *Biomass and Bioenergy* **5**, 145–153 (1993).
11. Kafetzopoulos, D.; Martinou, A. & Bouriotis, V. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 2564–2568 (1993).
12. Galed, G.; Miralles, B.; Paños, I.; Santiago, A. & Heras, A. N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: influence of the source of chitin. *Carbohydr. Polym.* **62**, 316–320 (2005).
13. Chang, K. L. B.; Tsai, G.; Lee, J. & Fu, W. R. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydr. Res.* **303**, 327–332 (1997).
14. Il'ina, A. V.; Kulikov, S. N.; Chalenko, G. I.; Gerasimova, N. G. & Varlamov, V. P. Obtaining and study of monosaccharide derivatives of low-molecular-weight chitosan. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **44**, 606–614 (2008).
15. Rinaudo, M.; Pavlov, G. & Desbrières, J. Influence of acetic acid concentration on the

- solubilization of chitosan. *Polymer*. **40**, 7029–7032 (1999).
16. Rinaudo, M.; Pavlov, G. & Desbrières, J. Solubilization of chitosan in strong acid medium. *Inr. J. Polym. Anal. Character.* **5**, 37–41 (2011).
 17. Wang, Q. Z.; Chen, X. G.; Liu N.; Wang, S. X.; Liu, C. S.; Meng, X. H. & Liu, C. G. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydr. Polym.* **65**, 194–201 (2006).
 18. Koide, S. S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. *Nutr. Res.* **18**, 1091–1101 (1998).
 19. Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M. & Chiellini, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **36**, 981–1014 (2011).
 20. Schipper, N. G. M.; Vårum, K. M. & Artursson, P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharmaceutical Research* **13**, 1686–1692 (1996).
 21. Schipper, N. G.; Olsson, S.; Hoogstraate, J.; DeBoer, G.; Varum, K. M. & Artursson, P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharmaceutical research* **14**, 923–9 (1997).
 22. Schipper, N. G. M.; Vårum, K. M.; Stenberg, P.; Ocklind, G.; Lennernäs, H. & Artursson, P. Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *Eur. J. Pharm. Sci.* **8**, 335–343 (1999).
 23. Shimoda, J.; Onishi, H. & Machida, Y. Bioadhesive characteristics of chitosan microspheres to the mucosa of rat small intestine. **27**, 567–576 (2001).
 24. Dhawan, S.; Singla, A. K. & Sinha, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS PharmSciTech* **5**, e67 (2004).
 25. Lehr, C. M.; Bouwstra, J. A.; Schacht, E. H. & Junginger, H. E. *In vitro* evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int. J. Pharm.* **78**, 43–48 (1992).
 26. Je, J. Y. & Kim, S. K. Reactive oxygen species scavenging activity of aminoderivatized chitosan with different degree of deacetylation. *Bioorganic Med. Chem.* **14**, 5989–5994 (2006).
 27. Ying, G. Q.; Xiong, W. Y.; Wang, H.; Sun, Y. & Liu, H. Z. Preparation, water solubility and antioxidant activity of branched-chain chitosan derivatives. *Carbohydr. Polym.* **83**, 1787–1796 (2011).
 28. Ai, H.; Wang, F.; Xia, Y.; Chen, X. & Lei, C. Antioxidant, antifungal and antiviral activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica* L. *Food Chem.* **132**, 493–498 (2012).
 29. Yen, M. T.; Yang, J. H. & Mau, J. L. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydr. Polym.* **74**, 840–844 (2008).

30. Xing, R.; Liu, S.; Guo, Z.; Yu, H.; Wang, P.; Li, C.; Li, Z. & Li, P. Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities *in vitro*. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 1573–1577 (2005).
31. Feng, T.; Du, Y.; Li, J.; Wei, Y. & Yao, P. Antioxidant activity of half N-acetylated water-soluble chitosan in vitro. *Eur. Food Res. Technol.* **225**, 133–138 (2007).
32. Ferrari, G. V.; Andrada, M. E.; Natera, J.; Muñoz, V. A.; Montaña, P.; Gambetta, C.; Boiero, M. L.; Montenegro, M. A.; Massad, W. A. & García, N. A. The employment of a removable chitosan-derivatized polymeric sensitizer in the photooxidation of polyhydroxylated water-pollutants. *Photochem. Photobiol.* **90**, 1251–1256 (2014).
33. Xie, W.; Xu, P. & Liu, Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **11**, 1699–1701 (2001).
34. Park, P. J.; Je, J. Y. & Kim, S. K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydr. Polym.* **55**, 17–22 (2004).
35. Tanaka, M.; Huang, J. R.; Chiu, W. K.; Ishizaki, S.; Taguchi, T. Effect of the Maillard reaction on functional properties of chitosan *Nippon Suisan Gakkaishi.* **59**, 1915–1921 (1993).
36. Kosaraju, S. L.; Weerakkody, R. & Augustin, M. A. Chitosan-glucose conjugates: influence of extent of Maillard reaction on antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 12449–12455 (2010).
37. Nishimura, K.; Nishimura, S.; Nishi, N.; Saiki, I.; Tokura, S. & Azuma, I. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine* **2**, 93–99 (1984).
38. Suzuki, K.; Mikami, T.; Okawa, Y.; Tokoro, A.; Suzuki, S & Suzuki, M. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.* **151**, 403–408 (1986).
39. Muzzarelli, R. A. A. Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients. *Carbohydr. Polym.* **20**, 7–16 (1993).
40. Porporatto, C.; Bianco, I. D.; Riera, C. M. & Correa, S. G. Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 266–272 (2003).
41. Porporatto, C.; Bianco, I. D.; Cabanillas, A. M. & Correa, S. G. Early events associated to the oral co-administration of type II collagen and chitosan: Induction of anti-inflammatory cytokines. *Int. Immunol.* **16**, 433–441 (2004).
42. Porporatto, C.; Bianco, I. D. & Correa, S. G. Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 62–69 (2005).
43. Mowat, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 331–341 (2003).
44. Taylor, M. Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality. Gran Bretaña: Elsevier

- Ltd. (2015).
45. Choi, B. K.; Kim, K. Y.; Yoo, Y. J.; Oh, S. J.; Choi, H. & Kim, C. Y. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **18**, 553–557 (2001).
 46. Eaton, P.; Fernandes, J. C., Pereira, E., Pintado, M. E. & Xavier Malcata, F. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy* **108**, 1128–1134 (2008).
 47. Zheng, L. Y. & Zhu, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydr. Polym.* **54**, 527–530 (2003).
 48. Kong, M.; Chen, X. G.; Liu, C. S.; Liu, C. G.; Meng, X. H. & Yu, L.. J. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids Surf., B* **65**, 197–202 (2008).
 49. Sudarshan, N. R.; Hoover, D. G. & Knorr, D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.* **6**, 257–272 (1992).
 50. Nam, K. S.; Choi, Y. R. & Shon, Y. H. Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide: Rec, Ames and Umu tests. *Biotechnol. Lett.* **23**, 971–975 (2001).
 51. Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 126–139 (2004).
 52. Ojagh, S. M.; Rezaei, M.; Razavi, S. H. & Hosseini, S. M. H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chem.* **122**, 161–166 (2010).
 53. Torres, E.; Marín, V.; Aburto, J.; Beltrán, H. I.; Shirai, K.; Villanueva, S. & Sandoval, G. Enzymatic modification of chitosan with quercetin and its application as antioxidant edible films. *Appl. Biochem. Microbiol.* **48**, 151–158 (2012).
 54. Park, S. Y.; Marsh, K. S. & Rhim, J. W. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *J. Food Sci.* **67**, 194–197 (2002).
 55. Motta de Moura, C.; Motta de Moura, J., Soares, N. M. & De Almeida Pinto, L. A. Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: used to produce biofilm. *Chem. Eng. Process* **50**, 351–355 (2011).
 56. Chávarri, M.; Marañón, I.; Ares, R.; Ibáñez, F. C.; Marzo, F. & Villarán, C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **142**, 185–189 (2010).

CAPÍTULO 5 – ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

5.1. Anatomía y fisiología de intestino

El intestino es un órgano complejo expuesto a numerosos microorganismos (comensales y patógenos) y antígenos (perjudiciales e inocuos) que estimulan una intensa actividad inmunológica, la cual es regulada por sofisticados mecanismos locales. El intestino delgado comienza en el píloro y termina en la válvula ileocecal, que constituye la entrada al intestino grueso, se divide en tres segmentos principales: duodeno, yeyuno e íleon. El intestino grueso comienza en el ciego, continúa en el colon ascendente o proximal, luego colon descendente o distal, recto y, finalmente, el ano. El intestino delgado tiene una longitud promedio de 6 a 7 m y se caracteriza por sus proyecciones conocidas como vellosidades, que se extienden en el lumen aumentando la superficie expuesta a los procesos de digestión, mientras que el colon mide 1,5 m, carece de vellosidades y su superficie es plana.^[1]

La mayoría de los procesos inmunológicos tienen lugar en la mucosa, la cual comprende el epitelio, la lámina propia subyacente y la muscular de la mucosa, que es una delgada lámina de músculo liso ubicada por debajo de la lámina propia (**Figura 5.1.**).

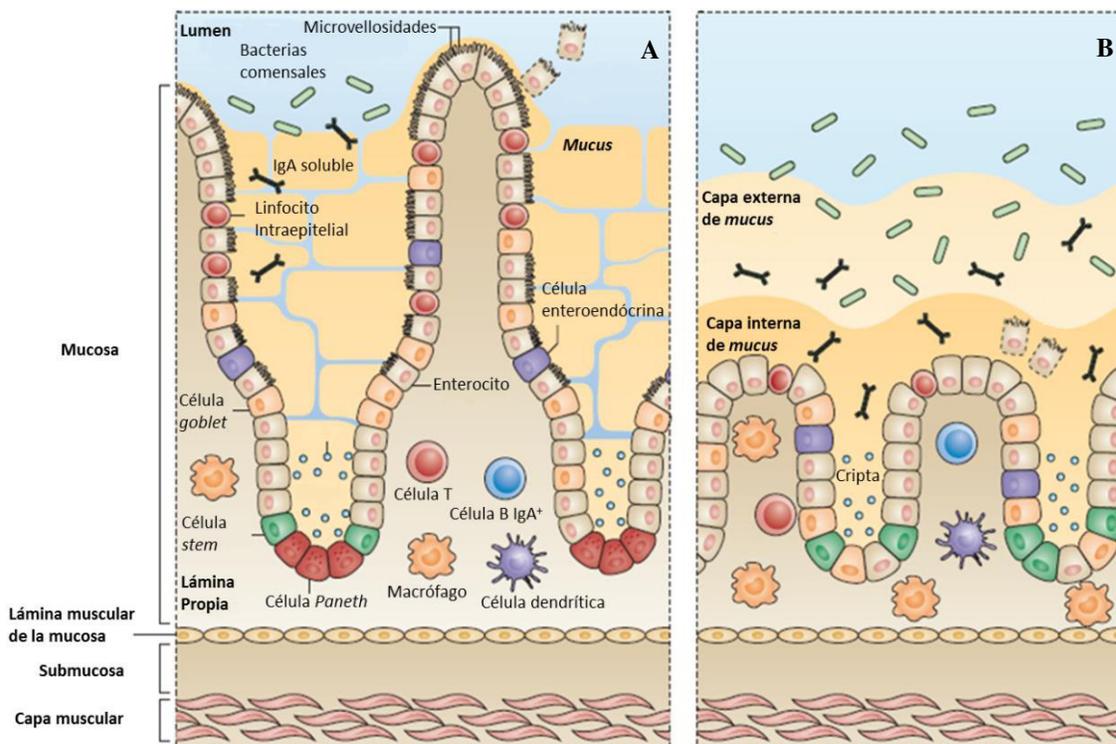


Figura 5.1.: Anatomía de la mucosa intestinal y su sistema inmune.
(A) Intestino delgado. (B) Colon.
Adaptado de Mowat y Agace. (2014).

La lámina propia consiste de tejido conectivo empaquetado de manera holgada de modo tal que pueda dar forma y estructura a las vellosidades. A estas proyecciones llega el flujo sanguíneo, el drenaje linfático y el soporte nervioso de la mucosa y contiene también las principales células de la inmunidad innata y adaptativa.^[2]

Las estructuras organizadas (placas de *Peyer* en intestino delgado, placas de colon y folículos linfoides)^[1] son lugares de inducción de la respuesta inmune, mientras que la lámina propia y el compartimiento epitelial contienen células maduras y efectoras. Las estructuras organizadas están cubiertas por epitelio especializado que contiene las llamadas células M, denominadas así por su morfología característica, que transportan microorganismos o estructuras antigénicas desde la luz hasta el tejido linfoide subyacente. Los antígenos procesados se presentan a linfocitos T en estado “naive”, y se activa la expansión de los clones más afines al antígeno. La expansión clonal de células T pueden dar lugar a linfocitos “helper” (células Th) de distinto fenotipo: Th1, Th2 o T reguladores (Th3 o Tr1). Las células T reguladoras desempeñan un papel central en la inmunotolerancia porque a través del contacto célula a célula y la producción de citoquinas reguladoras de carácter anti-inflamatorio, regulan la actividad de células efectoras estimuladas por antígenos del lumen.^[3] Los linfocitos T *helper* participan también en la activación clonal de células B antígeno-específicas para su diferenciación en plasmocitos que segregarán anticuerpos específicos (predominantemente de tipo inmunoglobulina IgA). Las células B y T estimuladas migran a los ganglios mesentéricos donde completan su expansión y diferenciación y desde allí, a través de la linfa, alcanzan la circulación sanguínea y se distribuyen por el organismo para terminar alojándose en áreas efectoras, como la lámina propia y el epitelio intestinal.

Este contexto de tolerancia permite la exposición continua a una carga antigénica abrumadora, sin que por ello se desencadenen reacciones inflamatorias que lesionarían al tejido intestinal.^[4]

Las diferentes regiones del intestino tienen distintas funciones fisiológicas. La superficie de las células epiteliales de absorción, en el intestino delgado, está cubierta por una capa de microvellosidades (borde “tipo cepillo”), embebidas de enzimas y moléculas transportadoras de nutrientes que se necesitan para digerir los componentes de la dieta. La función principal de la superficie del epitelio de colon por su parte, es reabsorber el agua de las heces y actuar como una barrera para la microbiota comensal.

En el trayecto descendente del intestino delgado, las vellosidades se vuelven progresivamente más cortas y anchas (menor número), lo cual se asocia con tasas más bajas de digestión y absorción (íleon). A su vez, las células de *Paneth* (células epiteliales especializadas ubicadas en las criptas de *Lieberkühn*, fuente de péptidos anti-microbianos que preservan la esterilidad de la cripta y protegen el nicho de células *stem*) y los IEL se vuelven menos frecuentes.

El ciego es un gran depósito para las bacterias comensales que están implicadas en la digestión fermentativa de los hidratos de carbono complejos que no pueden ser tratados por las enzimas intestinales, no tiene vellosidades y la mucosa se compone principalmente de criptas con sólo regiones cortas de epitelio de superficie plana. Las células caliciformes (células *goblet*) comienzan a ser numerosas y en colon representan aproximadamente el 25 % de la totalidad de células, mientras que en el intestino delgado son sólo el 10 %.^[1]

Este gran número de células caliciformes produce una capa extensa y gruesa de *mucus* protector. El *mucus* o glicocálix, material polimérico extracelular, está compuesto por proteínas y carbohidratos. Se compone en colon de dos capas distintas: una interna, densa y fuertemente unida a la superficie epitelial, y una externa, más laxa y similar a la presente en intestino delgado. En el colon, las bacterias se pueden encontrar en la capa de *mucus* exterior, pero normalmente no penetran en la capa interna. La producción de *mucus* es controlada por mediadores inmunes incluyendo leucotrienos, IFN- γ e IL-9 e IL-13.

El glicocálix tiene funciones antimicrobianas. Este gel altamente cargado actúa como una barrera física y está compuesto de glicoproteínas (mucina) que son tóxicas para muchas bacterias. Su menor densidad en intestino delgado también proporciona una matriz a la que los anticuerpos y los péptidos antimicrobianos pueden adherirse. Como se ha observado en animales de experimentación los defectos en la síntesis de *mucus* llevan a que microorganismos comensales penetren la barrera epitelial^[5] y generen mayor susceptibilidad a la colitis y, posteriormente, al cáncer de colon^[6,7].

5.2. Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

Actualmente, el concepto de EII engloba tres entidades: la enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa (CU) y la colitis indeterminada (CI). La cronicidad en el curso clínico de la EII consiste en alternar períodos de inactividad o quiescencia, que se identifican con las fases de remisión, con períodos de actividad clínica de diferente intensidad que se denominan brotes o recidivas. La teoría etiopatogénica más aceptada es que en sujetos susceptibles genéticamente, la desregulación de la respuesta inmune del huésped frente a la flora bacteriana residente y a otros antígenos intraluminales, juega un papel clave en la patogenia del daño tisular.^[8]

La EC, la CU y la CI son tres entidades que, a pesar de ser diferentes entre sí, tienen características comunes que en muchas ocasiones hacen muy difícil su diferenciación. Para realizar el diagnóstico entre EC y CU es necesario apoyarse en las características clínicas, endoscópicas, radiológicas, histológicas, serológicas y en la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo.

La EC es un tipo de EII crónica que puede afectar a cualquier zona del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano. Las áreas que presentan la enfermedad con mayor frecuencia son el íleon terminal y el ciego. La EC no afecta el recto, aspecto diferenciador con la CU, en la que es característica la inflamación de la mucosa del recto. La EC presenta, habitualmente, una inflamación segmentaria, lo que significa que existen áreas del intestino preservadas, de longitud variable. Es una enfermedad transmural por lo tanto, la inflamación afecta a todo el espesor de la pared intestinal, desde la mucosa hasta la vertiente de la serosa que recubre el intestino; su característica histológica clave es el hallazgo de granulomas en el estudio microscópico (**Figura 5.2.A**). Un granuloma se define como un conjunto de células epitelioides (macrófagos que adoptan el aspecto de células grandes, como epiteliales, con citoplasma pálido y abundante y núcleos grandes y ovalados), macrófagos y linfocitos, habitualmente células T.^[9]

La CU es un tipo de EII crónica que afecta de forma difusa a la mucosa del colon. La inflamación, habitualmente, comienza en el recto y se extiende de forma proximal en continuidad hacia el ciego, deteniéndose de manera abrupta en la válvula ileocecal. La afectación intestinal es continua, a diferencia de la EC. Dado que se limita a la mucosa del colon, es excepcional la aparición de engrosamientos transmurales como ocurre en la EC. La característica histológica de la CU es que el proceso inflamatorio se limita a la mucosa. La lámina propia se encuentra

congestiva, edematosa y con mayor número de células. Existe un aumento de infiltrado inflamatorio que se extiende tanto lateral como verticalmente, en la mucosa del colon (**Figura 5.2.B**). Otra característica que ayuda al diagnóstico y que indica la presencia de enfermedad activa es la aparición de neutrófilos en la pared de las criptas (criptitis), en su interior (abscesos de las criptas) o asociados al daño epitelial (destrucción de las criptas). Pero los daños que ayudan a diagnosticar la CU son aquellos que indican la cronicidad de la enfermedad como la deformación arquitectónica y la atrofia de las criptas, aumento de la separación entre ellas con disminución de su número y la presencia de agregados linfoides e infiltrado inflamatorio crónico, asociado a la disminución de *mucus*.^[9]

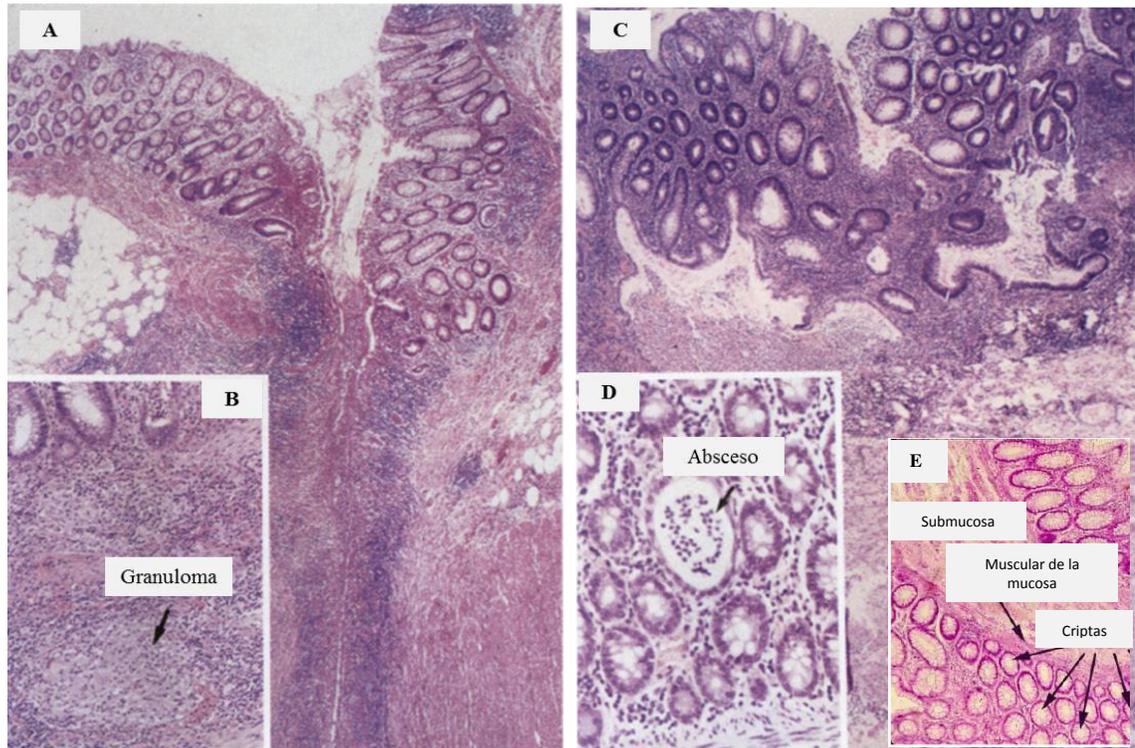


Figura 5.2.: Características histológicas de enfermedad de *Crohn* (EC) y colitis ulcerosa (CU).

Tinción hematoxilina-eosina (H&E) de colon. Adaptado de *Podolsky*. (1991).

(A) Corte transversal (100x) EC. (B) Corte transversal (250x) EC.

(C) Corte transversal (100x) CU. (D) Corte transversal (250x) CU.

(E) Corte transversal (100x) colon sano.

La CI es una EII crónica que presenta características de la EC y la CU, de confuso diagnóstico, afecta exclusivamente al colon y se la diagnostica luego de excluir la colitis infecciosa u otras causas de colitis.^[8]

5.2.1. Factores de riesgo interno

En la luz intestinal existe un ecosistema en el que coexisten bacterias comensales, nutrientes y elementos asociados a los mismos (contaminantes). Existe una compleja complementariedad entre ambos y las células eucariotas del intestino.^[10]

En el momento de nacer, el tracto gastrointestinal del ser humano se considera estéril. Tras el contacto con el medio ambiente, el intestino es colonizado y la microbiota existente, característica de cada individuo, va a permanecer relativamente constante a lo largo de la vida. Las bacterias intestinales se encuentran en una proporción de 10^{14} colonias por mm^3 de contenido intestinal.^[8]

El huésped se beneficia de la capacidad de la flora intestinal para sintetizar vitaminas (K y ácido fólico) y reciclar alimentos no absorbidos, sintetizando, entre otros sustratos, ácidos grasos de cadena corta. Los microorganismos aportan al organismo energía que de otra manera se perdería en las heces y, además, ejercen efectos tróficos o anti-inflamatorios sobre la mucosa intestinal. Finalmente, la flora comensal, controla el crecimiento excesivo de gérmenes patógenos, mantiene la integridad de la barrera intestinal, así como su homeostasis inmunológica.^[11]

El huésped desarrolla mecanismos de reconocimiento que se activan específicamente mediante moléculas propias y únicas de bacterias, hongos y virus, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) como lipopolisacárido, peptidoglicanos, muramil-dipéptido, flagelinas, etc. Dos de estos receptores, los receptores tipo *toll* (TLR), en la membrana celular, y los dominios de oligomerización nuclear (NOD), intracelulares, son necesarios para iniciar la respuesta inmune innata. Los TLR, a su vez, actúan como conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa. A pesar de que la activación de estos receptores conduce a la liberación de citoquinas, estos ligandos PAMP no sólo son bien tolerados por el sistema inmune intestinal, sino que son esenciales para adaptarlo a bacterias simbióticas y mantener la homeostasis inmunológica (tolerancia).^[10]

En este contexto, las bacterias intestinales son elementos esenciales para que se inicien y perpetúen las EII. Como se mencionó, en individuos genéticamente predispuestos, el sistema inmune adaptativo reaccionaría exageradamente frente a las bacterias comensales del intestino.

^[12] Las bases de esta hipótesis son:

- 1) La mayor intensidad de inflamación aparece en zonas con la mayor densidad bacteriana (intestino delgado distal y colon).
- 2) Los antibióticos de amplio espectro aminoran la inflamación intestinal, especialmente en el intestino delgado distal. ^[13,14]
- 3) Los ratones *knock-out* para la citoquina IL-10 (mediador anti-inflamatorio), cuando se mantienen en condiciones libres de gérmenes, no desarrollan inflamación en el intestino. ^[15]

En los pacientes con EII se ha observado la existencia de disbiosis (desequilibrio de la flora intestinal). Así, la presencia de *Bacteroides spp.*, *Escherichia coli* y *Enterobacterium spp.*, en lugar de lactobacilos y bifidobacterias, es mayor en pacientes con EC que en controles sanos. ^[16] La mayoría de los hallazgos bacteriológicos que relacionan la disbiosis, o un exceso de bacterias adheridas a la mucosa intestinal con la EII, han sido en el colon. El colon es un enorme biorreactor en donde las bacterias comensales juegan un papel fundamental en su función y trofismo, mientras que el tracto digestivo alto tiene mecanismos dedicados a seleccionar (HCl, bilis) y eliminar (motilidad) los antígenos existentes.

Las diferencias entre el intestino delgado y el colon en relación al ecosistema intestinal y los mecanismos por los que se produce inflamación pueden ser distintos. El intestino delgado es un órgano que en su luz contiene un menor número de bacterias, mientras el colon necesita de las bacterias para su normal fisiología y para mantenerse libre de inflamación.

Entre la microbiota del colon y los restos de alimentos no absorbidos (alrededor del 20 % de los ingeridos en condiciones normales) existe una importante actividad metabólica con producción de sustratos que no son aportados en la alimentación y que ejercen un papel fisiológico crucial. Entre otros, la fermentación de los carbohidratos no absorbidos produce, además de gas (CO₂ y H₂), ácidos grasos de cadena corta (acético, butírico y propiónico) y ácido láctico. Estos ejercen numerosas actividades metabólicas tales como la detoxificación de xenobióticos, acetilación de histonas, estimulación de la síntesis de *mucus* y la absorción de sodio. Sin embargo, en lo que concierne a la enfermedad inflamatoria en colon, la síntesis de ácidos grasos de cadena corta contribuye a disminuir el pH intraluminal para la selección de microorganismos benéficos y, al mismo tiempo, impide la activación del factor nuclear NF-κB lo que disminuye la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α e interleuquinas como IL-6 e IL-1β. ^[17,18]

El intestino humano alberga una comunidad diversa de bacterias comensales en una relación de simbiosis con el anfitrión, de modo que influye permanentemente en su fisiología. Hay evidencia clara de que las interacciones bacteria-anfitrión en la mucosa del intestino desempeñan un papel muy importante en el desarrollo y regulación del sistema inmune. Si esta interacción no es adecuada, la homeostasis entre la carga antigénica ambiental y la respuesta del individuo puede fallar. Ello repercute en el desarrollo de patologías de desregulación inmunitaria frente a estructuras antigénicas propias (autoinmunidad), incluyendo la propia microbiota (EII), o estructuras antigénicas del ambiente (atopia).^[16,19]

Tanto en la EC como en la CU, las bacterias comensales del tracto entérico constituyen la diana a la que se enfrenta el sistema inmune y, por lo tanto, el estímulo que desencadena y perpetúa los fenómenos inflamatorios que destruyen la mucosa. Muchos datos sugieren que la población bacteriana de estos pacientes tiene rasgos anómalos en cuanto a su composición (grupos bacterianos poco habituales, baja diversidad y alta inestabilidad).^[10,16,19]

5.2.2. Estrés oxidativo en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

La activación inmune de neutrófilos y monocitos resulta en lo que se conoce como “estallido respiratorio”.^[20] El estallido respiratorio o explosión respiratoria se caracteriza por un aumento violento en la demanda de oxígeno y en el consumo de energía a nivel celular, de allí su nombre. Es un mecanismo frecuentemente utilizado para producir compuestos con capacidad microbicida, tales como el anión hipoclorito (ClO^-), que es entre 100 a 1000 veces más tóxico que el O_2^- o el H_2O_2 .^[21]

Krieglstein y col. (2011)^[22] comprobaron, en modelos murinos, que el estrés oxidativo relacionado a la inflamación intestinal, no está relacionado a la actividad de NADPH-oxidasa, sugiriendo que otras fuentes alternativas^[21] (xantina oxidasa, lipoxigenasa, NADPH citocromo p450 reductasa, prostaglandina sintetasa, etc.) generarían el estado de estrés en estas patologías.

El estrés oxidativo y el daño celular asociado al mismo, son marcadores claves de la patogénesis de la EII. Las barreras antioxidantes fisiológicas muestran una deficiencia en cuanto a la proporción de especies reactivas generadas, que pueden modificar covalentemente el ADN y llevar la enfermedad a instancias carcinogénicas.^[23]

5.2.3. Tratamientos frecuentes

Generalmente, las EC y la CU se tratan con mesalazina (fármaco de la familia de los salicilatos que presenta propiedades anti-inflamatorias características), corticosteroides y anticuerpos específicos para TNF- α . Ningún tratamiento logra modular completamente estas patologías a lo largo de la vida y las recidivas son instancias complejas de difícil recuperación. [24]

5.3. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

Existen pocos reportes de prevalencia de las EII en Latinoamérica; específicamente trabajos hechos en Brasil, Puerto Rico, Panamá y Argentina reportan incidencia (frecuencia de aparición de nuevos casos en un período de tiempo determinado) de entre 1,2 a 4 cada 100.000 habitantes y prevalencias (números de casos en un tiempo de estudio determinado) de 20 a 100 cada 100.000 habitantes. Clásicamente la incidencia de las EII muestra un gradiente Norte-Sur. La prevalencia de EII (sumadas CU y EC) en Norteamérica (USA y Canadá), oscila entre 320 a 511 por 100.000 habitantes. En cifras absolutas se estima que entre 1,1 y 1,7 millones de personas presentan EII sumando estos países. [25]

La realización de estudios epidemiológicos de las EII presenta serias dificultades debido a diversos factores en su historia natural como su comienzo insidioso, que retrasa su diagnóstico incluso meses, así como la existencia de cierto número de casos en los que es difícil determinar el diagnóstico diferencial entre CU y EC. Al no existir criterios diagnósticos universalmente aceptados, el estudio comparativo de los diferentes estudios epidemiológicos en las distintas áreas geográficas es complejo y responsable, al menos en parte, de la variabilidad de datos disponibles hasta el momento. Por otro lado, existe la complicación añadida de ser una enfermedad relativamente poco frecuente que requiere de un gran esfuerzo para recoger el suficiente número de casos en orden a extrapolar conclusiones sobre su etiología, historia natural y eficacia en los distintos tipos de tratamientos a utilizar. [26]

La incidencia, y consecuentemente la prevalencia de las EII, así como otras enfermedades de origen autoinmune y alérgicas, han aumentado en las últimas décadas asociadas a un descenso de otras muchas enfermedades de origen infeccioso. Muy probablemente las EII sean enfermedades

poligénicas que estarían mediadas por diferentes factores de riesgo ambientales que alterarían la respuesta inmune, originando los diferentes fenotipos que se conocen de ambas enfermedades.

Mucho falta todavía por explicar en la etiopatogenia natural de estas enfermedades y para conocerla es prioritaria la realización de estudios epidemiológicos poblacionales, con inclusión del mayor número posible de pacientes.

Los estudios en países en transición entre el subdesarrollo y el desarrollo económico, con áreas muy diversas en su interior, serían sin duda de un enorme interés para obtener nueva información. Las especiales características de algunos países latinoamericanos indican que la realización de estudios epidemiológicos prospectivos, bien diseñados, podría ser un punto crítico de control en los estudios de incidencia y prevalencia de estas patologías, dado que las cifras estarían sujetas a variaciones aleatorias, poco representativas estadísticamente, del análisis.

5.4. Referencias

1. Mowat, A. M. & Agace, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* (2014). doi:10.1038/nri3738
2. Ramiro-Puig, E.; Pérez-Cano, F. J.; Castellote, C.; Franch, A. & Castell, M. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Rev. Española Enfermedades Dig.* 100, 29–34 (2008).
3. Guarner, F.; Bourdet-Sicard, R.; Brandtzaeg, P.; Gill, H. S.; McGuirk, P.; van Eden, W.; Versalovic, J.; Weinstock, J. V. & Rook, G. A. W. Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 3, 275–284 (2006).
4. Mowat, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 331–341 (2003).
5. Hansson, G. C. & Johansson, M. E. V. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* 1, 51–54 (2010).
6. Velcich, A. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science.* 295, 1726–1729 (2002).
7. Van der Sluis, M.; De Koning, B. A. E.; De Bruijn, A. C. J. M.; Velcich, A.; Meijerink, J. P. P.; Van Goudoever, J. B.; Büller, H. A.; Dekker, J.; Van Seuning, I.; Renes, I. B. & Einerhand, A. W. C. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that Muc2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131, 117–129 (2006).
8. Gassull, M. A.; Gomollon, F.; Hinojosa, J. & Obrador, A. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. España: Arán, S.L. (2007).
9. Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 325, 928 – 937 (1991).
10. Artis, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 411–420 (2008).
11. Hanauer, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm. Bowel Dis.* 12 Suppl 1, S3–9 (2006).
12. Bamias, G.; Nyce, M. R.; De La Rue, S. A. & Cominelli, F. Review new concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 143, 895–904 (2005).
13. Rutgeerts, P. Peeters, M.; Hiele, M.; Vantrappen, G.; Penninx, F.; Aerts, R.; Kerremans, R. & Goboos, K. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn’s disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 338, 771–774 (1991).
14. Rutgeerts, P.; Van Assche, G.; Vermeire, S.; D’Haens, G.; Baert, F.; Noman, M.; Aerden, I.; De Hertogh, G.; Geboes, K.; Hiele, M.; D’Hoore, A. & Penninckx, F. Ornidazole for prophylaxis of postoperative Crohn’s disease recurrence: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 128, 856–861 (2005).

15. Tautog, J. D. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J. Exp. Med* 180, 2359–2364 (1994).
16. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 313–323 (2009).
17. Segain, J. P.; Raingeard de la Blétière, D.; Bourreille, A.; Leray, V.; Gervois, N.; Rosales, C.; Ferrier, L.; Bonnet, C.; Blottière, H. M. & Galmiche, J. P. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF B inhibition: implications for Crohn’s disease. *Gut* 47, 397–403 (2000).
18. Ewaschuk, J. B.; Walker, J. W.; Diaz, H. & Madsen, K. L. Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs *in vitro* and *in vivo* in mice. *J. Nutr.* 136, 1483–1487 (2006).
19. Xavier, R. J. & Podolsky, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427–434 (2007).
20. Naito, Y.; Takagi, T. & Yoshikawa, T. Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 41, 18–26 (2007).
21. Pavlick, K. P.; Laroux, F. S.; Fuseler, J.; Wolf, R. E.; Gray, L.; Hoffman, J. & Grisham, M. B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 311–322 (2002).
22. Krieglstein, C. F.; Cerwinka, W. H.; Laroux, F. S.; Salter, J. W.; Russell, J. M.; Schuermann, G.; Grisham, M. B.; Ross, C. R. & Granger, D. N. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J. Exp. Med.* 194, 1207–18 (2001).
23. Seril, J.; Liao, G. Y. & Yang, C. S. Y. Oxidative stress and ulcerative colitis- associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* 24, 353–362 (2003).
24. Vargas, R. D. Epidemiology of inflammatory bowel disease: ¿why there are differences between North America and Latin America? *Rev. Colomb. Gastroenterol.* 25, 103–105 (2010).
25. Sicilia, B.; Vicente, R. & Gomollón, F. Enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa: Discusión de la epidemiología clásica. *Acta Gastroenterol. Latinoam.* 39, 135–145 (2009).
26. Bouma, G. & Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 521–533 (2003).

PARTE II - DESARROLLO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 6 – CARACTERIZACIÓN Y FUNCIONALIZACIÓN DE QUITOSANO

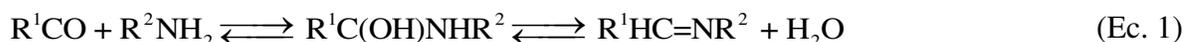
6.1. Introducción

Como fue mencionado en el **Capítulo 4**, las numerosas propiedades de Ch lo convierten en un biopolímero de amplia aceptación para ser empleado en la formulación de alimentos funcionales. Sin embargo, su limitada solubilidad a pH por encima de 6 termina por condicionar su aplicación.

^[1] En las últimas décadas, la funcionalización de Ch a través de variadas reacciones con diferentes moléculas que mejoren su solubilidad a pH neutro o fisiológico, se ha tornado una estrategia para ampliar el espectro de sus potenciales utilidades. ^[2]

La reacción de *Maillard* es un tipo de mecanismo que combina grupos amino $-\text{NH}_2$ y carbonilo $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}$, de dos moléculas diferentes, a través de una deshidratación intermolecular. Sucede comúnmente en alimentos, de modo deseado o indeseado (como consecuencia de algún tipo de deterioro). Los grupos $-\text{NH}_2$, generalmente, provienen de diversos aminoácidos de proteínas y los grupos $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}$ de azúcares reductores, ya sean aldosas o cetosas. Los cambios observables se conocen como “pardeamiento no enzimático”. Dentro de este tipo de pardeamiento se puede categorizar a la caramelización, aunque ésta es sólo producto de someter un azúcar a altas temperaturas. ^[3]

Ch con su disponibilidad de grupos $-\text{NH}_2$ puede llevar a cabo reacciones de funcionalización con diferentes azúcares a través de la reacción de *Maillard* (Ec. 1) ^[4-7]:



Donde R^1 representa un monosacárido y R^2 la cadena poli- β (1 \rightarrow 4)-glucosamina de Ch.

El producto de este primer estado intermedio (Ec. 1) de una serie compleja de reacciones, es conocido como base de *Schiff*, surge del re-arreglo de *Amadori* con la consecuente formación del enlace “imina” (doble enlace entre C y N) y tiene propiedades favorables en el color y *flavor* de alimentos. ^[3] Se conoce que estados más avanzados de este tipo de reacciones dan productos como el hidroximetilfurfural (HMF) y polímeros amarrados de nitrógeno conocidos como melanoidinas, de efectos tóxicos para quien los consume y relacionados a procesos de envejecimiento celular. ^[3,7]

La reacción de *Maillard* bajo riguroso control de pH y temperatura, permite obtener un derivado de Ch a instancias de una base de *Schiff*. A pH entre 8 y 10 y temperaturas que superen

los 150 °C, el quimismo se vuelve una reacción en cadena que termina rápidamente en los estadios indeseados de la misma. ^[8] Esto es fácilmente evidenciable a través de un seguimiento espectroscópico a 290 nm y 420 nm. La primera banda demuestra la existencia de productos intermedios de la reacción, la segunda, la polimerización de los mismos en melanoidinas coloreadas y una relación de las mismas ilustra el avance del mecanismo. ^[8,9]

Bajo condiciones controladas de reacción, funcionalizar Ch con azúcares simples mediante reacción de *Maillard*, ofrece una alternativa de buen rendimiento y fácil seguimiento en función del tiempo. Estos funcionalizados, al ser producto de la ramificación de la cadena polimérica de Ch con azúcares simples, se solubilizan a pH neutro o fisiológico. ^[5,6,10]

En la presente tesis se ha desarrollado la funcionalización de Ch nativo, de PM bajo y medio, con glucosamina como azúcar simple, a los fines de preservar el GDA de las moléculas originales mejorando su solubilidad en medios acuosos de amplio rango de valores de pH.

El detalle del presente capítulo contiene:

- Caracterización de Ch nativo de PM bajo y medio: evaluación del GDA mediante titulación potenciométrica y PM viscosimétrico y por cromatografía líquida de exclusión (SEC).
- Funcionalización de Ch nativo de PM bajo y medio: seguimiento espectroscópico de la reacción de *Maillard* con glucosamina.
- Obtención de los derivados solubles en agua en estado sólido: secado por liofilización de los productos obtenidos.
- Caracterización de ChF de PM bajo y medio: evaluación del GDA mediante titulación potenciométrica y PM por SEC. Caracterización de ambos derivados por espectroscopía en el infrarrojo (IR).
- Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de Ch nativo y sus derivados ChF: determinación de la eficiencia de desactivación de HO[•], O₂^{•-} y O₂(¹Δ_g).

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Reactivos

Los Ch nativos de PM bajo (ChL) y medio (ChM), clorhidrato de D-(+)-glucosamina, clorhidrato de nitroazul de tetrazolio (NBT), 2-Desoxi-D-ribosa, ácido tricloroacético (TCA), clorhidrato de hidroxilamina, alcohol frufurílico (FFA), cloruro de tris (bipiridina) rutenio (II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$), bromuro de potasio (KBr) y cloruro de hidrógeno deuterado (DCl), fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (MO). Los ácidos tiobarbitúrico (TBA) y etilendiaminotetraacético (EDTA), fueron provistos por Merck (Alemania). El cloruro férrico (FeCl_3), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), ácido ascórbico, ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de sodio (NaCl) y acetato de sodio (CH_3COONa), todos ellos de grado analítico, se obtuvieron de Cicarelli (Argentina). Ácido acético glacial (CH_3COOH) de Anedra (Argentina). Estándares de Pululanos (P-82, Shodex) provinieron de Showa Denko (Japón).

Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura.

6.2.2. Métodos

6.2.2.1. Obtención de quitosano funcionalizado (ChF) mediante reacción de Maillard

Este procedimiento fue ajustado conforme a Chung y col. (2005) ^[5]. A una solución al 1 % (p/v) de Ch nativo en CH_3COOH 0,25 M, se le añadió clorhidrato de D-(+)-glucosamina al 1 % (p/v), manteniendo la mezcla en un *orbital shaker*, en estufa (DALVO, Instrumentos OJALVO S.A.) a 65 °C durante 48 h. El avance de la reacción fue monitoreado espectrofotométricamente (Espectrofotómetro de arreglo de diodos Specord S600, Analytik Jena, Alemania). Una vez terminado el período de incubación, la muestra fue centrifugada (Centrífuga SORVALL ST 16R, ThermoSCIENTIFIC, USA.) a 5.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue dializado durante 96 h contra agua destilada a través de una membrana de diálisis con un corte de PM de 12.000 – 14.000 Da (Sigma-Aldrich) y luego secado por liofilización (Liofilizador L-T8, RIFICOR, Argentina), partiendo del producto previamente congelado a -40 °C.

6.2.2.2. Caracterización de los derivados de quitosano (ChF) por espectrometría de absorción en el Infrarrojo

Las muestras de Ch nativo y ChF fueron comparadas por espectroscopía infrarroja de transformada de *Fourier* (FT-IR) en el IR medio (4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1}) en un espectrómetro Nexus (modelo Nicolet, USA) mediante un detector MCT (telurio-cadmio-mercurio), con un promedio de 20 espectros y resolución de 2 cm^{-1} . La muestra fue triturada en una relación 1:100 con bromuro de potasio (1 mg de muestra:100 mg bromuro de potasio) y comprimida en discos.

El GDA fue también calculado a partir de los espectros en el IR tomando como banda característica a la localizada a 1380 cm^{-1} (amida III) y, como referencia (normalización por las imperfecciones propias de la pastilla), la banda a 1420 cm^{-1} , obteniendo una correlación lineal que viene expresada por la Ec. 2; donde 31,92 y 12,20 son constantes empíricas obtenidas a partir de la correlación de los valores experimentales reales del grado de acetilación y la relación de las respectivas bandas A_{1380}/A_{1420} .^[11,12]

$$\text{GDA (\%)} = 100 - \left[31,92 \times \frac{A_{1,380}}{A_{1,420}} - 12,20 \right] \quad (\text{Ec. 2})$$

6.2.2.3. Determinación del grado de desacetilación (GDA) por titulación potenciométrica

El protocolo fue llevado a cabo según Balázs y col. (2007)^[13], con ligeras modificaciones. 0,10 g de Ch o ChF se disolvieron en 100 mL de HCl 0,01 N, se añadió NaCl para ajustar la fuerza iónica de la solución a 0,1 y se agitó durante 5 h hasta lograr la solubilización total del polímero. Una alícuota de 20 mL fue titulada potenciométricamente (pHmetro HI 2211, HANNA, USA) con NaOH 0,1 N previamente valorado. La curva de dicha titulación presenta dos puntos de inflexión; el primero, corresponde a la neutralización del exceso de HCl y el segundo, a la de Ch o ChF protonado. La diferencia de ambos da el valor neto de NaOH requerido para neutralizar el número de grupos amino. Las ecuaciones Ec. 3 a Ec. 5 son las necesarias para el cálculo del GDA.

$$\text{GDA (\%)} = \frac{x}{(x + y)} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

$$x = \text{mol} (-\text{NH}_2) / g_{\text{muestra}} = \Delta V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} / g_{\text{muestra}} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$y = \text{mol} (-\text{NHCOCH}_3) / g_{\text{muestra}} = ((1-x) \times 161) / 204 \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

g_{muestra} son los g de Ch o ChF de bajo o medio PM; C_{NaOH} la concentración de NaOH y 161 y 204, los PM de glucosamina y acetilglucosamina, respectivamente.

6.2.2.4. Determinación del peso molecular (PM) viscosimétrico y por cromatografía líquida de exclusión (SEC)

Se realizaron diluciones seriadas de Ch desde 0,5 % (p/v) hasta 0,0625 % (p/v) utilizando como disolvente solución amortiguadora $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 0,25 M. Se empleó un viscosímetro tipo *Ubbelohde*, con un diámetro de capilar de 1,5 mm, para medir el tiempo de caída del solvente puro (t_0) y de las soluciones seriadas (t) entre los dos aforos del instrumento. El ensayo se realizó a una temperatura constante de 25 °C. ^[14-16] Los valores obtenidos se relacionan con la viscosidad por medio de coeficientes de viscosidad específica (η_{sp}) y viscosidad reducida (η_{red}), definidas por las expresiones Ec. 6 y Ec. 7, respectivamente.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \approx \frac{t - t_0}{t_0} \quad (\text{Ec. 6})$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (\text{Ec. 7})$$

Para calcular la viscosidad intrínseca se representa gráficamente la viscosidad reducida frente a la concentración del polímero disuelto (C) y se realiza la regresión lineal correspondiente. La viscosidad intrínseca $[\eta]$ es el valor de la ordenada al origen de dicha recta. Una vez calculada la $[\eta]$, se puede determinar el peso molecular viscosimétrico (M_v) de un polímero a partir de la ecuación de *Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada* (MHKS) (Ec. 8).

$$[\eta] = K \times M_v^a \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde K y a son constantes empíricas válidas sólo para un sistema establecido de solvente-polímero, las cuales dependen de la naturaleza del polímero, del sistema de disolvente utilizado y de la temperatura. Para este trabajo se utilizó $a = 0,59$ y $K = 0,119$.^[15]

Las masas molares promedio de ChL, ChM y sus derivados ChFL y ChFM, respectivamente, se evaluaron por SEC^[17] (Cromatógrafo Waters, USA) mediante un detector de índice de refracción (modelo 410, Waters, USA) operado a 30 °C y calibración directa con estándares de Pululanos. Se empleó una bomba binaria (modelo 1.525, Waters, USA), con inyector automático (modelo 717 plus, Waters, USA). La separación se realizó con un set de 5 columnas *Ultrahydrogel* (7,8 mm × 300 mm, Waters, USA) con tamaños de poro: 120, 250, 500, 1000, 2000 Å y límites de fraccionamiento: 5×10^3 , 8×10^4 , 4×10^5 , 1×10^6 , y 7×10^6 g/mol. Como fase móvil se empleó solución amortiguadora CH₃COOH/CH₃COONa 0,50 M, a un flujo de 0,8 mL/min y con un volumen de inyección de muestra de 200 µL. Las soluciones de los estándares, como así también de las diferentes muestras, fueron preparadas en una concentración igual a 1 mg/mL y antes de su inyección se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm y 13 mm de diámetro (GHP Acrodisc GF). Los datos fueron adquiridos con el software Breeze GPC (Waters Corporation, USA) y procesados con MatlabTM (MathWorks Incorporation, USA).

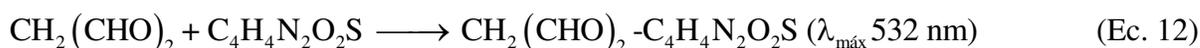
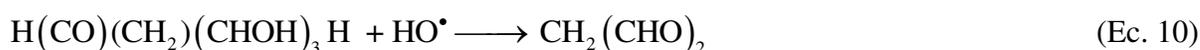
La curva de calibración se calculó a partir de la relación entre los volúmenes de pico de los cromatogramas para cada uno de los estándares de Pululanos, analizados por duplicado, y las masas molares de pico informadas por el fabricante. La comparación de los cromatogramas de las muestras, analizadas por triplicado, con los cromatogramas de los respectivos estándares permitió obtener el PM de las mismas.

6.2.2.5. Solubilidad a pH fisiológico

La solubilidad fue determinada conforme a Chung y col. (2005)^[5]. Se disolvieron 0,05 g de Ch o ChF, previamente secados, en 5 mL de amortiguador fosfato salino (PBS) y se sometieron a agitación durante 5 h en un *orbital shaker* climatizado a 25 °C. Posteriormente, las muestras fueron filtradas bajo vacío a través de un filtro de membrana de 0,22 µm. La solubilidad fue calculada a partir del cambio de peso del filtro de membrana y expresada en g/L y % (p/p).

6.2.2.6. Desactivación de radical hidroxilo (HO^\bullet)

HO^\bullet se generó, conforme a Boiero y col. (2014) ^[18], por la reacción de *Fenton* (Ec. 9) dando lugar a la formación de MDA por oxidación de la 2-Desoxi-D-ribosa (Ec. 10). El MDA en presencia de TBA forma un aducto ($\lambda_{\text{máx}}$ 532 nm) cuya inhibición por competición se traduce a comportamiento antioxidante de Ch o ChF (Ec. 11-12).



El medio de reacción fue provisto por amortiguador fosfato 50 mM pH 7,4 (400 μ L), se añadieron 2-Desoxi-D-ribosa 10 mM (560 μ L), H_2O_2 100 mM (50 μ L), $FeCl_3$ 1 mM (50 μ L), EDTA 5 mM (50 μ L), ácido ascórbico 5 mM (40 μ L), completando con la solución de antioxidante (Ch o ChF) y/o agua hasta volumen final de 2 mL. Luego de un período de incubación de 1 h a 37 °C, se adicionó TBA 1 % (p/v) (1 mL) y TCA 5,6 % (p/v) (1 mL) y se mantuvieron las muestras a 95 °C durante 20 min, para posteriormente leer las respectivas absorbancias.

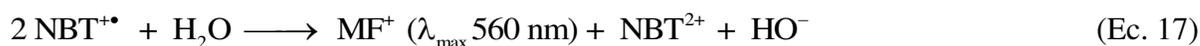
El porcentaje de desactivación (% D) de HO^\bullet fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (Ec.13):

$$D (\%) = 100 \times \frac{A_0 - A_x}{A_0} \quad (\text{Ec. 13})$$

Donde A_0 es el valor de absorbancia a 532 nm obtenida para la solución control y A_x es el valor de absorbancia en presencia de las diferentes muestras a diferentes concentraciones. A partir de las pendientes de los gráficos de % D vs. concentración se calculó para cada molécula la concentración efectiva (μ M) para desactivar el 50 % de la especie reactiva (CE_{50}).

6.2.2.7. Desactivación de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

$O_2^{\bullet-}$ fue generado por la autooxidación del clorhidrato de hidroxilamina (Ec. 14) conforme a Boiero y col. (2014) ^[18]; el estudio se basó en la inhibición por competición de la formación de monoformazan (MF^+) ($\lambda_{máx}$ 560 nm) por reducción del azul de nitrotetrazolium (NBT^{2+}) (Ec. 15-17).



El medio de reacción fue provisto por amortiguador fosfato 50 mM pH 8 (500 μ L), se añadieron NBT 1 mM (300 μ L), EDTA 1 mM (100 μ L), clorhidrato de hidroxilamina 5 mM (500 μ L), completando con la solución de antioxidante (Ch o ChF) y/o agua hasta volumen final de 3 mL. Luego de un período de incubación de 1 h a 37 °C, se leyeron las respectivas absorbancias.

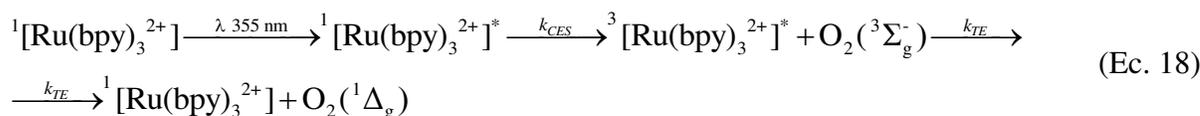
El % D de $O_2^{\bullet-}$ fue calculado de acuerdo a Ec. 13 y del mismo modo mencionado la CE_{50} (μ M) para $O_2^{\bullet-}$.

Los Ch nativos se evaluaron en un rango de concentraciones desde 0,1 a 0,7 μ M, mientras que los ChF desde 0,5 a 4,5 μ M. Se trabajó a igual concentración en masa y luego se efectuaron los cálculos de las concentraciones molares.

6.2.2.8. Desactivación de oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$)

Desactivación total de $O_2(^1\Delta_g)$.

$O_2(^1\Delta_g)$ fue generado por fotosensibilización de $Ru(bpy)_3Cl_2$ en D_2O (Ec. 18) conforme a Giménez y col. (2015) [19]. El sensibilizador fue excitado con un láser Nd-YAG de emisión a 355 nm, 10 ns de ancho de pulso y 3 mJ/pulso.



Donde k_{CES} es la constante unimolecular de cruce entre sistemas y k_{TE} es la constante bimolecular de transferencia de energía.

$O_2(^1\Delta_g)$ en presencia de un donador de electrones denominado "quencher" (Q) puede ser desactivado tanto por un proceso físico (Ec. 19) como químico o reactivo (Ec. 20), correspondiendo la suma de ambos procesos a la desactivación total.



Las constantes de desactivación total ($k_t = k_r + k_q$) de $O_2(^1\Delta_g)$, fueron determinadas mediante la detección infrarroja en ángulo recto de la fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ a 1270 nm con un detector de fotodiodos de germanio (J16TE2-66G, Teledyne Judson Technology, USA), en ausencia y presencia de Ch nativo y ChF de bajo y medio PM, en amortiguador acetato 0,1 M pD 4,7 y 5,8, para contemplar el efecto de la disponibilidad de los grupos ($-NH_2$). Del análisis de las señales de la fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ a 1270 nm, se calcularon los tiempos de vida de $O_2(^1\Delta_g)$ en ausencia y presencia de muestra, τ_Δ^0 y τ_Δ , respectivamente.

La constante de velocidad para la desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$, se calculó de acuerdo a la clásica ecuación de *Stern-Volmer* (SV) (Ec. 21):

$$k_{\Delta} = k_{\Delta}^0 + k_t [Q] \quad (\text{Ec. 21})$$

Donde, k_{Δ}^0 ($1/\tau_{\Delta}^0$), k_{Δ} ($1/\tau_{\Delta}$), y k_t es la constante de velocidad para la desactivación total de O_2 ($^1\Delta_g$) por Ch o ChF.

En la determinación de la k_t se utilizó D_2O , donde el tiempo de vida del O_2 ($^1\Delta_g$) es mayor (60 μs) que en agua ultrapura. [20,21] Para lograr una homogeneidad en el análisis y evitar la alteración del tiempo de vida del O_2 ($^1\Delta_g$), las soluciones madre 10 mg/mL de Ch y ChF se prepararon con DCl y se diluyeron a las concentraciones de análisis en una solución, saturada en aire, 57 μM de $Ru(bpy)_3Cl_2$ en amortiguador acetato 0,1 M (pD 4,7 y 5,8).

Los Ch nativos se evaluaron en rango de concentraciones desde 3 a 20 μM , mientras que los ChF desde 20 a 122 μM . Se trabajó a igual concentración en masa y luego se efectuaron los cálculos de las concentraciones molares.

Desactivación reactiva de O_2 ($^1\Delta_g$).

Las constantes de desactivación reactiva de O_2 ($^1\Delta_g$) por Ch y ChF, k_r^{Ch} , fueron determinadas registrándose los consumos de oxígeno en procesos de fotosensibilización a través del empleo de un sensor de oxígeno de fibra óptica luminiscente FOXY-R-AF de acero inoxidable 1/16" acoplado a un fluorómetro (CCD-USB2000, Ocean Optics, USA) colocado en la parte superior de una cubeta de 10 x 10 mm de cuarzo, empleando un método actinométrico mediado por FFA como referencia con $k_r = 1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [22] y $Ru(bpy)_3Cl_2$ 57 μM como sensibilizador. El consumo fotosensibilizado de oxígeno disuelto se monitoreó durante 15 min (900 s) con irradiación continua de un LED Royal Blue (emisión a $462 \pm 27 \text{ nm}$, 1 W) como fuente de excitación. Se analizó el efecto de la protonación, trabajando en amortiguador acetato 0,1 M a pH 4,7 y 5,8. Simultáneamente, se registraron los cambios en el espectro de absorción de la solución con un espectrómetro UV-vis (CCD-USB2000, Ocean Optics, USA).

Las constantes k_r^{Ch} , fueron calculadas a partir de la relación entre las velocidades iniciales de consumo de oxígeno de Ch o ChF, v_0^{Ch} , y la del compuesto de referencia FFA, v_0^{FFA} , a sus concentraciones iniciales $[Ch]_0$ y $[FFA]_0$, respectivamente (Ec. 22).

$$k_r^{Ch} = k_r^{FFA} \times \frac{v_0^{Ch}}{v_0^{FFA}} \times \frac{[FFA]_0}{[Ch]_0} \quad (\text{Ec. 22})$$

El actinómetro FFA se evaluó en un rango de concentración desde 100 a 500 μM ajustándose a un consumo de oxígeno de *pseudo*-primer orden en todo el rango.

Los experimentos fueron realizados a pH o pD 4,7 y 5,8 a los fines de evaluar el efecto del grado de protonación de los grupos $-\text{NH}_3^+$ sobre la eficiencia de desactivación de $^1\text{O}_2$. Considerando que, para el intervalo de PM y GDA de las muestras analizadas, los valores de pK_a están comprendidos entre 6,67 y 6,47, a pH o pD 4,7 y 5,8 los grupos $-\text{NH}_3^+$ están protonados, pero el grado de disociación (α) de los mismos varía desde 0 a 0,3 aproximadamente entre pH o pD 4,7 y 5,8. Esto indicaría un menor grado de protonación de la molécula de Ch o ChF con un aumento de pH o pD, modificando la disponibilidad de los grupos $-\text{NH}_2$.^[23]

6.2.3. Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron analizados con el programa OriginPro 8.5 (OriginLab Software Corporation, USA). Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado y los datos se presentan como el valor de media \pm desviación estándar (DE).

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) a una vía seguido del test *Tukey* como test *post-hoc* con la ayuda del programa InfoStat versión 2014 (Di Rienzo, Casanoves, Balzarini, Tablada & Robledo, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las diferencias entre grupos se consideraron significativas a $P < 0,05$.

6.3. Resultados y Discusión

6.3.1. Caracterización espectroscópica de los derivados solubles de quitosano (ChF) por reacción de Maillard

El curso de la reacción de *Maillard* entre Ch y clorhidrato de D-(+)-glucosamina fue evaluado por espectroscopía UV-Vis. Para confirmar que Ch no auto-reacciona con fracciones de su misma cadena polimérica bajo este mecanismo, la reacción fue llevada a cabo, adicionalmente, en ausencia de clorhidrato de D-(+)-glucosamina.

Como puede observarse en la **Figura 6.1.A** la banda a 275 nm, en ausencia del azúcar simple, no mostró cambios espectrales significativos, lo cual es característico en la **Figura 6.1.B**, denotando la formación de productos de reacción intermedios ^[8] a partir de las 12 h de reacción, aproximadamente. En la **Figura 6.1.C**, puede observarse el espectro final de la molécula dializada contra agua destilada, secada por liofilización y, finalmente, rehidratada a concentración de 1 mg/mL en amortiguador acetato pH 5,8. Se puede confirmar la ausencia absoluta de una banda a 420 nm, la cual indicaría presencia de melanoidinas pardas indeseadas. Por lo tanto, las condiciones de bajo pH y temperatura moderada permitieron obtener el producto deseado sin formación de HMF, que se evidencia por la ausencia de banda a 420 nm en la **Figura 6.1.B** a 48 h de reacción. ^[8,9]

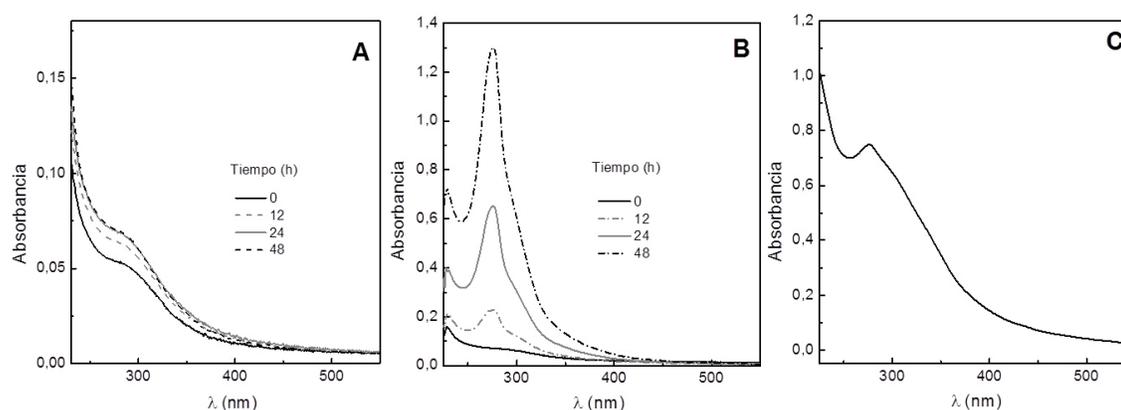


Figura 6.1.: Espectroscopía UV-Vis de la reacción de *Maillard*.
 (A) ChM tratado 48 h a 65 °C. (B) ChM tratado 48 h a 65 °C en presencia clorhidrato de D-(+)-glucosamina. (C) ChF de PM medio dializado contra agua destilada, secado por liofilización y rehidratado a concentración 1 mg/mL en amortiguador acetato pH 5,8.

Es destacable el cambio de relación de bandas a 275 nm y 230 nm ($A_{275 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$) entre el producto en medio de reacción (**Figura 6.1.B**) y el producto dializado, seco y rehidratado (**Figura 6.1.C**); el descenso de absorbancia a 275 nm muestra que productos de hidrólisis de bajo PM (< 12000-14000 Da), propios de la reacción, fueron separados durante la diálisis y esto pudo confirmarse con el descenso de PM del nuevo biopolímero ChF.

La **Figura 6.2.A** muestra el espectro de absorción FT-IR entre 4000 y 400 cm^{-1} de las diferentes moléculas nativas y sus derivados. Puede observarse que, a modo de efecto global de la reacción, ChF de PM bajo y medio presentan mayor estructura fina a 3394 cm^{-1} , correspondiente a la mayor disponibilidad de los grupos $-\text{OH}$, fuertemente ligados en las moléculas nativas. [24] Los incrementos asociados a las bandas a 1560 cm^{-1} y 3276 cm^{-1} responden a un cambio de ángulo en el plano de $-\text{NH}_2$ y a un aumento de estiramiento de los enlaces $\text{N}-\text{H}$ de $-\text{NH}_2$, respectivamente, denotando mayor accesibilidad a dichos grupos funcionales.

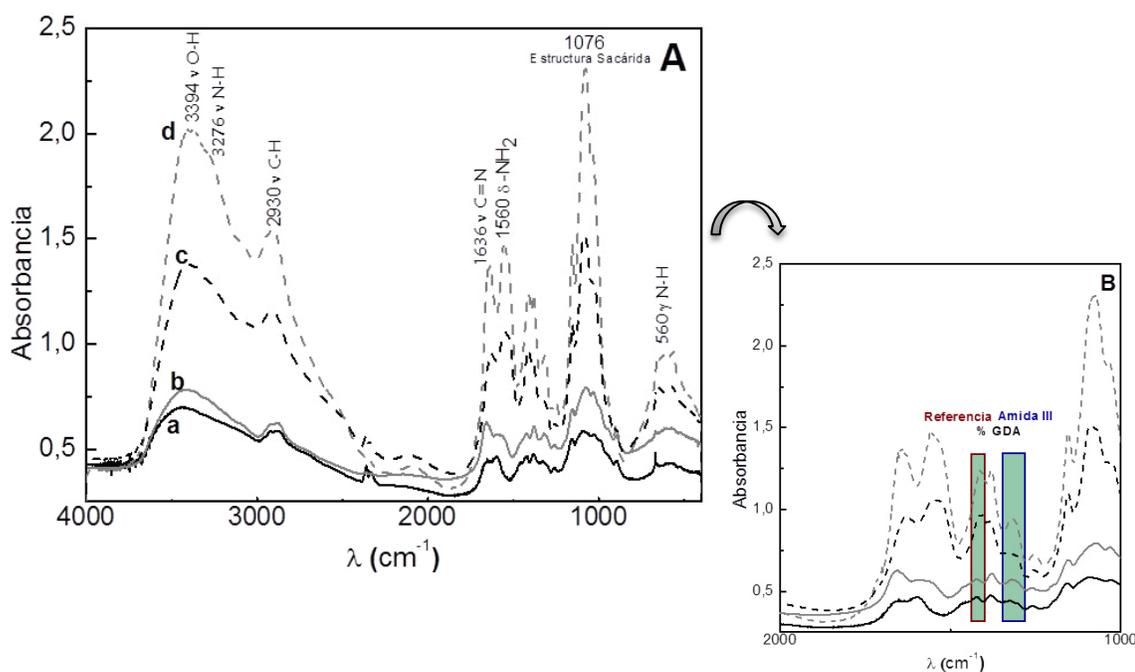


Figura 6.2.: Espectros de absorción en el IR de las moléculas de quitosano nativo (Ch) y sus derivados (ChF).
 (A) Espectro entre 4000 y 400 cm^{-1} . (B) Espectro entre 1000 y 2000 cm^{-1} .
 (a) ChL. (b) ChM. (c) ChFL. (d) ChFM

La región delimitada por el incremento en la banda a 1560 cm^{-1} , es caracterizada también por el establecimiento de nuevos enlaces amida R-NH-C=O , producto de la fusión del grupo carbonilo reductor de la glucosamina y el grupo $-\text{NH}_2$ de Ch. [25]

Se percibe un cambio en la relación entre las bandas a 1420 y 1320 cm^{-1} (**Figura 6.2.B**), a partir de las cuales se pudo calcular el GDA de las muestras analizadas (Ec. 7). Estas correlaciones se toman entre una de las bandas de los grupos amida (I o III), en este caso amida III (1380 cm^{-1} , aquí desfasada hacia 1320), y otra banda que sirva de referencia interna para corregir las diferencias de grosor de la pastilla de bromuro de potasio utilizada. Este cambio resulta propio de la modificación que sufrió la molécula nativa a lo largo de la reacción, lo cual explica el mecanismo lítico que derivó en un menor GDA. [12,17]

La mayor superficie de la banda a 1636 cm^{-1} es la consecuencia de la aparición de enlaces C=N- , característicos de las bases de *Schiff* que se forman durante estadios intermedios de las reacciones de pardeamiento no enzimático. [25,26]

La zona alrededor de $1100 - 1155\text{ cm}^{-1}$, muestra el cambio conformacional (estiramiento anti-simétrico del enlace C-O-C) de la estructura piranósica o sacárida, sugiriendo la incorporación de moléculas de azúcar D-(+)-glucosamina (ramificación), al polímero en cuestión. [25,27]

Finalmente, puede observarse que existe una mayor accesibilidad a los grupos $(-\text{N-H})$ correspondientes al enlace peptídico (N-acetilglucosamina), por el aumento vibracional de la banda a 560 cm^{-1} .

6.3.2. Grado de desacetilación (GDA), peso molecular (PM) y solubilidad a pH fisiológico

La **Tabla 6.1.** expone los GDA calculados a partir de una titulación ácido-base y la relación de áreas de las bandas a 1320 y 1420 cm^{-1} de los espectros FT-IR. Al comparar dichos valores puede concluirse en datos reproducibles.

La curva de titulación de Ch muestra dos puntos de inflexión (**Figura 6.3.**), el primero resulta de neutralizar el exceso de HCl presente y el segundo de la des-protonación de los grupos $-\text{NH}_3^+$ de la cadena polimérica. La diferencia entre los volúmenes del titulante (NaOH) de cada uno de estos puntos se traduce a grupos $-\text{NH}_2$.

Tabla 6.1.: Caracterización de quitosano (Ch) y sus derivados (ChF).

Muestra	GDA (%) Titulación potenciométrica	GDA (%) Espectroscopía IR	PM SEC (kDa)	PM _{viscosimétrico} (kDa)	Solubilidad % (p/p)	Solubilidad (g/L)
ChL	88±1	88±1	297±45	270±54	5±1 ^a	0,56±0,02
ChM	78±1	73±1	583±87	670±100	3±1 ^a	0,26±0,02
ChFL	79±2	78±1	49±7		29±2 ^c	2,83±0,05
ChFM	63±1	59±1	98±15		18±2 ^b	1,38±0,04

Medias con una letra común, para una misma columna, no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

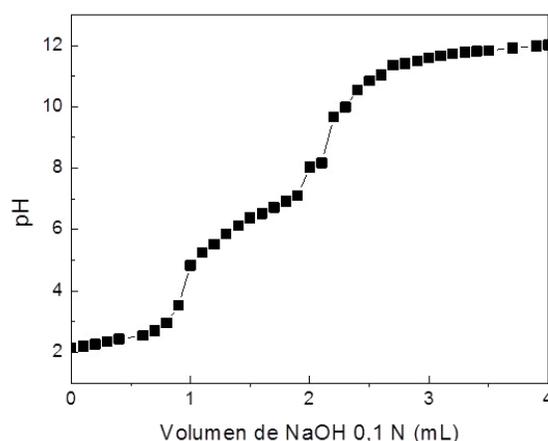


Figura 6.3.: Curva de titulación potenciométrica de quitosano (Ch).
ChL en HCl 0,01 N titulado con NaOH 0,1 N estandarizado.

Puede observarse un decrecimiento del GDA (calculado desde los resultados de la titulación potenciométrica) del 15 % entre ChM y su derivado ChFM, y del 9 % entre ChL y ChFL (**Tabla 6.1.**). Este efecto puede atribuirse a la naturaleza lítica de la reacción de *Maillard* ^[3] ya que, si bien a través de la misma se incorporan de modo ramificado moléculas de la unidad monomérica de Ch (glucosamina), el mecanismo propio de la reacción lleva al fraccionamiento aleatorio de la cadena del biopolímero. Un descenso del GDA, en promedio, del 15 % observaron Chung y col. (2005, 2006) ^[5,6] al funcionalizar Ch con glucosamina a 50 °C durante 48 h, destacando que el GDA descendió conforme al aumento del tiempo de reacción. En el presente trabajo de tesis, esto pudo constatarse con el descenso de PM entre las moléculas nativas y sus derivados. Los resultados obtenidos por SEC muestran para los derivados (ChF) un PM seis veces menor que sus moléculas originarias (Ch), confirmando la hidrólisis durante el mecanismo reactivo (**Tabla 6.1.**).

Las gráficas de viscosimetría capilar que permitieron calcular el PM de las moléculas nativas se presentan en la **Figura 6.4**. El intercepto de dichas rectas arrojan la viscosidad intrínseca $[\eta]$ a partir de la cual, con la ecuación de *Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada* (MHKS) (Ec. 8), se calcula el PM presentado en la **Tabla 6.1**.

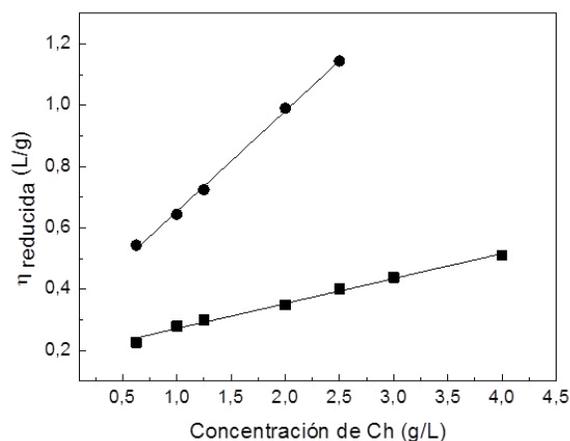


Figura 6.4.: Variación de la viscosidad reducida ($\eta_{reducida}$) en función de la concentración de quitosano (Ch). ChL (■), ChM (●).

La funcionalización de Ch necesita ciertos parámetros de partida, como el GDA y el PM, que dan la pauta del tipo de muestra con la que se cuenta, su potencial solubilidad en el medio de reacción, etc. Tener técnicas de evaluación inmediata como la titulación potenciométrica para el GDA y la viscosimetría capilar para el PM, es de gran utilidad al respecto. Sin embargo, poder validar dichas técnicas de rutina con métodos analíticos instrumentales avanzados, como la espectroscopía FT-IR y la cromatografía SEC, le otorgó un mayor margen de confianza a los valores obtenidos.

Finalmente, la solubilidad a pH 7,4 (**Tabla 6.1**) fue significativamente mejorada, incrementándose conforme se redujo el PM de los polisacáridos. Este resultado puede deberse a la disminución de interacciones intermoleculares, como fuerzas de *Van der Waals*, las cuales favorecen la agregación del polímero. ^[28] El mismo resultado fue observado por Chung y col. (2006) ^[6] en la funcionalización de Ch con diferentes mono y disacáridos. Este aumento en la solubilidad fue lo que no permitió evaluar el PM de los derivados por viscosimetría capilar, ya que la viscosidad de las soluciones descendió considerablemente y no se observó cambio aparente en los tiempos de flujo de las soluciones.

La solubilidad de Ch es una propiedad definida por el PM y el GDA del mismo. [29] Il'ina y col. (2008) demuestran que el descenso de η_{red} a través de reacción de *Maillard* se traduce a un aumento de solubilidad a pH por encima de 7, pese a la ligera disminución del GDA. La reacción de *Maillard* permite obtener derivados de menor PM que los Ch de origen, conservando un GDA y tamaño de cadena con propiedades poliméricas adecuadas. Esta alternativa de derivatización de Ch se corresponde con la hidrólisis ácida o enzimática del mismo, aunque estas deben llevarse a cabo en presencia de ácidos fuertes como el HCl [30], largos tiempos de reacción con ácidos débiles como el láctico [31] o delicadas (y costosas) condiciones de reacción enzimática [32].

6.3.3. Desactivación de radical hidroxilo (HO^\bullet) y anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

La variación del % D para HO^\bullet y $O_2^{\bullet-}$ con la concentración de Ch y ChF se muestra en la **Figura 6.5**. Puede observarse que las moléculas nativas ChL y ChM presentaron una eficiencia de desactivación de ambas especies radicalarias mayor que sus derivados ChFL y ChFM. Los valores de las pendientes lineales de las gráficas y las CE_{50} se exponen en la **Tabla 6.2**.

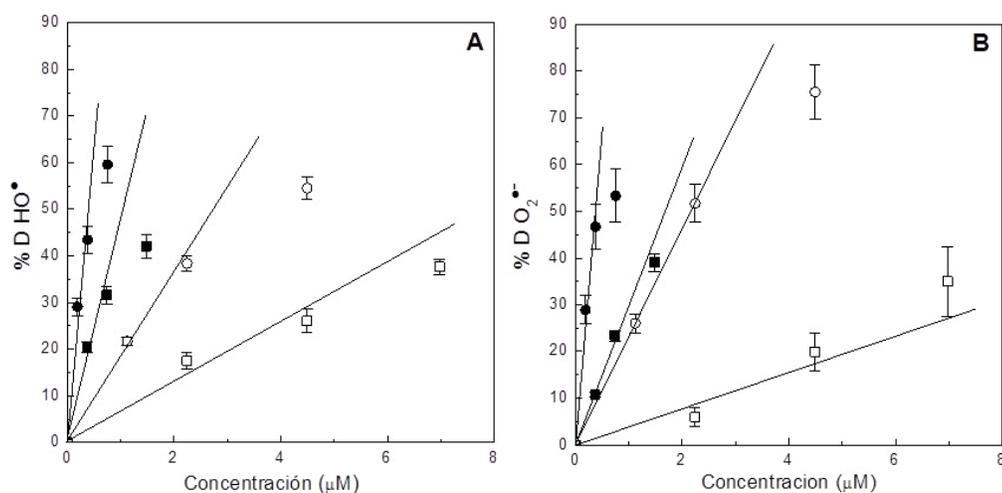


Figura 6.5.: Desactivación (% D) de (A) radical hidroxilo (HO^\bullet) y (B) anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por quitosano (Ch). ChL (■), ChM (●), ChFL (□) y ChFM (○).

Tabla 6.2.: Valores de pendientes de desactivación (μM^{-1}) y valores extrapolados de concentración efectiva de quitosano (Ch) para la desactivación del 50 % (CE_{50}) de radical hidroxilo (HO^\bullet) y anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

Muestra	Desactivación HO^\bullet		Desactivación $\text{O}_2^{\bullet-}$	
	Pendiente (μM^{-1})	CE_{50} (μM)	Pendiente (μM^{-1})	CE_{50} (μM)
ChL	47±2	1,1±0,1 ^a	31±2	1,6±0,2 ^a
ChM	121±7	0,4±0,1 ^a	130±11	0,4±0,1 ^a
ChFL	6±1	8,2±0,5 ^b	4±1	12,2±0,6 ^b
ChFM	18±1	2,8±0,2 ^a	23±3	2,2±0,5 ^a

Medias con una letra común, para una misma columna, no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Los resultados obtenidos muestran una relación directamente proporcional de la desactivación de estas especies con el PM (Figura 6.6.). De este modo las eficiencias de desactivación presentaron el siguiente orden ChM>ChL>ChFM>ChFL.

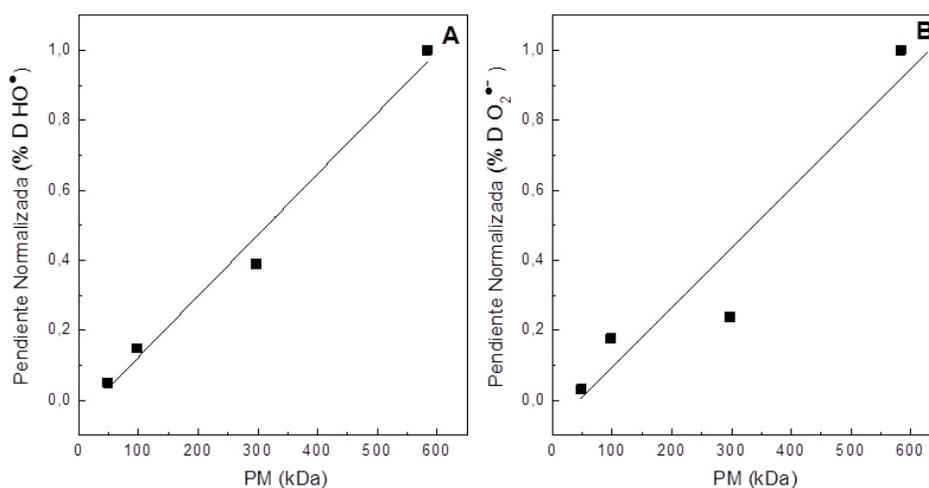


Figura 6.6.: Pendientes normalizadas de desactivación (% D) de (A) radical hidroxilo (HO^\bullet) y (B) anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) en función del peso molecular (PM) de quitosano (Ch).

Trabajos publicados, indican que la actividad de Ch frente a especies radicalarias como HO^\bullet y $\text{O}_2^{\bullet-}$ crece a medida que el PM disminuye.^[33–35] En estos estudios citados, se analiza el efecto de un amplio margen de PM (aproximadamente desde 4 a 800 kDa), notando una mayor capacidad

antioxidante cuando el PM fue menor a 10 kDa y hallando una diferencia significativa en contraste con moléculas del orden de los 800 kDa.

El rango de PM (100 – 600 kDa) y valores de concentración en mg/mL (0,1 – 0,5) analizados en el presente trabajo no mostraron diferencia significativa en la capacidad de desactivar especies radicalarias de oxígeno, y esto es apreciable en la estadística de los valores de CE_{50} (**Tabla 6.2.**).

A su vez, los valores de pendientes de las curvas de desactivación, como los de CE_{50} , descienden de manera proporcional al descenso de PM de las moléculas derivatizadas (ChF) respecto de las nativas (Ch), es decir, siendo el PM de ChF seis veces menor a Ch, la actividad antioxidante de ChF frente a HO^{\bullet} y $O_2^{\bullet-}$ fue seis veces menor que la de Ch, pudiendo esto indicar que las moléculas derivadas conservaron la capacidad antioxidante de las moléculas nativas, en proporción al descenso de PM. Este comportamiento fue reproducible en ambas derivatizaciones (ChL > ChFL y ChM > ChFM).

Adicionalmente, al vincular las **Tablas 6.1.** y **6.2.**, se puede concluir que la actividad antioxidante frente a especies radicalarias de oxígeno disminuyó (> CE_{50}) con el descenso del GDA ocasionado por la reacción de *Maillard*, indicando la importancia de los grupos $-NH_2$ en los mecanismos reactivos de desactivación de radicales libres, ya discutido previamente por Yen y col. (2008) ^[36], Je y Kim (2006) ^[37] y Park y col. (2004) ^[38]. Los grupos $-NH_2$ darían a Ch la capacidad de formar macroradicales más estables ^[34], lo cual permite explicar que el descenso en la proporción de estos grupos en ChF se podría traducir en una menor eficiencia de desactivación de radicales libres. Sin embargo, este descenso es compensado por el incremento en la solubilidad en pH neutro de ChF, posibilitando el empleo de dichos polímeros en medios biológicos.

6.3.4. Desactivación de oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$)

El tiempo de vida natural de la especie $O_2(^1\Delta_g)$ (τ_{Δ}^0) se obtuvo del ajuste exponencial decreciente de primer orden de la gráfica de intensidad de fosforescencia a 1270 nm respecto del tiempo (**Figura 6.7.A**); el mismo arrojó un valor de 55 μs acorde a lo esperado ^[20], conforme a (Ec. 23):

$$I_{(t)} = I_0 \times \exp(-t / \tau_{\Delta}) \quad (\text{Ec. 23})$$

Donde I_0 corresponde a la intensidad de fosforescencia inicial y τ_Δ al tiempo de decaimiento observado de $O_2(^1\Delta_g)$ que corresponde a τ_Δ^0 en ausencia de muestra o Q (Ch o ChF).

Frente al agregado de las distintas concentraciones de Ch o ChF, también se obtuvo el tiempo de vida de la especie (τ_Δ) y, conforme a dichos valores, se realizó la gráfica de SV (Ec. 21) para cada muestra, evaluadas a pD 4,7 y 5,8 (**Figura 6.7.A y B**).

El complejo de coordinación $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ es un buen sensibilizador en solventes polares, con un rendimiento cuántico de generación de $O_2(^1\Delta_g)$ entre 0,3 y 0,5. [19,39,40] La fracción de decaimiento de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ no mostró variaciones de I_0 , sugiriendo que la desactivación de la especie fue consecuencia de la interacción de Ch o ChF con $O_2(^1\Delta_g)$ y no por modificación de las propiedades del sensibilizador $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ al interactuar con Ch o ChF. Los valores de k_t obtenidos desde la pendiente de las gráficas τ_Δ^{-1} vs. concentración de Ch o ChF se exponen en la **Tabla 6.3**.

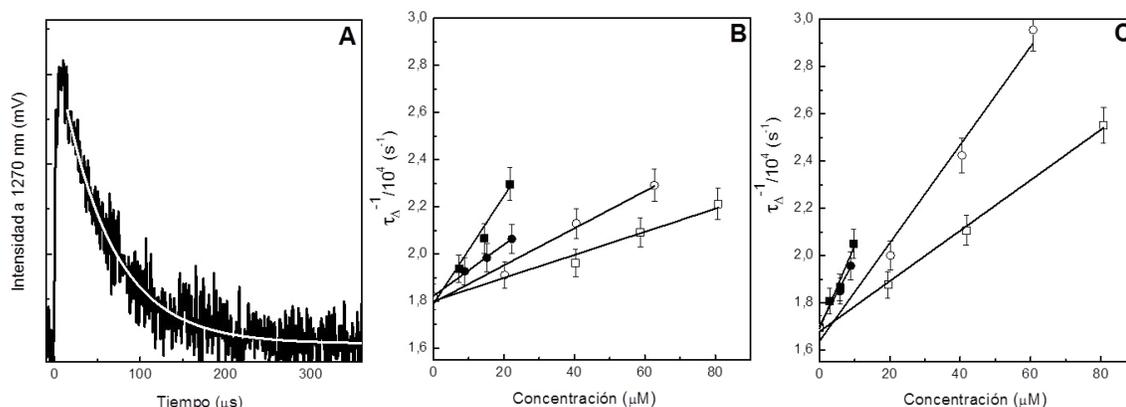


Figura 6.7.: Desactivación total de oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$) por quitosano (Ch). (A) Señal de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ a 1270 nm, generado por $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ en amortiguador acetato 0,1 M pD 4,7 saturado en aire. (B) Gráficas de SV para muestras de Ch y ChF a pD 4,7. (C) Gráficas de SV para muestras de Ch y ChF a pD 5,8. ChL (■), ChM (●), ChFL (□) y ChFM (○).

Tabla 6.3.: Constantes de desactivación total (k_t) y reactiva (k_r) de oxígeno molecular singlete ($O_2(^1\Delta_g)$) por quitosano (Ch).

Muestra	$k_t/10^8 M^{-1}s^{-1}$		$k_r/10^8 M^{-1}s^{-1}$		k_r/k_t	
	pD 4,7	pD 5,8	pH 4,7	pH 5,8	pH 4,7	pH 5,8
ChL	2,3±0,3	3,5±0,1	1,1±0,6	3,4±0,8	0,47	0,98
ChM	1,3±0,2	2,7±0,6	1,6±0,7	1,8±1,0	1,22	0,68
ChFL	1,2±0,1	2,5±0,7	0,3±0,1	0,8±0,7	0,24	0,31
ChFM	0,9±0,2	2,1±0,4	0,4±0,2	1,1±0,9	0,41	0,53

La desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ por Ch bajo condiciones ácidas ha sido asociada con los grupos amina primarios ($-NH_2$) de los residuos de glucosamina presentes en el polisacárido. ^[41] Al vincular la **Tabla 6.3.** con la **Tabla 6.1.** se puede constatar que la actividad frente a esta especie reactiva sería GDA dependiente, ya que aquellas muestras con mayor GDA exhiben una k_t mayor. A su vez, puede observarse que el aumento de una unidad en el valor de pH o pD provocó un incremento del doble en ambas constantes de desactivación (k_t y k_r) para todas las muestras, denotando que la disponibilidad de estos grupos, es decir que no se encuentren protonados ($-NH_3^+$), mejora la capacidad de desactivar a $O_2(^1\Delta_g)$. ^[23]

El valor de k_t para una molécula con un grupo amina primario, como por ejemplo la ciclohexilamina, es de $8 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ ^[42]. Por lo tanto, los valores de k_t para ChL y ChM, con aproximadamente 1600 y 2800 unidades de glucosamina, respectivamente, resultan acordes al orden de desactivación que propone el número de grupos $-NH_2$ presentes. Ahora bien, atendiendo al PM de los derivados ChFL y ChFM, el estudio realizado muestra que la desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ no se redujo en manera proporcional respecto a los mismos. Incluso, la relación k_r/k_t disminuye, pudiendo esto ser atribuido a las modificaciones en la cadena polimérica durante la reacción de *Maillard*, con un resultado de mayor eficiencia en la actividad contra esta especie excitada.

La **Figura 6.8.** muestra los perfiles de consumo de oxígeno por fotosensibilización mediada por $[Ru(bpy)_3^{2+}]$ a 462 nm en amortiguador fosfato 0,1 M, en ausencia y presencia de las muestras de Ch nativo y ChF.

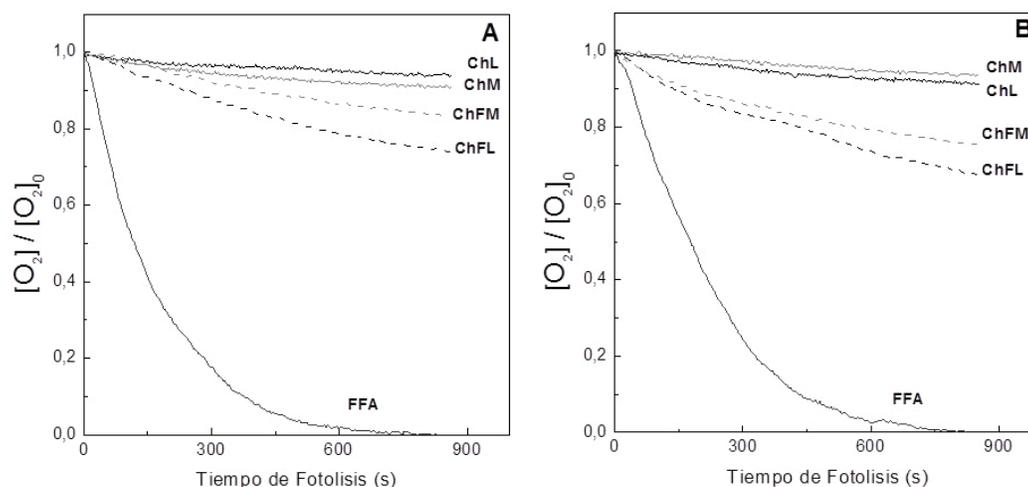


Figura 6.8.: Perfil de consumo de oxígeno por quitosano (Ch) mediante fotosensibilización en estado estacionario de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$ en amortiguador fosfato 0,1 M. (A) pH 4,7. (B) pH 5,8.

El actinómetro FFA se evaluó en un rango de concentración desde 100 a 500 μM ajustándose a un consumo de oxígeno de *pseudo*-primer orden en todo el rango. En la **Figura 6.8.** se expone el consumo de oxígeno de FFA 500 μM . Sin embargo, la baja proporción de oxígeno consumido, frente a las diferentes muestras de Ch y ChF (< 20 %) no permitió llevar a cabo un ajuste de *pseudo*-primer orden y, por ende, las constantes cinéticas reactivas, se calcularon por estimación de la velocidad inicial de consumo de oxígeno, v_0 , a través de un ajuste lineal hasta un consumo límite del 10 %. Finalmente, k_r se calculó según la Ec. 22.

Atendiendo a que $k_t = k_r + k_q$ (Ec. 19 y 20), los resultados muestran que $k_t = 2k_r$ para la mayoría de las muestras analizadas, indicado que ambos mecanismos, el físico y el reactivo, tienen lugar en la desactivación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

6.4. Conclusión

Bajo las condiciones de trabajo abordadas se obtuvo un derivado de Ch por reacción de *Maillar*, ChF, de mejorada solubilidad a pH fisiológico, carente de melanoidinas pardas que podrían provocar toxicidad, con una mínima reducción del GDA y PM de un orden menor a las moléculas nativas originarias.

La actividad antioxidante frente a EROS radicalarias HO[•] y O₂^{•-} de los derivados ChF, se conservó conforme al descenso de PM de las moléculas de Ch, mientras que frente a O₂ (¹Δ_g), una especie excitada, no se evidenciaron cambios significativos en la capacidad de desactivación, demostrando, a través de la relación de constantes de desactivación reactiva y total, una capacidad ligeramente mejorada.

En conclusión, se logró obtener una biomolécula de mejor solubilidad a pH neutro que la que brinda Ch nativo, capacidad antioxidante conservada, apta para emplearse como material de pared en el diseño de micropartículas capaces de dispensar compuestos bioactivos en un sitio específico de liberación a pH fisiológico.

6.5. Referencias

1. Muzzarelli, R. A. A. Chitin and its derivatives: new trends of applied research. *Carbohydr. Polym.* **3**, 53–75 (1983).
2. Aranaz, I.; Mengibar, M.; Harris, R.; Paños, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G. & Heras, A. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr. Chem. Biol.* **3**, 203–230 (2009).
3. Bastos, D. M.; Monaro, É.; Siguemoto, É. & Séfora, M. Maillard Reaction Products in Processed Food: Pros and Cons. *Food Ind. Process. - Methods Equip.* 418 (2012).
4. Tanaka, M.; Huang, J. R.; Chiu, W. K.; Ishizaki, S. & Taguchi, T. Effect of the Maillard reaction on functional properties of chitosan *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**, 1915–1921 (1993).
5. Chung, Y. C.; Kuo, C. L. & Chen, C. C. Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. *Bioresour. Technol.* **96**, 1473–1482 (2005).
6. Chung, Y. C.; Tsai, C. F. & Li, C. F. Preparation and characterization of water-soluble chitosan produced by Maillard reaction. *Fish. Sci.* **72**, 1096–1103 (2006).
7. Il'ina, A. V.; Kulikov, S. N.; Chalenko, G. I.; Gerasimova, N. G. & Varlamov, V. P. Obtaining and study of monosaccharide derivatives of low-molecular-weight chitosan. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **44**, 606–614 (2008).
8. Ajandouz, E. H. & Puigserver, A. Nonenzymatic browning reaction of essential amino acids: effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1786–1793 (1999).
9. Ajandouz, E. H.; Tchiakpe, L.S.; Dalle Ore, F.; Benajiba, A. & Puigserver, A. Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *Food Chem.* **66**, 926–931 (2001).
10. Kanatt, S. R.; Chander, R. & Sharma, A. Chitosan glucose complex - A novel food preservative. *Food Chem.* **106**, 521–528 (2008).
11. Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, F. M.; Argüelles Monal, W.; Desbrières, J. & Rinaudo, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer.* **42**, 3569–3580 (2001).
12. Sugimoto, M.; Morimoto, M.; Sashiwa, H.; Saimoto, H. & Shigemasa, Y. Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives. *Carbohydr. Polym.* **36**, 49–59 (1998).
13. Balázs, N. & Sipos, P. Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Carbohydr. Res.* **342**, 124–130 (2007).

14. Kienzle Sterzer, C.; Rodriguez-Sanchez, D. & Rha, C. Dilute solution behavior of a cationic polyelectrolyte. *J. Appl. Polym. Sci.* **27**, 4467–4470 (1982).
15. Yomota, C.; Miyazaki, T. & Okada, S. Determination of the viscometric constants for chitosan and the application of universal calibration procedure in its gel permeation chromatography. *Colloid Polym. Sci.* **271**, 76–82 (1993).
16. Knaul, J. Z.; Kasaai, M. R.; Bui, V. T. & Creber, K. A. M. Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Can. J. Chem.* **76**, 1699–1706 (1998).
17. Brugnerotto, J.; Desbrières, J.; Roberts, G. & Rinaudo, M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. *Polymer (Guildf)*. **42**, 09921–09927 (2001).
18. Boiero, M. L.; Mandrioli, M.; Vanden Braber, N. L.; Rodriguez-Estrada, M. T.; García, N. A.; Borsarelli, C. D. & Montenegro, M. A. Gum arabic microcapsules as protectors of the photoinduced degradation of riboflavin in whole milk. *J. Dairy Sci.* **97**, 5328–36 (2014).
19. Giménez, R. E.; Vargova, V.; Rey, V.; Turbay, M. B. E.; Abatedaga, I.; Moran Vieyra, F. E.; Paz Zanini, V. I.; Mecchia Ortiz, J. H.; Katz, N. E. & Ostatná, V. Interaction of singlet oxygen with bovine serum albumin and the role of tryptophan residues and protein structure. *Free Radic. Biol. Med.* **94**, 99-109 (2016).
20. Wilkinson, F. & Brummer, J. G. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **10**, 809–999 (1981).
21. Derosa, M. C. & Crutchley, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **234**, 351–371 (2002).
22. Allen, S. K.; Todd, A. & Allen, J. M. Photochemical formation of singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) in illuminated 6-methylcoumarin solutions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 615–618 (1997).
23. Wang, Q. Z.; Chen, X. G.; Liu N.; Wang, S. X.; Liu, C. S.; Meng, X. H. & Liu, C. G. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydr. Polym.* **65**, 194–201 (2006).
24. Ying, G. Q.; Xiong, W. Y., Wang, H., Sun, Y. & Liu, H. Z. Preparation, water solubility and antioxidant activity of branched-chain chitosan derivatives. *Carbohydr. Polym.* **83**, 1787–1796 (2011).
25. García Bermejo, A. B.; Cardelles-Coba, A.; Ruiz-Matute, A. I.; Montañés, F.; Olano, A. & Corzo, N. Effect of drying methods on the reactivity of chitosan towards Maillard reaction. *Food Hydrocoll.* **29**, 27–34 (2012).
26. Umemura, K. & Kawai, S. Modification of chitosan by the Maillard reaction using cellulose model compounds. *Carbohydr. Polym.* **68**, 242–248 (2007).

27. Kasaai, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* **71**, 497–508 (2008).
28. Kubota, N.; Tatsumoto, N.; Sano, T. & Toya, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr. Res.* **324**, 268–274 (2000).
29. Li, J.; Du, Y. & Liang, H. Low molecular weight water-soluble chitosans: preparation with the aid of cellulase, characterization, and solubility. *J. Appl. Polym. Sci.* **102**, 1098–1105 (2006).
30. Einbu, A.; Grasdalen, H. & Varum, K. M. Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid. *Carbohydr. Res.* **342**, 1055–1062 (2006).
31. Il'ina, A. V. & Varlamov, V. P. Hydrolysis of chitosan in lactic acid. *Appl. Biochem. Microbiol.* **40**, 300–303 (2004).
32. Kim, S. K. & Rajapakse, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydr. Polym.* **62**, 357–368 (2005).
33. Xing, R.; Liu, S.; Guo, Z.; Yu, H.; Li, C.; Ji, X.; Feng, J. & Li, P. The antioxidant activity of glucosamine hydrochloride *in vitro*. *Bioorganic Med. Chem.* **14**, 1706–1709 (2006).
34. Feng, T.; Du, Y.; Li, J.; Wei, Y. & Yao, P. Antioxidant activity of half N-acetylated water-soluble chitosan *in vitro*. *Eur. Food Res. Technol.* **225**, 133–138 (2007).
35. Jung, J. & Zhao, Y. Comparison in antioxidant action between α -chitosan and β -chitosan at a wide range of molecular weight and chitosan concentration. *Bioorganic Med. Chem.* **20**, 2905–2911 (2012).
36. Yen, M. T.; Yang, J. H. & Mau, J. L. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydr. Polym.* **74**, 840–844 (2008).
37. Je, J. Y. & Kim, S. K. Reactive oxygen species scavenging activity of aminoderivatized chitosan with different degree of deacetylation. *Bioorganic Med. Chem.* **14**, 5989–5994 (2006).
38. Park, P. J.; Je, J. Y. & Kim, S. K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydr. Polym.* **55**, 17–22 (2004).
39. Tanielian, C.; Wolff, C. & Esch, M. Singlet oxygen production in water: aggregation and charge-transfer effects. *J. Phys. Chem.* **100**, 6555–6560 (1996).
40. Abdel-Shafi, A. A.; Beer, P. D.; Mortimer, R. J. & Wilkinson, F. Photosensitized generation of singlet oxygen from (substituted bipyridine)ruthenium(II) complexes. *Helv. Chim. Acta* **84**, 2784–2795 (2001).
41. Ferrari, G. V.; Andrada, M. E.; Natera, J.; Muñoz, V. A.; Montaña, P.; Gambetta, C.; Boiero, M. L.; Montenegro, M. A.; Massad, W. A. & García, N. A. The employment of a removable chitosan-derivatized polymeric sensitizer in the photooxidation of polyhydroxylated water-pollutants.

Photochem. Photobiol. **90**, 1251–1256 (2014).

42. Young, R. H.; Martin, R. L.; Feriozi, D.; Brewer, D. & Kayser, R. On the mechanism of quenching of singlet oxygen by amines-III. Evidence for a charge-transfer-like complex. *Photochem. Photobiol.* **17**, 233–244 (1973).

CAPÍTULO 7 - MICROENCAPSULACIÓN DE FLAVONOIDES MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN

7.1. Introducción

El diseño de alimentos funcionales y/o nutracéuticos con aplicaciones específicas está en continuo desarrollo. Para este fin, la aplicación de la microencapsulación de compuestos bioactivos en la industria alimentaria es una de las herramientas más importantes utilizadas ya que, como fue mencionado anteriormente, no sólo constituye una barrera de protección física para sustancias lábiles, sino que también resguarda a dichos compuestos de las condiciones gastrointestinales, permitiendo una liberación controlada de los mismos. ^[1-3]

Quercetina, 3,3',4',5'-7-pentahidroxi flavona, y genisteína, 4',5,7-trihidroxiisoflavona, son fitonutrientes de excelentes propiedades comprobadas. La aplicación de estos flavonoides en alimentos industrializados se fundamenta en su capacidad antioxidante, anti-inflamatoria, antimutagénica y anticancerígena. Sin embargo, su utilización se ve limitada por su escasa solubilidad en agua y su inestabilidad frente a condiciones de procesamiento y almacenamiento de alimentos (temperatura, luz, oxígeno, pH) y de digestión (pH, presencia de enzimas digestivas, etc.). ^[4]

En este contexto, el secado por aspersión (*Spray-Drying*) es la operación unitaria más empleada para formular microcápsulas (MC) debido a su bajo costo, la disponibilidad del equipamiento necesario y la eficiencia que brinda al final del proceso. El tamaño, la estructura y la forma de las partículas dependerán de los materiales de pared que se escojan para su formulación. ^[5,6] Numerosos polifenoles se han estudiado en la conformación de partículas complejas con diferentes materiales de pared asociados a la funcionalidad de las mismas. ^[7-9]

El proceso de *Spray-Drying* consiste en tres pasos fundamentales: la preparación de la emulsión o suspensión del compuesto a encapsular en la solución de material de pared, la homogeneización y estabilización de dicha mezcla y la atomización de la misma para la obtención del producto seco final. ^[6] Una de las principales limitaciones que ofrece el secado por aspersión es que exige que el material de pared o recubrimiento sea soluble en agua. ^[10,11]

En el proceso de secado (**Figura 7.1.**) la temperatura de ingreso del aire caliente suele ser de 150-220 °C lo que permite que la evaporación de agua sea instantánea y luego el producto se enfría a 50-80 °C. ^[11,12] El tiempo de exposición de la micropartícula a elevada temperatura es muy corto, generalmente de unos pocos segundos, por lo que el centro de la misma no llega a alcanzar la temperatura del aire de ingreso y la exposición del compuesto interno termosensible a

posibles cambios es prácticamente inexistente. Esto ha sido probado con innumerables sustancias antioxidantes, lábiles por definición. ^[1]

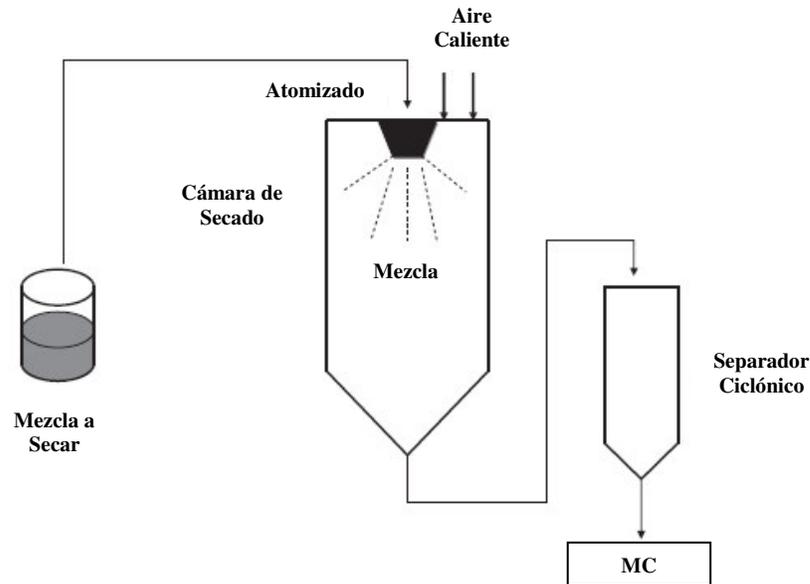


Figura 7.1.: Esquema del proceso de secado por aspersión (*Spray-Drying*).
Adaptado de de Vos y col. (2010).

Las propiedades que Ch aporta a la solución de material de pared son determinantes para la calidad de las MC obtenidas. Lorenzo-Lamosa y col. (1998) ^[13] observaron que, conforme el PM de Ch aumenta, aumenta también la viscosidad de la solución del material de pared, lo cual afecta directamente al tamaño de gota formada en el atomizado y, por ende, a la regularidad en el tamaño de las partículas obtenidas. A su vez, el GDA determina la cristalinidad e hidrofobicidad de Ch, influyendo sobre la capacidad de hinchamiento y liberación del componente encapsulado al re-hidratarse. ^[14]

El empleo de agentes de entrecruzamiento (*crosslinkers*) es crítico en el diseño de la MC ya que, según su presencia, la misma resistirá en mayor o menor medida el pasaje gástrico, reteniendo el componente encapsulado y minimizando las pérdidas del mismo antes del arribo a intestino. ^[10,15] En la actualidad, el empleo de tripolifosfato de sodio (TPP) como *crosslinker* está ampliamente difundido dado que es biocompatible para el organismo humano y forma una red mediada por enlaces iónicos capaz de ceder frente a los cambios de pH del medio circundante a la MC, permitiendo la liberación del activo microencapsulado sin mayor dificultad. ^[14,16]

La microencapsulación de flavonoides en Ch brinda una herramienta específica para el desarrollo de aditivos alimentarios capaces de sortear el pasaje gástrico y llevar al compuesto encapsulado hasta intestino, donde no sólo tiene una mejor absorción y alcance a nivel sistémico, sino que también provee *in situ* de un material antioxidante y anti-inflamatorio capaz de modular procesos patológicos. [8,17,18]

El detalle del presente capítulo contiene:

- Optimización del proceso de microencapsulación de quercetina (Q) y genisteína (G) a través del secado por aspersión: empleo de Ch nativo de PM medio (ChM) y su derivado (ChFM) como materiales de pared.
- Caracterización morfológica por microscopía de barrido electrónico (SEM): comparación de MC obtenidas a partir de ChM y ChFM.
- Evaluación de la eficiencia de microencapsulación (EM).
- Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de MC de ChM y ChFM (MC_{Ch} y MC_{ChF}), con y sin flavonoide, y el compuesto bioactivo libre: evaluación de la desactivación de HO[•], O₂^{•-} y O₂(¹Δ_g).

Dados los resultados expuestos en el **Capítulo 6**, se procedió a microencapsular los flavonoides en estudio con Ch nativo de PM medio y su derivado ChFM (a los fines de realizar comparaciones pertinentes) ya que el descenso de PM de ChM por reacción de *Maillard* brinda un biopolímero (ChFM) de solubilidad considerablemente mejorada a pH fisiológico, con cierta capacidad conservada de deposición sobre el material a microencapsular, propia de la molécula originaria ^[12]. Según Sinha y col. (2004) ^[17], esta característica se relacionaría con el PM y la viscosidad que Ch imparte al sistema, resultando en una mayor eficiencia de encapsulación las moléculas derivadas de PM entre 50-100 kDa que la que proveen moléculas de bajo PM (< 50 kDa) a una misma concentración. Esto es útil para la obtención de partículas complejas por un mecanismo físico-mecánico, como el *Spray-Drying*, en donde no habrá un soporte electrostático considerable como en la gelificación iónica (método físico-químico). ^[16,19]

Los ensayos de capacidad antioxidante *in vitro* se llevaron a cabo sólo con Q microencapsulada en ChM y ChFM, ya que al trabajar con G grado analítico la disponibilidad del flavonoide fue menor. La G, microencapsulada sólo en ChFM, se destinó completamente a los estudios con el modelo murino de colitis ulcerosa generada con DSS (**Capítulo 8**) a los fines de comparar el flavonoide modelo (Q) con uno (G) sin referencia publicada de ensayo en el mencionado modelo.

7.2. Materiales y Métodos

7.2.1. Reactivos

Ch de peso molecular medio (ChM), quercetina (Q), genistéina (G), clorhidrato de nitroazul de tetrazolio (NBT), 2-Desoxi-D-ribosa, clorhidrato de hidroxilamina, tripolifosfato de sodio (TPP), cloruro de tris (bipiridina) rutenio (II) (Ru(bpy)₃Cl₂) y ácido tricloroacético (TCA) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (MO). Mientras que, cloruro férrico (FeCl₃), fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), cloruro de sodio (NaCl), hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de potasio (KCl), bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y ácido ascórbico, todos ellos de grado analítico, se obtuvieron de Cicarelli (Argentina). Los ácidos tiobarbitúrico (TBA) y etilendiaminotetraacético (EDTA), fueron provistos por Merck (Alemania) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido acético glacial (CH₃COOH), ácido clorhídrico (HCl) e isopropanol por Anedra (Argentina)

Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura.

7.2.2. Métodos

7.2.2.1. Microencapsulación de quercetina (Q) y genistéina (G) mediante secado por aspersión

Se preparó la solución de material de pared utilizando ChM 0,5 % (p/v) en ácido acético 0,5 % (v/v); y para ChFM el producto de diálisis que se obtiene en el proceso de funcionalización con un contenido de sólidos evaluado por método gravimétrico de, aproximadamente, 0,5 % (p/v) (la preparación de la mezcla a secar terminó por ajustarse al valor empírico de sólidos).

A la solución de material de pared se le añadió el compuesto bioactivo Q o G en una proporción del 5 % (p/p) de material de pared (0,025 % (p/v)). La mezcla fue homogeneizada a 18.000 rpm durante 5 min, en recipiente al resguardo de la luz. A continuación, bajo constante agitación, se adicionó TPP al 1 % (p/v), como agente de entrecruzamiento, en una relación del 5 % respecto del volumen de la solución del material de pared.

Preparada la mezcla se procedió al secado por aspersión en un equipo BÜCHI Mini B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza) bajo las siguientes condiciones de trabajo: T° de ingreso de 130 °C, T° de salida de 76/78 °C, flujo de aire de 1,05 m³/h, caudal de líquido 4 mL/min y velocidad de bombeo del 10 %.

Se obtuvieron MC vacías se lograron sin el agregado de los compuestos bioactivos, siguiendo el mismo procedimiento planteado en los puntos anteriores. Las mismas se utilizaron como blanco para las distintas evaluaciones a las que se sometieron aquellas con flavonoides.

7.2.2.2. Eficiencia y rendimiento de microencapsulación

Para cuantificar el total de Q o G presente en las MC, una masa exacta se resuspendió en HCl 0,1 N (ruptura o disgregación total de la cápsula) preparado en una mezcla isopropanol:agua (1:1). Esta solución fue sonicada durante 2 h, a modo de asegurar la completa liberación del compuesto bioactivo, y se evaluó su absorbancia (Espectrofotómetro de arreglo de diodos Specord S600, Analytik Jena, Alemania), a 366 nm para Q y 262 nm para G, para su cuantificación mediante el empleo de un coeficiente de extinción molar (ϵ) empírico calculado a partir de una curva de calibración para cada flavonoide, según la ecuación de *Lambert y Beer*.

Del mismo modo, para cuantificar la Q o G fuera de la MC, una masa exacta se resuspendió en una mezcla isopropanol:agua (1:1). Esta solución fue inmediatamente centrifugada a 500 rpm durante 5 min y se evaluó la absorbancia del sobrenadante a 366 nm para Q y 262 nm para G, para su cuantificación.

Para todos los ensayos espectroscópicos de flavonoide microencapsulado se utilizaron blancos de MC vacías a la misma concentración del biopolímero empleado como material de pared.

La eficiencia de microencapsulación (EM) ^[20] se calculó según (Ec. 1):

$$EM (\%) = ([\text{Flavonoide}]_{\text{Dentro}} / [\text{Flavonoide}]_{\text{Total}}) \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

El contenido de flavonoide dentro de MC se calculó a través de la sustracción del contenido total y exterior.

El rendimiento de microencapsulación (RM) fue calculado según (Ec. 2):

$$RM (\%) = (M_A / M_B) \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde M_A = masa obtenida al final del proceso de secado y M_B = masa de sólidos presente en la suspensión a secar.

7.2.2.3. Morfología de microcápsulas (MC)

La morfología de las MC obtenidas fue analizada por microscopía electrónica de barrido (SEM) (Microscopio FE-SEM Modelo SIGMA, ZEISS, Alemania) usando un voltaje de aceleración de 5 kV. Las muestras en forma de polvo fueron adheridas al portamuestras mediante una cinta doble faz conductora de carbono, posteriormente se realizó un depósito conductor de oro con una metalizadora CED 010 (Balzers Union, Liechtenstein).

La distribución de tamaño fue evaluada con el software ImageJ 2014 (Rasban, National Institute of Health, USA).

7.2.2.4. Ensayos de liberación controlada

Una masa de 0,05 g de MC se hidrató con 5 mL de agua ultra pura y se suspendió a través del empleo de un agitador *vortex* durante 5 min. Una vez homogénea la suspensión, la misma se colocó en una membrana de diálisis de PM de corte 12.000 – 14.000 Da (8 cm de longitud) (Sigma Aldrich), y dicho sistema se dializó contra amortiguador gástrico pH 1,2 durante 2,5 h, seguido de 4,5 h en amortiguador intestinal pH 6,8, en *orbital shaker* a 37 °C y 150 rpm a los fines de simular condiciones reales de digestión.

Las soluciones de diálisis se prepararon de la siguiente manera:

- Amortiguador gástrico pH 1,2: NaCl 125 mM; KCl 7mM; NaHCO₃ 45 mM, y HCl para ajustar a pH final.
- Amortiguador intestinal pH 6,8: KH₂PO₄ 50 mM; NaOH 22,4 mM.

La Q liberada se cuantificó por espectroscopía UV-Visible a 366 nm, para lo cual se tomaron muestras del medio a diferentes tiempos de diálisis, y las concentraciones fueron determinadas a partir de curvas de calibración realizadas en cada uno de los sistemas a evaluar.

Los resultados se expresan conforme a (Ec. 3):

$$\% \text{ Liberación} = \frac{[Q]_{\text{Medio de Liberación}}}{[Q]_{\text{Total}}} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

7.2.2.5. Desactivación de radical hidroxilo (HO^\bullet)

HO^\bullet se generó, conforme a Boiero y col. (2014) ^[21], por la reacción de *Fenton*, como fue descrito en el **Capítulo 6**, dando lugar a la formación de MDA por oxidación de la 2-Desoxi-D-ribosa. El MDA en presencia de TBA forma un aducto ($\lambda_{\text{máx}}$: 532 nm) cuya inhibición por competición se traduce como comportamiento antioxidante de MC.

El medio de reacción fue provisto por amortiguador fosfato 50 mM pH 7,4 (400 μL), se añadieron 2-Desoxi-D-ribosa 10 mM (560 μL), H_2O_2 100 mM (50 μL), FeCl_3 1 mM (50 μL), EDTA 5 mM (50 μL), ácido ascórbico 5 mM (40 μL), completando con la suspensión de MC (5 mg/mL en ácido acético 0,5 %v/v) o solución madre de Q pura y agua, hasta volumen final de 2 mL. Luego de un período de incubación de 1 h a 37 °C, se adicionó TBA 1 % (p/v) (1 mL) y TCA 5,6 % (p/v) (1 mL) y se mantuvieron las muestras a 95 °C durante 20 min, para posteriormente leer las respectivas absorbancias.

El porcentaje de desactivación (% D) de HO^\bullet fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (Ec. 4):

$$D (\%) = 100 \times \frac{A_0 - A_x}{A_0} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde A_0 es el valor de absorbancia a 532 nm obtenida para la solución control y A_x es el valor de absorbancia en presencia de las diferentes muestras a diferentes concentraciones. A partir de las pendientes de los gráficos de % D vs. concentración se calculó para cada molécula la concentración efectiva (μM) para desactivar el 50 % de la especie reactiva (CE_{50}).

7.2.2.6. Desactivación de anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

$\text{O}_2^{\bullet-}$ fue generado por la autooxidación del clorhidrato de hidroxilamina conforme a Boiero y col. (2014) ^[21]; el estudio, como fue descrito en el **Capítulo 6**, se basó en la inhibición por competición de la formación de monoformazan (MF^+) ($\lambda_{\text{máx}}$: 560 nm) por reducción del azul de nitrotetrazolium (NBT^{2+}).

El medio de reacción fue provisto por amortiguador fosfato 50 mM pH 8 (500 μ L), se añadieron NBT 1 mM (300 μ L), EDTA 1 mM (100 μ L), clorhidrato de hidroxilamina 5 mM (500 μ L), completando con la suspensión madre de MC (5 mg/mL en ácido acético 0,5 % v/v) o solución madre de Q pura y agua, para abordar las diluciones deseadas, hasta volumen final de 3 ml. Luego de un período de incubación de 1 h a 37 °C, se leyeron las respectivas absorbancias.

El % D de $O_2^{\bullet-}$ fue calculado de acuerdo a Ec. 4 y del mismo modo mencionado la CE_{50} (μ M) para $O_2^{\bullet-}$.

Para la actividad frente a HO^{\bullet} y $O_2^{\bullet-}$, todas las muestras fueron analizadas en un mismo contenido de MC (mg/mL) y, posteriormente, se expresaron en su concentración equivalente de Q (μ M). La concentración de Q fue evaluada espectrofotométricamente a 366 nm con un blanco de MC vacías a la misma concentración de biopolímero empleado como material de pared.

7.2.2.7. Desactivación de oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$)

El consumo fotosensibilizado de oxígeno disuelto, utilizando $Ru(bpy)_3Cl_2$ 57 μ M como sensibilizador, se monitoreó durante 10 min a través del empleo de un microelectrodo sensor de oxígeno con irradiación continua de un LED Blue (emisión a 466 ± 30 nm, 1W) como fuente de excitación, conforme a la metodología propuesta por Giménez y col. (2016) [22]. A su vez, se evaluó el consumo de Q por espectroscopía UV-Visible (Espectrómetro CCD-USB2000, Ocean Optics, USA).

Una suspensión de MC (5 mg/mL) se preparó en HCl 0,1 M y se diluyó (1 mg/mL) en el amortiguador gástrico arriba descripto (inciso 7.2.2.4.). La suspensión resultante se fraccionó en dos partes, una de las cuales se ensayó inmediatamente y, la restante, se incubó 2 h a 37 °C para simular las condiciones fisiológicas de digestión gástrica y ver la pérdida de actividad de Q al someterse a las mismas. También se analizó, a modo de control, Q pura en una concentración equivalente a la que las MC aportan desde el exterior (alrededor de 20 μ M).

7.2.3. Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron analizados con el programa OriginPro 8.5 (OriginLab Software Corporation, USA). Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado y los datos se presentan como el valor de media \pm desviación estándar (DE).

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) a una vía seguido del test *Tukey* como test *post-hoc* con la ayuda del programa InfoStat versión 2014 (Di Rienzo, Casanoves, Balzarini, Tablada & Robledo, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las diferencias entre grupos se consideraron significativas a $P < 0,05$.

7.3. Resultados y Discusión

7.3.1. Caracterización de microcápsulas (MC)

Desai y Park (2005) ^[10], Lorenzo-Lamosa y col. (1997) ^[13], Caddeo y col. (2014) ^[18] y Nunes y Mercadante (2007) ^[23] han obtenido RM en la recolección de polvos, en promedio, del 50 %. Como puede observarse en la **Tabla 7.1.**, los RM del presente trabajo han sido optimizados para el proceso de secado por aspersión. El RM para ChFM fue más alto que el obtenido con ChM, mostrando una diferencia estadística en las MC con Q. Esto podría responder al descenso de PM (PMChM = 583 kDa; PMChFM = 98 kDa) que sufre el biopolímero Ch en la funcionalización por reacción de *Maillard* ya que, al bajar el PM, desciende también la viscosidad de la suspensión y la adherencia de la misma a las paredes de la cámara de secado. ^[12]

Tabla 7.1.: Rendimiento y eficiencia de microencapsulación de quercetina (Q) y genisteína (G) en matrices de quitosano (Ch).

Muestra	Contenido % (p/p) Flavonoide en Masa Total de			EM (%)	RM (%)
	MC				
	Total	Fuera	Dentro		
MC _{Ch} -Q	3,88±0,25 ^a	0,84±0,01 ^b	3,04±0,20 ^a	78±5 ^a	60±5 ^a
MC _{ChF} -Q	3,23±0,25 ^a	0,74±0,01 ^a	2,49±0,25 ^a	77±5 ^a	75±5 ^b
MC _{ChF} -G	2,30±0,20	0,50±0,01	1,80±0,20	78±5	70±6

Medias con una letra común, para una misma columna, no son significativamente diferentes ($P > 0,05$)

Como fue mencionado previamente, la viscosidad de la suspensión a secar es un parámetro fundamental y crítico en la formulación de MC a través de *Spray-Drying*. En una primera instancia, la misma mejora la deposición del material de pared sobre la partícula micro-suspendida que se pretende encapsular, aumentando la EM. ^[17] Ahora bien, una viscosidad elevada compromete la fluidez del sistema, evitando una aspersión homogénea del mismo, lo cual influye, directamente, en la distribución de tamaño de partículas secas finalmente obtenidas. ^[6,10,12,17] Los valores de EM no muestran cambios significativos entre ambos polisacáridos utilizados como material de pared, esto se corresponde, en el caso de Q, con el contenido total e interno de flavonoide en la MC. Sin embargo, estos contenidos (total e interno) entre las MC_{Ch} y las MC_{ChF} difieren en, promedio, un 0,6 % (3,88 % - 3,23 % y 3,04 % - 2,49 %, respectivamente.) y esta diferencia sí repercute significativamente en el contenido de Q por fuera de la partícula.

Sinha y col. (2004) ^[17], explican que la viscosidad de las soluciones de Ch evita una recristalización del activo durante el secado, mejorando la capacidad de entrapamiento del mismo. ChFM perdería parte de esa capacidad en la presente formulación tal como puede observarse en los valores de contenido obtenidos.

G muestra valores de contenido más bajos que Q, pudiendo esto atribuirse a que es un compuesto más lábil frente a las condiciones de procesamiento (suspensión, homogenización, secado). ^[24] Las MC_G quedaron excluidas del análisis estadístico de EM porque se perseguía la comparación de materiales de pared y G sólo se encapsuló en ChF.

Las micrografías SEM (**Figura 7.2.**) muestran partículas individuales, no fusionadas, con superficie lisa y forma esférica. Las MC se observan colapsadas debido a la rápida evaporación del solvente (agua) atribuible al proceso de *Spray-Drying*. El tamaño medio de las MC obtenidas es de, aproximadamente, 2 μm (**Tabla 7.2.**), pero la distribución del tamaño de MC_{Ch} fue más amplia debido a la viscosidad de la suspensión, la cual arroja gotas más heterogéneas durante la pulverización. ^[6,12,17]

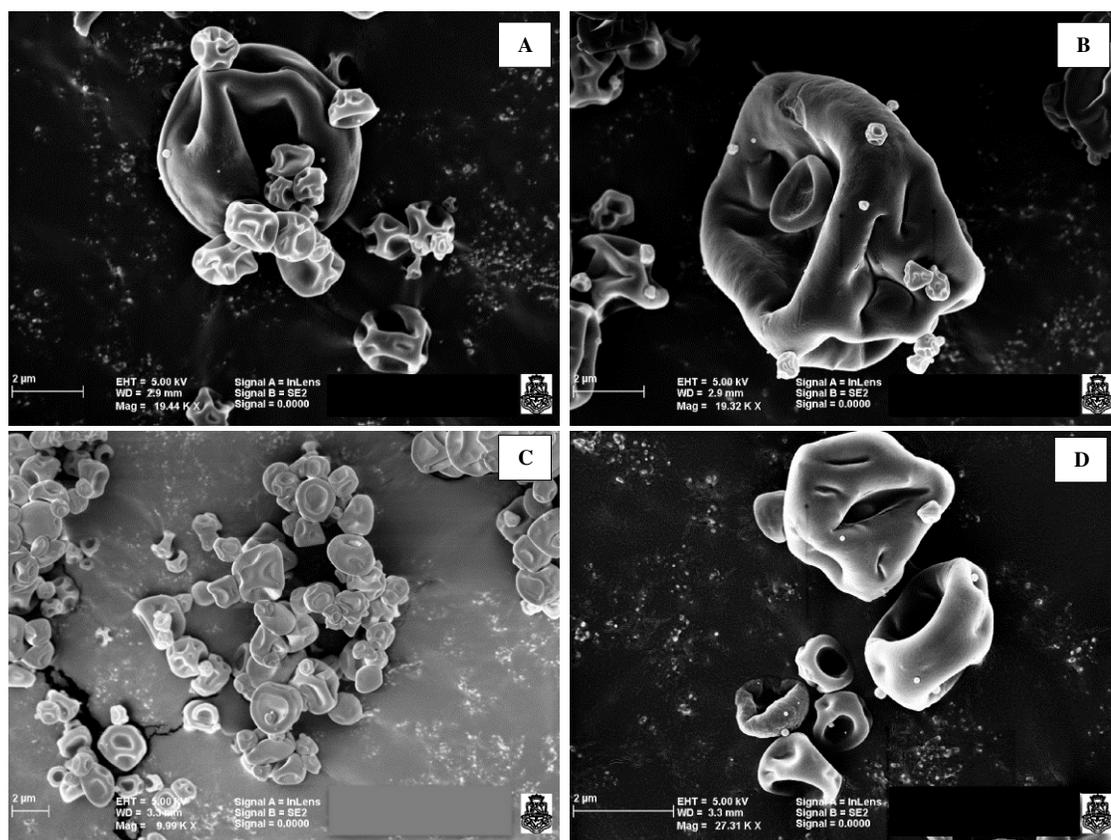


Figura 7.2.: Micrografías SEM de microcápsulas (MC) con quercetina (Q).

Voltaje de aceleración 5 kV. (A y B) MC_{Ch} (Magnitud 19,44 K X y 19,32 K X), (C y D) MC_{ChF} (Magnitud 9,99 K X y 27,31 K X).

Tabla 7.2.: Tamaño de microcápsulas (MC) con quercetina (Q).

Tamaño MC con Q (μm)		
	MC _{ChF}	MC _{Ch}
Media	1,94 \pm 0,70	1,86 \pm 1,90
Máx.	3,50	8,37
Mín.	1,00	0,12

Media \pm DE (n = 100)

Los ensayos de liberación controlada (**Figura 7.3.**) muestran que la Q liberada desde las MC de ChFM fue mayor que aquella proveniente de la MC de ChM, independientemente de que el contenido interno de estas últimas haya sido 0,55 % mayor (**Tabla 7.1.**).

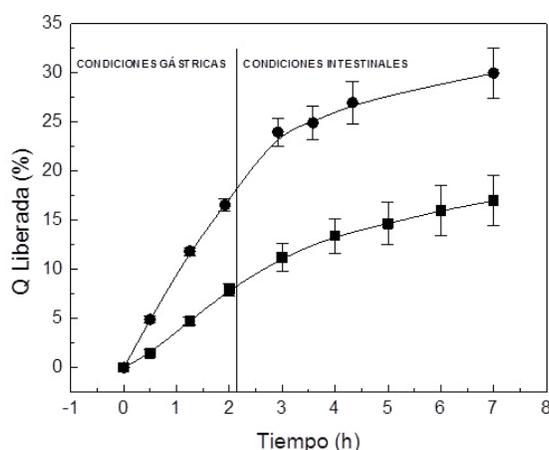


Figura 7.3.: Ensayos de liberación controlada de quercetina (Q) desde microcápsulas (MC).
MC_{Ch} (■) y MC_{ChF} (●).

A partir de estos ensayos se puede concluir que ChFM mejora las cualidades de las MC mostrando una mejor capacidad de hinchamiento y liberación de activo al medio. Luego de 7 h, la Q liberada desde las MC_{ChF} fue del 30 % respecto del contenido total de la partícula, mientras que para MC_{Ch} fue del 15 %. Caddeo y col. (2014) ^[18] reportaron valores similares para un sistema compuesto por el 30 % de Q respecto del material de pared Ch en la mezcla a secar. Guazelli y col. (2013) ^[25] mostraron valores del 40 %, luego de 6 h, para partículas de pectina-caseína obtenidas por coacervación compleja y secadas por aspersión, con una proporción de Q del 20 % respecto del material de pared. En el presente sistema, acorde al diseño de un aditivo

alimentario, la proporción de Q, en función de Ch o ChF, fue del 5 %. El contenido neto liberado en condiciones intestinales fue de 106 μg para MC_{ChF} y de 80 μg para MC_{Ch} .

7.3.2. Desactivación de radical hidroxilo (HO^\bullet) y anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

En la **Figura 7.4.** se muestran gráficos de % D vs. concentración de Q. Para poder llevar a cabo un análisis comparativo se calcularon, a partir de estos datos, las concentraciones necesarias para desactivar el 50 % de cada radical (CE_{50}) que se presentan en la **Tabla 7.3.**

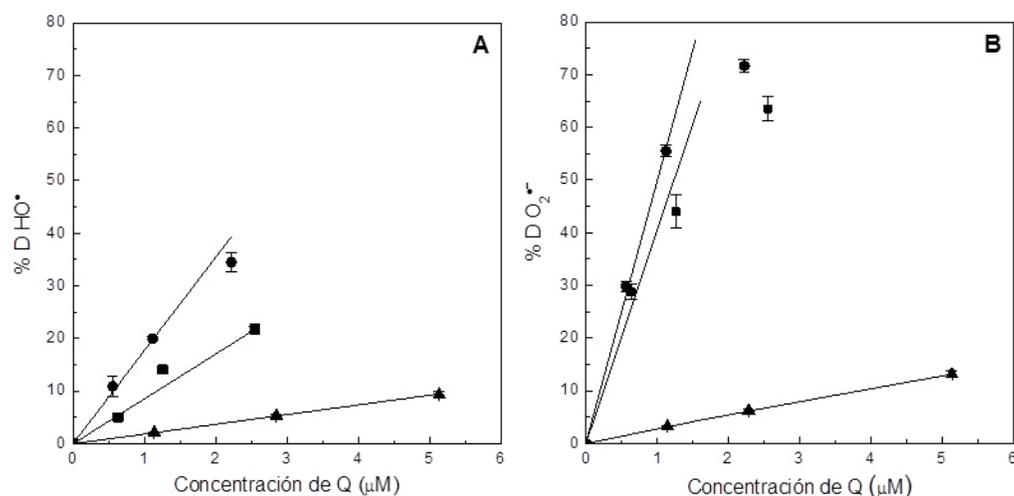


Figura 7.4.: Desactivación (% D) de (A) radical hidroxilo (HO^\bullet) y (B) anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) por microcápsulas (MC).
Q liberada desde MC_{Ch} (■), MC_{ChF} (●) y Q pura (▲).

Tabla 7.3.: Valores extrapolados de concentración efectiva de quercetina (Q) para la desactivación del 50 % (CE_{50}) de radical hidroxilo (HO^\bullet) y anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).

Muestra	CE_{50} (μM)	
	HO^\bullet	$\text{O}_2^{\bullet-}$
Q pura	$26,88 \pm 1,91^c$	$18,52 \pm 1,43^b$
Q desde MC_{Ch}	$5,80 \pm 0,08^b$	$1,23 \pm 0,13^a$
Q desde MC_{ChF}	$2,82 \pm 0,23^a$	$0,82 \pm 0,04^a$

Medias con una letra común, para una misma columna, no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Q posee tres estructuras funcionales a las cuales se les atribuye su actividad antioxidante. En primer lugar, la función catecol en el anillo B; en segundo lugar, el doble enlace entre C2 y C3, en conjunción con el grupo 4-oxo, del anillo C y, finalmente, los grupos –OH de C4 y C5 del anillo A. [26] La capacidad de Q para desactivar radicales libres se asocia, principalmente, a grupos –OH presentes en el anillo B, capaces de donar un hidrógeno acompañado de un electrón a radicales libres [27,28] dando un radical fenoxilo más estable y menos reactivo. [29] El grupo 3' 4' – catecol inhibe la peroxidación lipídica a través del establecimiento de puentes hidrógeno y la deslocalización de electrones en la estructura molecular del flavonoide. [30] Otra función importante de este grupo es la posibilidad de quelar iones de metales de transición intermediarios en vías oxidativas como la reacción de *Fenton*. [31] La sustitución del grupo –OH en C3 del anillo B por un grupo metilo o un glicósido anula casi por completo la actividad antioxidante de Q. [32] De aquí el valor agregado que aporta usarla en su forma aglicona.

Los valores de CE_{50} muestran que la Q microencapsulada tiene un mayor efecto de desactivación de especies radicalarias de oxígeno que Q pura. La diferencia estadística entre Q pura y Q microencapsulada, liberada tanto desde MC_{Ch} como MC_{ChF} , permitiría deducir que la MC actúa como un sistema de reposición permanente de flavonoide en el sistema, como así también que ChM y ChFM contribuyen con sus características *per se* a la actividad de Q. En este contexto, la actividad de Q microencapsulada en ChFM fue 10 veces mayor que Q pura para HO^{\bullet} , y 23 veces mayor para $O_2^{\bullet-}$. Aunque sin diferencia estadística para $O_2^{\bullet-}$, el valor % D para Q en MC_{ChF} resultó ser, aproximadamente, el doble del valor de % D para Q en MC_{Ch} , frente ambas especies reactivas, pudiendo esto responder a lo probado en los ensayos de liberación controlada (mayor cantidad de Q liberada desde MC_{ChF}).

La menor capacidad antioxidante frente a HO^{\bullet} , en comparación a $O_2^{\bullet-}$ (**Figura 7.4.**), podría deberse a que esta especie es generada por reacción de *Fenton*. Existe una actividad competitiva pro-oxidante de flavonoides a través este mecanismo, dependiente de la cantidad de –OH presentes en el anillo B de la molécula, lo que le otorga actividad “redox”, y la naturaleza del agente quelante. [32–34] Puppo (1992) [35] expone que los flavonoides con mayor número de –OH en el anillo B pueden actuar en el ciclo “redox” del Fe, restituyendo el Fe^{2+} en el sistema y cooperando en la formación de HO^{\bullet} ; *in vivo*, la presencia de citrato y ATP como agentes quelantes de Fe promueven la actividad antioxidante de los flavonoides, lo cual se correspondería con la presencia de EDTA en sistemas *in vitro*. Frente a esto, Bors y col. (1990) [36] postulan que

las ventajas antioxidantes de Q *in vivo* podrían reducir dicho efecto adverso, por competición de estas dos actividades. ^[37]

7.3.3. Desactivación de oxígeno molecular singulete ($O_2(^1\Delta_g)$)

La desactivación del estado triplete de $[Ru(bpy)_3^{2+}]^*$ por oxígeno ocurre a través de dos vías: transferencia de electrones, con generación de especies radicalarias, y transferencia de energía generando $O_2(^1\Delta_g)$. ^[38,39] Sin embargo, se ha podido concluir que la desactivación es mediada, principalmente, por un mecanismo de transferencia de energía (Ec. 18-**Capítulo 6**) ya que esta transferencia es más favorable energéticamente que la de electrones. ^[38,40] En conclusión, la principal especie generada por fotosensibilización mediada por $[Ru(bpy)_3^{2+}]$ es $O_2(^1\Delta_g)$.

La desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ por Q microencapsulada fue significativamente diferente a la de Q pura como se muestra en la **Tabla 7.4.** a través del cálculo de las pendientes iniciales de las curvas linealizadas de consumo de oxígeno de las **Figuras 7.5.A y B.** Q microencapsulada fue, aproximadamente, un 20 % más efectiva que Q pura. Del mismo modo que para especies radicalarias, puede observarse que ChM y ChFM actuarían como coadyuvantes del flavonoide aportando una ventaja competitiva a través del proceso de microencapsulación.

Los valores de pendientes de MC_{Ch} con Q son mayores que aquellos de MC_{ChF} en la misma proporción que lo son los % (p/p) del contenido total (**Tabla 7.1.**), siendo, ambas relaciones, de 1,2 (**Tabla 7.1.**) Se puede deducir, entonces, que la mayor actividad de desactivación de las MC de ChM es relativa a la cantidad neta de flavonoide aportado al sistema.

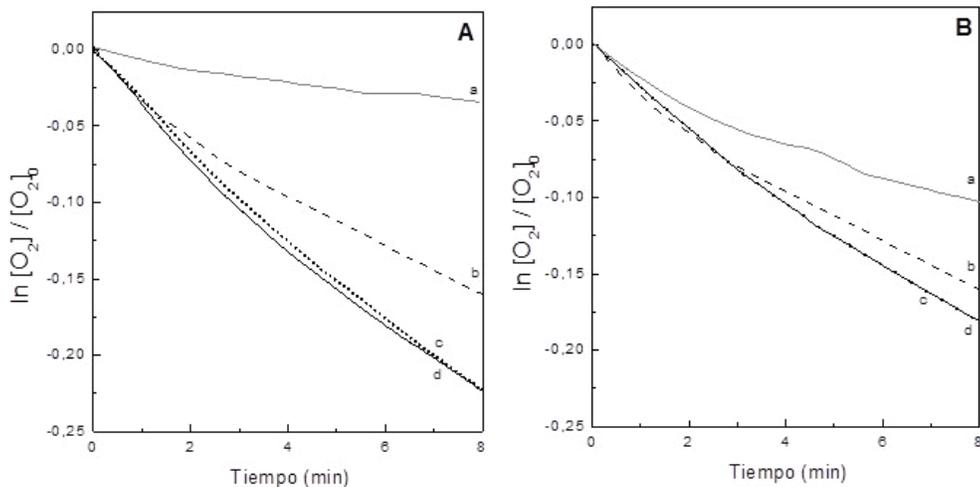


Figura 7.5.: Perfil de consumo de oxígeno por microcápsulas (MC) con quercetina (Q) (curvas linealizadas) mediante fotosensibilización en estado estacionario de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$ en condiciones gástricas simuladas. (A) MC_{Ch} vacía (a), Q pura (b), MC_{Ch} con Q t = 0 h (c) y t = 2 h - $T^\circ = 37^\circ\text{C}$ (d). (B) MC_{ChF} vacía (a), Q pura (b), MC_{ChF} con Q t = 0 h (c) y t = 2 h - $T^\circ = 37^\circ\text{C}$ (d).

Tabla 7.4.: Reactividad de microcápsulas (MC) frente a oxígeno molecular singulete ($\text{O}_2 (^1\Delta_g)$). Valores de pendientes iniciales de desactivación a partir de curvas linealizadas.

	Pendiente $\times 10^{-4}$ (min^{-1}) $\text{MC}_{\text{Ch}}\text{-Q}$	Pendiente $\times 10^{-4}$ (min^{-1}) $\text{MC}_{\text{ChF}}\text{-Q}$
Q pura 20 μM		$3,95 \pm 0,04^{\text{b}}$
MC-Q 0 h	$5,50 \pm 0,03^{\text{c}}$	$4,45 \pm 0,03^{\text{c}}$
MC-Q 2 h - 37 $^\circ\text{C}$	$5,68 \pm 0,04^{\text{c}}$	$4,48 \pm 0,03^{\text{c}}$
MC vacía	$0,91 \pm 0,03^{\text{a}}$	$2,46 \pm 0,03^{\text{a}}$

Medias con una letra común, para una misma columna, no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Las **Figuras 7.6.A y 7.6.B** muestran que Q pura es totalmente consumida por $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$. Además, la **Figura 7.7.** muestra que el sistema de trabajo no pudo haber dado lugar a una fotodegradación de Q ya que la muestra se excitó a mayor longitud de onda que la usada para monitorear Q (366 nm).

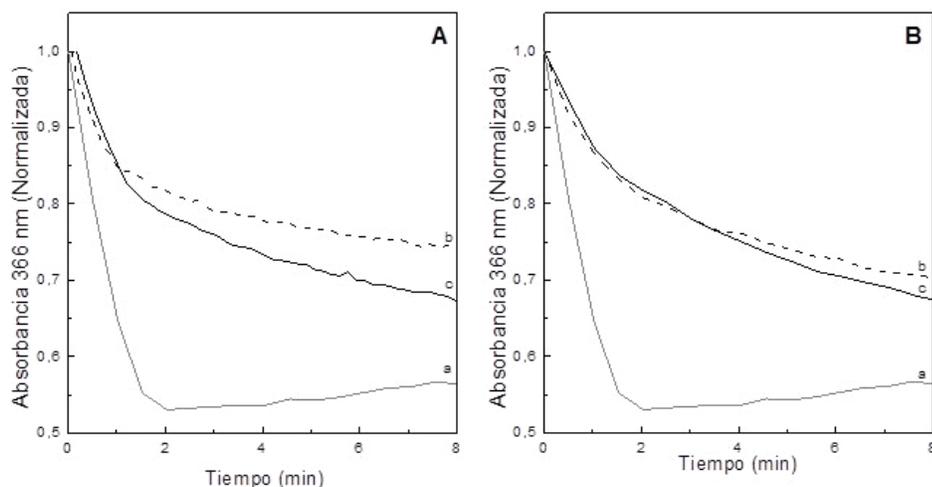


Figura 7.6.: Consumo de quercetina (Q) monitoreado a 366 nm (curvas normalizadas).

(A) Q pura (a), MC_{Ch} con Q t = 0 h (b) y t = 2 h - T° = 37 °C (c).

(B) Q pura (a), MC_{ChF} con Q t = 0 h (b) y t = 2 h - T° = 37 °C (c).

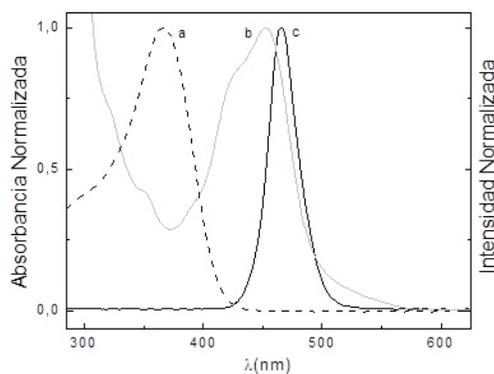


Figura 7.7.: Bandas de absorbancia (normalizadas) de quercetina (Q) (a) [Ru(bpy)₃]²⁺ (b) e intensidad (normalizada) del LED Blue (c).

Morales y col. (2012) ^[41] expusieron, para Q, una relación entre la constante total (k_t) y reactiva (k_r) de desactivación de O₂ (¹Δ_g) igual a 1. Morán Vieyra y col. (2009) ^[28] obtuvieron lo mismo, para un flavonoide particular en estudio, bajo condiciones básicas de pH. El incremento en los valores de absorbancia luego de los 4 min (**Figura 7.6.**), podría deberse a productos de oxidación por la incorporación de O₂ (¹Δ_g) al doble enlace C2=C3 del anillo C, con la consecuente formación de un hidroperóxido intermediario. ^[42] Puede observarse que Q pura se consume totalmente, esto no sucede con la Q encapsulada ya que la MC es un sistema de

reposición de flavonoide en el medio. A su vez, luego de 2 h bajo condiciones de digestión gástrica a 37 °C, la actividad de la MC con Q frente a O₂ (¹Δ_g) no se vio en absoluto afectada, observándose el mismo valor de pendiente que a t=0 (**Tabla 7.4.**).

Es importante destacar que las MC formuladas con ChFM mejoran considerablemente las propuestas de partículas obtenidas con Ch nativo como material de pared. Caddeo y col. (2014)^[18] encapsulan Q con una mezcla de Ch y goma xántica para ser dispensada en colon, la goma mejoraría la capacidad hinchamiento y liberación de la MC, lo cual en el presente trabajo se logra con la funcionalización de Ch, que mejora su solubilidad a pH fisiológico y, por ende, su hidratación en medios biológicos. Guazelli y col. (2013)^[25] encapsulan Q en una matriz de pectina y caseína, con el empleo de glutaraldehído, compuesto altamente tóxico^[12], para dar estructura a la partícula obtenida por coacervación compleja, un método costoso y difícil de escalar; la formulación del presente trabajo utiliza TPP para entrecruzar a Ch y las partículas se obtienen a través de un método físico ampliamente utilizado en la industria de alimentos, lo cual coopera con la inocuidad de la preparación. Kumari y col. (2010)^[43] desarrollaron nanopartículas de Q en ácido poliláctico; muestran que Q conserva su capacidad antioxidante frente a DDPH luego de la síntesis de nanopartículas; sin embargo no observan, como en los resultados expuestos en el desarrollo de esta tesis, que el material de pared coopere en las propiedades bioactivas de la Q encapsulada. Pool y col. (2012)^[4] también desarrollaron nanopartículas de Q en ácido poliláctico y ellos pudieron observar una capacidad antioxidante mejorada de la Q encapsulada. Ahora bien, el ácido poliláctico permitiría la liberación de Q en estómago para su absorción directa en intestino delgado, sin llegar a colon.

De esta manera, ChFM se convierte en un potencial material de pared para la obtención de MC capaces de sortear el pH gástrico y liberar, de manera controlada, compuestos bioactivos en intestino grueso.

7.4. Conclusión

Dados los resultados obtenidos, puede concluirse que la microencapsulación de flavonoides en matrices de Ch constituye una excelente alternativa para formular un aditivo nutracéutico que pueda utilizarse para generar un efecto benéfico en el organismo de quien lo consume. Además Ch no actúa como mero excipiente, sino que también coadyuva al activo encapsulado en su desempeño.

La funcionalización de Ch por reacción de *Maillard* mejoró la capacidad de las partículas para hidratarse y liberar el flavonoide en el sitio de acción.

En efecto, el presente capítulo sugiere que el secado por aspersion constituye una técnica adecuada para obtener partículas gastro-resistentes. Las MC obtenidas mostraron una buena eficiencia de microencapsulación, un elevado rendimiento de proceso y una morfología acorde a la técnica de obtención de las mismas. Estas características, acopladas a la capacidad mucoadherente de Ch ^[44,45], permiten diseñar una partícula de liberación controlada que podría mejorar la biodisponibilidad del flavonoide en intestino, específicamente en colon.

7.5. Referencias

1. Desai, K. G. H. & Jin Park, H. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technol.* **23**, (2005).
2. Champagne, C. P. & Fustier, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 184–190 (2007).
3. Borgogna, M.; Bellich, B.; Zorzini, L.; Lapasin, R. & Cesàro, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chem.* **122**, 416–423 (2010).
4. Pool, H.; Quintanar, D.; Figueroa, J.; Marinho Mano, C.; Bechara, J. E. H.; Godínez, L. A. & Mendoza, S. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. *J. Nanomater.* doi: 10.1155/2012/145380 (2012).
5. Gouin, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 330–347 (2004).
6. Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A. & Saurel, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res. Int.* **40**, 1107–1121 (2007).
7. Kosaraju, S. L.; Labbett, D.; Emin, M.; Konczak, I. & Lundin, L. Delivering polyphenols for healthy ageing. *Nutr. Diet.* **65**, (2008).
8. Fang, Z. & Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols-A review. *Trends Food Sci. Technol.* **21**, 510–523 (2010).
9. Sun-Waterhouse, D.; Wadhwa, S. S. & Waterhouse, G. I. N. Spray-Drying microencapsulation of polyphenol bioactives: a comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants. *Food Bioprocess Technol.* **6**, 2376–2388 (2013).
10. Desai, K. G. H. & Park, H. J. Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres. *J. Microencapsul.* **22**, 377–395 (2005).
11. de Vos, P.; Faas, M. M.; Spasojevic, M. & Sikkemaa, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. J. Chem. Tech. Res.* **20**, 292–302 (2010).
12. Estevinho, B. N.; Rocha, F.; Santos, L. & Alves, A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications-A review. *Trends Food Sci. Technol.* **31**, 138–155 (2013).
13. Lorenzo-Lamosa, M. L.; Remuñán-López, C.; Vila-Jato, J. L. & Alonso, M. J. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J. Control. Release* **52**, 109–118 (1998).

14. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A. & Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**, 19–34 (2004).
15. Desai, K. G. H. & Park, H. J. Preparation and characterization of drug-loaded chitosan-tripolyphosphate microspheres by spray drying. *Drug Dev. Res.* **64**, 114–128 (2005).
16. Shu, X. Z. & Zhu, K. J. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *Int. J. Pharm.* **233**, 217–225 (2002).
17. Sinha, V. R.; Singla, A. K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Bansal, K. & Dhawan, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. Pharm.* **274**, 1–33 (2004).
18. Caddeo, C.; Nácher, A.; Diez-Sales, O.; Merino-Sanjuán, M.; Fadda, A. M. & Manconi, M. Chitosan-xanthan gum microparticle-based oral tablet for colon-targeted and sustained delivery of quercetin. *J. Microencapsul.* **2048**, 1–6 (2014).
19. Tan, Q.; Liu, W.; Guo, C. & Zhai, G. Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 1621–1630 (2011).
20. McNamee, B. F.; O’Riordan, E. D. & O’Sullivan, M. Effect of partial replacement of gum arabic with carbohydrates on its microencapsulation properties. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3385–3388 (2001).
21. Boiero, M. L.; Mandrioli, M.; Vanden Braber, N. L.; Rodriguez-Estrada, M. T.; García, N. A.; Borsarelli, C. D. & Montenegro, M. A. Gum arabic microcapsules as protectors of the photoinduced degradation of riboflavin in whole milk. *J. Dairy Sci.* **97**, 5328–36 (2014).
22. Giménez, R. E.; Vargova, V.; Rey, V.; Turbay, M. B. E.; Abatedaga, I.; Moran Vieyra, F. E.; Paz Zanini, V. I.; Mecchia Ortiz, J. H.; Katz, N. E. & Ostatná, V. Interaction of singlet oxygen with bovine serum albumin and the role of tryptophan residues and protein structure. *Free Radic. Biol. Med.* **94**, 99–109 (2016).
23. Nunes, I. L. & Mercadante, A. Z. Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **50**, 893–900 (2007).
24. Williamson, G. & Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am.J. Clin. Nutr.* **81**, 243S–255S (2005).
25. Guazelli, C. F. S.; Fattori, V.; Colombo, B. B.; Georgetti, S. R.; Vicentini, F. T. M. C.; Casagrande, R.; Baracat, M. M. & Verri, W. A. Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *J. Nat. Prod.* **76**, 200–208 (2013).
26. Burda, S. & Oleszek, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2774–2779 (2001).

27. Russo, N.; Toscano, M. & Uccella, N. Semiempirical molecular modeling into quercetin reactive site: structural, conformational, and electronic features. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3232–3237 (2000).
28. Morán Vieyra, F. E.; Boggetti, H. J.; Zampini, I. C.; Ordoñez, R. M.; Isla, M. I.; Alvarez, R. M. S.; De Rosso, V.; Mercadante, A. Z. & Borsarelli, C. D. Singlet oxygen quenching and radical scavenging capacities of structurally-related flavonoids present in *Zuccagnia punctata* Cav. *Free Radic. Res.* **43**, 553–64 (2009).
29. Gonzalez, E. A. Reactividad química de flavanonas presentes en cítricos: Su relación con aplicacines industriales y nutraceuticas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Santiago del Estero (2005).
30. Jurasekova, Z.; Domingo, C.; Garcia-Ramos, J. V & Sanchez-Cortes, S. Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-Visible and Raman) spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 12802–12811 (2014).
31. Jurasekova, Z.; Torreggiani, A.; Tamba, M.; Sanchez-Cortes, S. & Garcia-Ramos, J. V. Raman and surface-enhanced Raman scattering (SERS) investigation of the quercetin interaction with metals: Evidence of structural changing processes in aqueous solution and on metal nanoparticles. *J. Mol. Struct.* **918**, 129–137 (2009).
32. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572–584 (2002).
33. Hanasaki, Y.; Ogawa, S. & Fukui, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 845–850 (1994).
34. Cao, G.; Sofic, E. & Prior, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 749–760 (1997).
35. Puppo, A. Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by fenton-type reactions; influence of the iron chelator. *Phytochemistry* **31**, 85–88 (1991).
36. Bors, W.; Heller, W.; Michel, C. & Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **186**, 343–355 (1990).
37. Galey, J. B. Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Adv. Pharmacol.* **38**, 167–203 (1996).
38. Muazzani, Q. G.; Sun, H.; Hoffman, M. Z.; Ford, W. E. & Rodgers, M. A. J. Quenching of the excited states of ruthenium(II)-diimine complexes by oxygen. *J. Phys. Chem.* **2**, 1145–1150 (1994).
39. Tanielian, C.; Wolff, C. & Esch, M. Singlet oxygen production in water: aggregation and charge-transfer effects. *J. Phys. Chem.* **100**, 6555–6560 (1996).

40. Timpson, C. J.; Carter, C. C. & Olmsted, J. Mechanism of quenching of electronically excited ruthenium complexes by oxygen. *J. Phys. Chem.* **93**, 4116–4120 (1989).
41. Morales, J.; Günther, G.; Zanocco, A. L. & Lemp, E. Singlet oxygen reactions with flavonoids. A theoretical-experimental study. *PLoS One* **7**, 1–8 (2012).
42. Matsushima, H. & Nakawma, R. Photosensitized oxygenation of 3-hydroxyflavones as a nonenzymatic model for quercetinase. *Photoinduced Reac.* **26**, 435–443 (1970).
43. Kumari, A.; Yadav, S. K.; Pakade, Y. B.; Singh, B. & Yadav, S. C. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. *Colloids Surf., B* **80**, 184–192 (2010).
44. He, P.; Davis, S. S. & Illum, L. *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.* **166**, 75–88 (1998).
45. Dhawan, S.; Singla, A. K. & Sinha, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS Pharm Sci. Tech.* **5**, e67 (2004).

CAPÍTULO 8 - APLICACIÓN EN MODELO MURINO DE COLITIS GENERADA CON DSS

8.1. Introducción

Como se expuso en el **Capítulo 5**, el tracto gastrointestinal de mamíferos está continuamente expuesto a numerosos microorganismos como así también a toxinas provenientes del ambiente o presentes en los alimentos consumidos, lo que lo convierte en una zona de alta vulnerabilidad. Dos de las más importantes EII, la EC y CU, se caracterizan por una inflamación crónica del intestino con etiología multifactorial. ^[1]

DSS es un polisacárido sulfatado, soluble en agua, cargado negativamente, con una variación de PM desde 5 a 1400 kDa, utilizado para desarrollar modelos de estudio de colitis *in vivo*. El potencial colitogénico del DSS es PM dependiente. El modelo murino de colitis más próximo a la patología en humanos se alcanza con la administración de DSS de 40-50 kDa en el agua de bebida, a una concentración promedio del 3 % (p/v). ^[2]

Una característica importante relacionada con la colitis generada a partir del suministro de DSS es que, a diferencia de la enfermedad en humanos, no se requieren células T y B para el desarrollo de la misma. Esta limitación sin embargo, permite el estudio de la contribución del sistema inmune innato al desarrollo de la inflamación intestinal con el aporte esencial de las bacterias intestinales. ^[3]

Laroui y col. (2012) ^[4] han demostrado que el mecanismo de acción del DSS está mediado por la formación de nanolipocomplejos (vesículas) con ácidos grasos de cadena media, como el dodecanoato, presentes en abundante cantidad en colon. Estas vesículas de aproximadamente 200 nm de diámetro pueden fusionarse con las membranas celulares de los enterocitos, internalizarse y, en el citoplasma, estimular cascadas de señalización que activan el proceso inflamatorio. ^[5] La fusión de las vesículas ocurre porque los ácidos grasos de cadena media interactúan con las claudinas ^[6], componentes sustanciales en las zonas de oclusión. En el mismo sentido, Coyne y col. (2000) ^[7], han probado *in vivo* que el anión caprato (C12) altera las uniones estrechas (*tight junctions*) modulando la transferencia génica viral, con un mecanismo de acción similar al propuesto para DSS. ^[6]

Las características clínicas e histológicas inducidas por el suministro de DSS al 3 % (p/v) en agua de bebida son un reflejo de lo que acontece en CU en humanos. Se inducen cambios histológicos agudos a partir de 4 a 7 días de dosificación, acompañándose con pérdida de peso, diarrea, sangrado en heces y encorvamiento. ^[3] La disrupción de la integridad de barrera (**Figura 8.1.**) se refleja histológicamente en la depleción de mucina y células *goblet*, erosión epitelial y

ulceración. En efecto, DSS induce un influjo de neutrófilos en la lámina propia y submucosa. Los efectos crónicos de DSS, logrados con la dosificación cíclica (períodos intermedios de descanso cada 7 días de dosificación, aproximadamente), resulta en la infiltración de leucocitos mononucleares (monocitos, linfocitos).^[3]

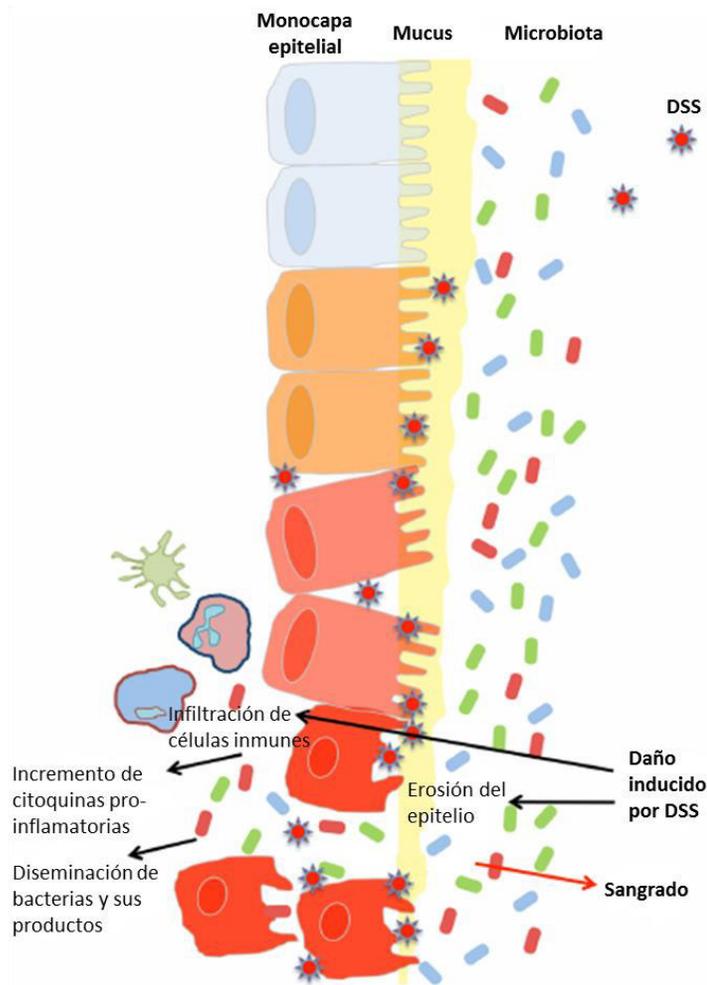


Figura 8.1.: Representación esquemática del mecanismo de la colitis inducida por DSS.
Adaptado de Chassaing y col. (2014).

La patogenicidad de la CU ha sido estudiada a lo largo del tiempo desde dos aristas fundamentales: los procesos inflamatorios y los oxidativos. Ambos procesos confluyen en el denominado “estallido respiratorio”, donde las mismas células de la inmunidad innata, concentradas en el sitio de acción, generan gran cantidad de EROS y ON, resultando en daño del tejido y malestar generalizado. ^[1,8-14]

Por sus propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, los flavonoides, y los polifenoles en general ^[15-19], han sido ampliamente estudiados en modelos de inflamación intestinal ya que, frente a la cronicidad de estas patologías, resulta de gran interés la modulación de la inflamación desde la dieta. ^[20-22] Incluso, su consumo desde fuentes naturales muestra con el tiempo una menor tendencia a contraer cáncer de colon a través de un efecto protector relacionado a su actividad anti-mutagénica y anti-proliferativa. ^[23,24] Su empleo en estado puro para la formulación de alimentos nutraceuticos y funcionales no asegura su arribo a colon, ya que su absorción es a nivel de estómago e intestino delgado ^[25], como ha sido mencionado en el

Capítulo 2.

La microencapsulación es una herramienta de gran utilidad para el desarrollo de este tipo de aditivos alimentarios. Lorenzo- Lamosa y col. (1998) ^[26] y Caddeo y col. (2014) ^[27] sugieren que Ch es un material de pared adecuado para soportar las condiciones gástricas y dispensar el activo encapsulado en intestino grueso. Guazelli y col. (2013) ^[28] mostraron la efectividad mejorada de Q microencapsulada en un sistema de pectina-caseína en un modelo de colitis generada con ácido acético.

En este contexto, el derivado ChFM obtenido por reacción de *Maillard* entre Ch nativo de PM medio y clorhidrato de D-glucosamina, soluble a pH fisiológico, se convierte en un material de pared de características mejoradas dado que, pasadas las condiciones gástricas, su capacidad de hinchamiento y liberación controlada en intestino arrojarían un efecto potencialmente más eficaz del flavonoide en cuestión.

El detalle del presente capítulo contiene:

- Aplicación de MC de ChFM (MC_{ChF}) con quercetina (Q) y genisteína (G) en un modelo murino de colitis ulcerosa generada con DSS: seguimiento clínico.
- Análisis histológico de colon.
- Evaluación de la actividad anti-inflamatoria en homogenato de colon a través del ensayo de citoquinas y quimioquinas.
- Determinación de la actividad de mieloperoxidasa (MPO) y N-acetilglucosaminidasa (NAG): indicadores de la infiltración de neutrófilos y macrófagos, respectivamente.
- Evaluación del estrés oxidativo en homogenato de colon: determinación de la actividad de SOD y catalasa y la presencia de MDA como producto de peroxidación lipídica de membrana.

8.2. Materiales y Métodos

8.2.1. Ratonés

Para el modelo animal se utilizaron ratones hembra de entre 6 y 8 semanas de edad de la cepa C57BL/6. Estos animales fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos, alojados en jaulas colectivas a 22 ± 1 °C en ciclos de 12 h de luz/oscuridad (luces encendidas a las 7:00 a.m.) con acceso libre a comida de laboratorio y agua potable. Los experimentos se llevaron a cabo durante la fase de luz del ciclo. Todos los experimentos con animales se realizaron en conformidad con las directivas del comité institucional de bioética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

8.2.2. Reactivos

DSS fue provisto por Dextran Products Limited (Canadá). Clorhidrato de nitroazul de tetrazolio (NBT), metionina, riboflavina, ácido tricloroacético (TCA), bromuro de hexadecil-trimetil amonio, p-nitrofenil-2-acetamida- β -D-glucopiranosida, Tritón X-100, inhibidores de proteasas e isotiocianato de fluoresceína (FITC) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (MO). Los ácidos tiobarbitúrico (TBA) y etilendiaminotetraacético (EDTA) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), fueron provistos por Merck (Alemania). Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) y fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), ácido acético glacial (CH_3COOH), etanol, cloroformo, cloruro de sodio (NaCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4), todos ellos de grado analítico, se obtuvieron de Cicarelli (Argentina). El reactivo de *Bradford* para ensayo de contenido de proteínas fue provisto por Bio-Rad (USA) y tetrametilbenzidina (TMB) por BD Biosciences (USA).

8.2.3. Métodos

8.2.3. Modelo de colitis ulcerosa (CU) generada con DSS. Tratamiento con quercetina (Q) y genisteína (G) microencapsuladas en derivado soluble de quitosano (ChF)

Se llevó a cabo un modelo de 10 días conforme a Pedrotti y col. (2016).^[29] Los grupos ensayados (n=3/4; realizado 2 veces) fueron separados en Control Normal, Colitis, Colitis + MC_Q/MC_G y Colitis + MC vacía (MC_V). El DSS fue suministrado al 3 % (p/v) en agua de bebida

durante los primeros 5 días, luego se reemplazó por agua 4 días y al día 10 se procedió al sacrificio. Las MC en estudio se administraron diariamente durante la inducción de colitis, en 3 dosis por día, de 75 µL/animal de una suspensión de 1 mg/100 µL en CH₃COOH 0,25 % (v/v). Los grupos Control Normal y Colitis recibieron dosis equivalentes de mezcla solvente. Los animales se evaluaron clínicamente, a diario, tomando su peso y recolectando heces para valorar la consistencia y posible presencia de sangre oculta o evidente en las mismas. Se determinó, de esta manera, el índice de enfermedad (IE) que es el resultado combinado de la pérdida de peso, la consistencia de las heces y el sangrado.^[30] Para la pérdida de peso, se asignó un valor de 0 si el peso corporal aumentó o se mantuvo dentro del 1 % de la línea de base, 1 para un 1 % a 5 % de pérdida, 2 para un 5 % a un 10 % de pérdida, 3 para un 10 % a 15 % de pérdida, y 4 para una pérdida de peso mayor al 15 %. Para consistencia de las heces, 0 correspondió a heces formadas y duras, 2 para heces húmedas y de menor consistencia y 4 para heces líquidas. En la determinación de sangre se asignó 0 a la ausencia de la misma en las heces, 2 a la presencia de sangre oculta y 4 para la hemorragia evidente.

Una vez finalizado el experimento se evaluaron longitud y peso de colon y se procedió a su muestreo para análisis histológico, citoquinas pro y anti-inflamatorias, estrés oxidativo e infiltración de neutrófilos y macrófagos a través de los ensayos de MPO y NAG.

8.2.3.2. Análisis histológico

Secciones de colon distal se fijaron inmediatamente en solución de Carnoy (60 % de etanol, 30 % de cloroformo y 10 % de ácido acético) y se embebieron en parafina. Luego, secciones de 5 µm fueron montadas en portaobjetos de vidrio y desparafinadas. Para el análisis histológico los cortes fueron teñidos utilizando el método estándar hematoxilina-eosina (H&E). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido de epifluorescencia asociado a cámara fotográfica (Eclipse TI-S, Nikon, USA).

8.2.3.3. Preparación de homogenatos de colon

Después del sacrificio, se tomó inmediatamente muestra del tejido en estudio, se lavó con amortiguador PBS y se almacenó a -80 °C, en caso de no proceder a su análisis.

Las determinaciones siguientes se hicieron en homogenato de colon de aproximadamente 0,05 g de tejido en 1,5 mL de amortiguador de lisis compuesto por PBS, Tritón X-100 1 % (v/v) e

inhibidores de proteasas 1 % (v/v). El homogenato fue centrifugado a 10.000 rpm (Centrífuga Micro 17R, Thermo Fisher Sorvall Legend, USA) durante 5 min, a 4 °C, se separó el sobrenadante y se evaluó el contenido de proteínas totales a través del método de *Bradford*.

8.2.3.4. Medición de citoquinas y quimioquinas

TNF- α y MCP-1 (BD Biosciences) y las interleuquinas IL-6 e IL-10 (BD Pharmingen) se midieron en los homogenatos de colon mediante el uso de *kits* de ELISA, tal como está especificado por los fabricantes. La lectura de las diferentes densidades ópticas se llevó a cabo con un lector de microplacas Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, USA).

8.2.3.5. Actividad de mieloperoxidasa (MPO)

Los ensayos de la actividad de MPO, indicativa del infiltrado de neutrófilos en colon, se realizaron conforme a Bento y col. (2011) ^[30]. Los segmentos de tejido de colon obtenidos luego del sacrificio se homogeneizaron en una solución amortiguadora al 5 % (p/v) de EDTA/NaCl (pH 4,7) y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sedimento se resuspendió en bromuro de hexadecil-trimetil amonio al 0,5 % (p/v) (pH 5,4), y las muestras se congelaron, y se descongelaron, en una mezcla de hielo seco/etanol anhidro tres veces consecutivas. Las muestras se centrifugaron nuevamente y el sobrenadante se utilizó para el ensayo de MPO. Para determinar la actividad enzimática a 50 μ L del sobrenadante recogido se adicionaron 50 μ L de TMB, y se frenó la reacción con 25 μ L de H₂SO₄ 2 N.

La absorbancia se midió en un lector de microplacas a 450 nm, dentro de los 30 min, y los resultados se expresaron como DO a 450 nm por mg de tejido.

8.2.3.6. Actividad de N-acetilglucosaminidasa (NAG)

Los ensayos de la actividad de NAG, indicativa del infiltrado de macrófagos en colon, se realizaron conforme a Bento y col. (2011) ^[30]. Los segmentos de tejido de colon obtenidos luego del sacrificio se homogeneizaron en una solución amortiguadora al 5 % (p/v) de EDTA/NaCl (pH 4,7) y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sedimento se resuspendió en bromuro de hexadecil-trimetil amonio al 0,5 % (p/v) (pH 5,4), y las muestras se congelaron y se

descongelaron, en una mezcla de hielo seco/etanol anhidro tres veces consecutivas. Las muestras se centrifugaron nuevamente y el sobrenadante se utilizó para el ensayo de NAG. Para determinar la actividad enzimática NAG se adicionaron 25 μL de p-nitrofenil-2-acetamida- β -D-glucopiranosida 2,25 mM (pH 4,5). La absorbancia se midió en un lector de microplacas a 405 nm, dentro de los 30 min, y los resultados se expresaron como DO a 405 nm por mg de tejido.

8.2.3.7. Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD se estimó, conforme a Liaudat y col. (2014) ^[31], a través de su capacidad para inhibir la reducción fotoquímica del NBT (Ecs. 15 y 17-**Capítulo 6**) en una mezcla EDTA 1 μM (25 μL), amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,8 (25 μL), metionina 13 mM (25 μL), NBT 75 μM (25 μL) y riboflavina 40 μM (100 μL). Las determinaciones se realizaron en homogenato de colon mediante medidas espectroscópicas (Espectrofotómetro de arreglo de diodos Specord S600, Analytik Jena, Alemania) a 560 nm. Los resultados se expresaron como U SOD/mg de proteína (una unidad SOD se define como la cantidad de enzima que causa el 50 % de inhibición de la reducción fotoquímica del NBT).

8.2.3.8. Actividad de catalasa

Según la técnica de Aebi (1984) ^[32], se colocaron 300 μL de homogenato de colon en 1,3 mL de amortiguador fosfato 50 mM pH 7 y 1,25 mL de agua bidestilada. A la mezcla anterior se le adicionaron 150 μL de H_2O_2 y, de manera inmediata, se evaluó la extinción del H_2O_2 a 240 nm durante 1 min.

8.2.3.9. Peroxidación lipídica: malondialdehído (MDA)

Conforme a Esterbauer y col. (1982) ^[33], un volumen de 1 mL de homogenato de colon se mezcló con 2 mL de TCA al 10 % (p/v) y 2 mL de TBA 0,67 % (p/v), llevándolo luego a un baño de agua a 85 °C durante 15 min. Se enfrió la mezcla 5 min bajo agua corriente y se evaluó la absorbancia a 532 nm. A través de la ecuación de *Lambert y Beer* y atendiendo a un ϵ para el MDA, a 532 nm, de $1,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, los resultados se expresaron en μmoles de MDA/mg de proteína.

8.2.3.10. Marcación de microcápsulas (MC_V) con FITC

Las MC_V se marcaron con FITC conforme a la reacción espontánea de Qaqish y Amiji (1999).^[34] A 300 μ L de una suspensión 1 mg de MC por cada 100 μ L de CH_3COOH 0,25 % (v/v) se le adicionaron 200 μ L de una solución de FITC en DMSO 1 μ g/ μ L, se incubó la mezcla 90 min a 37 °C. Posteriormente, se adicionaron 500 μ L de PBS y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. Eliminado el sobrenadante, se resuspendió el pellet de MC en 300 μ L de CH_3COOH 0,25 % (v/v) a los fines de dosificar a 4 animales. Luego de 4 y 5 h se sacrificaron, respectivamente, 2 animales para ensayar por duplicado la presencia de MC en duodeno, yeyuno, íleon y colon a través de la recolección del contenido intestinal por sucesivos lavados con PBS. Los lavados de cada sección se evaluaron por citometría de flujo, obteniéndose 100.000 eventos (MC marcadas) con un equipo FAC-SCanto (BD Pharmingen, USA) que se analizaron con el software FlowJo (Tree Star Incorporation, USA).

A modo de control, 2 animales fueron dosificados con la solución de FITC en DMSO 1 μ g/ μ L, y se procedió como se describió para las MC.

8.2.4. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado y los experimentos se realizaron al menos 2 veces. Los datos se presentan como el valor de media de cada grupo de análisis \pm error estándar (EE). Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) a una vía seguido del test Tukey como test *post-hoc* con la ayuda del programa InfoStat versión 2014 (Di Rienzo, Casanoves, Balzarini, Tablada & Robledo, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las diferencias entre grupos se consideraron significativas a $P < 0,05$.

8.3. Resultados y Discusión

8.3.1. Seguimiento clínico

Las **Figuras 8.2.A** y **8.2.B** muestran el seguimiento clínico de los tratamientos con MC_Q y MC_G, respectivamente. Como puede observarse, a partir del quinto día, el grupo Colitis comienza a mostrar síntomas clínicos que no se manifiestan en los grupos tratados con los flavonoides encapsulados. El tratamiento con MC_V no llega a reducir los signos clínicos de los animales en el tratamiento con MC_G de modo estadísticamente significativo, pero sí muestra una estadística intermedia en el de MC_Q.

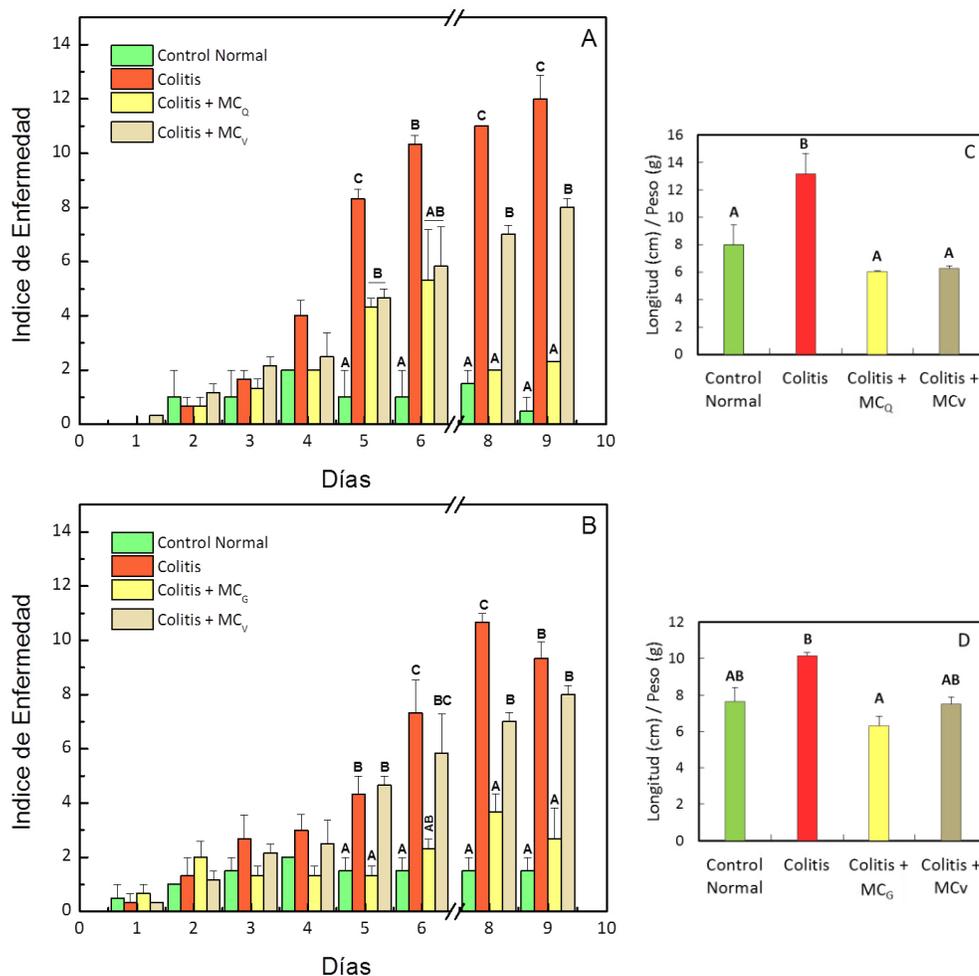


Figura 8.2.: Gráficos de índice de enfermedad (IE) y relación longitud/peso de colon. (A y C) Tratamiento con MC_Q. (B y D) Tratamiento con MC_G. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

A su vez, las **Figuras 8.2.C y 8.2.D**, ilustran la magnitud del proceso inflamatorio representado por un acortamiento y pérdida de peso de colon. ^[3] Se observa que en los animales que fueron dosificados con MC_Q y MC_G estos parámetros fueron similares al grupo Control Normal (**Figura 8.3.**).

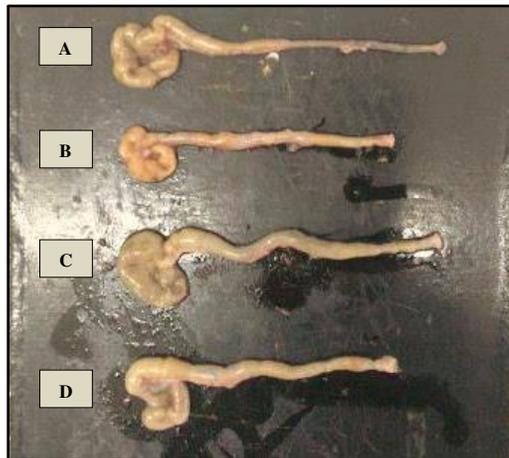


Figura 8.3.: Fotografía de colon luego del sacrificio. (A) Control Normal. (B) Colitis. (C) Colitis + MC_G . (D) Colitis + MC_V .

En lo que concierne al IE, la pérdida de peso es uno de los factores más significativos en su cálculo. En las **Figuras 8.4.A y 8.4.B** se representa la pérdida de peso de los animales a lo largo del ensayo. Al quinto día, el grupo Colitis comenzó a tener un decaimiento permanente a lo largo del tiempo mientras que, los animales tratados con MC_Q y MC_G , atenuaron el efecto del DSS llegando al décimo día en condiciones similares a las de los animales que no lo consumieron (Control Normal).

El resultado apreciable del seguimiento clínico muestra un efecto protector de las MC_Q y MC_G frente al DSS, dado que el efecto tóxico del mismo comienza entre los días 5 y 7 de suministro ^[3] y los animales bajo tratamiento no evidenciaron el decaimiento esperado. Los animales tratados con MC_V retrasan la pérdida de peso un día en el tratamiento con MC_Q , sin embargo, su ingesta no logra aminorar el efecto del DSS a lo largo del tiempo.

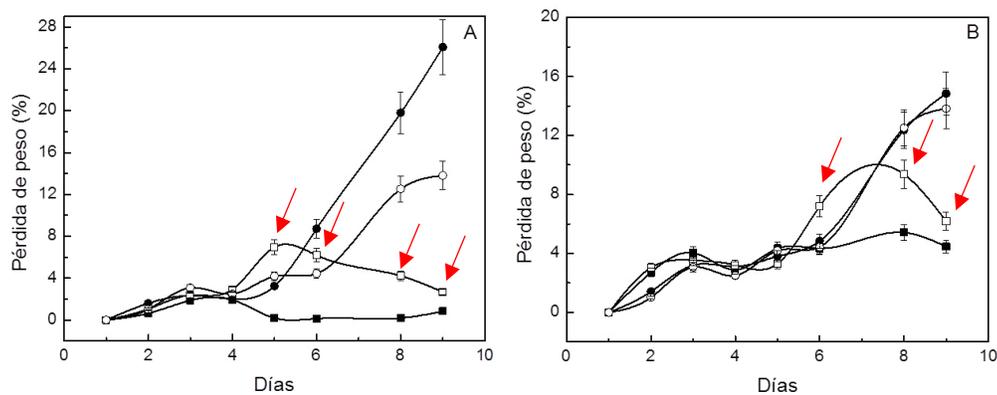


Figura 8.4.: Pérdida de peso en tratamientos con flavonoides microencapsulados.

(A) Tratamiento con MC_Q. (B) Tratamiento con MC_G.

(■) Control Normal. (●) Colitis. (□) Colitis + MC_{Q/G}. (○) Colitis + MC_V.

8.3.2. Análisis Histológico

Las micrografías de las tinciones H&E se exponen en la **Figura 8.5**. De cada grupo se muestra una imagen de un corte longitudinal (micrografía de mayor tamaño) y uno transversal (micrografía de menor tamaño).

Este análisis complementa los datos del seguimiento clínico a lo largo del ensayo en cuanto a los efectos del tratamiento. La CU generada a través del DSS se caracteriza por una disrupción de la funcionalidad de la mucosa como barrera de protección, lo cual genera un contacto directo de la microbiota con el tejido linfoide asociado a intestino, dando lugar a una respuesta inflamatoria exacerbada con infiltrado inflamatorio en lámina propia.

El daño en el grupo Colitis se confirma a través de la depleción de las células caliciformes (células *goblet*) secretoras de *mucus* y la pérdida de la arquitectura epitelial, acompañada de infiltración de células leucocitarias y formación de abscesos.^[1,5] Este patrón se repite, en gran medida, en los animales tratados con MC_V. Los animales tratados con MC_Q y MC_G muestran perfil histológico de colon con arquitectura de mucosa conservada, en este contexto, la micrografía de corte transversal del tejido bajo ingesta de MC_Q evidencia menos daño que el tratado con MC_G.

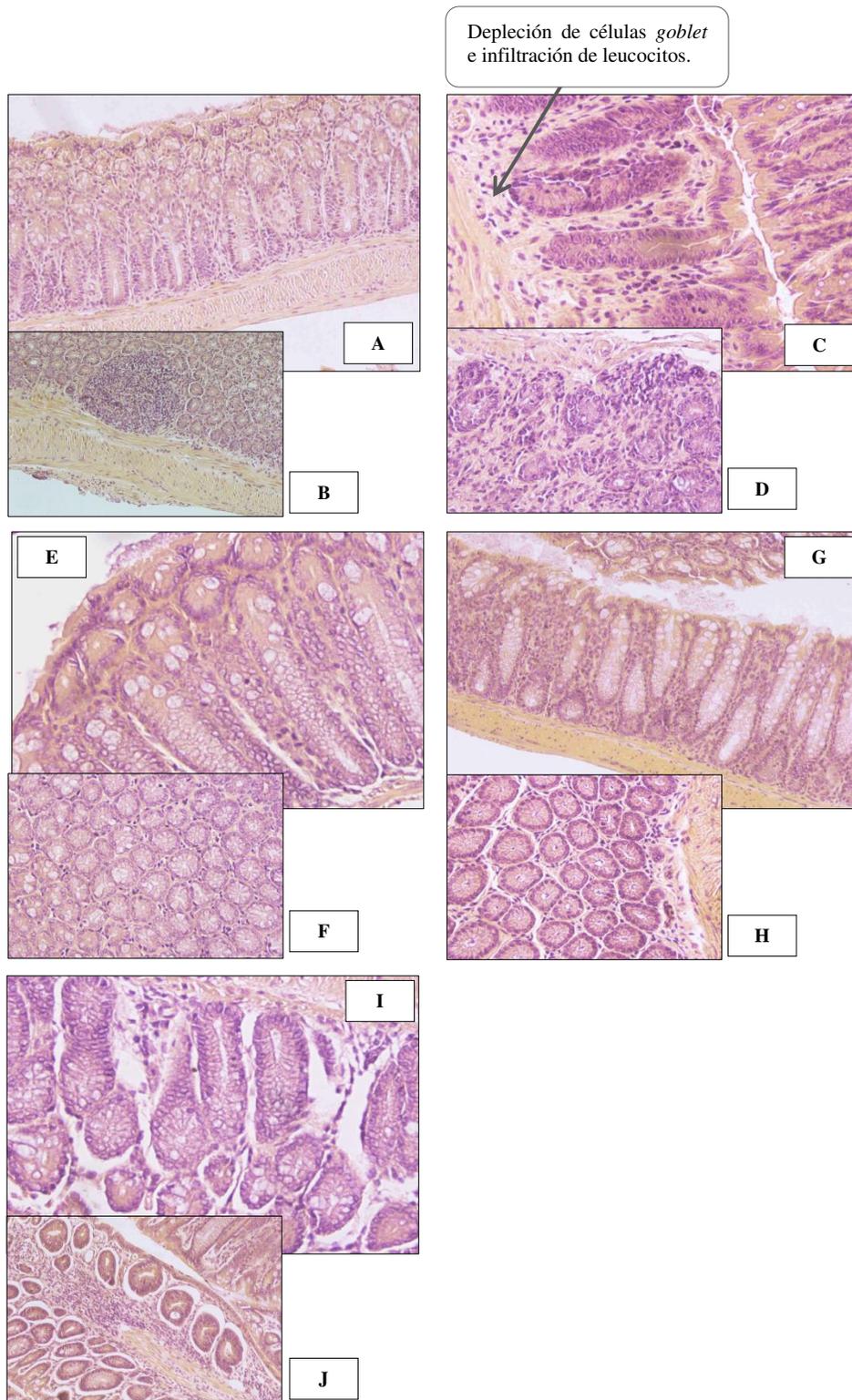


Figura 8.5.: Micrografías de tinciones hematoxilina-eosina (H&E) (400x).
(A y B) Control Normal. (C y D) Colitis. (E y F) Colitis + MC_Q. (G y H) Colitis + MC_G. (I y J) Colitis + MC_v.

8.3.3. Citoquinas y quimioquinas

Las citoquinas son mediadores claves en el sistema inmune intestinal y son fundamentales para mantener la homeostasis.^[35] Los niveles de citoquinas en tiempo y espacio coordinan el desarrollo, recurrencia y gravedad del proceso inflamatorio en las enfermedades inflamatorias intestinales. La inmunidad innata en este tipo de patologías juega un rol crítico ya que células dendríticas activadas, macrófagos y neutrófilos secretan citoquinas que activamente regulan la inflamación en la CU, mediando la diferenciación y activación de células T de la inmunidad adaptativa.^[9]

La **Figura 8.6.** muestra los resultados obtenidos en el ensayo de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias. Para ambos tratamientos, con MC_Q y MC_G, los niveles de IL-6 y TNF- α (**Figuras 8.6.A, 8.6.B, 8.6.C y 8.6.D**) presentaron valores equivalentes a los animales Control Normal, sin diferencia estadística; lo mismo mostraron los animales tratados con MC_V. IL-6 y TNF- α son citoquinas pleiotrópicas que inducen la producción de otros mediadores inflamatorios, moléculas de adhesión, proliferación de fibroblastos, etc. IL-6, a través del transductor de señal y activador de la traducción-3 (STAT3), ha sido relacionada con muchas de las características clínicas de la EC y la CU.^[36]

MCP-1, también denominada CCL-2, regula la migración e infiltración de monocitos y macrófagos.^[37] Los resultados obtenidos para MCP-1 muestran que MC_Q y MC_G, como así también MC_V, son capaces de restablecer y/o mantener a este mediador en niveles basales sin diferencia estadística con el grupo Control Normal (**Figuras 8.6.E y 8.6.F**).

Como se expuso en el **Capítulo 2**, G y Q inhiben la inducción, estimulada por TNF- α , de moléculas de adhesión celular derivadas del endotelio vascular, interrumpiendo también el comienzo de la cascada de señalización inflamatoria mediada por el factor nuclear κ B (NF- κ B) a través del impedimento de la fosforilación de la subunidad I κ B α del NF- κ B. Esto se traduce en una actividad anti-inflamatoria de notable evidencia.^[38-40] Esta actividad podría resumirse en el efecto inhibitorio de ciertos flavonoides sobre tirosina quinasa (enzima interviniente en la fosforilación de residuos de tirosina mediante el consumo de ATP). Q actúa sobre quinasas varias, G tiene un efecto específico sobre tirosina quinasa.^[38,41] Dicho efecto está relacionado a la presencia de un grupo -OH en C5 del anillo A. Daidzeína es una isoflavona de soja que no

presenta dicho grupo y tampoco el mencionado efecto inhibitorio. ^[38] La competencia con el ATP sería la clave reactiva de esta capacidad. ^[41]

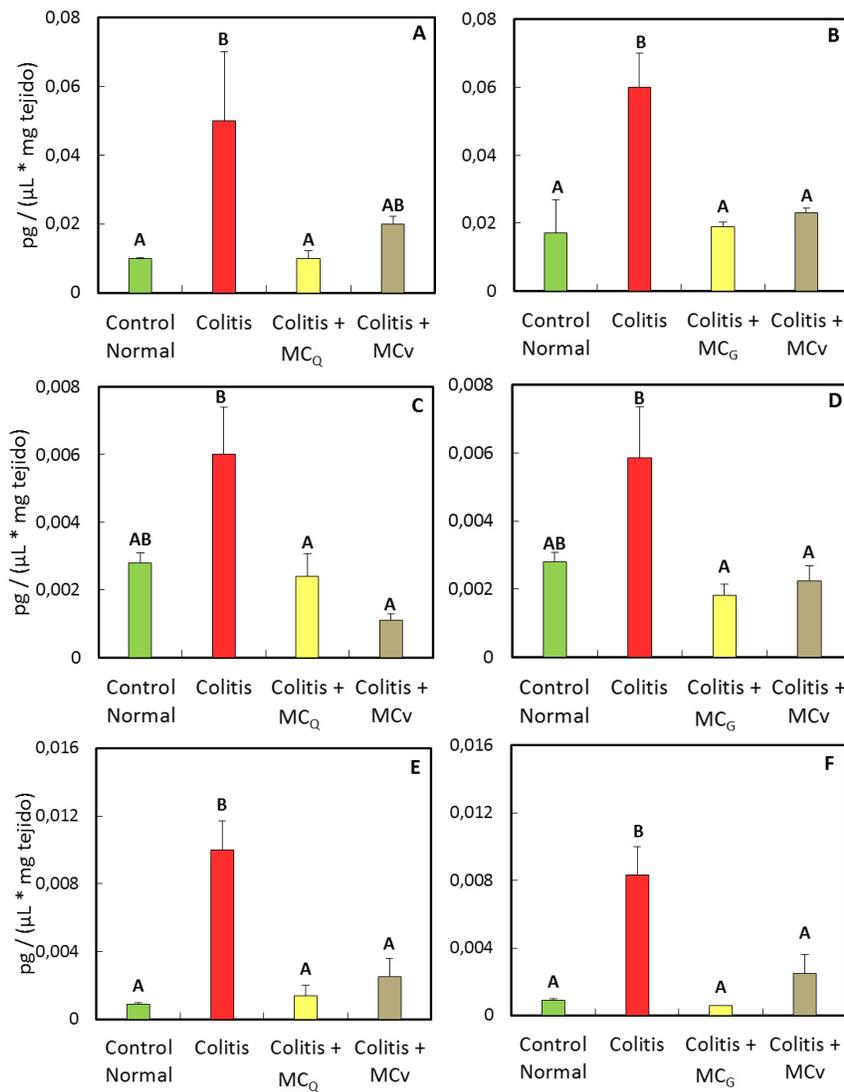


Figura 8.6.: Citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias.

(A y B) IL-6. (C y D) TNF-α. (E y F) MCP-1.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria capaz de inhibir la presentación de antígenos y la subsecuente producción de citoquinas pro-inflamatorias, por lo tanto, es capaz de atenuar los efectos de las mismas sobre la mucosa. [9] La **Figura 8.7.** muestra que los tratamientos con ambos flavonoides microencapsulados en ChFM llevaron los niveles de IL-10 a parámetros normales, sin diferencia estadística para Colitis + MC_G y Control Normal. Los valores para Colitis + MC_V fueron tan bajos como para el grupo Colitis. Estos resultados, podrían claramente explicar porqué el grupo Colitis + MC_V no evidenció aminorar los síntomas clínicos. En el **Capítulo 4** se mencionó que Ch nativo es un fuerte inductor de citoquinas anti-inflamatorias de manera dosis dependiente en intestino delgado. En estas condiciones experimentales, la cantidad de ChF presente en las dosis de MC diarias, como así también la presencia de TPP como *crosslinker*, la conformación física de las MC y el modelo experimental con DSS, que afecta selectivamente a colon, no guardan suficiente concordancia con las características del modelo probado por Porporatto y col. (2004) [42].

A su vez, el PM podría condicionar la inducción de tolerancia, dado que la misma dependería de la internalización celular de residuos de N-acetilglucosamina a través del receptor de manosa por parte de ciertos leucocitos. [43] Atendiendo a que ChF derivado de Ch nativo de PM medio, arrojó un PM de 98 kDa (**Capítulo 6**), peso que duplica la masa molecular del empleado por Porporatto y col. (2004) [42], el potencial tolerogénico podría ser menor, en cuanto a la producción de esta citoquina regulatoria.

En efecto, la actividad de las MC_V evaluadas a través de citoquinas pro-inflamatorias sugiere una modulación por parte de ChFM que no llega a ser suficiente para reducir las manifestaciones clínicas de la patología.

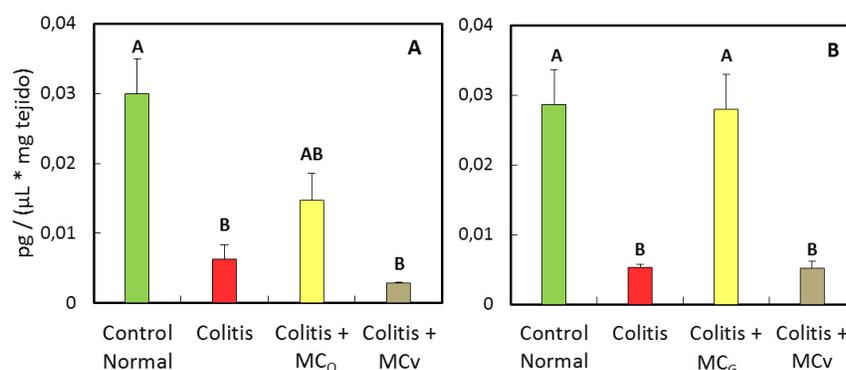


Figura 8.7.: Citoquina anti-inflamatoria IL-10.
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

8.3.4. Actividad de mieloperoxidasa (MPO) y N-acetilglucosaminidasa (NAG)

La enzima MPO está presente en los fagosomas de los neutrófilos y de los monocitos. Es responsable de la actividad microbicida contra un amplio espectro de microorganismos. En los PMN estimulados, la MPO cataliza la producción de ácidos hipohalogenosos, principalmente ácido hipocloroso (Ec. 1), y otros intermediarios tóxicos que aumentan poderosamente la actividad microbicida.



Una vez producido el hipoclorito (ClO^-), éste forma una serie de productos microbicidas como el cloro (Cl_2), cloraminas, HO^\bullet y O_2 ($^1\Delta_g$). [44] MPO es, en conclusión, un nexo entre procesos inflamatorios y oxidativos y es un indicador indirecto de la infiltración de neutrófilos en lámina propia.

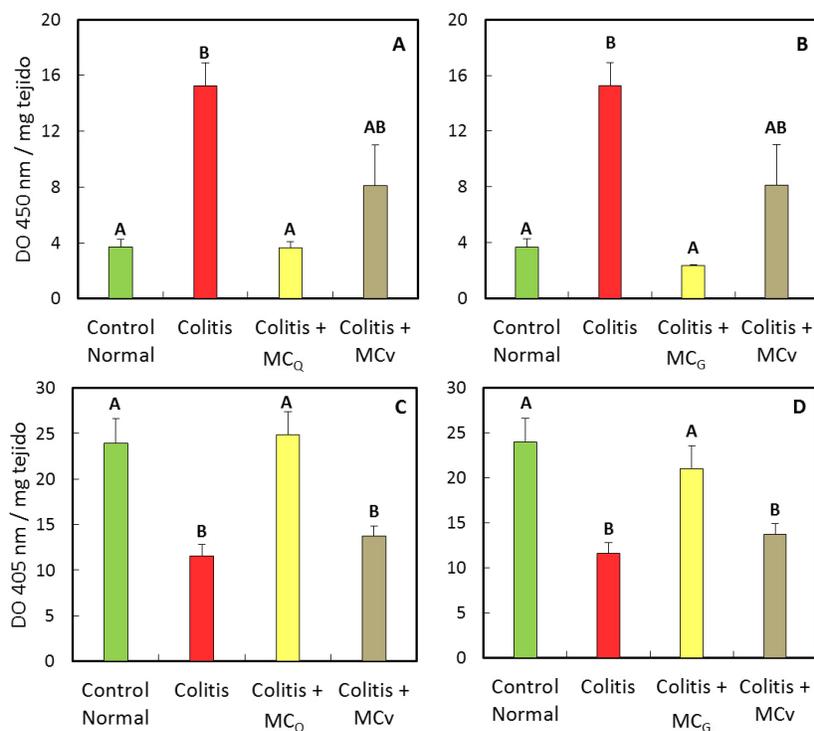


Figura 8.8.: Actividad de mieloperoxidasa (MPO) y n-acetilglucosaminidasa (NAG).
(A y B) MPO. (C y D) NAG.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Los resultados obtenidos (**Figuras 8.8.A y 8.8.B**), muestran que la actividad de MPO en animales Colitis + MC_{Q/G} ha sido comparable a la de animales Control Normal, en los que el tejido colónico está intacto. Así mismo, los animales que ingirieron MC_V presentan una actividad intermedia entre el grupo Colitis y Control Normal, mostrando que el efecto es dependiente de la actividad propia del flavonoide. La menor actividad de MPO observada con el tratamiento podría atribuirse al incremento significativo de la IL-10 ya que en un modelo de *shock* hemorrágico se ha detectado reducida actividad de MPO en pulmones luego de la inhalación de IL-10. [45]

De manera homóloga, la enzima NAG ilustra la infiltración de macrófagos en lámina propia. Las **Figuras 8.8.C y 8.8.D** muestran la reducción de esta actividad en los grupos Colitis y Colitis + MC_V. A simple vista, los resultados parecieran contradecir los expuestos para MPO, pero la colitis generada con DSS tiene como clave la infiltración masiva de neutrófilos y una progresión a una respuesta del tipo T *helper* 1 (Th1). [3,5,12,46,47] En el tiempo evaluado (día 10), la infiltración de PMN generaría un efecto de dilución de la actividad de los macrófagos presentes en el sitio de inflamación. En conclusión, la mayor actividad de MPO indicaría una elevada tasa de neutrófilos en el tejido evidenciándose en los grupos con menor actividad de NAG.

8.3.5. Estrés oxidativo

Numerosa evidencia clínica y experimental ha demostrado que las inflamaciones agudas y crónicas se asocian con una exacerbada producción de EROS de alta reactividad química, entre ellas: radicales libres, como O₂^{•-} y HO[•], y moléculas no radicalarias, como O₂ (¹Δ_g) y H₂O₂. Las mismas inducen un grado de estrés oxidativo crítico en la patofisiología de la inflamación intestinal. [48,49]

El aporte de sustancias antioxidantes desde la dieta coopera en la regulación y desactivación de especies reactivas intrínsecamente vinculadas al proceso inflamatorio porque actúan, también, como mediadores en el reclutamiento de células inmunes. [49,50]

Las **Figuras 8.9.A y 8.9.B** ilustran la actividad de SOD en homogenatos de colon de los animales sometidos a los diferentes tratamientos. Los animales Control Normal mostraron una actividad SOD *per se* dado que todo tejido, aún en condiciones fisiológicamente estables, se expone a EROS derivados de la respiración celular. Ahora bien, aquellos animales que consumieron flavonoides encapsulados en ChF, junto con DSS, mostraron un nivel de actividad

SOD inferior al grupo Colitis resaltando la importancia del aporte de estos fitonutrientes desde la dieta.

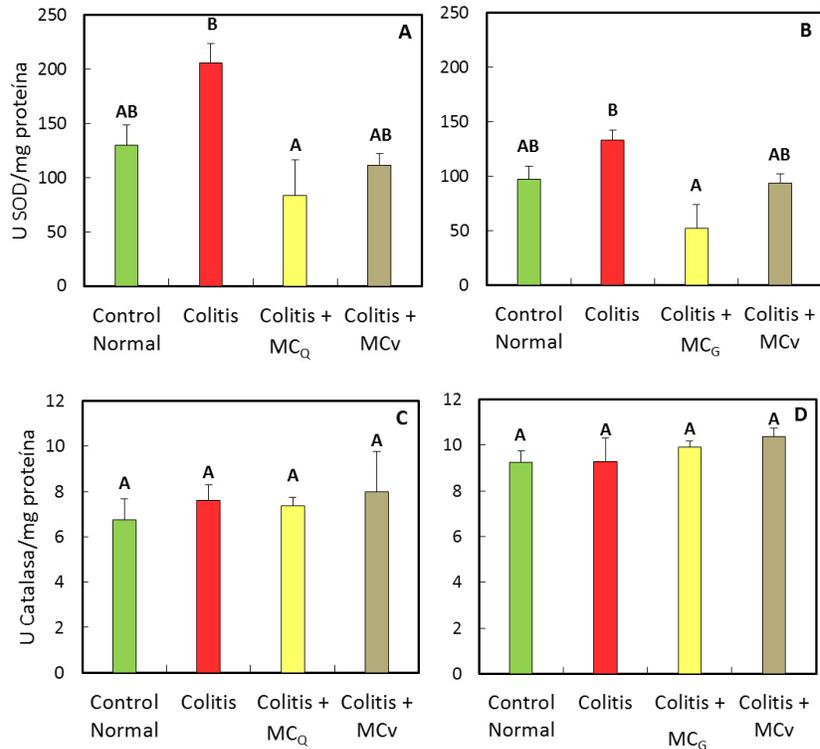


Figura 8.9.: Actividad de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa.
(A y B) SOD. (C y D) Catalasa.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Korenaga y col. (2002) ^[46] han estudiado la actividad de SOD en CU generada con DSS a lo largo de diferentes ciclos (7 días DSS al 4 % en agua de bebida seguidos de 14 días de agua, con repeticiones de hasta 4 ciclos), a los fines de comparar estadios de inflamación aguda con instancias carcinogénicas de la enfermedad. Ellos concluyen que en el período agudo de la patología (ciclo 1), la actividad de SOD se incrementa casi 2 veces respecto de animales sanos. Luego (ciclos 2, 3 y 4), la misma descende, dada la intensidad del daño que el tejido sufre tras constante contacto con EROS. Wong y Goeddel (1988) ^[51], confirmaron la inducción autócrina de la isoforma manganeso SOD (Mn-SOD) por citoquinas como el TNF- α ; la misma generación de EROS actuaría como inductora de SOD en todas sus isoformas.

Los resultados obtenidos para catalasa (**Figuras 8.9.C y 8.9.D**), no muestran diferencia estadística de su actividad en ninguno de los grupos experimentales. La actividad de catalasa se incrementa a altas concentraciones de H_2O_2 [52], trabaja en colaboración con la enzima glutatión peroxidasa que se activa frente a concentraciones bajas de H_2O_2 , los resultados denotan la suficiencia de la actividad basal de catalasa frente a la concentración de H_2O_2 generada por dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$.

La peroxidación lipídica es un indicador de la magnitud del daño generado por especies oxidantes, que se traduce como daño de membrana y posible acceso de las mismas al núcleo celular. [46] El resultado de ambos experimentos (**Figuras 8.10.A y 8.10.B**) muestra que, en instancias agudas del proceso inflamatorio, el daño puede regularse desde la dieta, donde incluso MC_V presenta un efecto estadísticamente tan significativo como el del flavonoide Q microencapsulado.

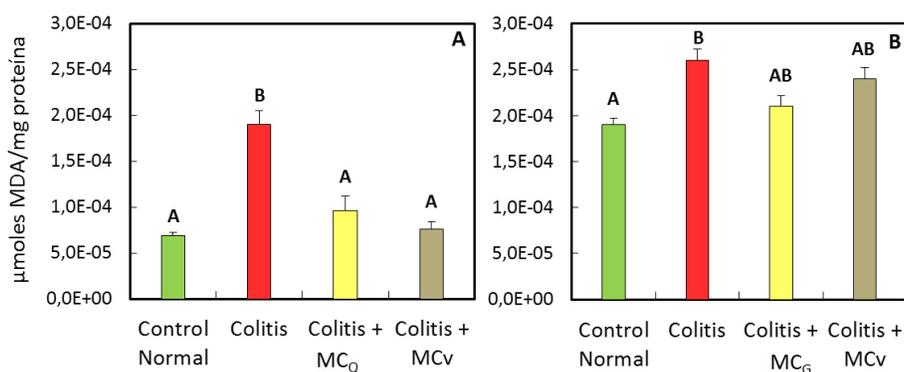


Figura 8.10.: Peroxidación lipídica: malondialdehído (MDA).
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

8.3.6. Tratamiento con genisteína (G) libre

Como se explicó anteriormente en el **Capítulo 2**, la absorción de flavonoides aglicona en el organismo ocurre a nivel de estómago e intestino delgado. [18,25,53] A su vez, existe referencia bibliográfica del escaso efecto de Q aglicona en modelos de CU. [28,39]

En el presente trabajo se llevaron a cabo controles con G en estado libre en un grupo de análisis Colitis + G, en dosis equivalentes del flavonoide aportado por las MC_G , a los fines de complementar lo citado para Q y validar el efecto de la microencapsulación en ChF.

Como puede observarse en la **Figura 8.11.** la pérdida de peso fue equivalente al grupo Colitis y lo mismo se tradujo al IE alcanzando un valor, en el último día de análisis, característico para animales enfermos (**Tabla 8.1.**).

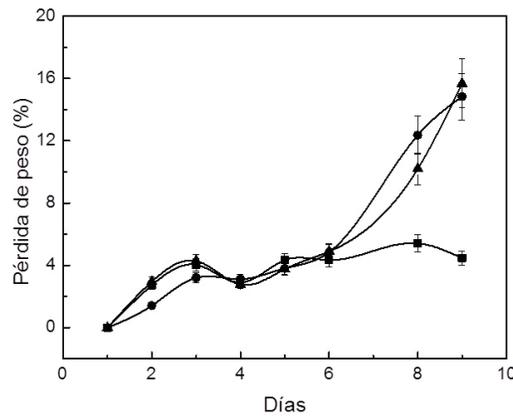


Figura 8.11.: Pérdida de peso en tratamiento con genisteína (G) libre. (■) Control Normal. (●) Colitis. (▲) Colitis + G.

Tabla 8.1.: Índices de enfermedad (IE) en ratones tratados con genisteína (G) libre.

Grupo	IE día 9
Control Normal	0,5 ± 0 ^a
Colitis	7,67 ± 1,33 ^b
Colitis + G	8 ± 1 ^b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Las micrografías de tinciones H&E de colon mostraron la severidad del daño (**Figura 8.12**) de acuerdo a lo observado en el seguimiento clínico.

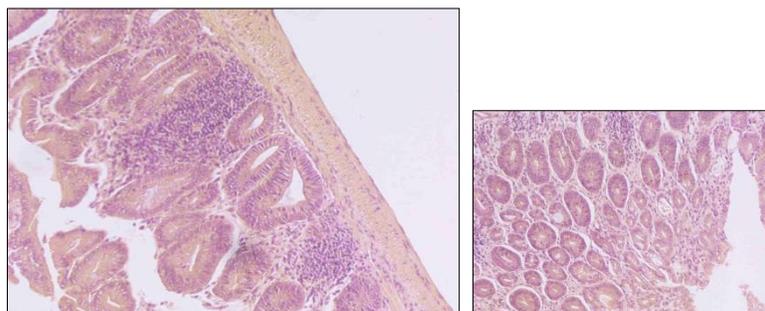


Figura 8.12.: Micrografías de tinciones hematoxilina-eosina (H&E) (400x). Tratamiento con genisteína (G) libre.

Como se muestra en la **Figura 8.13.B** la infiltración de neutrófilos evaluada como actividad de MPO no presentó diferencia estadística con el grupo Colitis, al igual que la actividad de SOD (**Figura 8.13.C**). La concentración de MCP-1 en tejido (**Figura 8.13.A**) mostró una tendencia semejante.

En este contexto, se puede aseverar que G por sí sola no podría atenuar la inflamación generada por el DSS.

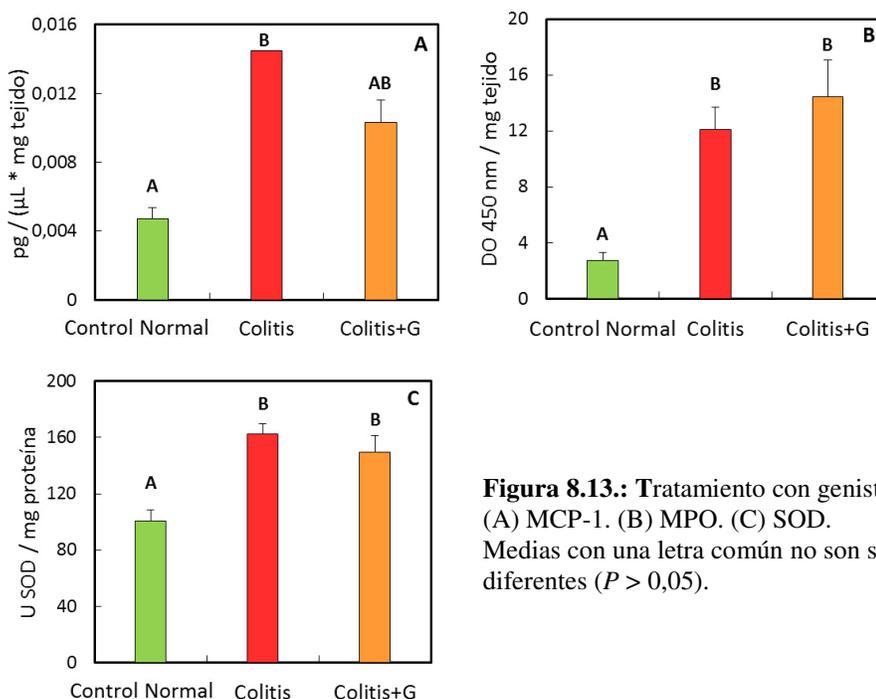


Figura 8.13.: Tratamiento con genisteína (G) libre. (A) MCP-1. (B) MPO. (C) SOD. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

8.3.7. Marcación de microcápsulas (MC_v) con FITC

A los efectos de confirmar si los flavonoides actúan efectivamente en el intestino grueso, se estudió la presencia de MC_v fluorescentes a distintos tiempos luego de la administración. Como estrategia de selección se delimitó una primera región en función del tamaño (FSC-A) y complejidad de las partículas (SSC-A) y luego se consideró la fluorescencia verde vs. SSC-A. La fluorescencia se representó como histogramas, tal como lo indica la **Figura 8.14.A**.

Los resultados arrojados a partir de la recolección del contenido intestinal para cada ensayo (**Figura 8.14.B**) muestran escasa fluorescencia en el contenido luminal cuando FITC se administró soluble, sin unirse a las MC_v de ChFM (panel A), ausencia de fluorescencia cuando

las MC_V se administraron solas (panel B) y arribo de las cápsulas MC_V marcadas con FITC al colon 5 h después de su consumo (comparar paneles C y D).

La densa capa de *mucus* en intestino grueso, constituida por mucina altamente glicosilada ^[54], juega un rol fundamental en la actividad de las MC.

He y col. (1998) ^[55] y Dhawan y col. (2004) ^[56] corroboraron la capacidad mucoadherente de MC de Ch *in vitro*, haciendo un análisis detallado de las diferentes características del biopolímero, y del tipo de mucina, que optimizan la adherencia. Paralelamente, Schipper y col. (1999) ^[57], comprobaron que la absorción de drogas escasamente aprovechadas en intestino mejora considerablemente al encapsularlas en matrices de Ch, dada la posibilidad del mismo de interactuar con el *mucus* y mejorar el contacto con las células del epitelio.

A su vez, Zhang y Neau (2002) ^[58], comprobaron la degradación *in vitro* de Ch a partir de enzimas bacterianas (quitinasas) en contenido aislado de ciego y colon de rata, lo cual contribuiría a la liberación de los activos en el lumen de colon, dada la degradación del material de pared (ChFM).

La revisión bibliográfica arriba mencionada, sumada a las pruebas realizadas con MC_V marcadas con FITC, permitirían aseverar que el efecto observado en los animales tratados es propio del arribo de las diferentes MC a colon, pudiendo resaltar que el control sintomatológico (IE) al quinto día en los tratamientos con MC_Q y MC_G sería producto de un efecto protector de los flavonoides dado que, sorteado el sistema gástrico, las partículas pueden llegar a colon y actuar atenuando los procesos inflamatorios y oxidativos y amplificando la respuesta regulatoria, lo que no ocurre con MC_V que aminoran ciertos efectos del consumo de DSS pero no evitan el daño asociado al mismo.

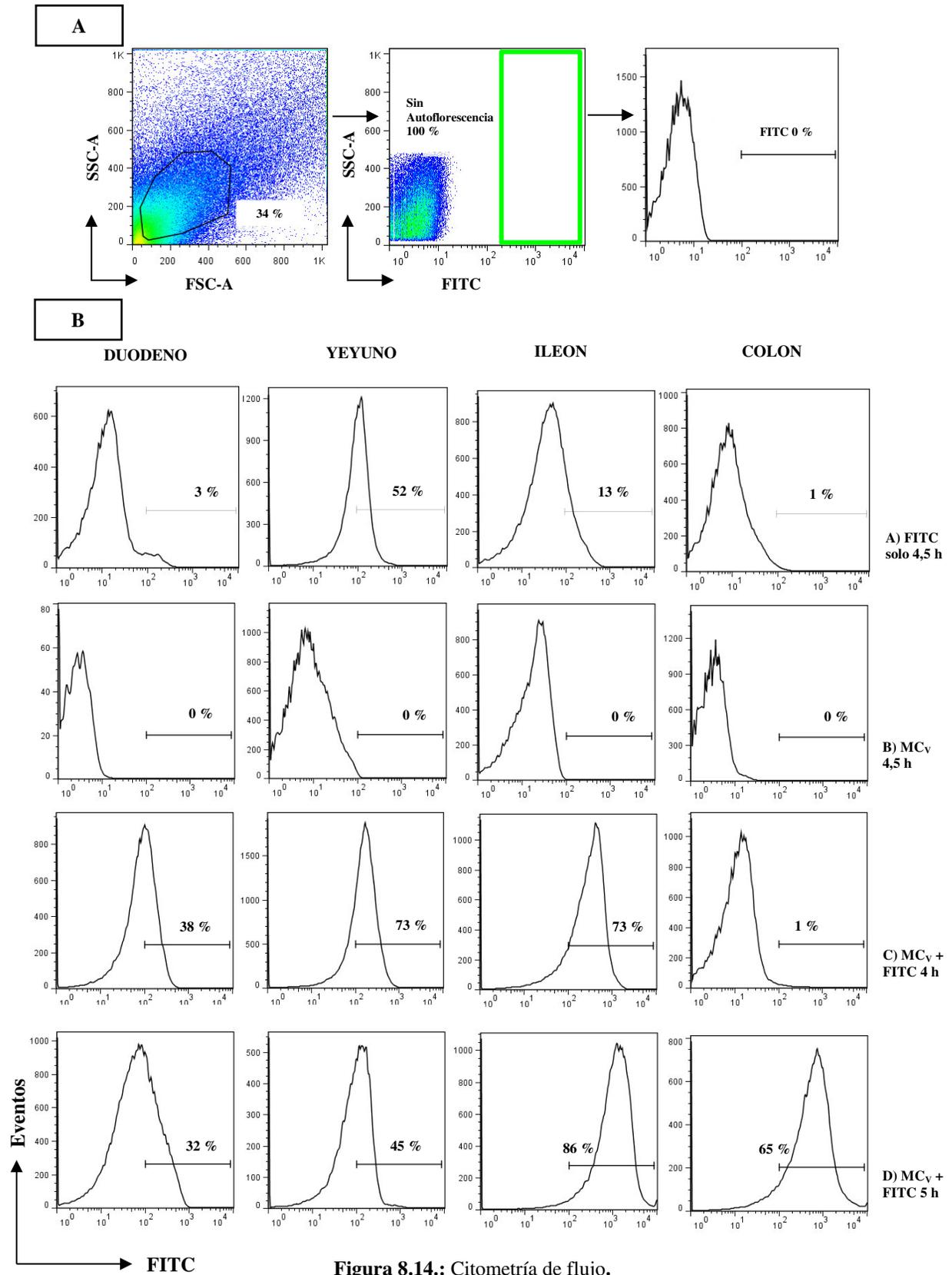


Figura 8.14.: Citometría de flujo.
 (A) Estrategia de selección. (B) Histogramas de resultados experimentales.

8.4. Conclusión

El presente capítulo permite establecer que los flavonoides Q y G encapsulados en ChFM llegarían a colon y actuarían reduciendo los síntomas clínicos inducidos por el consumo de DSS, atenuando la inflamación y cooperando en el restablecimiento del balance de las especies oxidantes. Es importante destacar que la efectividad se logra en dosis adecuadas al diseño de un aditivo destinado a la formulación de alimentos nutracéuticos (≈ 3 mg/kg).

El empleo de ChFM como material de pared se convierte en una opción eficaz para formular partículas complejas de liberación controlada en la porción más distal del tracto gastrointestinal, sorteando condiciones de extrema exposición, como lo es el pH gástrico.

La funcionalización de Ch para ampliar sus posibilidades de uso muestra la versatilidad del biopolímero para adecuarse a la necesidad en cuestión y ser utilizado como un coadyuvante más que un mero excipiente.

8.5. Referencias

1. Xavier, R. J. & Podolsky, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427–434 (2007).
2. Kitajima, S.; Takuma, S. & Morimoto, M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp. Anim* **49**, 9–15 (2000).
3. Chassaing, B.; Aitken, J. D.; Malleshappa, M. & Vijay-Kumar, M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr. Protoc. Immunol.* **15.25**, 1–14 (2014).
4. Laroui, H.; Ingersoll, S. A.; Liu, H. C.; Baker, M. T.; Ayyadurai, S.; Charania, M. A.; Laroui, F.; Yan, Y.; Sitaraman, S. V. & Merlin, D. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One* **7**, (2012).
5. Poritz, L. S.; Garver, K. I.; Green, C.; Fitzpatrick, L.; Ruggiero, F. & Koltun, W. A. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J. Surg. Res.* **140**, 12–19 (2007).
6. Yan, Y.; Kolachala, V.; Dalmaso, G.; Nguyen, H.; Laroui, H.; Sitaraman, S. V. & Merlin, D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One* **4**, (2009).
7. Coyne, C. B.; Kelly, M. M.; Boucher, R. C. & Johnson, L. G. Enhanced epithelial gene transfer by modulation of tight junctions with sodium caprate. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 602–609 (2000).
8. Bouma, G. & Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 521–533 (2003).
9. Sanchez-Muñoz, F.; Dominguez-Lopez, A. & Yamamoto-Furusho, J. K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **14**, 4280–4288 (2008).
10. Keshavarzian, A.; Morgan, G.; Sedghi, S.; Gordon, J. H. & Doria, M. Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int.* **31**, 786–790 (1990).
11. Kruidenier, L.; Kuiper, I.; Lamers, C. B. H. W. & Verspaget, H. W. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J. Pathol.* **201**, 28–36 (2003).
12. Seril, D. N.; Liao, J.; Yang, G.Y. & Yan C. S. Oxidative stress and ulcerative colitis- associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* **24**, 353–362 (2003).
13. Araki, Y.; Andoh, A. & Fujiyama, Y. The free radical scavenger edaravone suppresses experimental dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Int. J. Mol. Med.* **12**, 125–129 (2003).

14. Naito, Y.; Takagi, T. & Yoshikawa, T. Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis *J. Clin. Biochem. Nutr.* **41**, 18–26 (2007).
15. Formica, J. V. & Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 1061–1080 (1995).
16. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572–584 (2002).
17. Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* **96**, (2002).
18. Manach, Claudine; Scalbert, Augustin; Morand, Christine; Rémésy, Christian & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727 – 747 (2004).
19. Williamson, G. & Manach, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 243S–255S (2005).
20. Yao, J.; Wang, J. Y.; Liu, L.; Li, Y. X.; Xun, A. Y.; Zeng, W. S.; Jia, C. H.; Wei, X. X.; Feng, J. L.; Zhao, L. & Wang, L. S. Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch. Med. Res.* **41**, 288–294 (2010).
21. Sánchez-Fidalgo, S.; Cárdeno, A.; Villegas, I.; Talero, E. & de la Lastra, C. A. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **633**, 78–84 (2010).
22. Shigeshiro, M.; Tanabe, S. & Suzuki, T. Dietary polyphenols modulate intestinal barrier defects and inflammation in a murine model of colitis. *J. Funct. Foods* **5**, 949–955 (2013).
23. Messina, M. J.; Persky, V.; Setchell, K. D. R. & Barnes, S. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr. Cancer* **21**, 113–131 (1994).
24. Murakami, A.; Ashida, H. & Terao, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett.* **269**, 315–325 (2008).
25. Hollman, P. C.; Bijman, M. N.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. P.; de Vries, J. H. & Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic. Res.* **31**, 569–573 (1999).
26. Lorenzo-Lamosa, M. L.; Remuñán-López, C.; Vila-Jato, J. L. & Alonso, M. J. Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *J. Control. Release* **52**, 109–118 (1998).
27. Caddeo, C.; Nacher, A.; Diez-Sales, O.; Merino-Sanjuán, M.; Fadda, A. M. & Manconi, M. Chitosan-xanthan gum microparticle-based oral tablet for colon-targeted and sustained delivery of quercetin. *J. Microencapsul.* 2048, 1–6 (2014).

28. Guazelli, C. F. S.; Fattori, V.; Colombo, B. B.; Georgetti, S. R.; Vicentini, F. T. M. C.; Casagrande, R.; Baracat, M. M. & Verri, W. A. Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *J. Nat. Prod.* **76**, 200–208 (2013).
29. Pedrotti, L. P.; Barrios, B. E.; Maccio-Mareto, L.; Bento, A. F.; Sena, A. A.; Rodriguez-Galán, M. C.; Calixto, J. B. & Correa S. G. Systemic IL-12 burst expands intestinal T-lymphocyte subsets bearing the $\alpha 4\beta 7$ integrin in mice. *Eur. J. Immunol.* **46**, 70–80 (2016).
30. Bento, A. F. Marcon, R.; Dutra, R. C.; Claudino, R. F.; Cola, M.; Pereira-Leite, D. F. & Calixto, J.B. β -caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. *Am. J. Pathol.* **178**, 1153–1166 (2011).
31. Liaudat, A. C.; Bohl, L. P.; Tolosa de Talamoni, N. G.; Maletto, B.; Pistoresi-Palencia, M. C. & Picotto, G. Oxidative stress, cell cycle arrest and differentiation contribute toward the antiproliferative action of BSO and calcitriol on Caco-2 cells. *Anticancer. Drugs* **25**, 810–8 (2014).
32. Aebi, H. Oxygen radicals in biological systems. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126 (1984).
33. Esterbauer, H.; Cheeseman, K. H.; Dianzani, M. U.; Poli, G. & Slater, T. F. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem. J.* **208**, 129–140 (1982).
34. Qaqish, R. & Amiji, M. Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan–mucin interactions. *Carbohydr. Polym.* **38**, 99–107 (1999).
35. Mowat, A. M. & Agace, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* (2014). doi:10.1038/nri3738
36. Mitsuyama, K.; Toyonaga, A.; Sasaki, E.; Ishida, O.; Ikeda, H.; Tsuruta, O.; Harada, K.; Tateishi, H.; Nishiyama, T. & Tanikawa, K. Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut* **36**, 45–9 (1995).
37. Deshmane, S. L.; Kremlev, S.; Amini, S. & Sawaya, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interf. Cytokine Res.* **29**, 313–326 (2009).
38. Natarajan, K.; Manna, S. K.; Chaturvedi, M. M. & Aggarwal, B. B. Protein tyrosine kinase inhibitors block tumor necrosis factor-induced activation of nuclear factor- κ B, degradation of I κ B α , nuclear translocation of p65, and subsequent gene expression. *Arch. Biochem. Biophys.* **352**, 59–70 (1998).
39. Comalada, M. Camuesco, D.; Sierra, S.; Ballester, I.; Xaus, J.; Gálvez, J. & Zarzuelo, A. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *Eur. J. Immunol.* **35**, 584–592 (2005).
40. Ruiz, P. A.; Braune, A.; Hölzlwimmer, G.; Quintanilla-Fend, L. & Haller, D. Quercetin inhibits TNF-induced NF-kappaB transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in

- murine intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* **137**, 1208–1215 (2007).
41. Akiyama, T.; Ishida, J.; Nakagawa, S.; Ogawara, H.; Watanabe, S.; Itoh, N.; Shibuya, M. & Fukami, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**, 5592–5595 (1987).
 42. Porporatto, C.; Bianco, I. D.; Cabanillas, A. M. & Correa, S. G. Early events associated to the oral co-administration of type II collagen and chitosan: induction of anti-inflammatory cytokines. *Int. Immunol.* **16**, 433–441 (2004).
 43. Porporatto, C.; Bianco, I. D.; Riera, C. M. & Correa, S. G. Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 266–272 (2003).
 44. Stief, T. W. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med. Hypotheses* **60**, 567–572 (2003).
 45. Korenaga, D. Takesue, F.; Kido, K.; Yasuda, M.; Inutsuka, S.; Honda, M. & Nagahama, S. Impaired antioxidant defense system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J. Surg. Res.* **102**, 144–149 (2002).
 46. Kobbe, P.; Lichte, P.; Schreiber, H.; Reiss, L. K.; Uhlig, S.; Pape, H. C. & Pfeifer, R. Inhalative IL-10 attenuates pulmonary inflammation following hemorrhagic shock without major alterations of the systemic inflammatory response. *Mediators Inflamm.* **2012**, 6–10 (2012).
 47. Jurjus, A. R.; Khoury, N. N. & Reimund, J.-M. Animal models of inflammatory bowel disease. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **50**, 81–92 (2004).
 48. Pavlick, K. P.; Laroux, F. S.; Fuseler, J.; Wolf, R. E.; Gray, L.; Hoffman, J. & Grisham, M. B. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease^{1,2} *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 311–322 (2002).
 49. Karp, S. M. & Koch, T. R. Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. *Dis. Mon.* **52**, 199–207 (2006).
 50. Veldhoen, M. & Brucklacher-Waldert, V. Dietary influences on intestinal immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 696–708 (2012).
 51. Wong, G. H. W. & Goeddel, D. V. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science.* **242**, 941 (1988).
 52. Chihuailaf, R.; Contreras, P. A. & Wittwer, F. G. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. México* **33**, 265–283 (2002).
 53. Crespy, V.; Morand, C.; Besson, C.; Manach, C.; Demigne, C. & Remesy, C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 618–621 (2002).

54. Shan, M.; Gentile, M.; Yeiser, J. R.; Walland, A. C.; Bornstein, V. U.; Chen, K.; He, B.; Cassis, L.; Bigas, A.; Cols, M.; Comerma, L.; Huang, B.; Blander, J. M.; Xiong, H.; Mayer, L.; Berin, C.; Augenlicht, L. H.; Velcich, A. & Cerutti, A. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science*. **342**, 447–453 (2013).
55. He, P.; Davis, S. S. & Illum, L. *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.* **166**, 75–88 (1998).
56. Dhawan, S.; Singla, A. K. & Sinha, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *AAPS PharmSciTech* **5**, e67 (2004).
57. Schipper, N. G. M.; Vårum, K. M.; Stenberg, P.; Ocklind, G.; Lennernäs, H. & Artursson, P. Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *Eur. J. Pharm. Sci.* **8**, 335–343 (1999).
58. Zhang, H. & Neau, S. H. *In vitro* degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. *Biomaterials* **23**, 2761–2766 (2002).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En relación a los objetivos específicos expuestos en la **INTRODUCCIÓN** del presente trabajo se puede concluir que:

- Mediante la reacción de *Maillard* entre Ch y clorhidrato de D-(+)-glucosamina, se obtuvo una molécula funcionalizada, ChF, de solubilidad a pH fisiológico significativamente mejorada, PM seis veces menor que Ch y variación mínima en el GDA; la actividad antioxidante frente a EROS radicalarias, HO[•] y O₂^{•-}, se conservó conforme al descenso de PM, mientras que, frente a O₂ (¹Δ_g), no presentó cambio significativo en la capacidad de desactivación, demostrando, a través de la relación de constantes de desactivación reactiva y total, una capacidad ligeramente mejorada.
- La microencapsulación a través del secado por aspersión (*Spray-Drying*) de los flavonoides Q y G en ChM y ChFM demostró ser una adecuada alternativa para la obtención de micropartículas, con elevados rendimientos y eficiencias de microencapsulación en función a la técnica empleada, adecuada morfología e importante resistencia de las MC frente condiciones gástricas simuladas. A su vez, QsF resultó ser un material de pared de características mejoradas respecto de Ch, dado que su solubilidad a pH fisiológico incidiría de manera directa en la capacidad de hinchamiento de las MC y liberación del activo. La capacidad actioxidante de Q microencapsulada frente a las EROS ya mencionadas fue significativamente más elevada que la de Q en estado libre, confirmando a la MC como un sistema complejo de reposición del flavonoide y a los materiales de pared, Ch y ChF, como verdaderos coadyuvantes de dicha actividad.
- La evaluación de las MC de Q y G en ChFM en un modelo de colitis generada con DSS mostró una mejora significativa en los síntomas clínicos asociados al modelo experimental, atenuando la inflamación y restableciendo el balance de las especies oxidantes, en dosis adecuadas al diseño de un aditivo destinado a la formulación de alimentos nutracéuticos (≈ 3 mg/kg). MC_v fluorescentes demostraron arribar a colon

dando lugar a la conclusión de que los flavonoides microencapsulados pudieron actuar controlando los procesos inflamatorios y oxidativos gracias a la protección que ChFM ofrecería como material de pared frente a condiciones gástricas *in vivo*.

Dada la complejidad de la CU, como todas las EII, el tratamiento está siempre sujeto a constantes modificaciones que puedan atenuar la sintomatología e intentar revertir la condición inflamatoria extrema. En el presente trabajo de tesis se llevó a cabo un estudio interdisciplinario de manera tal que, desde diferentes perspectivas, se integren objetivos específicos para lograr obtener aditivos nutraceuticos antioxidantes, altamente eficientes en la finalidad de su función.

Suplir desde la dieta sustancias naturales capaces de cooperar con la barrera antioxidante fisiológica, constituye una excelente alternativa para mitigar los efectos del estrés oxidativo vinculado a diversas patologías. En este contexto, los flavonoides han sido ampliamente estudiados y el beneficio de su consumo se ha probado a lo largo del tiempo en diferentes modelos, anteriormente discutidos. Su extrema sensibilidad, a condiciones ambientales y digestivas, impulsa el desarrollo de técnicas para prolongar la estabilidad en matrices alimentarias. Ch, por sus amplias propiedades y su abundante disponibilidad, se define como un biopolímero de elevado interés para la formulación de MC destinadas a vehiculizar y proteger sustancias lábiles, como son los antioxidantes. A su vez, la homología estructural con la celulosa lo convierte en fibra alimentaria, con la particularidad de poder alcanzar la fracción más distal del tracto gastrodigestivo humano: el colon. Funcionalizar Ch, a través de diferentes mecanismos reactivos, permite ampliar el campo de sus utilidades compensando la escasa solubilidad del polisacárido en medios biológicos. La reacción de *Maillard* resulta ser un quimismo simple e inocuo, de fácil escalado y ampliamente utilizado en la industria alimentaria; Ch, por su particular grupo amino ($-NH_2$), es un excelente sustrato para este mecanismo reactivo. Para la obtención de MC, el secado por aspersion (*Spray-Drying*) constituye una operación unitaria económica, flexible, que permite plantear procesos continuos a gran escala, brindando partículas de buena calidad y directa aplicación.

Como conclusión general, los resultados obtenidos permiten inferir que microencapsular flavonoides en matrices de Ch dio lugar al desarrollo un aditivo capaz de suministrarse desde la dieta, como ingrediente alimentario, y modular los procesos inflamatorios y oxidativos característicos de una patología de curso crónico, con recidivas de diferente intensidad clínica, como la CU.

PERSPECTIVAS A FUTURO

Como posibles trabajos a futuro, la presente tesis deja abiertas tres posibles aristas de continuidad:

- Desarrollar derivados de Ch con aptitud alimentaria y propiedades bioactivas que potencien al polímero de origen.
- Probar las MC en una matriz alimentaria.
- Estudiar el posible mecanismo de respuesta inmune que se puede presentar en un modelo inflamatorio frente flavonoides libres y encapsulados en Ch.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Evaluación de propiedades funcionales de un aditivo nutracéutico a base de quercetina microencapsulada en quitosano en modelo murino de colitis. Córdoba, del 02 al 04 de Noviembre de 2016.
- VIII Congresso Brasileiro de Micologia. Levaduras probióticas aisladas de lactosuero: resistencia al tracto gastrointestinal y encapsulación en quitosano. Florianópolis, del 03 al 06 de Octubre de 2016.
- VI Encuentro Argentino de Materia Blanda. Generación de nuevos biopolímeros funcionales a partir de quitosano para su aplicación en el desarrollo de sistema de micro y nano encapsulación con fines nutracéuticos. Córdoba, del 17 al 19 de Agosto de 2016.
- XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Diseño de un Nuevo Aditivo Antioxidante a base de Quercetina Microencapsulada en Matrices de Quitosano (Qs). Buenos Aires, del 03 al 05 de noviembre de 2015.
- VI Jornadas de Ciencia y Tecnología UTN-FRVM. Desactivación de Oxígeno Molecular Singlete por Quitosano Soluble en Agua (WSCh). Villa María, del 08 al 10 de Octubre de 2014.
- 16th International Congress on Photobiology. Singlet Molecular Oxygen Quenching, $O_2(^1\Delta_g)$, Ability of Water Soluble Chitosan (WSCh). Córdoba, del 07 al 12 de Septiembre de 2014.

- VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine-South American Group (VIII SFRBM-SAG). Hydroxyl and Superoxide Anion Radicals Scavenging Activities of Water-Soluble Chitosan (WSC). Buenos Aires, del 14 al 17 de Octubre de 2013.
- XXIX Congreso Argentino de Química. Carotenoides Microencapsulados como Desactivantes de Especies Reactivas de Oxígeno. Mar del Plata, del 03 al 05 de Octubre de 2012.
- XI Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología. Desactivación de Oxígeno Molecular Singulete por Quitosano con Diferente Grado de Deacetilación. Córdoba, del 01 al 04 de Octubre de 2012.
- V Jornadas de Ciencia y Tecnología UTN-FRVM. Interacción de Quitosano con Especies Reactivas de Oxígeno. Autor. Villa María, del 15 al 16 de Agosto de 2012.
- XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Interacción de Quitosano con Especies Reactivas de Oxígeno. Córdoba, del 03 al 06 de Mayo de 2011.

PUBLICACIONES

- María L. Boiero, María T. Rodríguez-Estrada, Mara Mandrioli, Noelia Vanden Braber, Norman A. García, Claudio D. Borsarelli, Mariana A. Montenegro. Gum arabic microcapsules as protectors of the photoinduced degradation of riboflavin in whole milk. *Journal of Dairy Science*. (ISSN: 0022-0302). 97:5328–5336, 2014.

Enviadas:

- Noelia L. Vanden Braber, Ladislao I. Díaz Vergara, Faustino E. Morán Vieyra, Claudio D. Borsarelli, Mariana M. Yossen, Jorge R. Vega, Silvia G. Correa, Mariana A. Montenegro. Physicochemical characterization, singlet oxygen quenching ability and antibacterial activity of water-soluble chitosan. *Reactive and Functional Polymers*. (REACT-S-16-00681)

PATENTES

FDI Presentado:

Carolina Morgante, Romina Bachetti, Mariana Montenegro, Carina Porporatto, Vanden Braber Noelia, Verónica Morgante. PRODUCTO Y MÉTODO PARA BIORREMEDIACIÓN A BASE DE UNA BACTERIA DEGRADADORA DE ATRAZINA INMOVILIZADA EN MATRIZ DE QUITOSANO DERIVATIZADO CON GLUCOSA MEDIANTE N-ALQUILACIÓN REDUCTIVA. Se presentó ante la Dirección de Vinculación Tecnológica CCT Córdoba- CONICET el formulario de Divulgación de Invención. Diciembre de 2015.

DISTINCIONES

INNOVAR 2015. Concurso Nacional de Innovaciones. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. ID 18115 - Desarrollo del Proceso de Obtención de Quitosano Derivatizado para la Encapsulación de Levaduras con Fines Nutracéuticos y Biotecnológicos. Publicado en catálogo de mejores proyectos. Ladislao I. Diaz Vergara; Noelia L. Vander Braber; María G. Cervellini; Carina M. Pereyra; Lilia R. Cavaglieri; Mariana A. Montenegro.

