



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biblioteca Digital FCEN-UBA

Síntesis de materiales inorgánicos con porosidad controlada para la inmovilización de células. Aplicaciones en biorreactores

Perullini, Ana Mercedes
2009

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física**

**SÍNTESIS DE MATERIALES INORGÁNICOS CON POROSIDAD
CONTROLADA PARA LA INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS.
APLICACIONES EN BIORREACTORES.**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Inorgánica, Analítica y Química Física.

Ana Mercedes Perullini

***Directores: Sara Aldabe Bilmes
Alejandro Mentaberry***

Lugar de trabajo: Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física e Instituto
de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (FCEyN, UBA, CONICET)

2009

**A Miguel, Anabel y Luciana,
mis mayores tesoros.**

RESUMEN

En este trabajo se describe la obtención y aplicación de materiales con actividad biológica, MABs, basados en la encapsulación de células eucariotas y organismos pluricelulares en matrices de sílica sintetizadas por sol-gel.

Dada la importancia del contacto célula-célula y el crecimiento activo de las células encapsuladas para la aplicación a biorreactores, se diseñó una estrategia de síntesis en dos pasos, que involucra una inmovilización previa de los organismos en alginato de calcio. Este procedimiento permitió incorporar células muy sensibles y mantenerlas viables durante varios meses, aun aumentando la concentración de precursores hasta niveles de citotoxicidad para lograr buenas propiedades ópticas, mecánicas y de transporte.

La capacidad de encapsulación con alta viabilidad se probó con diferentes microorganismos (*B. subtilis*, *E. coli*, *S. cerevisiae*), algas (*C. vulgaris*), hongos (*S. hirsutum*) y con la línea BY2 de tabaco (*N. tabacum*) y tejido floemático de zanahoria (*D. carota*). En este último caso, se comprobó la eficacia del sistema para tiempos de operación de 6 meses.

Las principales variables de síntesis involucradas en los dos pasos de la construcción de los MABs se analizaron en términos de biocompatibilidad, estrés celular, estabilidad mecánica, transporte de solutos y calidad óptica.

Por último, se verificó la potencialidad de los MABs para la construcción de biorreactores modulares para dos casos particulares: (I) encapsulación de un hongo ligninolítico para la construcción de dispositivos de biorremediación y (II) encapsulación de un alga verde para la construcción de un foto-biorreactor.

Palabras clave: encapsulación, sílica, sol-gel, alginato, biorreactores, biomateriales, biorremediación.

ABSTRACT

This work describes the synthesis and application of materials with biological activity, MABs, based on the encapsulation of eukaryotic cells and multicellular organisms in silica matrices synthesized by sol-gel.

Considering the importance of cell-to-cell contact and active growth of the encapsulated cells for applications to bioreactors, a two-steps strategy of synthesis was designed, which involves a previous immobilization of the organisms in calcium alginate. This procedure made possible to incorporate very sensitive cells and to keep them viable for several months, even increasing the precursors' concentration up to cytotoxicity levels appropriate to achieve good optical, mechanical and transport properties.

The possibility of encapsulation with high viability was proved with different microorganisms (*B. subtilis*, *E. coli*, *S. cerevisiae*), algae (*C. vulgaris*), fungi (*S. hirsutum*) and with tobacco BY2 line (*N. tabacum*) and carrot floem tissue (*D. carota*). In the latter case, the efficacy of the system was verified during a 6 months operation.

The principal variables of synthesis involved in the two steps of the construction of MABs were analyzed in terms of biocompatibility, cellular stress, mechanical stability, transport of solutes and optical quality.

Finally, the potentiality of application of MABs for the construction of modular bioreactors was verified for two particular cases: (I) encapsulation of ligninolytic fungi for the construction of devices of bioremediation and (II) encapsulation of green algae for the construction of a photo-bioreactor.

Key words: **encapsulation, silica, sol-gel, alginate, bioreactors, biomaterials, bioremediation.**

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, Sara y Alejandro, que me guiaron en este trabajo interdisciplinario y corrigieron con igual meticulosidad el diseño experimental en cada experiencia y los signos de puntuación en cada frase.

A Sara le agradezco, además, el tiempo compartido tanto en el laboratorio como fuera de él y su preocupación constante por generar un buen ambiente de trabajo.

A Pedro Aramendia, mi consejero de estudios.

A Matías Jobbágy que corrigió gran parte del trabajo, haciendo valiosos aportes.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Ceci que me ayudó, entre otras cosas, a medir los tiempos de gelificación y a Flaminia que procesó algunas imágenes durante su estadía.

Al grupo de Agrobiotecnología, especialmente a Mercedes Rivero y Santiago Mencacci, por las horas de mesada compartidas.

A todos los integrantes del DQIAQF-INQUIMAE que de forma directa o indirecta contribuyeron con este trabajo, especialmente a Ernesto Marceca por la ayuda con el cañón génico, a Betty por las medidas con el fluorómetro, a Jorge por las medidas de AAS de sodio, a mis docentes y a mis compañeros en docencia, de quienes aprendí mucho.

Al laboratorio FOMECC por el uso de los equipos y a Lili por sus consejos.

A Nora Mouso y Flavia Forchiassin, por el soporte en biorremediación.

A Roberto Fernández por las medidas de microscopía confocal.

A Galo, que aportó reactivos, recetas, ideas...

A Susana y Mariana por la colaboración en el trabajo de estrés en levaduras, y sobre todo, por brindar continuamente su apoyo, en lo académico y en lo humano.

Al laboratorio de *Chimie de la Matière Condensée* de la Universidad de Paris, especialmente a Thibaud y Makhlof, por su hospitalidad.

A mis maestros: Carlos Gentile, Susana Fishmann, Liliana Scattaglini, Mabel Rembado, Mario Bunge, Santiago Costantino, Silvina Menu Márquez, Catalina Fedele, Silvina Ponce Dawson, y tantos otros!

A Edith que compartió conmigo la emoción del primer logro con estas “esponjas de vidrio” y a Cristina y Quique que me acompañan en todo lo que hago.

A mis amigos. A García, Biuso, Sentinel, Romina, Gonza y sus respectivos amores, con quienes muchas veces discutimos de ciencia, un poco mezclada entre asados y política. A Pato con quien aprovechamos el “mangazo” de algún reactivo para juntarnos a tomar un café y a Mer con quien discutimos sobre encapsulación celular (obviamente, en francés). A las Andreas y a Javier, por estar siempre cerca.

A mi madre, que se leyó toda la tesis e hizo correcciones (¡Esas son madres!)

A mi padre, que discutía en serio las ideas de Anita que estaba convencida de poder ver los átomos a ojo desnudo, y a Marcela por su interés constante.

A mis hermanos que están siempre al pie del cañón.

A los abuelos y tíos de mis hijas; sin ellos nada de esto sería posible. Especialmente a Abu Carmen, Abu Petete y Tía Ana, incondicionales!

A Anabel y Luciana, que me ayudaron tanto en este último tiempo que hasta podría decirse que invirtieron los roles.

Al amor de mi vida, Miguel, que me acompaña en todo, incluso en la simulación numérica del proceso de transporte.

ÍNDICE

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN	3
I.1 MATERIALES BIOMIMÉTICOS	4
I.2 HUÉSPEDES CELULARES	5
I.3 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN: EVOLUCIÓN Y LIMITACIONES	7
I.4 QUÍMICA DEL SI(IV) Y PROCESOS SOL-GEL	8
I.5 ANTECEDENTES DE ENCAPSULACIÓN EN MATRICES DE SÍLICA	13
I.6 ORGANIZACIÓN DE ESTA PRESENTACIÓN	15
I.7 BIBLIOGRAFÍA	17

CAPÍTULO II:

ENCAPSULACIÓN DE MICROORGANISMOS	25
II.1 MICROORGANISMOS	25
II.1.a <i>Escherichia coli</i>	27
II.1.b <i>Bacillus subtilis</i>	28
II.1.c <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
II.2 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD	30
II.3 CONSTRUCCIÓN DE MABs EN MATRICES DE SÍLICA	33
II.3.a Estrategia general de síntesis	33
II.3.b Inmovilización previa en alginato de calcio	34
II.3.c Síntesis de la matriz de sílica	38
II.3.d Difusión de citrato y licuefacción de la cápsula de alginato	40
II.3.e Viabilidad celular en función del tiempo	41
II.3.f Barrera de prevención de contaminación	43
II.4 PRINCIPALES RESULTADOS DE ESTE CAPÍTULO	45
II.5 BIBLIOGRAFÍA	47

CAPÍTULO III:

ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS VEGETALES	51
III.1 SISTEMAS VEGETALES	51

III.2 DESARROLLO DE CALLOS EN MATRICES DE SÍLICA	53
III.2.a Líneas celulares y condiciones de cultivo	53
III.2.b Encapsulación de células vegetales	54
III.2.c Evaluación de la viabilidad celular en función del tiempo	54
III.3 RESULTADOS	56
III.4 PRINCIPALES RESULTADOS DE ESTE CAPÍTULO	58
III.5 BIBLIOGRAFÍA	60

CAPÍTULO IV:

CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES:

PROPIEDADES ÓPTICAS, MECÁNICAS Y DE TRANSPORTE 65

IV.1 PROPIEDADES Y ESTRUCTURA DE GELES	65
IV.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	66
IV.2.a Síntesis de hidrogeles por la vía de los alcóxidos	67
IV.2.b Síntesis de hidrogeles por la vía acuosa	68
IV.3 PROPIEDADES ÓPTICAS	68
IV.3.a Calidad óptica de geles sintetizados por la vía de los alcóxidos	69
IV.3.b Calidad óptica de geles sintetizados por la vía de los alcóxidos con aditivos	70
IV.3.c Calidad óptica de geles sintetizados por la vía acuosa	71
IV.4 PROPIEDADES MECÁNICAS	72
IV.4.a Viscoelasticidad de geles sintetizados por la vía acuosa	74
IV.4.b Viscoelasticidad de geles sintetizados por la vía de los alcóxidos	75
IV.5 PROPIEDADES DE TRANSPORTE	77
IV.5.a Isotermas de adsorción	77
IV.5.b Adsorción de colorantes en geles sintetizados por la vía acuosa	78
IV.5.c Difusión en medios porosos	80
IV.5.d Difusión de colorantes en geles sintetizados por la vía acuosa	81
IV.6 PRINCIPALES RESULTADOS DE ESTE CAPÍTULO	87
IV.7 BIBLIOGRAFÍA	88

CAPÍTULO V:

ESTRÉS CELULAR EN EL DESARROLLO DE LOS MABs 93

V.1 RESPUESTA A ESTRÉS AMBIENTAL	93
----------------------------------	----

V.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	96
V.2.a Cepas y condiciones de cultivo	96
V.2.b Procedimientos de encapsulación directa en hidrogeles de sílica	97
V.2.c Procedimiento con inmovilización previa en alginato	98
V.2.d Análisis de Na(I)	98
V.2.e Cuantificación de la fluorescencia	99
V.3 INTENSIDAD DEL ESTRÉS DURANTE LA ENCAPSULACIÓN	99
V.3.a Encapsulación directa	101
V.3.b Encapsulación con inmovilización previa en alginato	104
V.4 PRINCIPALES RESULTADOS DE ESTE CAPÍTULO	108
V.5 BIBLIOGRAFÍA	109

CAPÍTULO VI:

BIORREACTORES MODULARES	113
VI.1 DISPOSITIVOS PARA BIORREMEDIACIÓN	114
VI.1.a Biorremediación	114
VI.1.b Hongos ligninolíticos	114
VI.1.c Cepa y condiciones de cultivo	115
VI.1.d Determinación de la actividad de Manganeseo peroxidasa	116
VI.1.e Procedimiento de encapsulación	116
VI.1.f Ensayos preliminares	117
VI.1.g Diseño de biorreactor en <i>batch</i>	119
VI.1.h Diseño de biorreactor para proceso continuo	122
VI.2 FOTOBIORREACTORES	123
VI.2.a Cultivos fotosintéticos	123
VI.2.b <i>Chlorella vulgaris</i>	124
VI.2.c Cepa y condiciones de cultivo	125
VI.2.d Procedimiento de encapsulación	125
VI.2.e Recuento de células en las cavidades	127
VI.2.f Crecimiento algal en los foto-biorreactores	128
VI.3 PRINCIPALES RESULTADOS DE ESTE CAPÍTULO	129
VI.3 BIBLIOGRAFÍA	131

CONCLUSIONES	135
---------------------	-----

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

CAPITULO I:

INTRODUCCIÓN

«La naturaleza pasa tan gradualmente de lo inanimado a lo animado que su continuidad hace que no se distingan los límites entre ambas esferas; [...]»

Aristóteles

El objetivo de este trabajo de tesis es el desarrollo de un sistema de encapsulación de células eucariotas y organismos pluricelulares dentro de matrices inorgánicas que permitan su crecimiento y proliferación. Este objetivo procura sentar las bases para nuevas y variadas aplicaciones biotecnológicas, tales como dispositivos para biorremediación, biorreactores y biosensores que requieran el crecimiento masivo de células o tejidos encapsulados.

Una condición fundamental que debe cumplir el material que compone la matriz es permitir que las células puedan comunicarse a través de señales químicas, lo que generalmente favorece su división y la generación de metabolitos de interés económico. Además, para cualquier aplicación en biorreactores, se requiere que el material sea física y químicamente estable. Por otra parte, su porosidad debe ser tal que permita el intercambio de nutrientes con el medio externo, posibilite la difusión de los productos de biosíntesis que pudieran resultar de interés e impida el ingreso o salida de células, manteniéndolas protegidas de contaminaciones por agentes patógenos. Este desafío implica una búsqueda de estrategias de síntesis que garanticen un alto grado de biocompatibilidad y permitan confinar una población en crecimiento.

Debido a que en el proceso de encapsulación celular convergen conceptos y metodologías de biología y físico-química, en esta introducción se incluirán aspectos básicos de ambas disciplinas, así como una breve reseña del estado del arte en este tema.

1.1. MATERIALES BIOMIMÉTICOS

La naturaleza brinda numerosos ejemplos de materiales basados en la compleja combinación de moléculas y polímeros descritos por la química “orgánica”, con fases sólidas amorfas o cristalinas que son normalmente tratados por la química “inorgánica”. Las fibras proteicas presentes en las membranas de la cáscara del huevo interactúan con la matriz de colágeno extracelular induciendo la cristalización de carbonato de calcio durante la formación de la cáscara. En los mamíferos, la estructura ósea se remodela continuamente durante el crecimiento. La reorganización de los cristales de hidroxiapatita que componen los huesos está dirigida por una estructura lamelar de colágeno, la que también es responsable de su formación.¹ Ejemplos similares se observan entre las diatomeas, algas unicelulares que generan a su alrededor un esqueleto nanoporoso utilizando el ácido silícico presente en el agua de ríos y mares.¹ Sus funciones metabólicas alteran tanto el pH local como el potencial redox sobre la superficie celular produciendo una sobresaturación local de ácido silícico, que induce la precipitación de dióxido de silicio sobre proteínas especializadas que actúan como sitios de nucleación. Las estructuras formadas tienen una morfología y una porosidad exquisitamente reguladas y adaptadas a los requerimientos fisiológicos de cada especie, así como a las características de su hábitat.^{2,3}

Los procesos de biomineralización han inspirado la formulación de nuevos procesos de encapsulación que resultan de asociar distintas entidades biológicas con materiales estrictamente “inorgánicos” (geles, soles, partículas, esponjas, etc.), los que pueden caracterizarse mediante técnicas fisicoquímicas. Se ha desarrollado así los materiales con actividad biológica (MABs), los cuales son producto de la incorporación de biomoléculas, organelas subcelulares, células o tejidos biológicos en matrices sintetizadas en forma artificial.

Existe actualmente un gran interés en el desarrollo de MABs. Su campo de aplicaciones potenciales es muy vasto e incluyen la producción de biosensores, biorreactores, órganos artificiales y dispositivos para biorremediación.^{4,5,6,7} En el caso de los biosensores, pequeños dispositivos que pueden detectar la presencia de virus o toxinas en el ambiente, la principal ventaja de la encapsulación reside en que permite estabilizar el sistema biológico y hacerlo más resistente a las variaciones ambientales. Por otro lado, la manipulación del sistema incluido resulta más sencilla y genera escaso riesgo de contaminación biológica. Las aplicaciones en biorreactores, si bien apuntan fundamentalmente a proteger a las células del estrés mecánico provocado por agitadores o aireadores, permiten también en muchos casos

¹ La sílica es uno de los minerales más difundidos depositados por organismos vivos. Ha sido encontrada en microorganismos, algas, plantas superiores, células de insectos e incluso de mamíferos.

una separación más fácil de los productos de biosíntesis, los cuales pueden ser recuperados desde el medio externo del cultivo sin necesidad de laboriosos pasos de filtrado. Además, la encapsulación permite disminuir el riesgo de contaminación de las células, lo que representa una gran ventaja cuando se trata de cultivos de crecimiento lento. Por último, en lo que se refiere a los dispositivos para biorremediación, los procedimientos de encapsulación pueden prevenir, entre otras cosas, muchos de los inconvenientes provenientes del contacto entre el ambiente natural y los organismos con que se utilizan con esta finalidad.

En síntesis, las principales limitaciones para el diseño de MABs provienen de las características biológicas de los organismos a utilizar y de la disponibilidad de materiales adaptados a los mismos, lo que establece el grado de biocompatibilidad de los distintos procedimientos de encapsulación.

1.2. HÚESPEDES CELULARES

Se cree que todos los organismos existentes derivan de una única célula primitiva surgida a partir de la agregación previa de distintos complejos moleculares mediante un proceso escasamente comprendido aún. Este evento inicial, ocurrido hace unos 3.500 millones de años, definió los rasgos básicos de la estructura y del metabolismo celular, incluyendo la capacidad de autoreproducción propia de los seres vivos. Debido a que los organismos actuales reconocen este origen común, no es sorprendente que muchos procesos a nivel celular se hayan conservado en el curso de la evolución, aun entre especies muy poco relacionadas.

Un hito importante en este largo camino evolutivo se produjo hace 1.500 millones de años al ocurrir la transición entre las células procariotas (pequeñas y con una estructura relativamente sencilla caracterizada por la ausencia del núcleo) y las células eucariotas, (nucleadas y radicalmente más complejas). La evolución de los organismos pluricelulares dependió de la capacidad de las células eucariotas de regular la expresión de su información genética para actuar de forma cooperativa y desarrollar funciones especializadas. La diferenciación celular (producción de tipos celulares especializados) requiere de un número cada vez mayor de sistemas de control genético crecientemente elaborados.ⁱⁱ

La información genética se transcribe de DNA a RNA y se traduce a partir de éste último bajo la forma de proteínas. Las funciones biológicas de las proteínas dependen de sus

ⁱⁱ Distintas células del organismo, aunque cumplan funciones muy diversas, comparten un mismo genoma, el cual se expresa diferencialmente.

estructuras tridimensionales y, sobre todo, de las propiedades químicas asociadas a sus superficies. Los procesos moleculares relacionados con la síntesis de proteínas son complejos y ocurren en el ribosoma, un complejo ribonucleoproteico conformado por un grupo de varias proteínas unidas alrededor de un núcleo de moléculas de RNA.⁸ Los ribosomas de las células procariotas son funcionalmente homólogos a los de las células eucariotas, aun cuando existen diferencias importantes en cuanto al número y al tamaño de sus respectivos componentes.

La existencia de un código genético universal permite la producción de proteínas recombinantes heterólogasⁱⁱⁱ a partir de microorganismos genéticamente transformados, como bacterias y levaduras, en forma eficiente y segura.⁹ Sin embargo, la actividad biológica de muchas proteínas de origen eucariota puede verse afectada debido a la ausencia o al diferente grado de especificidad de algunos pasos del procesamiento postraduccional en los sistemas mencionados.¹⁰ Esta pérdida de actividad es limitante para aplicaciones biotecnológicas.

Las levaduras, eucariotas inferiores, poseen importantes ventajas sobre las bacterias para la producción de proteínas heterólogas de origen eucariótico.¹¹ Éstas combinan la simplicidad de los sistemas de expresión bacterianos con los bajos costos de los medios de cultivo y cuentan además con un entorno intracelular más apropiado para el procesamiento postraduccional y la secreción.¹² A diferencia de las bacterias, las levaduras glicosilan las proteínas, y esto influye positivamente en la integridad estructural, solubilidad y actividad biológica de las cadenas polipeptídicas sintetizadas.^{13,14} Sin embargo, los sistemas de expresión basados en levaduras introducen perfiles de glicosilación que no se corresponden con los de los animales y que confieren a las proteínas expresadas en ellas una elevada inmunogenicidad en mamíferos, hecho que limita su utilización. La bioactividad, estabilidad y farmacocinética de la mayoría de las proteínas utilizadas con fines terapéuticos en los seres humanos están estrechamente ligadas a los procesos de modificación postraduccional, tales como la formación de puentes disulfuro entre cisteínas, la sulfatación de tirosinas, la carboxilación, la metilación, la hidroxilación, la fosforilación y la glicosilación.¹⁵

Existen numerosos metabolitos biosintetizados por distintas especies (fundamentalmente vegetales) que resultan de gran interés para la industria agroalimentaria y farmacéutica. Dichos metabolitos son expresados en forma tardía^{iv} en órganos y tejidos

ⁱⁱⁱ El desarrollo en la tecnología del ADN recombinante, a mediados de la década de los 70 del siglo pasado, permitió modificar genéticamente un organismo, introduciéndole genes foráneos y regulando la expresión de los mismos.

^{iv} Los metabolitos que se expresan en forma tardía (durante la *idíofase* o fase en la que el microorganismo no crece, pero sigue metabólicamente activo) se denominan "metabolitos secundarios", en contraposición a los "metabolitos primarios", sintetizados durante los primeros estadios del ciclo celular (*trofofase* o fase de crecimiento).

diferenciados y no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del organismo. En las plantas, la mayoría de estos compuestos participa del denominado “metabolismo secundario” y sus funciones se relacionan con las interacciones y respuestas a distintos factores bióticos y abióticos. La gran diversidad de efectos biológicos de los metabolitos secundarios¹⁶ ha generado el desarrollo de muchas drogas medicinales, antibióticos, aditivos alimentarios, colorantes, insecticidas y herbicidas.

Por todo lo expuesto, la maquinaria biosintética de las células eucariotas superiores^{17,18} ofrece mejores posibilidades de aplicación biotecnológica que la de las células procariotas. Sin embargo, el cultivo y la transformación genética estable de líneas celulares de este tipo son procesos costosos y exigentes desde el punto de vista técnico.¹⁹ Más aun, dado que la mayoría de los productos biosintéticos de interés se obtienen cuando se alcanza un *plateau* en la curva de crecimiento,²⁰ el metabolismo lento de las células vegetales se convierte en un problema en el diseño de sistemas a gran escala, donde la contaminación por microorganismos implica enormes pérdidas, tanto en retraso de producción como en costos de descontaminación. Estos inconvenientes han impulsado el presente estudio de encapsulación de células vegetales para su aplicación en biorreactores.

1.3. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN: EVOLUCION Y LIMITACIONES

La biocompatibilidad es un requisito fundamental que deben cumplir las matrices concebidas para la encapsulación de entidades biológicamente activas. Las enzimas pueden inmovilizarse en liposomas o en micelas, pero la inmovilización de células requiere una matriz más robusta. Durante mucho tiempo las únicas matrices utilizadas para inmovilización celular fueron polímeros de origen natural, tales como alginatos y pectatos.²¹ Sin embargo, estas matrices no proveen una adecuada protección a las células ya que no son químicamente estables, son biodegradables y presentan malas propiedades mecánicas.²² Surgió entonces la idea de producir matrices más robustas con la adición de componentes “inorgánicos” que dieron origen a encapsulados híbridos.²³ Un avance en este sentido lo constituyeron los experimentos del grupo de Carturan,^{24,25} en los cuales se suspendieron células sobre polímeros de origen natural para luego someterlas a corrientes de vapores de alcóxidos de Si(IV). Dichos tratamientos resultaron en recubrimientos de sílica que, si bien mejoraron las propiedades mecánicas de estos polímeros, no resultaron apropiados para resolver el problema de la estabilidad a largo plazo en biorreactores y fueron utilizados principalmente para el desarrollo de órganos artificiales.^{26,27,28}

Otra alternativa de inmovilización la constituyen los soportes de crecimiento, tales como esponjas de poliuretano²⁹ o acero inoxidable,³⁰ que si bien tienen buena estabilidad química y mecánica, presentan la desventaja de no aislar al microorganismo del medio circundante, ya que el mismo no queda encapsulado en el soporte.^v

Las cerámicas biológicamente activas (biocerámicas), que combinan componentes biológicos con matrices cerámicas, surgen como una alternativa interesante para superar estas limitaciones.³¹ La química sol-gel de silicatos provee una ruta biocompatible para la síntesis de hospedadores inorgánicos ya que puede realizarse a temperaturas moderadas y en condiciones fisiológicas. Estas condiciones, que se aproximan a las empleadas por organismos, como por ejemplo las diatomeas que bioinducen estructuras de sílica, han sido explotadas para encapsular bacterias y levaduras con diferentes objetivos de aplicación.^{32,33,34,35} No obstante, aun las condiciones relativamente suaves de la química sol-gel pueden resultar dañinas para las células de organismos superiores y afectar la viabilidad celular.³⁶ En los procedimientos estándar, las células no sólo están expuestas a un ambiente hostil durante la síntesis inorgánica, sino que quedan en contacto directo y permanente con los grupos silanoles del gel durante todo el proceso de encapsulación. Esto puede resultar inapropiado para aplicaciones en las cuales la biomasa debe ser reutilizada en regímenes de cultivo a largo plazo.

Los silicatos representan la categoría dominante de la industria cerámica. Son económicos, debido a la abundancia de materias primas, y poseen propiedades mecánicas, térmicas y ópticas adecuadas para un amplio rango de aplicaciones. En esta tesis, como en la mayoría de los trabajos de encapsulación, se trabajó con matrices de sílica.

I.4. QUIMICA DEL SI(IV) Y PROCESOS SOL-GEL

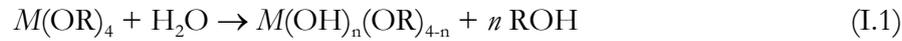
La “*chimie douce*”, basada en procesos sol-gel, fue desarrollada como una ruta alternativa para la obtención de nuevos materiales cerámicos.³⁷ Actualmente es una vía de síntesis apropiada para la preparación de materiales biomiméticos, dado que brinda la posibilidad de obtener productos de alta pureza con propiedades específicas a bajas temperaturas, lo cual es condición necesaria para la preservación de la actividad biológica.

Un bosquejo de las diferentes etapas del proceso sol-gel y el tipo de material que puede obtenerse se presenta en la figura I.1. En la etapa inicial, el compuesto de partida participa en una serie de reacciones de hidrólisis y condensación que conducen a formar

^v La encapsulación es un caso particular de inmovilización en la cual el organismo o sistema biológico queda contenido dentro del material soporte y aislado del entorno.

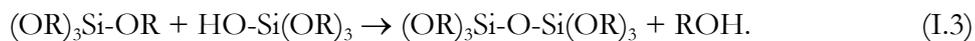
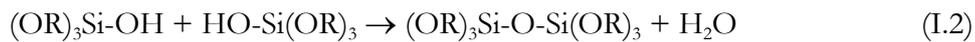
partículas (soles particulados) o polímeros (soles poliméricos), uniformemente distribuidos en el solvente.

La mayoría de los geles óxido de interés tecnológico son preparados por hidrólisis de alcóxidos, $M(OR)_n$, y sus derivados, donde R es un grupo alquilo.

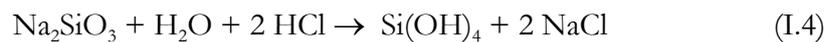


La reactividad de los alcóxidos de silicio, $Si(OR)_4$, es baja comparada con la de los alcóxidos de otros metales de transición (por ejemplo, la velocidad de hidrólisis de $Ti(OR)_4$ es cuatro órdenes de magnitud mayor que para $Si(OR)_4$). Esta diferencia en reactividad se debe tanto al hecho de que el número de coordinación del silicio en el alcóxido es máximo, por lo cual la expansión de la coordinación al reaccionar con H_2O no ocurre espontáneamente, como a la mayor electronegatividad del Si(IV) que lo hace menos susceptible al ataque nucleofílico.

Dos moléculas parcialmente hidrolizadas se pueden unir por reacciones de condensación con liberación de una molécula pequeña, tal como agua o alcohol:



Otra alternativa para la síntesis en medio acuoso es partir de ácido silícico, $Si(OH)_4$, que se obtiene fácilmente acidificando un silicato soluble:³⁸



A partir de un mismo precursor, variando las condiciones de síntesis, se pueden obtener tanto geles particulados como poliméricos. Los objetos euclídeos (partículas densas) son más propensos a formarse cuando la solubilidad de la sílica es alta; la partícula crece hasta un tamaño que corresponde a un mínimo de energía libre de la interfaz. En sistemas no acuosos, la solubilidad de la fase sólida es muy limitada y la condensación es prácticamente irreversible. En estas condiciones las uniones se forman al azar y no se alcanza una configuración de equilibrio, obteniéndose *clusters* poliméricos.

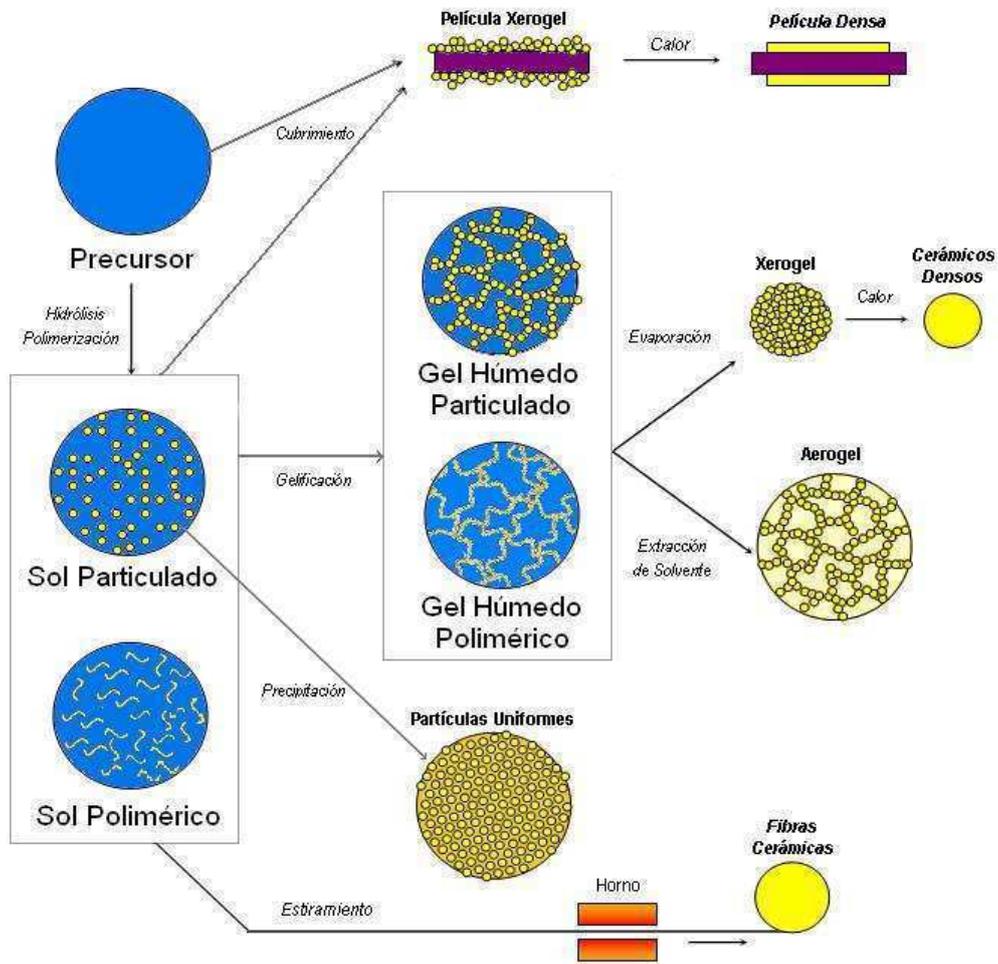


Figura I.1. Representación esquemática de los pasos de procesos sol-gel en relación con el material final.³⁹

La polimerización del ácido silícico acuoso procede a través de la condensación de dos monómeros para formar un dímero que, por posteriores reacciones de condensación, forma partículas primarias u oligómeros densos, compuestos por pocas unidades de $\equiv\text{Si}(\text{OH})_n$ que actúan como centro de nucleación para el crecimiento de partículas más grandes. Las uniones entre estas partículas forman un entramado que se extiende por el medio líquido, dando lugar al gel.

Las reacciones de condensación que llevan a las partículas ocurren de manera tal que los enlaces Si-O-Si tienden a ser máximos, llevando a un mínimo de grupos hidroxilo ubicados en la superficie. El crecimiento de las partículas primarias ocurre mediante un proceso

reversible,⁴⁰ en el cual las partículas de menor tamaño, con mayor curvatura, se redisuelven y reprecipitan sobre las partículas de mayor tamaño, de menor curvatura.^{vi} A partir de este punto la formación del gel depende de la relación entre la velocidad de las reacciones de crecimiento de partículas y de unión entre partículas que varían marcadamente con el pH y la fuerza iónica.

Por encima de $\text{pH} = 7$, la solubilidad de las partículas es alta, predominando el crecimiento frente a la agregación. Esta última es restringida porque las partículas tienden a repelerse cuando el pH es alto debido a que los hidroxilos en superficie están parcialmente desprotonados y, en consecuencia, la carga superficial es negativa. En estas condiciones, el crecimiento de las partículas sigue por adición de monómeros a las partículas más condensadas. Por otra parte, por debajo de $\text{pH} = 7$, la formación de cadenas ocurre por adición de especies más pequeñas a las más condensadas (análogo a una polimerización de cadenas de carbono) o por agregación de las especies condensadas. Esta última es máxima a $\text{pH}=2$, valor al cual la carga superficial es nula, que por definición es el punto isoeléctrico de la sílica (PIE).

Para que la encapsulación sea poco agresiva, el pH de trabajo debe ser cercano al fisiológico que se encuentra entre 6 y 8 para la mayoría de las células. En estas condiciones, para favorecer la gelificación se aumenta la concentración de sales a fin de disminuir la repulsión entre partículas, procedimiento bien conocido en la química de coloides.

En base a lo anterior, pH y fuerza iónica son dos parámetros que definen el umbral de tamaño de partícula a partir del cual predomina la formación de un entramado por sobre el crecimiento. Este umbral, a su vez, promueve que un gel sea más polimérico o más particulado. En la figura I.2 se esquematiza la dependencia del tamaño umbral y de la estructura de los geles de sílica en fase acuosa con el pH y la fuerza iónica.

La transición sol-gel o punto de gelificación es el momento en el cual las unidades están conectadas por condensación de polímeros o por agregación de partículas, formando un *cluster* “gigante” del tamaño del recipiente, o *spanning cluster*. En este esquema, el gel se forma cuando la conectividad entre unidades produce una trama elástica y con alta viscosidad, que no fluye. En el punto de gelificación coexisten el *spanning cluster* con unidades más pequeñas en la fase sol y durante las primeras etapas de envejecimiento estas últimas se unen al *spanning cluster*, consolidándose más la estructura del gel.

^{vi} Este proceso se denomina “Ostwald ripening”

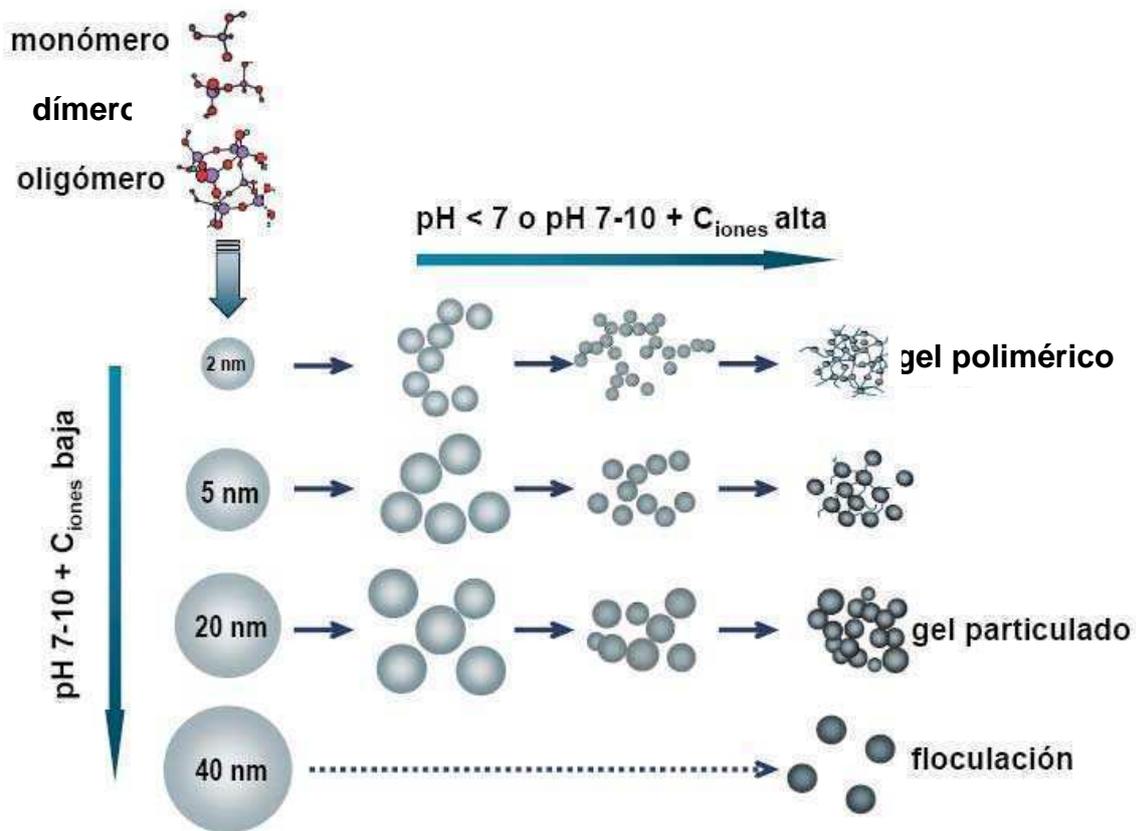


Figura I.2. Esquema de la dependencia del tamaño de partícula umbral y de la estructura del gel con pH y fuerza iónica.

La síntesis de materiales sólidos a partir de gels involucra una etapa de evaporación del solvente que puede ser simultánea a la gelificación o posterior a ésta.

La eliminación completa del solvente da como resultado lo que en la jerga se denomina xerogel, o bien, si el secado se realiza en condiciones supercríticas, un aerogel con fracciones sólidas del orden del 1%. Por otra parte, cuando se encapsulan células vivas, no puede llevarse a cabo un procesamiento del gel que involucre un secado excesivo o altas temperaturas. La mayor parte de los gels sintetizados en este trabajo de tesis son gels húmedos, monolíticos (la menor dimensión del gel es mayor que un milímetro), ya que para las aplicaciones a biorreactores se requiere, además de un gel en equilibrio con un medio acuoso, una masa celular importante. Esto último trae una dificultad extra, generada por el volumen de material sintetizado, que es lograr homogeneidad y ausencia de fisuras en la matriz.

1.5. ANTECEDENTES DE ENCAPSULACIÓN EN MATRICES DE SÍLICA

Los primeros experimentos que demostraron la posibilidad de encapsular enzimas en geles de sílica fueron realizados hace más de 50 años,⁴¹ pero el interés de estos logros no fue apreciado en su momento. El mayor avance en encapsulación de macromoléculas en matrices de dióxido de silicio se remonta a principios de la década del '80, con la encapsulación de anticuerpos específicos para progesterona⁴² y con la encapsulación de distintas enzimas, como glucosa oxidasa, tripsina y fosfatasa alcalina.⁴³ A partir de allí, al entrever la factibilidad de diseñar y construir materiales inorgánicos con actividad biológica, el campo comenzó a expandirse notablemente.^{44,45} Uno de los principales éxitos del método fue el haber congelado la estructura nativa de una enzima, manteniendo o incrementando su actividad enzimática, incluso en condiciones altamente desnaturalizantes.⁴⁶ Un ejemplo es la actividad de enzimas en solventes no acuosos, donde la encapsulación provee de grupos silanoles terminales que mantienen una atmósfera de hidratación que preserva a la enzima. Otra ventaja aceptada es que se puede regular la porosidad del material a través de la síntesis, de forma tal de permitir la difusión de los sustratos y los productos.

En un principio, la idea de incorporar células enteras en lugar de enzimas surgió como alternativa para obtener la actividad enzimática de alguna enzima altamente expresada por ese tipo celular, pero sin necesidad de pasar por laboriosos pasos de aislamiento y purificación de la proteína a partir de un homogenato celular. En este contexto, se dio poca importancia a la preservación de viabilidad y fisiología celulares. Incluso en muchos casos se sacó ventaja del aumento en la expresión de determinadas enzimas de interés causado por el estrés del proceso de encapsulación y el estado de confinamiento posterior.⁴⁷

Si bien se ha logrado encapsular una gran cantidad de tipos celulares en matrices de sílica, la encapsulación de células con el fin de aprovechar funciones celulares (por ejemplo toda la maquinaria biosintética de la célula para obtener un producto de interés comercial) ha sido mucho menos explorada. La principal razón es que, siendo entidades complejas, las células son mucho más vulnerables a su entorno y, por lo tanto, la preservación de su actividad representa un desafío más ambicioso.⁴⁸

En este escenario, se ha puesto considerable atención en procurar minimizar el daño celular durante y después del proceso de encapsulación. Más allá del estrés físico que experimentan las células al encontrarse confinadas en un medio no fluido, la interacción de la pared celular con los grupos silanoles de la matriz tiene un peso importante en la mortandad de las células. Para resolver este problema, se han propuesto algunas alternativas interesantes. Por ejemplo, en el laboratorio de Livage se han realizado experimentos adicionando agentes

complejantes durante la etapa de gelificación para reducir la agresividad de los grupos silanoles.⁴⁹ Sin embargo, éstos quedan distribuidos inespecíficamente en todo el gel. También se obtuvo una mejora significativa con la utilización de un porcentaje de derivados no hidrolizables en la mezcla de precursores, tales como el glicidoxipropil-trimetoxisilano (GPTMS).⁵³ Otra estrategia utilizada fue el uso de mecanismos biológicos, tales como moléculas señalizadoras del *quorum sensing* para promover el arresto del ciclo celular y lograr la adaptación al confinamiento.⁵⁰

Como se mencionó en la sección I.4, las dos principales estrategias de síntesis de geles de sílica difieren en la etapa inicial. Una es la llamada vía de los alcóxidos, en la cual el gel se sintetiza por hidrólisis ácida controlada de alcóxidos. La clara desventaja de esta vía de síntesis denominada “ruta de los alcóxidos” para aplicaciones en biomateriales es la liberación de alcohol como un sub-producto de las reacciones de hidrólisis y condensación, lo cual puede no alterar la actividad catalítica de una enzima pero suele ir en detrimento de la viabilidad celular. Esta es la razón por la cual las primeras encapsulaciones exitosas de células enteras se llevaron a cabo con levaduras, más tolerantes a concentraciones altas de alcohol en el medio.^{51,52,53,54} Trabajando en la encapsulación de enzimas, el grupo de Avnir demostró que no es necesario utilizar una cantidad extra de alcohol como cosolvente, ya que el alcohol liberado como subproducto durante la reacción es suficiente para homogeneizar los reactivos.⁵⁵ A partir de esta idea, se encontraron mejoras para un proceso en dos pasos, con una prehidrólisis inicial en medio ácido ($\text{pH} < 3$), seguida de una etapa de condensación por catálisis básica a $\text{pH} 7$, en la cual se realiza el agregado del material biológico.⁵⁶ Sin embargo, se observó una lisis importante de células, lo que puede atribuirse al alcohol generado durante la hidrólisis del precursor tetrametoxisilano (TMOS) ya que se comprobó que la remoción cuidadosa del alcohol mejora notablemente el proceso.⁵⁷ Otras alternativas consisten en la adición de precursores que liberen como subproductos alcoholes biocompatibles^{58,59} o la adición de polímeros orgánicos solubles o surfactantes en la mezcla de precursores.^{60,61}

En la síntesis por la vía acuosa, al partir directamente de ácido silícico o silicato, se evita la primera etapa de hidrólisis y no se genera alcohol como subproducto de reacción.^{62,63} Por otro lado, disminuye los costos, lo cual no constituye un detalle menor cuando se desarrollan materiales con vistas a una aplicación biotecnológica. Dado que la concentración remanente de iones sodio proveniente del silicato de sodio puede resultar citotóxica se propuso la gelificación en presencia de sílica coloidal para minimizar este efecto.^{64,65} En estos procedimientos, al disminuir la concentración de silicato de sodio en el precursor, hay un deterioro de la calidad óptica del gel resultante.

Si bien todas las vías descritas pueden ser exitosas para preservar células, la limitación del espacio para las células encapsuladas torna imposible la división celular y, en consecuencia, el crecimiento poblacional. Debido a estas restricciones, es fácil entender que no se haya podido avanzar mucho en aquellas aplicaciones biotecnológicas de biocerámicos que demandan un gran número de células metabólicamente activas.

1.6. ORGANIZACIÓN DE ESTA PRESENTACIÓN

De los factores analizados en las secciones anteriores se deduce que la evolución sol-gel tiene gran influencia en la estructura del material final cuyas propiedades pueden sintonizarse controlando las condiciones de síntesis. En consecuencia, la clave de un encapsulado exitoso surge del ajuste de los parámetros de síntesis manteniendo un compromiso entre biocompatibilidad y calidad mecánica, óptica o de transporte del material.

En virtud de los objetivos de este plan, el trabajo experimental consistió en la preparación de MABs (síntesis y encapsulación del sistema biológico) seguida de un monitoreo de la evolución de las poblaciones confinadas, especialmente tasa de crecimiento y actividad metabólica asociada al desarrollo de los tejidos celulares. En paralelo, se estudiaron las propiedades mecánicas, ópticas y de transporte de algunas matrices en relación con los parámetros de síntesis para evaluar la factibilidad de emplearlas en un dispositivo específico.

En el capítulo siguiente se describe la estrategia general ideada para la encapsulación y se la utiliza a modo de prueba de concepto para la encapsulación de microorganismos de crecimiento rápido. Se presentan y se discuten resultados de crecimiento de poblaciones unicelulares en función del tiempo para probar la división celular activa dentro del material. La selección de los tipos celulares empleados responde a la necesidad de utilizar organismos de crecimiento rápido, con los cuales pudiera validarse el procedimiento.

A diferencia de los organismos empleados en el capítulo II para validar el método de encapsulación, las células vegetales presentan una tasa de división baja, por lo cual una curva de crecimiento típica podría observarse en el término de 2-3 meses. En el capítulo III se analizan los datos de viabilidad inicial y proliferación celular monitoreados durante un lapso de 3 meses, obtenidos al encapsular células vegetales.

Las tendencias en las propiedades mecánicas, ópticas y de transporte de las matrices en función de la composición se discuten en el capítulo IV. En éste se presentan los experimentos realizados para la medición de estas propiedades y el análisis de los resultados obtenidos.

En capítulo V se describe el método desarrollado para la evaluación *in situ* del estrés celular generado en las distintas etapas de síntesis en relación con las propiedades discutidas en el capítulo IV ya que ambas cuestiones están íntimamente relacionadas y pequeñas variaciones, necesarias para aumentar la biocompatibilidad, pueden llevar a cambios importantes en la estabilidad mecánica, porosidad y calidad óptica de las matrices.

Por último, en el capítulo VI se describe el empleo de MABs para la construcción de biorreactores modulares. La racionalización de la síntesis de las matrices se realizó para dos aplicaciones concretas: 1) encapsulación de un hongo ligninolítico para la obtención de dispositivos de biorremediación y 2) encapsulación de un alga verde para la construcción de un foto-biorreactor.

I.7. BIBLIOGRAFIA

- ¹ S. Mann, J. Webb, R. J. P. Williams, Eds., *Biom mineralization: Chemical and Biochemical Perspectives*, VCH: New York, **1989**.
- ² Bäuerlein, E. Biom mineralization of unicellular organisms: an unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures, *Angew. Chem.*, **2003**, *42*, 614-641.
- ³ Coradin, T., López, P. J., Biogenic silica patterning: Simple chemistry or subtle biology?, *Chem Bio.Chem.*, **2003**, *4*, 251-259.
- ⁴ Power, M., Hosticka, B., Black, E., Daitch, C., Norris, P., Aerogels as biosensors: viral particle detection by bacteria immobilized on a large pore aerogel, *J. Non Cryst. Sol.*, **2001**, *285*, 303-308.
- ⁵ Mansur, H. S., Oréface, R. L., Vasconcelos, W. L., Lobato, Z. P., Machado, L. J. C., Biomaterial with chemical engineered surface for protein immobilization, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **2005**, *16*, 333-340.
- ⁶ Luckarift, H. R., Spain, J. C., Naik, R. R., Stone, M. O., Enzyme immobilization in a biomimetic silica support, *Nat. Biotechnol.*, **2004**, *22*, 211-213.
- ⁷ Zhang, Y., Wang, S., Eghtdari, M., Matamedi, M., Kotov, N. A., Inverted-colloidal-crystal hydrogel matrices as three-dimensional cell scaffolds, *Adv. Funct. Mater.*, **2005**, *15*, 725-731.
- ⁸ Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., *Biología molecular de la célula*, 3ra Ed., Ediciones Omega: Barcelona, **1996**.
- ⁹ Palomares, L.A., Estrada-Mondaca, S., Ramírez, O.T., Production of recombinant proteins: challenges and solutions, *Methods Mol Biol*, **2004**, *267*, 15-52.
- ¹⁰ Simmons, L.C., Yansura, D.G., Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.*, **1996**, *14*, 629-634.
- ¹¹ Romano, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for the high-level gene expression, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1995**, *6*, 527-533.
- ¹² Sudbery, P. E. The expression of recombinant proteins in yeasts, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1996**, *7*, 517-524.
- ¹³ Kobata, A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins, *Eur. J Biochem.*, **1992**, *209*, 483-501.
- ¹⁴ Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology*, **1993**, *3*, 97-130.

- ¹⁵ Kaufman, R.J. Post-translational modifications required for coagulation factor secretion and function, *Thromb Haemost.*, **1998**, *79*, 1068-1079.
- ¹⁶ Levin, D. A., The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores, *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **1976**, *7*, 121-159.
- ¹⁷ Werner, R.G., Noe, W., Kopp, K., Schluter. Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals, *J. Biotechnol.*, **1998**, *48(8)*, 870-880.
- ¹⁸ Andersen, D. C, Krummen, L., Recombinant protein expression for therapeutic applications, *Curr Opin Biotechnol*, **2002**, *13*, 117-123.
- ¹⁹ Molowa, D.T., Mazanet, R. The state of biopharmaceutical manufacturing, *Biotechnol. Ann. Rev.*, **2003**, *9*, 285-302.
- ²⁰ Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Sci.*, **2001**, *161*, 839–851.
- ²¹ Muralidhar, R. V., Jayachandran, G., Singh, P., Development of high-density cultivations systems by bioencapsulation, *Current Science*, **2001**, *81*, 3, 263-269.
- ²² Ripp, S., Nievens, D.E., Ahn, Y., Werner, C., Jerrell, J., Eastern, J.P., Cox, C.D., Burlage, R.S., Sayler, G. S., Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control, *Environ. Sci. Technol*, **2000**, *34*, 846–853.
- ²³ Chia, S. Y., Urano, J., Tamanoi, F., Dunn, B., Zink, J. I., Patterned hexagonal arrays of living cells in sol–gel silica films, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 6488–6489.
- ²⁴ Carturan, G., Dal Monte, R., Muraca, M., SiO₂ entrapment of animal cells for hybrid bioartificial organs, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, **2000**, 628:CC10.1.1–14T.
- ²⁵ Carturan, G., Dal Toso, Bonisegna, S., Dal Monte, R., Encapsulation of cells by sol-gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy, *J. Mater. Chem.*, **2004**, *14*, 2087-2098.
- ²⁶ Coradin, T., Livage, J., Synthesis and characterization of alginate-silica biocomposites, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **2003**, *26*, 1165-1168.
- ²⁷ Coradin, T., Nassif, N., Livage, J., Silica-alginate composites for microencapsulation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, *61*, 429-434.
- ²⁸ Boninsegna, S., Dal Toso, R., Dal Monte, R. J., Alginate microspheres loaded with animal cells and coated by a siliceous layer, *J. Sol-Gel Sci. Tech.*, **2003**, *26*, 1151-1157.

- ²⁹ Vaněk, T., Valterová, I., Vánková, R., Vaisar, T., Biotransformation of (-)limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* immobilized plant cells, *Biotechnol. Lett.*, **1999**, *21*, 625-628.
- ³⁰ Rodríguez Couto, S., Sanromán, M. A., Hofer, D., Gübitz, G. M., Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilization of the white rot fungus *trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes, *Biores. Technol.*, **2004**, *75*, 67-72.
- ³¹ Böttcher, H., Soltmann, U., Mertig, M., Pombe, W., Biocers: ceramics with incorporated microorganisms for biocatalytic, biosorptive and functional materials development, *J. Mater. Chem.*, **2004**, *14*, 2176.
- ³² Ciriminna, R., Pagliaro, M., Catalysis by sol-gels: An advanced technology for organic chemistry, *Curr. Org. Chem.*, **2004**, *8 (18)*, 1851-1862.
- ³³ Marseaut, S., Debourg, A., Dostálek, P., Votruba, J., Kuncová, G., Tobin, J. M., A silica matrix biosorbent of cadmium, *Int. Biodeter. Biodeg.*, **2004**, *54*, 209-214.
- ³⁴ Inama, L., Diré, S., Carturan, G., Entrapment of viable microorganisms by SiO₂ sol-gel layers on glass surfaces: trapping, catalytic performance and immobilization durability of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol.*, **1993**, *30*, 197-210.
- ³⁵ Premkumar, J. R., Rosen, R., Belkin, S., Lev, O., Sol-gel luminescence biosensors: encapsulation of recombinant *E. coli* reporters in thick silicate films, *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *462*, 11-23.
- ³⁶ Kuncova, G., Podrazky, O., Ripp, S., Trögl, J., Saylor, G. S., Demnerova, K., Vankova, R. J., Monitoring of the viability of cells immobilized by sol-gel process, *Sol-Gel Sci. Technol.*, **2004**, *31*, 1-8.
- ³⁷ Brinker, C.J., Scherer, G., *Sol Gel Science.*, Academic Press: San Diego, CA, **1990**.
- ³⁸ Freundlich, H., *Colloid and capillary chemistry*, Methuen, Londres, **1926**.
- ³⁹ María Claudia Marchi, *Tesis doctoral: Estudio de la transición sol-gel y de la estructura de geles de titania con sondas foto físicas*, Universidad de Buenos Aires, **2001**.
- ⁴⁰ Jones, R. A. L., *Soft condensed matter*, Oxford University Press, Londres, **2002**, p.38.
- ⁴¹ Dickey, F. H., Specific adsorption, *J. Phys. Chem.*, **1955**, *59*, 695-707.
- ⁴² Venton, D. L., Cheesman, K. L., Chatterton Jr., R. T., Anderson, T. L., Entrapment of a highly specific antiprogestrone antiserum using polysiloxane copolymers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, *797*, 343-347.

- ⁴³ Glad, M., Norrlöw, O., Sellergren, B., Siegbahn, N., Mosbach, K., Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica, *J. Chromatogr.*, **1985**, *347*, 11-23.
- ⁴⁴ Pierre, A. C., Sol-gel encapsulation of enzymes, *Biocatal. and Biotransform.*, **2004**, *22 (3)*, 145-170.
- ⁴⁵ Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi, M., Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials, *Chem. Mater.*, **1994**, *6 (10)*, 1605-1614.
- ⁴⁶ Frenkel-Mullerad, H., Avnir, D., Sol-Gel Materials as Efficient Enzyme Protectors: Preserving the activity of phosphatases under extreme pH conditions, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 8077-8081.
- ⁴⁷ Pressi, G., Dal Toso, R., Dal Monte, R., Carturan, G., Production of enzymes by plant cells immobilized by sol-gel silica, *J. Sol- Gel Sci. Technol.*, **2003**, *26*, 1189-1193.
- ⁴⁸ Livage, J., Coradin, T., Living cells in oxide glasses, *Rev.Mineral. Geochem*, **2006**, *64*, 315-322.
- ⁴⁹ Nassif, N., Roux, C., Coradin, T., Rager, M. N., Bouvet, O. M. M., Livage, J., A sol-gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria, *J. Mater. Chem.*, **2003**, *13*, 203-208.
- ⁵⁰ Nassif, N., Roux, C., Coradin, T., Bouvet, O. M. M., Livage, J., Bacteria quorum sensing in silica matrices, *J. Mater. Chem.*, **2004**, *14*, 2264-2268.
- ⁵¹ Carturan, G., Campostrini, R., Dire, S., Scardi, V., DeAlteriis, E., Inorganic gels for immobilization of biocatalysts. Inclusion of invertase-active whole cells of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) into thin layers of SiO₂ gel deposited on glass sheets, *J. Mol. Catal.*, **1989**, *57*, L13–L16.
- ⁵² Inama, L., Dire, S. G. C., Cavazza, A. Entrapment of viable microorganisms by SiO₂ sol–gel layers on glass surfaces - Trapping catalytic performance and immobilization durability of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biotechnol.*, **1993**, *30*, 197–210.
- ⁵³ Uo, M., Yamashita, K., Suzuki, M., Tamiya, E., Karube, I., Makishima, A., Immobilization of yeast cells in porous silica carrier with sol–gel process, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **1992**, *100*, 426–429.
- ⁵⁴ Pope, E., Gel encapsulated microorganisms –*S. cerevisiae*– silica-gel biocomposites., *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **1995**, *4*, 225–229.
- ⁵⁵ Avnir, D., Kaufman, V. R., Alcohol is an unnecessary additive in the silicon alkoxide sol-gel process, *J. Non-Cryst. Solids*, **1987**, *192*, 180-182.

- ⁵⁶ Fennouh, S., Guyon, S., Jourdat, C., Livage, J., Roux, C., Encapsulation of bacteria in silica gels, *C.R. Acad. Sci. IIc.*, **1999**, 2, 625-630.
- ⁵⁷ Ferrer, M. L., Yuste, L., Rojo, F., del Monte, F., Biocompatible sol-gel route for encapsulation of living bacteria in organically modified silica matrices, *Chem. Mater.*, **2003**, 15, 3614-3618.
- ⁵⁸ Gill, I., Ballesteros, A., Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: an efficient and generic approach, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 8587-8598.
- ⁵⁹ Brook, M., Chen, Y., Guo, K., Zhang, Z., Jin, W., Deisingh, A., Cruz-Aguado, J., Brennan, J. D., Proteins entrapped in silica monoliths prepared from glyceroxysilanes, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **2004**, 31, 343-348.
- ⁶⁰ Conroy, J. F. T., Power, M. E., Martin, J., Earp, B., Hosticka, B., Daitch, C. E., Norris, P. M., Cells in sol-gels I: a cytocompatible route for the production of macroporous silica gels, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **2000**, 18, 269-283.
- ⁶¹ Chia, S. Y., Urano, J., Tamanoi, F., Dunn, B., Zink, J. I., Patterned hexagonal arrays of living cells in sol-gel silica films., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 6488-6489.
- ⁶² Bathia, R. B., Brinker, C. J., Gupta, A. K., Singh, A. K., Aqueous sol-gel process for protein encapsulation, *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 2434-2441.
- ⁶³ Liu, D. M., Chen, I. W., Encapsulation of protein molecules via an aqueous sol-gel process, *Acta Mater.*, **1999**, 47 (18), 4535-4544.
- ⁶⁴ Finnie, K. S., Bartlett, J. R., Woolfrey, J. L., Encapsulation of sulfate-reducing bacteria in a silica host, *J. Mater. Chem.*, **2000**, 10, 1099-1101.
- ⁶⁵ Coiffier, A., Coradin, T., Roux, C., Bouvet, O., Livage, J., Sol-gel encapsulation of bacteria: a comparison between alkoxide and aqueous routes, *J. Mater. Chem.*, **2001**, 11, 2039-2044.

CAPÍTULO II

ENCAPSULACIÓN DE MICROORGANISMOS

CAPITULO II:

ENCAPSULACIÓN DE MICROORGANISMOS

«Todas las teorías son legítimas y ninguna tiene importancia. Lo que importa es lo que se hace con ellas.»

Jorge Luis Borges.

En este capítulo se describen los procedimientos básicos que llevan a la construcción de materiales con actividad biológica (MABs). Se describen los pasos de encapsulación que permitieron la división celular y el contacto célula-célula dentro de un hidrogel de sílica y se analizan las principales variables involucradas en cada una de las etapas. A modo de prueba de concepto, se encapsularon cultivos de tres microorganismos modelo: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se evaluó la viabilidad en función del tiempo para dichas poblaciones, empleando el criterio de viabilidad más ampliamente aceptado que, para microorganismos, es la capacidad de dividirse en un medio nutritivo, formando una colonia.

Los conceptos y procedimientos expuestos en este capítulo son la base a partir de la cual se construyen capítulos siguientes.

II.1. MICROORGANISMOS

En estos experimentos de encapsulación se emplearon dos especies bacterianas, *E. coli* y *B. subtilis*, y una levadura, *S. cerevisiae*. Estos microorganismos son quimioorganótrofos: su división y crecimiento dependen de la presencia de compuestos orgánicos simples (azúcares, proteínas, lípidos) que utilizan como fuente de carbono y nitrógeno, como así también de factores fisicoquímicos tales como la osmolaridad, la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno disuelto, etc.

La evolución de una población en el tiempo se define a través del parámetro “tiempo de generación”, que es el tiempo durante el cual la población se duplica en condiciones óptimas.

Este tiempo es del orden de 20, 30 y 90 minutos, para *E. coli*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae*, respectivamente.

La figura II.1 muestra una curva típica de crecimiento de un microorganismo unicelular. Después de la inoculación en un medio de cultivo de una cantidad inicial de células, X_0 , durante la fase de adaptación, el microorganismo desarrolla una intensa actividad metabólica para adaptarse al medio antes de poder duplicarse. Pasado este tiempo (fase de latencia o *lag*), se establece una velocidad de crecimiento constante, o fase de crecimiento exponencial. En esta fase, cada célula de bacteria o levadura da, por escisión o gemación, dos células hijas y después de n generaciones, se obtiene un número de células $X_n = X_0 \cdot 2^n$. El tiempo de generación $g = t/n$, y la velocidad específica de crecimiento de la población $\mu = \ln 2/g$ son los parámetros que describen su evolución.

En el curso de la fase exponencial la velocidad de crecimiento alcanza su valor más elevado. Esta fase de crecimiento se prolonga mientras las condiciones del medio sean favorables y no haya superpoblación. Finalmente, por escasez de nutrientes, por la acumulación de productos de su propio metabolismo (que a partir de cierta concentración comienzan a resultar citotóxicos) o por variaciones fisicoquímicas del medio tales como pH, temperatura o presión parcial de O_2 , se inhibe la división celular. El cultivo entra entonces en la fase estacionaria, durante la cual el número de células permanece constante. Esta fase puede durar mucho tiempo, por ejemplo décadas en el caso de las bacterias endoesporuladas como *B. subtilis*, pero siempre será seguida, más temprano o más tarde, por la fase de muerte celular.¹

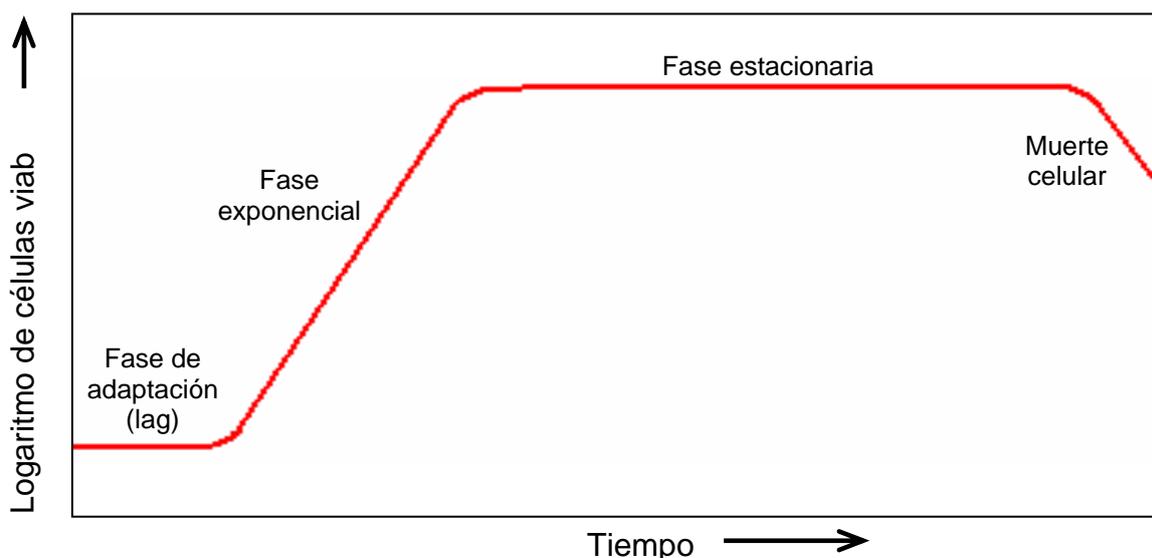


Figura II.1. Curva de crecimiento típica para un microorganismo en presencia de nutrientes no limitantes: se grafica el logaritmo del número de células viables por volumen en función del tiempo.

La curva de crecimiento permite determinar el tiempo de cultivo necesario para la obtención de microorganismos en el estado fisiológico deseado. Para experimentos de respuesta al medio, como los de encapsulación, se seleccionaron microorganismos en crecimiento exponencial ya que durante esta etapa se encuentran en un estado óptimo, con mayor tolerancia al estrés.

II.1.a. *Escherichia coli*

Según la coloración de Gram, se pueden diferenciar dos grandes grupos de bacterias: las gram positivas y las gram negativas. Estas últimas se distinguen por tener pared celular. Su citoplasma está separado del medio externo por tres capas sucesivas características: la membrana externa (compuesta por lipopolisacáridos y fosfolípidos y atravesada por porinas, poros proteicos que permiten el paso de compuestos de bajo peso molecular) que se asienta sobre una estructura rígida de peptidoglicano, el periplasma (donde se acumulan nutrientes y productos metabólicos) y la membrana citoplasmática. La pared bacteriana le confiere a las bacterias protección mecánica, y mayor resistencia al estrés osmótico.

E. coli pertenece a la familia de las enterobacterias, bacilos gram negativos que son huéspedes normales del tracto digestivo del hombre y de otros animales de sangre caliente. Su genoma fue uno de los primeros en ser secuenciado en forma completa y es un microorganismo modelo ampliamente utilizado tanto en investigación como en la industria.

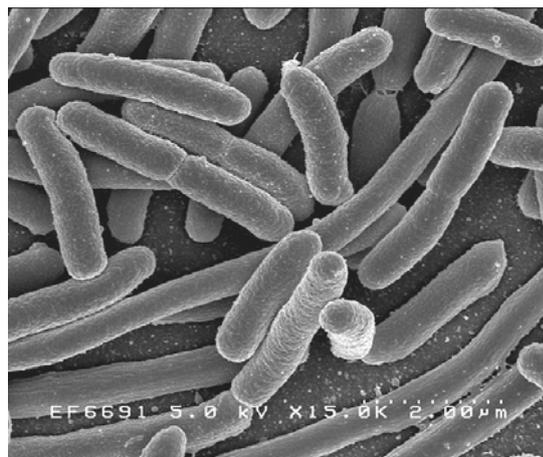


Figura II.2. *Escherichia coli*

Foto de microscopía electrónica de barrido (SEM) 25.000x, donde puede apreciarse el tamaño celular aproximado del bacilo (0.5 - 1 μm de diámetro x 2 - 3 μm de largo).²

II.1.b. *Bacillus subtilis*

En términos de popularidad como un organismo modelo de laboratorio, *B. subtilis* es el equivalente gram positivo de *E. coli*. Si las condiciones del medio no son propicias, este microorganismo entra en un proceso de diferenciación celular que conduce a la producción de una estructura especial llamada endospora, que es una forma de reposo criptobiótica, es decir de metabolismo prácticamente detenido, que le permite resistir una amplia gama de agentes agresivos ambientales, físicos y químicos. La célula-madre (la célula vegetativa original que generó la endospora) finalmente se autolisa, liberando a la espora, la cual es capaz de permanecer en estado criptobiótico varios decenios. Las esporas son formas de reposo y no formas reproductivas; cuando las condiciones del medio vuelven a ser propicias, se desencadena su germinación: se reinicia la actividad metabólica, de modo que cada espora genera una nueva célula vegetativa, capaz de realizar división binaria.

En algunas circunstancias la germinación puede inducirse con un inductor específico. Por ejemplo, las esporas de bacilo inmovilizadas en films delgados de sílica presentan germinación dependiente del agregado dipicolinato de calcio.³

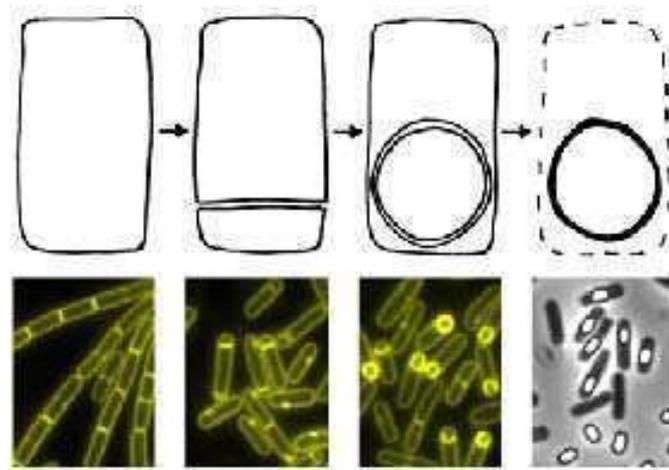


Figura II.3. Esporulación de *Bacillus subtilis* ⁴

Arriba: Esquema de división asimétrica con diferenciación celular: la célula-madre se divide en forma asimétrica, formando inicialmente una doble membrana de péptidoglicano, que da origen a la endospora. Finalmente se esquematiza la autólisis de la célula-madre, que deja libre a la espora.

Abajo: Fotos de microscopía confocal de fluorescencia 20.000x, donde mediante marcaciones específicas puede seguirse el proceso de esporulación. En la última fotografía las esporas se distinguen al microscopio iluminadas con luz blanca.

II.1.c. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) es un hongo unicelular utilizado industrialmente en la fabricación de pan, cerveza y vino, entre otras variadas aplicaciones. Se divide por gemación y puede tener una reproducción asexual cuando se encuentra en su forma haploide, o de manera sexual cuando a partir de un cigoto se forma un asca que contiene cuatro ascosporas haploides.

S. cerevisiae es un sistema eucariota, con una complejidad superior a la de la bacteria pero compartiendo con ella muchas de sus ventajas técnicas. Además de su rápido crecimiento, dispersión de las células y la facilidad con que se replican cultivos y aíslan mutantes, se dispone de un sistema de transformación de ADN sencillo y versátil. Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite su manipulación con las mínimas precauciones.

Las utilidades industriales más importantes de esta levadura explotan su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol durante el proceso de fermentación. Básicamente, este proceso se lleva a cabo cuando la levadura se encuentra en un medio muy rico en azúcares (como la D-glucosa). En condiciones de escasez de nutrientes, la levadura utiliza otras rutas metabólicas que le permiten obtener un mayor rendimiento energético, y por tanto no realiza la fermentación.

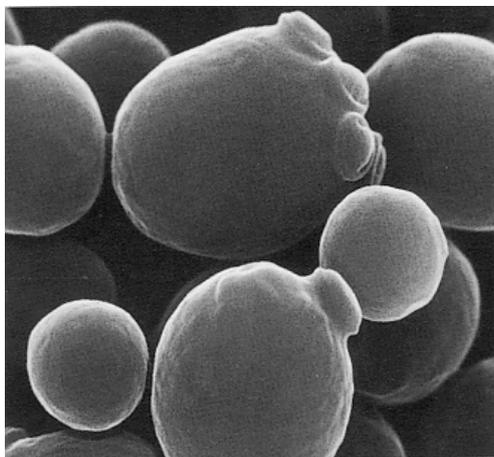


Figura II.4. – *Saccharomyces cerevisiae* ⁵

Foto de microscopía electrónica de barrido (SEM) 20.000x, donde puede apreciarse el tamaño celular aproximado (2 - 6 μm de diámetro).

Desde el punto de vista de la síntesis de biomateriales, *S. cerevisiae* presenta la ventaja de ser tolerante a una concentración de alcohol relativamente alta. En los primeros trabajos de encapsulación en matrices inorgánicas se aprovechó esta cualidad para emplear matrices de sílica obtenidas a partir de alcóxidos de silicio⁶.

II.2. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD

La evaluación de la cantidad de microorganismos viables por unidad de volumen se realiza mediante la técnica de recuento en placa de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Para aplicar este método es necesario tener una estimación de la carga de microorganismos de la muestra de partida. El protocolo usual se basa en realizar diluciones apropiadas de la muestra que se siembran en una placa de Petri con medio de cultivo semisólido (el volumen sembrado es del orden de 100 μ l). Esta placa se mantiene en estufa de cultivo a la temperatura adecuada durante el tiempo necesario para que se forme, a partir de cada célula inicial, una colonia que pueda ser detectada a ojo desnudo. Está establecido que el conteo de las colonias formadas es válido en el rango 30 – 300 UFC; por debajo de ese valor la dispersión estadística es muy grande y por arriba de este valor aumenta enormemente el error por defecto debido a la presencia de colonias formadas por dos células sembradas inicialmente a muy corta distancia entre sí.⁷ En los ensayos de viabilidad realizados por este método se realizan diluciones seriadas de la muestra al décimo y se siembran tres de las diluciones para las cuales se espera contar entre 30 y 300 colonias. Estos ensayos demandan un gran esfuerzo ya que, para obtener resultados estadísticamente significativos, es necesario realizar un número importante de replicados de cada muestra.

Cuando el número de muestras a evaluar es muy grande o bien no es posible estimar la carga de microorganismos de las mismas (que requiere sembrar un mayor número de diluciones), una alternativa interesante es el método de siembra puntual en placa de Petri. Éste consiste en realizar diluciones seriadas al décimo (generalmente 7) y sembrarlas, en gotas discretas (volumen entre 2 y 4 μ l) en una única placa de Petri. En la figura II.5 se muestra un esquema de diluciones y siembra de muestras y en la figura II.6 se ve una foto tomada de una placa sembrada por este método.

En este trabajo se realizaron algunas modificaciones para optimizar el método de siembra puntual en cuanto a calidad de los datos y rapidez de obtención de resultados. Esto último es especialmente útil para emplear este método como análisis preliminar para estimar la carga de microorganismos de una muestra. Conocido este valor, se siembra en la forma tradicional sólo la dilución de muestra para la cual se espera obtener resultados estadísticamente significativos.

Los cambios introducidos son los siguientes: 1) se realizan diluciones seriadas de la muestra y de una dilución al medio de la muestra; 2) para disminuir el error por exceso generado por división celular previa a la absorción de la gota sembrada sobre la placa de Petri, se prepara un medio semisólido con mayor concentración de agar (2,5% en lugar de 2% en peso) , y 3) las colonias se cuentan bajo la lupa, haciendo coincidir la zona de siembra con el campo visual. Se

detectan colonias a las 8 horas de haber sido sembradas y pueden contarse hasta 100 colonias en cada punto de siembra.

Dado que este no es un método comúnmente usado para la evaluación de viabilidad, se realizó un estudio de la precisión y exactitud del mismo, tomando como valor de referencia el hallado por el método de recuento de UFC. Se prepararon dos suspensiones bacterianas (*E. coli* en *buffer* fosfato 0,1 M, pH 7) y se analizaron realizando tres series de diluciones independientes, sembradas cada una por triplicado. En la tabla II.1 se presentan los resultados hallados. Se concluyó que el método presenta buena exactitud (97% y 100% respecto de los valores de referencia para cada una de las muestras ensayadas) y una precisión aceptable (desviación estándar de 14 y 15 %, comparada con 10 y 5 % obtenido por el método de siembra tradicional).

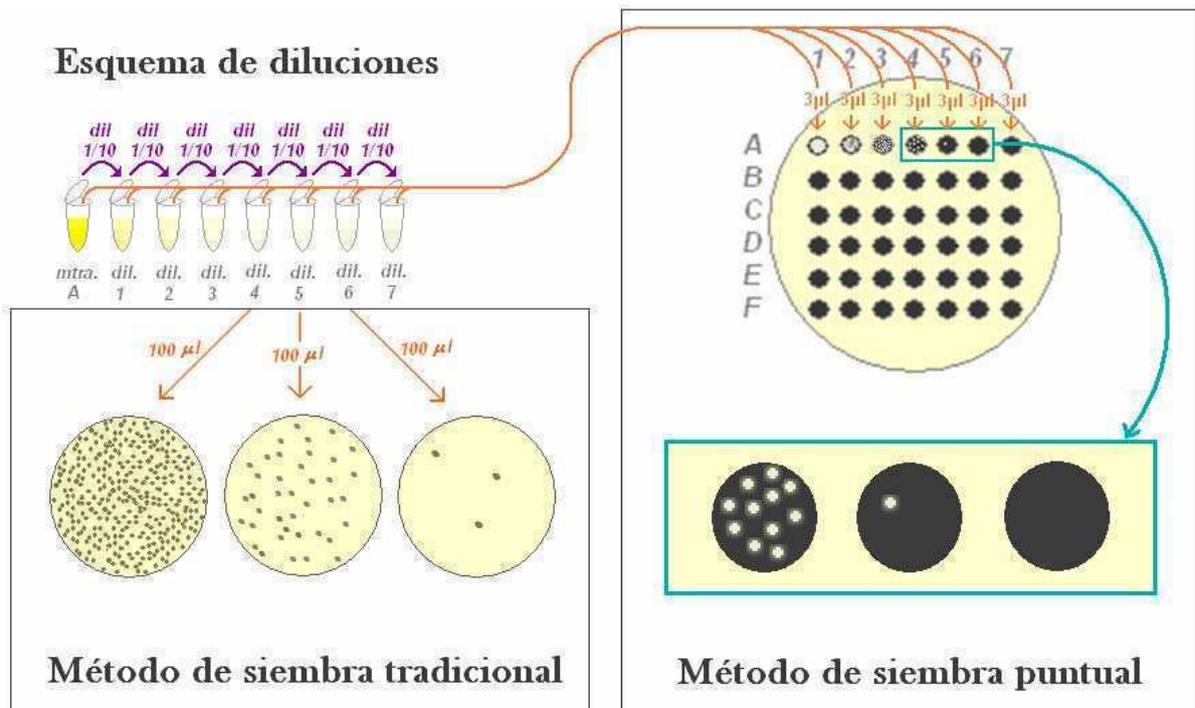


Figura II.5.

Ensayos de viabilidad: esquema de diluciones y siembra de muestras para el método de siembra en placa tradicional (izquierda) y para el método de siembra puntual (derecha), para una muestra A hipotética, con un título de $4 \cdot 10^8$ bacterias/ml.

A la derecha, abajo, se muestra el detalle de la zona ampliada de la placa de siembra puntual que corresponde a las 3 placas sembradas por el método tradicional.

En una única placa pueden sembrarse distintas diluciones de 6 muestras (A, B, ..., F).

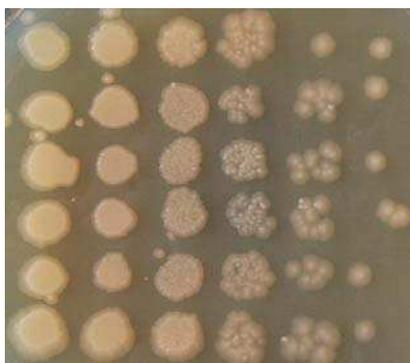


Figura II.6. Foto de una placa sembrada por el método de siembra puntual.

Tabla II.1. Comparación entre el método de siembra tradicional y el método de siembra puntual - UFC

dilución	Método de siembra tradicional			Método de siembra puntual			
	1/ 100.000	1/ 1.000.000	1/ 10.000.000	1/ 30.000	1/ 100.000	1/ 300.000	1/ 1.000.000
Muestra 1-a	>300	108	<30	93	35	9	3
	>300	93	<30	90	32	8	2
	>300	101	<30	78	19	10	2
Muestra 1-b	>300	79	<30	100	23	6	1
	>300	82	<30	89	24	9	4
	>300	103	<30	97	28	10	5
Muestra 1-c	>300	94	<30	105	30	11	0
	>300	91	<30	77	25	9	3
	>300	90	<30	81	26	8	1
Muestra 2-a	>300	166	<30	>100	50	14	6
	>300	191	<30	>100	43	11	6
	>300	186	<30	>100	51	18	5
Muestra 2-b	>300	177	<30	>100	62	19	6
	>300	182	<30	>100	58	21	4
	>300	170	<30	>100	55	22	7
Muestra 2-c	>300	180	<30	>100	47	17	3
	>300	199	<30	>100	50	20	3
	>300	175	<30	>100	50	19	4
Cantidad de placas usadas	54			2			

Tabla II.1 continuación – Carga bacteriana de dos muestras, evaluada a partir de ambos métodos.

Resultados	Método de siembra tradicional		Método de siembra puntual	
	Promedio	RSD %	Promedio	RSD %
Muestra 1	9,3 x 10 ⁸	9,6 %	9,0 x 10 ⁸	14,2 %
Muestra 2	1,8 x 10 ⁹	5,4 %	1,8 x 10 ⁹	15,2 %

Cuando no es necesario contar con valores cuantitativos, puede utilizarse el método de evaluación de la turbidez del cultivo por absorbancia a 600 nm, más sencillo y rápido que el método de recuento de placas.¹ Éste se utiliza generalmente para obtener curvas de crecimiento en cultivos líquidos. La estimación de la cantidad absoluta de microorganismos por unidad de volumen de muestra se realiza a partir de una curva de calibración con suspensiones de carga conocida. Sin embargo, en muchos ensayos alcanza con tener valores relativos, ya que lo que verdaderamente importa evaluar es en qué medida se modifica la curva de crecimiento de una cepa al variar las condiciones de cultivo. En estos casos, se realizan curvas de crecimiento en forma paralela, entre la condición a evaluar (por ejemplo, presencia de alguna toxina) y el control (ausencia de toxina).

II.3. CONSTRUCCIÓN DE MABs EN MATRICES DE SÍLICA

II.3.a. Estrategia general de síntesis

Tal como se mencionó en el capítulo anterior, la ruta de síntesis de matrices de sílica puede realizarse partiendo de silicatos en solución acuosa o partiendo de alcóxidos de silicio. La primera es más difícil de controlar pero presenta dos ventajas importantes para la construcción de MABs: la ausencia de alcohol mejora la biocompatibilidad y su costo es significativamente menor. Esto último es fundamental para proyectar una aplicación biotecnológica sustentable.

La estrategia empleada para obtener células en macrocavidades de matrices de sílica se resume en la figura II.7. Básicamente consta de 3 pasos: (i) inmovilización de las células en alginato de calcio (Ca-alg), (ii) encapsulación de las esferas de Ca-alg conteniendo las células en un monolito de sílica obtenido por la vía sol-gel y (iii) redisolución del Ca-alg por quelación de Ca²⁺ con citrato, tornando líquido el contenido de las macrocavidades dentro del gel.

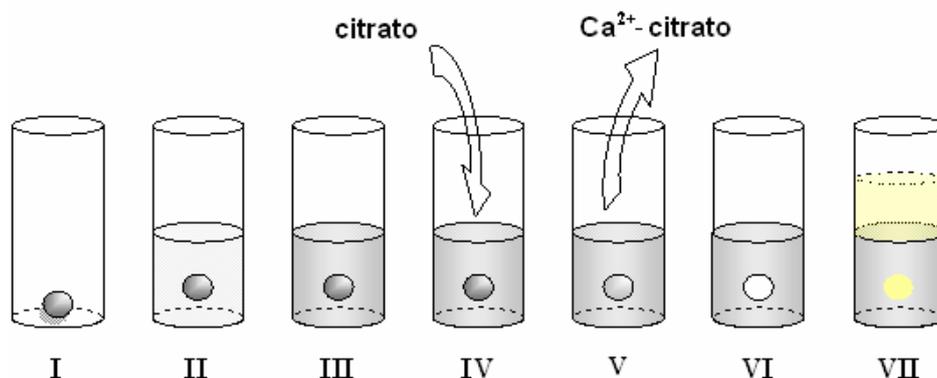


Figura II.7. Resumen de los pasos involucrados en el procedimiento de síntesis descrito en este capítulo para la encapsulación de células:

I. Se coloca dentro del molde para la preparación del MAB una esfera de alginato de calcio que contiene las células de interés inmovilizadas. II. Se llena parcialmente el molde con los precursores sol-gel (sílica coloidal comercial, silicato de sodio y ácido succínico). III. Se agita vigorosamente a temperatura ambiente durante el tiempo requerido para alcanzar el punto de gelificación (típicamente entre decenas de segundos y varios minutos). Se obtiene un hidrogel de sílica. IV. Se agrega citrato de potasio, que difunde a través del hidrogel de sílica y secuestra los cationes Ca^{2+} del interior de las cápsulas de alginato. V. El espacio ocupado por la cápsula se torna líquido a medida que el Ca^{2+} difunde hacia afuera del hidrogel en la forma de complejo Ca(II)-citrato . VI. Como resultado se obtiene una cavidad esférica que contiene una suspensión de células en medio líquido. VII. Se agrega el medio de cultivo según los requerimientos de las células encapsuladas. Los nutrientes difunden hacia la cavidad, permitiendo la división celular y el consiguiente crecimiento de la población de células albergadas en la matriz de sílica.

II.3.b. Inmovilización previa en alginato de calcio

Alginato (alg) es un término colectivo que se da a una familia de exopolisacáridos producidos por algas pardas y algunas bacterias. Químicamente son copolímeros lineales de residuos de (1→4)- β -D-manuronato (M) y α -L-guluronato (G). Tanto la composición de residuos de M/G como el patrón de distribución de los mismos dependen de la especie de alga o microorganismo productor.⁸ Actualmente, mediante la utilización de enzimas específicas, se dispone comercialmente de alginatos de determinado rango de peso molecular y de estructura controlada.⁹

En la figura II.8 se presenta un esquema del modelo *egg-box*, aceptado para la formación de gelatos de calcio.¹⁰ El ión Ca^{2+} , al igual que otros cationes alcalinotérreos, se une preferentemente a los residuos G del alginato. Los bloques de residuos G adoptan una conformación helicoidal 2/1 y los iones Ca^{2+} son coordinados por dos hélices de polímero, formando un dímero. La estructura del gelato puede resultar más o menos compacta según cual sea la relación Ca^{2+}/G . A

medida que ésta aumenta se forman trímeros, tetrámeros o multímeros con mayor número de polímeros de alginato, pudiendo llegar a adoptar una conformación helicoidal 3/1, más cerrada.¹¹

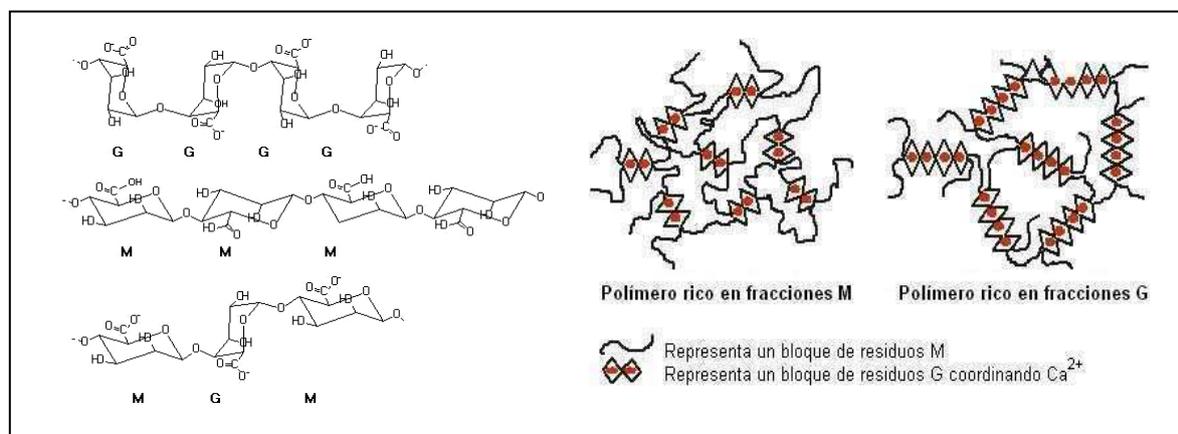


Figura II.8. Gelación del polímero de alginato. Izquierda: estructuras de alginato, de acuerdo con el predominio de los residuos de (1→4)-β-D-manuronato (M) y α-L-guluronato (G). Derecha: estructuras del gelato obtenido por coordinación de cationes de Ca²⁺ de acuerdo con el predominio de residuos M o G.

La utilización de Ca-alg para la inmovilización de células es usual en procedimientos microbiológicos, en biorreactores en *batch*, en dispositivos de biorremediación y en la encapsulación de embriones somáticos que son utilizados como semillas artificiales para algunas aplicaciones agropecuarias.^{12,13} Si bien, tal como se mencionó en el capítulo I, la gelación en polímeros de origen natural es el método más extendido para la encapsulación de células, éstos no proveen una protección efectiva a las células, esencialmente porque el gel se entrecruza en forma reversible. Aprovechando este hecho, se incluyó una etapa previa de inmovilización en gelatos con idea de minimizar el contacto de las células durante la síntesis del hidrogel de sílica.

El primer paso del protocolo de encapsulado consistió en encapsular las células en Ca-alg, a partir de alginato de sodio (Na-alg, Fluka Bio chemica). Para esto, se hizo gotear una solución de Na-alg de concentración definida sobre una de CaCl₂ 0,1 M, formándose inmediatamente cápsulas esféricas de Ca-alg. El tamaño de éstas depende de diversos factores: diámetro de la aguja, flujo de solución de Na-alg que se inyecta, las concentraciones de alginato y de Ca²⁺ empleadas, el tiempo de contacto de la gota del polímero con la solución de CaCl₂ y la viscosidad de la solución o suspensión celular en Na-alg. Para determinar el volumen de las cápsulas se las colectó de la solución de CaCl₂ con un ansa circular y sobre ésta se midió el diámetro con un calibre. Los valores obtenidos usando dos agujas comerciales se presentan en la tabla II.2. Cada punto es el valor promedio sobre 10 cápsulas.

Tabla II.2. Tamaño de las cápsulas de Ca-alg obtenidas con dos agujas de distinto diámetro. Condiciones experimentales: concentración Na-alg = 1,0% en peso, concentración CaCl₂ = 0,1 M. Bombeo con peristáltica a un flujo de 0,5 ml/min. Valores obtenidos de 100 mediciones.

Diámetro de la aguja	Diámetro medio de la cápsula	RSD
0,5 mm	2,0 mm	1,1 %
0,8 mm	3,3 mm	0,8 %

La formación de Ca-alg es un proceso complejo, que ocurre en varias etapas. Cuando la gota de Na-alg toma contacto con los cationes Ca²⁺, se forma una capa de gel en la superficie y posteriormente, a medida que el calcio difunde hacia el interior, va aumentando el espesor de la película de gelato y disminuyendo el espacio líquido en el interior de la esfera. Dependiendo de las concentraciones de las especies involucradas, en el término de minutos o pocas horas, todo el volumen de la esfera está ocupado por el gelato.

La formación inicial de una estructura relativamente laxa está favorecida cinéticamente. En presencia de exceso de calcio se forma una estructura más compacta y de mayor estabilidad termodinámica. Esta evolución involucra ruptura y formación de la coordinación Ca(II)-alg, lo cual demanda tiempos del orden de varios días/años a temperatura ambiente. En la figura II.9 se muestran los valores obtenidos para la dependencia del volumen (normalizado por el de la gota de Na-alg) de las esferas formadas a partir de soluciones de Na-alg, en función del tiempo de contacto con una solución 0,1 M de CaCl₂.

El control del tamaño de las esferas que posibilita el diseño de los MABs no es el único parámetro que incide sobre el estrés de los distintos tipos celulares encapsulados. Otros parámetros tales como la concentración de Na⁺, fuerza iónica y tiempo de hambre (falta de nutrientes) también son importantes y para cada caso habrá un compromiso entre éstos. Un análisis detallado del estrés celular en función de la concentración de Na⁺ y de la compactación de las esferas de Ca-alg se presenta en el capítulo V.

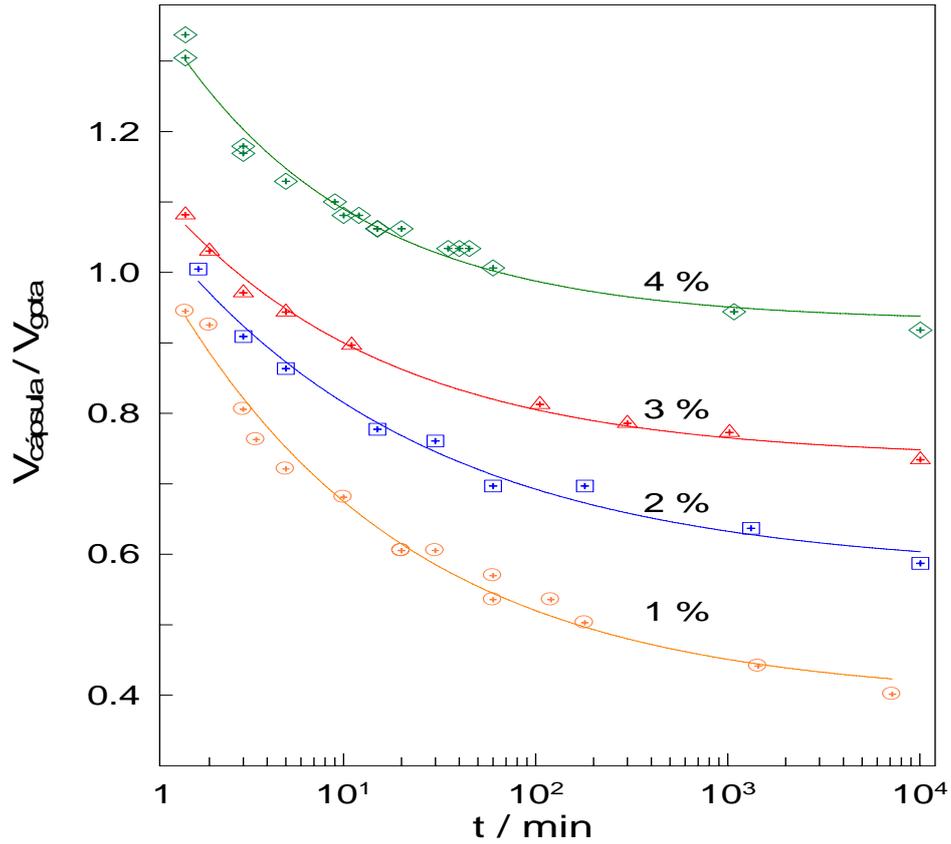


Figura II.9. Evolución del volumen normalizado por el de la gota inicial de Na-alg de esferas de Ca-alg en función del tiempo de contacto con solución de CaCl_2 0,1M. Los diferentes conjuntos de mediciones corresponden a las concentraciones de Na-alg (en %) indicadas sobre cada curva.

Por inyección continua de Na-alg en la solución de CaCl_2 se pueden obtener fibras de Ca-alg. También en este caso se puede ajustar el diámetro de la fibra variando el tamaño de la aguja y/o regulando la velocidad de inyección de la suspensión celular (ver valores en tabla II.3.) Si bien en todo el trabajo de tesis se emplearon arreglos esféricos, estos resultados indican la posibilidad de emplear otras geometrías, dando una gran versatilidad para el diseño de los MABs.

Tabla II.3. Diámetro medio de los cilindros obtenidos con dos agujas distintas. Condiciones experimentales: concentración Na-alg = 1,0% en peso, concentración CaCl_2 = 0,1 M. Bombeo con peristáltica. Valores obtenidos de 50 mediciones.

Diámetro de la aguja	Velocidad de inyección	Diámetro medio del cilindro	RSD
0,5 mm	0,5 ml / min	1,4 mm	5,3 %
	0,7 ml / min	1,2 mm	4,2 %
0,8 mm	0,5 ml / min	1,6 mm	4,1 %
	0,7 ml / min	1,5 mm	4,7 %

Resumiendo, la densidad del gelato de calcio que actuará como protector de las células durante la formación de la matriz de sílica depende de varios factores. Algunos son estrictamente intrínsecos, como la proporción de residuos G/M (resultando más compacto cuanto mayor sea dicha proporción). En cambio otros, como la concentración del polímero, la concentración de Ca^{2+} y el tiempo de contacto entre el gelato de calcio en formación y la solución de CaCl_2 , son controlables.

En esta parte del trabajo se encontraron las mejores condiciones de pre-inmovilización colectando las cápsulas luego de 10 minutos de agitación en solución de CaCl_2 .

II.3.c. Síntesis de la matriz de sílica

La vía de síntesis utilizada en esta etapa se basa en la condensación del ácido silícico, generado por neutralización en medio acuoso de una solución de silicato de sodio (SIL, Riedel de Haën, NaOH 10%, SiO_2 27%), en presencia de partículas coloidales de sílica (COL, LUDOX HS-40, 40% en agua) con diámetro medio de 12 nm. Como se explicó en el capítulo I, el agregado de partículas de sílica preformadas permite aumentar la concentración total de silicio en el gel final sin elevar la concentración de Na^+ a niveles citotóxicos.

La relación SIL/COL empleada en los distintos procedimientos depende tanto del tipo celular encapsulado como de las condiciones de operación del MAB. En líneas generales, cuando se trabaja con células sensibles a fuerzas iónicas elevadas, conviene aumentar la proporción de sílica coloidal. Esto suele ir en detrimento tanto de las propiedades mecánicas como de las ópticas además de modificar la porosidad y, en consecuencia, el transporte de nutrientes o metabolitos a través del hidrogel. En el capítulo IV se presentará un análisis detallado de la dependencia de estas propiedades con las condiciones de síntesis.

Uno de los parámetros de síntesis que incide sustancialmente sobre el tiempo de gelificación, t_g , es el pH. En líneas generales, se busca que la reacción sol-gel proceda con la rapidez suficiente para que el contacto del sistema biológico con precursores que puedan resultar nocivos sea breve, reduciendo al mínimo el tiempo de hambre de las células. Sin embargo, la velocidad de gelificación no puede ser excesivamente rápida para permitir la incorporación de las células pre-inmovilizadas en alginato en el material final. Por lo tanto, el pH de trabajo resulta entonces de un compromiso entre estos factores y del rango de tolerancia de la cepa encapsulada.

Para analizar la dependencia de t_g con el pH se emplearon las siguientes condiciones: (i) concentración total de sílice de 12,7% en peso en la mezcla inicial de precursores y (ii) relación

molar en silicio, SIL:COL = 1:4. Se ajustó el pH con HCl, sin agregado posterior de solución *buffer*.¹⁴

La medición de pH se realizó en forma indirecta. Una vez obtenido el gel (en estos ensayos se sintetizaron muestras de 400 μ l de volumen) se agregó igual volumen de agua Milli-Q y, una vez establecido el equilibrio con el gel, se midió el pH con un electrodo de vidrio en la fase acuosa.

El tiempo de gelificación a cada pH se determinó con un procedimiento similar al que se usa para determinar el tiempo de coagulación sanguínea.¹⁵ Se prepararon, con diferencia de 10 segundos entre sí, 3 muestras de idéntica composición en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad, con tapa. La primera muestra de la serie se invirtió a intervalos de tiempo regulares hasta que se evidenció aumento de la viscosidad. En ese momento se comenzó a invertir la segunda muestra de la serie y, cuando ésta gelificó, se comenzó con la última muestra. Se definió t_g como el tiempo transcurrido desde la mezcla de los precursores hasta el momento en que, al invertir el recipiente, dicha mezcla no fluye durante el tiempo de observación. De esta forma, con la última muestra se confirma el tiempo de gelificación medido en la segunda muestra o bien se obtiene un segundo valor promediable con el anterior. La ventaja de este método es que t_g se determina con una perturbación mínima. Los resultados obtenidos se muestran en la figura II.10.

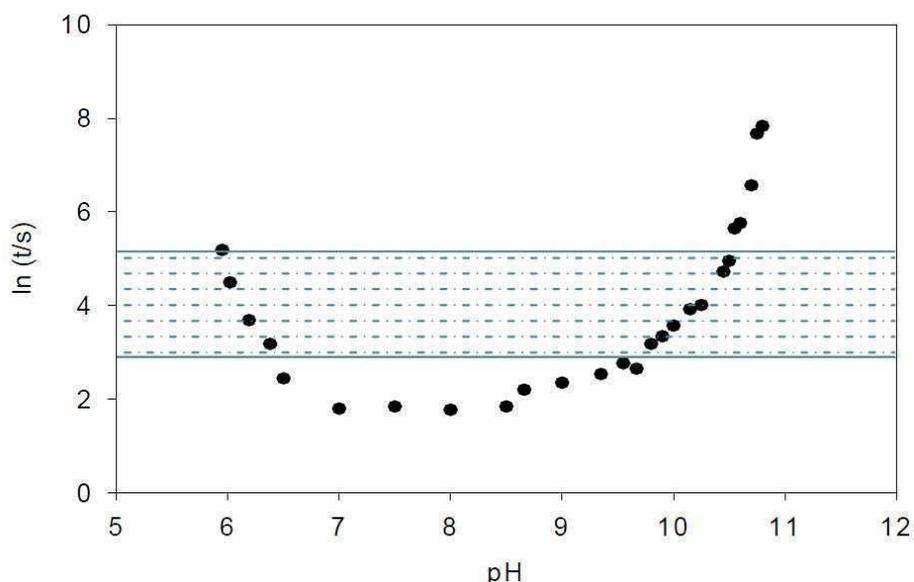


Figura II.10. Variación del tiempo de gelificación en función del pH de síntesis. Se marca la franja de tiempos que permiten una buena manipulación del material y un contacto no muy prolongado con precursores sol-gel solubles.

Dado que pequeñas variaciones en el volumen de HCl producen grandes variaciones en el pH, y con esto, también en la estructura final del material obtenido, para el trabajo con células pre-inmovilizadas se introdujo una modificación que permitió lograr la estandarización de la síntesis. Por este motivo, durante la preparación de los geles se acidificó la solución con ácido succínico (Anedra, p.a. > 99,0%). El ácido succínico (HSucc) es un ácido débil ($pK_a = 5.2$) que fue elegido considerando que: i) la mezcla con los precursores conduce a un gel con pH regulado por la dupla HSucc/Succ, evitando acidificación por debajo del pH biocompatible y ii) la constante de formación del complejo Ca(II)-Succ ($K_{Ca-Succ} = 15.9$) es significativamente menor que la del complejo con citrato ($K_{Ca-Cit} = 3.2 \times 10^3$)¹⁶ evitando una licuefacción indeseada de Ca-alg durante el tiempo requerido para la gelación de la sílica.

II.3.d. Difusión de citrato y licuefacción de la cápsula de alginato

Si se deja en contacto una solución de citrato de potasio (KCit) con la matriz de sílica, al cabo de un cierto tiempo se puede verificar en forma directa la licuefacción de Ca-alg cortando el gel y rescatando el contenido de la cavidad. Sin embargo, para poder establecer el tiempo mínimo requerido para la disolución de Ca-alg es necesario conocer la velocidad de difusión del citrato. Ésta fue evaluada con un diseño experimental basado en el movimiento de partículas magnéticas confinadas en esferas de Ca-alg cuando están sometidas al un campo magnético. El experimento se realizó con micropartículas de $CoFe_2O_4$ sintetizadas en nuestro laboratorio que, según imágenes de microscopía electrónica tienen 0,1 a 0,2 μm de diámetro. Las imágenes también mostraron la formación de agregados.

Cada esfera de Ca-alg conteniendo las partículas fue ubicada a una determinada distancia d de la interfaz gel/ KCit 5 mM. En la figura II.11 se muestra la foto de un arreglo de tubos empleado para estas medidas. La orientación de las partículas frente a un campo magnético generado por un imán externo es una evidencia indirecta de la llegada del citrato a la cavidad, y el libre movimiento de estas partículas por toda la cavidad es una indicación de la completa disolución de Ca-alg.

En la figura II.12 se muestra la dependencia del tiempo al cual se observa el movimiento libre de las partículas, t_{ϕ} con la distancia cápsula-interfaz. Se observa una relación lineal entre $(t_{\phi})^{1/2}$ y d . La extrapolación a $d \rightarrow 0$ correspondería al tiempo de disolución del alginato. Éste no es significativo (< 5 min) comparado con el tiempo de difusión del citrato en un MAB típico con las cápsulas ubicadas a 5 mm de la interfaz (≈ 1 hora). Estos resultados confirman que las matrices

poseen porosidad suficiente para permitir el transporte rápido de nutrientes de bajo peso molecular.



Figura II.11. Foto de los geles sintetizados para evaluar el tiempo característico de difusión de citrato en función de la distancia entre la superficie del monolito de sílica hasta la esfera de alginato. Se inmovilizaron en el alginato de calcio micropartículas de CoFe_2O_4 , cuya movilidad frente a un campo magnético externo fue indicio de la licuefacción de la cavidad de alginato.

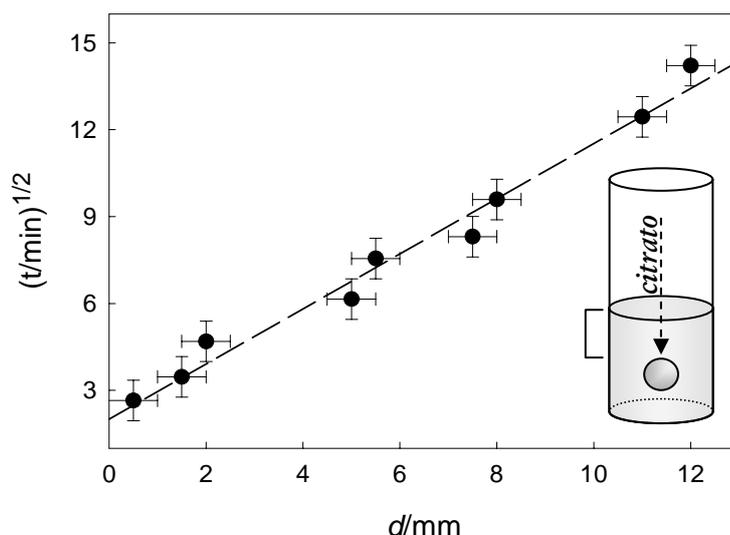


Figura II.12. Gráfico de la raíz cuadrada del tiempo de difusión en función de la distancia cápsula-interfaz gel/solución.

II.3.e. Viabilidad celular en función del tiempo

Los experimentos de encapsulación se hicieron con esporas de *B. subtilis* (cepa 168), con monolitos conteniendo una única cápsula de Ca-alg. Después de la adición del medio de cultivo tripteína-soja (TS), los tubos fueron incubados a 30 °C. Para cada tiempo de incubación, se tomaron duplicados y se sembraron diluciones seriadas de cada uno de ellos sobre un medio de cultivo semisólido. Paralelamente se realizó un control de crecimiento en el cual *B. subtilis* fue cultivado en medio líquido TS. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) por

macrocavidad en función del tiempo de incubación se presenta en la figura II.13, junto con los resultados del experimento control. En ambos casos se ve que la zona de crecimiento exponencial es de 4 a 5 días. El crecimiento de la población bacteriana se puede observar a partir de la turbidez que aumenta progresivamente dentro de las cavidades del monolito. El inserto de la figura muestra tubos al comienzo del experimento y luego de 1 semana. Es importante notar que el tiempo de licuefacción del gel y el retraso causado por la difusión de nutrientes son despreciables respecto del tiempo de crecimiento de la población de células.

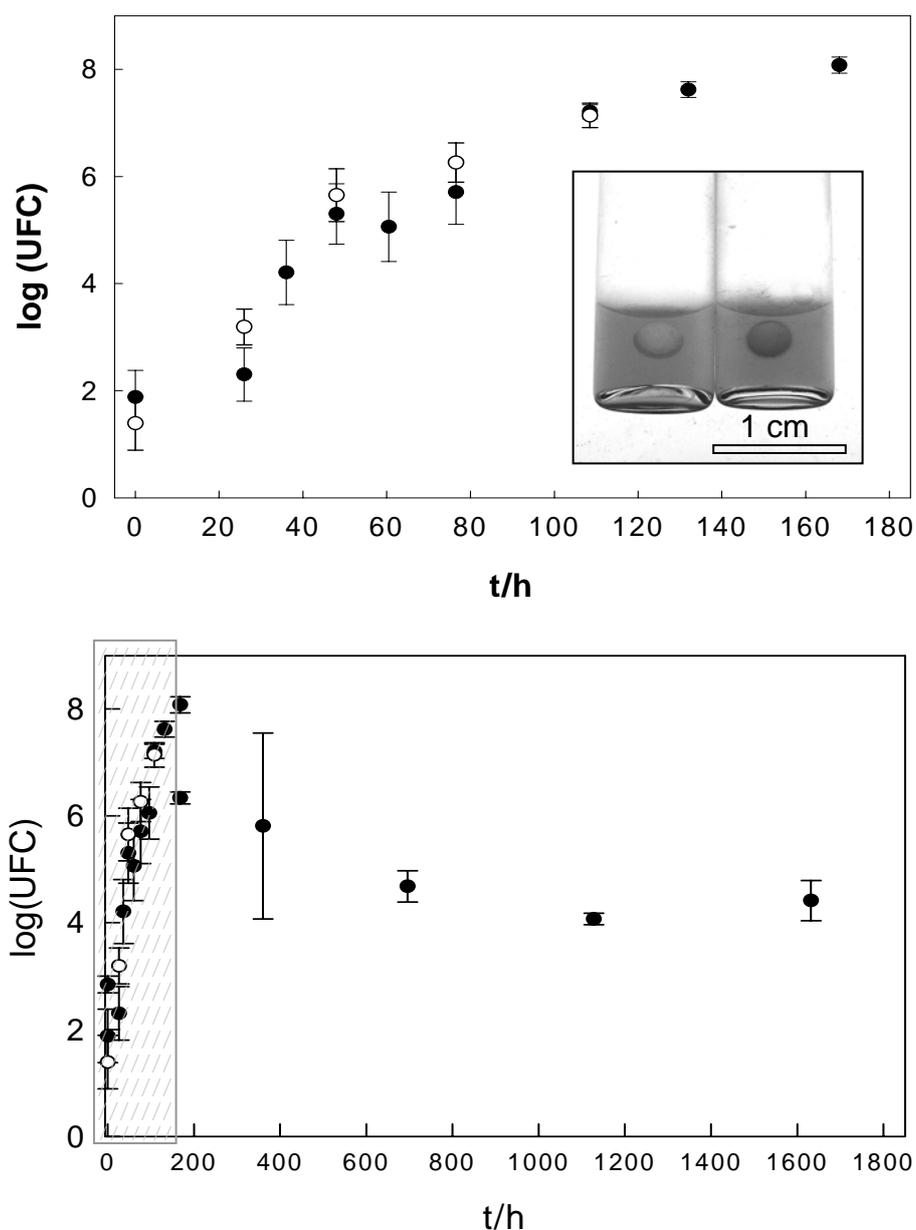


Figura II.13. Arriba: curva de crecimiento de *B. subtilis* encapsulado (●) y control en medio de cultivo líquido TS (○). En el inserto se muestra una foto de una muestra a tiempo inicial (izquierda) y después de 1 semana de incubación (derecha). El crecimiento bacteriano puede inferirse a simple vista a partir de la turbidez de la cavidad. Abajo: resultados obtenidos a tiempos largos (en el recuadro se marcan los resultados a tiempos cortos que corresponden al gráfico de arriba).

Después de una semana se completó un ciclo de amplificación de 5×10^6 . Dos monolitos adicionales, incubados al igual que los anteriores durante 1 semana, fueron dejados sin medio de cultivo a temperatura ambiente por un lapso de 1 mes hasta completa desecación. Bajo estas condiciones, se evidenció viabilidad a largo plazo, esporulación, de *B. subtilis* (se evaluó viabilidad a 1 mes y a 3 meses). Las esporas inmovilizadas permanecieron viables, formándose colonias nuevamente cuando el gel fue pulverizado, suspendido en agua estéril y dispersado sobre un medio de cultivo semisólido.

Para evaluar la generalización de resultados a otras especies menos resistentes, el mismo procedimiento fue aplicado a la bacteria no esporulante, *E. coli*, cepa DH5 α , y a células de *S. cerevisiae*, cepa Σ 1278b. En los ensayos llevados a cabo con estos microorganismos, a corto plazo se obtuvo una curva de crecimiento típica y, en el término de aproximadamente una semana, la población decreció rápidamente, llegando a 0 UFC en el término de 12 días, como se muestra en la figura II.14. Resultados similares se obtuvieron con los controles (cultivos no encapsulados).

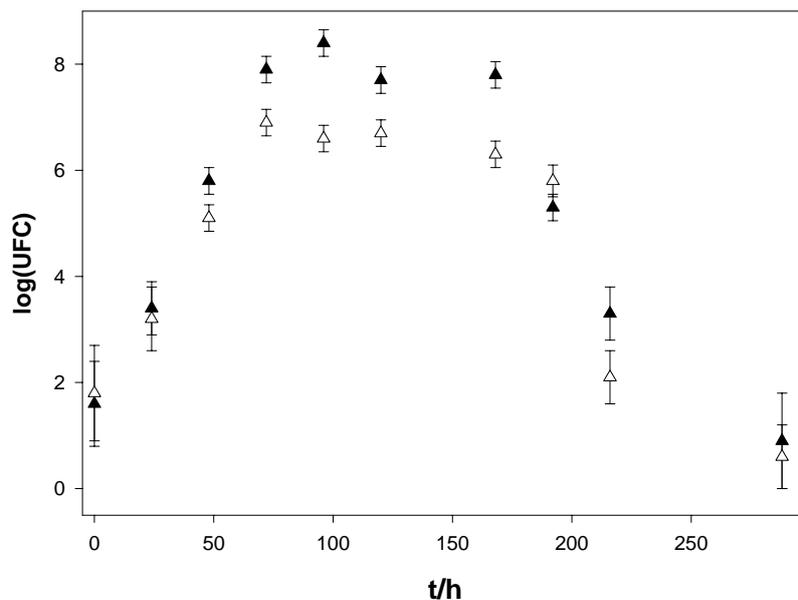


Figura II.14. Curva de crecimiento de microorganismos encapsulados: *E. coli* (▲) y *S. cerevisiae* (Δ) en medio de cultivo líquido TS.

II.3.f. Barrera de prevención de contaminación

Para evaluar la efectividad de las matrices como barrera frente a la contaminación por otros microorganismos, se hicieron ensayos inoculando el medio de cultivo con un microorganismo distinto al encapsulado dentro de las matrices. En este experimento, una colonia

de *B. subtilis* encapsulada fue incubada con un medio de cultivo inoculado con *E. coli*. Después de 5 días de incubación a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, se extrajeron muestras tanto de la cavidad interior del monolito como del medio de cultivo externo y se sembraron en medios de cultivo semisólidos, selectivos y diferenciales (Agar Mac Conkey para *E. coli* y Agar Mossel para *B. subtilis*). La figura II.15 describe esquemáticamente el diseño del experimento y en la tabla II.4 se especifica la composición de cada medio de cultivo.

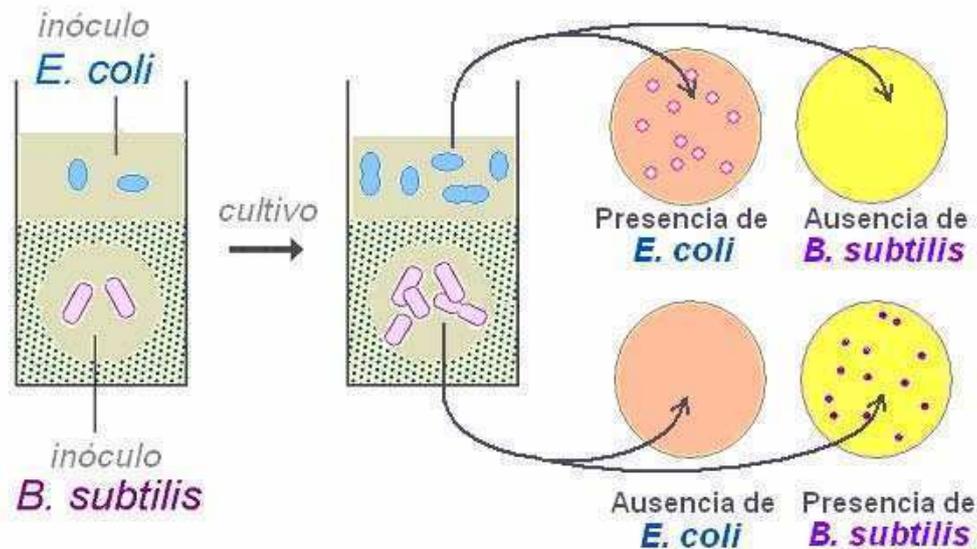


Figura II.15. Descripción esquemática del experimento realizado para evaluar la efectividad del material en la prevención de la contaminación por entrada de agentes biológicos.

Tabla II.4. Composición de los medios de cultivo para *E. coli* (Agar Mac Conkey) y *B. subtilis* (Agar Mossel)

AGAR MAC CONKEY	AGAR MOSSEL
Peptona de caseína..... 17,0 g	Peptona de carne..... 10,0 g
Peptona de carne..... 3,0 g	Extracto de carne..... 1,0 g
Cloruro de sodio..... 5,0 g	D (-) manita.....10,0 g
Lactosa..... 10,0 g	Cloruro de sodio..... 10,0 g
Sales biliares..... 1,5 g	Rojo de fenol..... 0,025 g
Rojo neutro..... 0,03 g	Agar..... 12,0 g
Cristal violeta..... 0,001 g	Agua destilada c.s.p. 1 l
Agar..... 13,5 g	
Agua destilada c.s.p. 1 l	
pH = 7,1 ± 0,1	ADITIVOS: Luego de autoclavar: 0,05 g Polimixina B

No se detectó *B. subtilis* en el medio externo ni *E. coli* en la cavidad, que contiene una población de *B. subtilis* similar a la del experimento control. De esta forma se confirmó que la matriz es una barrera eficiente para la contaminación por microorganismos.

II.4. PRINCIPALES RESULTADOS DE ESTE CAPÍTULO

En este capítulo se presenta una estrategia de síntesis original para el diseño de MABs que permite el crecimiento y división de células procariotas y eucariotas dentro de cavidades incluidas en una matriz de sílica. El método se basa en una inmovilización previa en alginato de calcio antes de la formación del gel de sílica que previene del contacto con los elementos citotóxicos inherentes al proceso sol-gel.

Se comprobó la eficacia del proceso con distintos tipos celulares: *B. subtilis*, *E. coli* y *S. cerevisiae*. En todos los casos se obtuvo una curva de crecimiento que no presentó diferencias significativas con la obtenida cuando éste se realiza en el mismo medio de cultivo pero sin encapsulación (control). Adicionalmente, cuando el microorganismo encapsulado forma estructuras de resistencia, se llegó hasta la formación del xerogel, manteniéndose la viabilidad de las esporas por un lapso prolongado (3 meses). Esta estructura seca podría funcionar como un medio de transporte seguro y resistente para especies que esporulan, actuando como una “espora híbrida múltiple artificial”.

Se investigaron los parámetros más relevantes de cada uno de los pasos. Para el primero, se analizó la influencia de la variación del diámetro de aguja y velocidad de flujo sobre las características de las esferas y cilindros de alginato de calcio obtenidos por el método de goteo en solución de CaCl_2 . También se estudió la evolución temporal del tamaño de las esferas en contacto con dicha solución. Para el segundo paso, se evaluó la dependencia del tiempo de gelificación con el pH de síntesis. Dado que, para los microorganismos encapsulados, las mejores condiciones se alcanzaron a pH cercanos a 6, se optimizó el procedimiento acidificando con un ácido débil, no complejante de los iones Ca^{2+} de la cápsula de alginato de calcio, demostrando la eficacia del proceso con el empleo de ácido succínico como fuente de protones.

Una vez formado el hidrogel de sílica, la redisolución de la matriz de alginato de calcio debe realizarse de manera tal de mantener a las células el menor tiempo posible en ausencia del medio de cultivo. Teniendo en cuenta la constante de formación del complejo Ca(II)-citrato y la baja citotoxicidad, se optó por emplear citrato de potasio para la remoción del Ca^{2+} . Se desarrolló un método basado en el movimiento libre de partículas magnéticas de una ferrita de cobalto, con el cual se evaluó el tiempo requerido para la difusión del citrato y la disolución del alginato de calcio. Con esto se determinó el coeficiente de difusión aparente del ión citrato, que también constituye un valor de referencia para la difusión de nutrientes y metabolitos de bajo peso molecular.

Se verificó que la matriz es una barrera eficiente para microorganismos, inoculando en el medio de cultivo externo un microorganismo distinto al encapsulado dentro de las matrices.

A partir de estos resultados, en los capítulos siguientes se presentarán estudios más detallados de encapsulación de células de organismos superiores. A su vez, estos resultados fueron la base para racionalizar la síntesis tal que se obtengan MABs con un mínimo de estrés de las células encapsuladas y, al mismo tiempo, con las propiedades requeridas según su función específica.

II. 5. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Brock, T. D., Madigan, M. T., *Microbiología*, Prentice-Hall: México, DF, 6ta. Ed., **1991**; cap. 5.
- ² Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH.
- ³ Matys, S., Raff, J., Soltmann, U., Selenska-Pobell, S., Böttcher, H., Pompe, W., Calcium Dipicolinate Induced Germination of Bacillus Spores Embedded in Thin Silica Layers: Novel Perspectives for the Usage of Biocers, *Chem. Mater.*, **2004**, *16*, 5549-5551.
- ⁴ Rudner, D., Harvard University, Boston.
- ⁵ Wheals, A. E. University of Bath, Inglaterra.
- ⁶ Carturan, G., Campostrini, R., Diré, S., Scardi, V., De Alteris, E. Inorganic gels for immobilization of biocatalysts: inclusion of invertase-active whole cells of yeast (*saccharomyces cerevisiae*) into thin layers of SiO₂ gel deposited on glass sheets, *J. Molec. Catal.*, **1989**, *57 (1)*, 13-16.
- ⁷ Postage, J. R., Crumpton, J. E., Hunter, J. R., The measurement of bacterial viabilities by slide culture, *J. Gen. Microbiol.*, **1961**, *J*: 15-24.
- ⁸ Draget, K. I., Smidsrod, O., SkjakBraek, G. *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, Production, and Patents.*; Steinbuchel, A., Rhee, S. K., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2005**; p 1.
- ⁹ Donati, I., Holtan, S., Morch, Y. A., Borgogna, M., Dentini, M., Skjak-Braek, G. Biomacromolecules 2005, *6*, 1031.
- ¹⁰ Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C., Thom, D., Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg- box model, *FEBS Lett.*, **1973**, *32*, 195-198.
- ¹¹ Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G.O., Nishinari, O., Funami, T., Williams, P. A., Li, L. Multiple Steps and Critical Behaviors of the Binding of Calcium to Alginate, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111*, 2456-2462.
- ¹² Onishi, N., Sakamoto, Y., Hirosawa, T., Synthetic seed as an application of mass production of somatic embryos, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **1994**, *39*, 137-145.
- ¹³ Bienaimé, C., Barbotin, J., Nava-Saucedo, J., How to build an adapted and bioactive cell microenvironment?, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2003**, *67A (2)*, 376.

- ¹⁴ Coiffier, A., Coradin, T., Roux, C., Bouvet, O., Livage, J., Sol-gel encapsulation of bacteria: a comparison between alkoxide and aqueous routes, *J. Mater. Chem.*, **2001**, *11*, 2039-2044.
- ¹⁵ Henry, J. B., *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio*, Ediciones Científicas y Técnicas: Barcelona, 9 Ed., **1993**; pp. 3-28.
- ¹⁶ Martell, A. E., Smith, R. M., *Critical stability constants*, Plenum Publishing Corporation: New York, 1977; vol. 3, pp 108, 161.

CAPÍTULO III

ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS VEGETALES

CAPITULO III:

ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS VEGETALES

«Horreur des courants d'air... Ce n'est pas de chance, pour une plante, avait remarqué le petit prince. Cette fleur est bien compliquée.»

Antoine Saint Exupéry, Le Petit Prince.

En este capítulo se presenta una extensión del procedimiento descrito en el capítulo anterior para la encapsulación de bacterias y levaduras, a células más sensibles, como las del tejido floemático de zanahoria (*Daucus carota*) y las de la línea BY2 de tabaco (*Nicotiana tabacum*).

III.1 SISTEMAS VEGETALES

El potencial de las plantas como fuente de compuestos de interés comercial es muy grande. En el mundo occidental, más del 25% de los principios activos farmacéuticos provienen del extracto de plantas.¹ Además de las aplicaciones medicinales, las plantas son fuente de un gran número de colorantes, saborizantes, fragancias, insecticidas y herbicidas. Estos compuestos son metabolitos secundarios; no cumplen un rol importante en el crecimiento de la planta *per se*, su producción está generalmente asociada a la formación de órganos: raíces, tallos, hojas y flores y no suelen ser sintetizados por microorganismos. Generalmente no son proteicos y tienen una estructura molecular compleja. Estas características hacen difícil la síntesis en el laboratorio que requiere muchos pasos, con poco rendimiento y alto costo. Por otro lado, para la producción de proteínas recombinantes,² los mecanismos de síntesis y secreción de proteínas y las modificaciones post-traduccionales son las propias de las células eucariotas,³ evitando las dificultades técnicas que suelen aparecer cuando se intenta expresar un gen de origen eucariota en un sistema procarionta.^{4,5} Comparados con otras plataformas más convencionales, tales como los cultivos microbianos y animales, las plantas ofrecen muchas ventajas en términos económicos, de escalamiento y bioseguridad.⁶

Como contraparte a estas ventajas, la falta de control preciso sobre las condiciones de crecimiento (cuando se utilizan plantas enteras) y las variaciones entre individuos de una población, no permiten alcanzar los estándares de calidad requeridos para la producción a escala industrial. Ante este escenario, los cultivos de células vegetales surgen como una alternativa prometedora, que combinaría las ventajas de las plantas con aquellas de los sistemas más convencionales.⁷

Actualmente, el cultivo de células vegetales a gran escala se enfrenta a limitaciones tecnológicas,⁸ aun cuando se han realizado cultivos exitosos en biorreactores a mediana escala. Por ejemplo, se han reportado cultivos de líneas de tabaco en prototipos entre 20 y 50 m³.⁹ Estos tipos celulares pueden ser muy grandes, con tamaños que van entre los 10 y los 100 μm y cuando están expuestos a turbulencia en tanques de mezclado con agitación, el estrés hidrodinámico suele afectar la integridad de las células. Por otro lado, la agitación vigorosa presenta muchas veces la desventaja adicional de desagregar los *clusters* de células. Esto último, constituye un problema para la biosíntesis de metabolitos que, en la mayoría de los casos, es inducida por altas densidades celulares que mantienen la comunicación célula-célula mediada por moléculas señal.¹⁰ Otra dificultad para el desarrollo de procesos basados en plantas es que su metabolismo es mucho más lento que el de los microorganismos. Los cultivos celulares tienen tiempos de duplicación que oscilan entre las 20 y 100 h, lo cual requiere mantener condiciones asépticas por largos períodos de tiempo.¹¹

Una de las claras ventajas de la inmovilización de estos cultivos es la de restaurar hasta cierto grado la comunicación célula-célula por (a través de plasmodesmos o por moléculas señal disueltas en el medio). Otra ventaja de la inmovilización es que facilita la separación de los productos de interés del medio, lo cual no sólo contribuye a la resolución de aspectos estrictamente técnicos de ingeniería del proceso (*scaling-up*), sino que también permitiría una remoción constante del producto, con el consiguiente aumento del rendimiento al evitar la acción de mecanismos de inhibición por retroalimentación (*feed-back*). Asimismo, la remoción temprana de un producto, al minimizar el tiempo de residencia en el reactor, previene la degradación del mismo.

Los sistemas inmovilizados son aplicables cuando se puede hacer una operación continua y cuando el producto de interés puede ser secretado por las células al medio extracelular. Más aun, algunas estrategias de inmovilización pueden promover y/o aumentar la síntesis de metabolitos secundarios.¹² Sin embargo, aun las más exitosas como la encapsulación por gelación de polímeros orgánicos naturales¹³ o sintéticos,¹⁴ no resuelven muchas de las limitaciones planteadas.

Los trabajos de encapsulación directa de células de plantas superiores en matrices de sílica no han sido exitosos. En un trabajo reciente, se comparó la viabilidad de distintos tipos celulares (bacterias, levaduras y células de plantas superiores) en matrices sintetizadas por el proceso sol-gel.¹⁵ En ese trabajo se usaron películas de 1 mm de espesor preparadas a partir de tetrametoxisilano (TMOS) con distintas proporciones de alginato en la mezcla de reacción para mejorar la biocompatibilidad. En estas matrices compuestas sílica-alginato, el polímero de alginato se distribuye homogéneamente en el material. Por tratarse de películas de poco espesor, la evaporación del metanol producido durante la hidrólisis es rápida y, en consecuencia, la toxicidad es mínima. Los resultados mostraron que la viabilidad de células de la línea BY-2 de tabaco, en términos de actividad de estearasa luego de 1 h post-inmovilización, está fuertemente condicionada por la concentración de sílica de la matriz, siendo prácticamente nula en matrices inorgánicas puras, en las cuales se observó un importante daño celular. Por otra parte, las matrices compuestas, si bien mejoraban las propiedades mecánicas y de estabilidad fisico-química de las matrices de alginato puro, no eran lo suficientemente robustas y evidenciaron pérdida del contenido celular inmovilizado.

En base a estos antecedentes, el diseño de MABs como módulos de biorreactores basados en cultivos celulares de plantas sería una alternativa para el *scaling up*. La conformación en módulos minimizaría la contaminación biológica de grandes volúmenes y, con una distribución racional y ordenada de los componentes, se podrían garantizar la comunicación intercelular y las propiedades mecánicas para operar en tiempos del orden de los meses.

III.2 DESARROLLO DE CALLOS EN MATRICES DE SÍLICA

III.2.a. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las células vegetales utilizadas en estos experimentos fueron iniciadas a partir de callos de la línea celular BY2 de tabaco¹⁶ (*N. tabacum*) y de tejido floemático de zanahoria (*D. carota*). Se obtuvieron suspensiones celulares a partir de callos cultivados bajo condiciones controladas sobre medio semisólido Murashige and Skoog (MS).¹⁷ Las suspensiones celulares *stock* fueron crecidas en oscuridad a (24 ± 1) °C bajo agitación orbital (120 rpm) y fueron subcultivados periódicamente cada 7 días durante 1 mes en medio MS suplementado con ácido nicotínico 40 µM, clorhidrato de piridoxina 2,4 µM, sacarosa 0,175 M y ácido 2,4-diclorofenoxiacético 0,5 µM. Previo a los experimentos de inmovilización, el cultivo fue filtrado a través de malla estéril de 50-100 µm de tamaño de poro a fin de obtener un cultivo de células aisladas. Los ensayos de contaminación se

llevaron a cabo con *E. coli* (cepa DH5 α), *S. cerevisiae* (cepa Σ 1278b) y *Trametes trogii* (cepa BAFC 463). Se utilizaron para su cultivo medio Tripteína-soja (TS), Yeast Nitrogen Base (YNB) y Extracto de Malta 2% (EM), respectivamente, adicionados con agar al 2% cuando fuera necesario un medio semi-sólido.

III.2.b. Encapsulación de células vegetales

Se tomaron 15 μ l de cultivo celular (conteniendo aproximadamente $1,5 \times 10^4$ células) y se mezclaron con 5 ml de alginato de sodio (Na-alg) al 1,5%. Una vez homogeneizada la mezcla, se hizo gotear (diámetro de aguja: 0,8 mm) en solución de CaCl_2 0,1 M. Luego de 10 min de agitación se colectaron por filtrado, esferas de alginato de calcio (Ca-alg) con diámetro entre 3,0 y 3,2 mm. Se colocaron las mismas dentro de tubos de vidrio (a razón de 15 por tubo) y se procedió al agregado de los precursores sol-gel: solución de silicato de sodio, SIL, (Riedel-de Haën; NaOH 10%, SiO_2 27%) y suspensión de sílica coloidal, COL, (LUDOX HS-40, 40% en agua) con concentración total de sílice 12,7% en peso en la mezcla inicial de precursores y una relación SIL:COL 1:4.

Una vez que el sistema gelificó, se colocaron las muestras en citrato de potasio 5 mM durante 2 h para licuar la matriz de Ca-alg. El diámetro promedio de las macrocavidades obtenidas por este procedimiento fue 3,1 mm. A continuación, las muestras se lavaron con agua y se introdujeron en un Erlenmeyer con medio MS líquido. El sistema se mantuvo bajo agitación orbital (120 rpm) a (24 ± 1) °C y el medio se reemplazó periódicamente cada 7 días. El contenido de las macrocavidades se evaluó a los 10, 20, 30, 45 y 60 días post-encapsulación y se monitorearon durante 6 meses la proliferación de células y la estabilidad física del monolito.

III.2.c. Evaluación de viabilidad celular en función del tiempo

Para evaluar la viabilidad de las células se utilizó la técnica de tinción con diacetato de fluoresceína.¹⁸ Siendo moléculas polares, los ésteres de fluoresceína penetran fácilmente en el interior de las células en forma no específica, tanto en células viables como en células dañadas. Una vez en el citoplasma, sólo son hidrolizados por esterasas en aquellas células metabólicamente activas, generando fluoresceína (máximo de emisión a 530 nm). Esta última no puede atravesar libremente la membrana celular y, por lo tanto, se acumula exclusivamente en las células viables. En la figura III.1 se presentan las estructuras de ambos compuestos.

Se preparó una solución madre de diacetato de fluoresceína (0,5% en acetona) y se almacenó a -15 °C. Previo a una tinción se preparó una dilución (1/50) de esta solución madre en medio de cultivo MS. Se colocó una gota de muestra sobre portaobjetos, se mezcló con otra gota de igual volumen de esta última dilución, se esparció y se cubrió con vidrio cubreobjetos. Para obtener resultados comparables, la observación microscópica se realizó entre los 5 y los 20 min posteriores al agregado del reactivo. Se contabilizó el número de células observadas bajo luz blanca (células totales) y el número de células que presentaban fluorescencia (células viables) en imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia (Zeiss, modelo Axioplan). Con estos valores se calculó el porcentaje de viabilidad (células viables / células totales x 100).

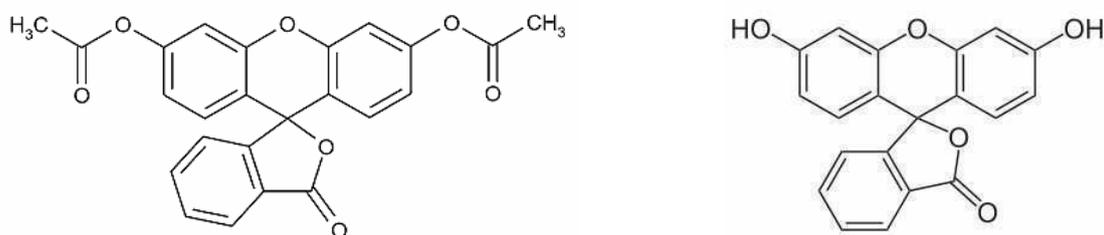


Figura III.1. Estructura de diacetato de fluoresceína (izquierda) y fluoresceína (derecha).

El protocolo consistió en tomar tubos individuales, muestreando el contenido de 10 cavidades a cada tiempo especificado. Se extrajo el volumen contenido en una cavidad (aproximadamente 15 μ l) introduciendo una jeringa dentro de la matriz semisólida y aplicando cuidadosamente una ligera succión para evitar disrupciones en el gel y en los microcallos, se diluyó con medio de cultivo MSⁱ y se esparció un volumen de 10 μ l de esta dilución de muestra sobre cubreobjetos.

Dado que para encapsular células aisladas es necesario realizar un filtrado por malla fina que puede afectar la viabilidad, se realizó un control con el cultivo obtenido inmediatamente después del filtrado. Sobre un total de 400 células se observó una viabilidad de 99,5 %.

III.3. RESULTADOS

ⁱ La dilución no se realizó para baja densidad de células

La evaluación de la viabilidad celular realizada al principio del ensayo, promediando el contenido de células de 10 cavidades reveló que el $(97 \pm 1) \%$ de las células de zanahoria y el $(95 \pm 2) \%$ de las células de tabaco permanecieron metabólicamente activas inmediatamente después del procedimiento de encapsulación.

En la figura III.2 se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de las células BY2. La curva de crecimiento muestra que el número total de células de tabaco por cavidad aumentó más de 20 veces luego de 45 días de ensayo; en la misma figura se ve un resultado similar para las células de tejido floemático de zanahoria.

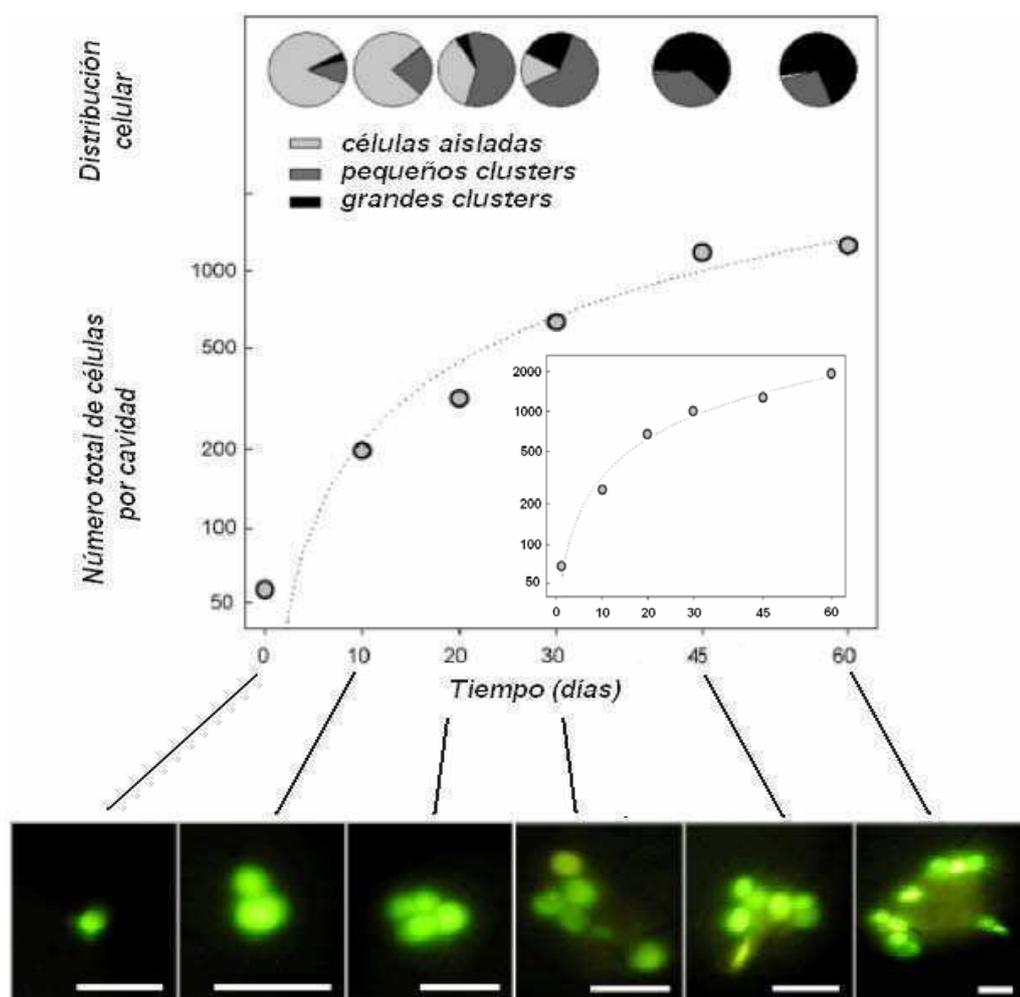


Figura III.2. Proliferación de células de plantas dentro del hospedador inorgánico.

Arriba: Contenido total en células de la línea BY2 de tabaco en una sola cavidad (15 µl), muestreada luego de 0, 10, 20, 30, 45 y 60 días de cultivo dentro de la matriz de sílica (escala logarítmica). Los gráficos de torta muestran la distribución de células: aisladas (gris claro), células formando pequeños *clusters* de 2-8 células (gris oscuro) y células formando *clusters* grandes (negro). En el *inset* se grafican los resultados hallados con células de tejido floemático de zanahoria.

Abajo: Imágenes de Microscopía Confocal de Fluorescencia representativas de cada uno de los tiempos de muestreo. Las barras representan 50 µm.

En la primera etapa (0 a 45 días), para ambos tipos celulares se registró un tiempo de duplicación de aproximadamente 250 h. A medida que transcurrió el tiempo, el tamaño de los callos fue aumentando progresivamente mientras que el número de callos menores (microcallos) por cavidad mostró una tendencia a disminuir. Después de 45 días, la mayoría de las células dentro de las cavidades se encontró organizada en forma de *clusters* grandes, haciendo progresivamente difícil el conteo del número total. Por otro lado, a tiempos de encapsulación más largos, cada macrocavidad se encontró ocupada por un callo celular suficientemente grande, conspicuo, como para que su crecimiento pudiera ser seguido a simple vista, como puede verse en la fotografía de la figura III.3. Después de 3 meses de cultivo, se observaron dentro de cada cavidad 2 a 4 callos pequeños (de entre 0,1 y 1,0 mm), y dentro de cada cavidad de monolitos cultivados durante 6 meses, se observó un único callo de más de 1 mm de diámetro. Este resultado es una indicación del bajo estrés hidrodinámico. Es decir, no se producen corrientes convectivas dentro de las cavidades y, por lo tanto, las células se organizan en estructuras crecientemente más grandes sin sufrir disgregación.

Con el fin de descartar posibles efectos nocivos de la encapsulación sobre la división celular, se plaqueó el contenido de cavidades muestreadas a los 3 meses de inmovilización sobre MS semisólido. Para los dos tipos celulares ensayados se obtuvo un gran número de callos de apariencia normal sobre las placas de Petri (figura III.3, derecha).

La matriz resultó ser química y mecánicamente estable ya que se mantuvo intacta después de ser sometida a agitación continua durante 6 meses. Para comprobar la ausencia de fisuras, se procedió en forma análoga a lo reportado en el capítulo anterior (sección II.3.f). En el medio externo al cultivo de un MAB de 6 meses de envejecimiento se inocularon diferentes microorganismos (*E. coli*, *S. cerevisiae* y *Stereum hirsutum*). Después de 48 h se tomaron muestras del medio externo y del interior de las cavidades. Previamente al muestreo de las cavidades se eliminó el medio externo contaminado en contacto con el MAB, se lavó el hidrogel dos veces con agua estéril y se lo sometió a un procedimiento de esterilización superficial por inmersión en etanol al 70% durante 10 min. Se sembraron alícuotas de ambas muestras sobre medio semisólido MS y sobre medios de cultivo semisólidos apropiados para cada uno de los microorganismos. Sin importar el microorganismo ensayado, la contaminación fue detectada exclusivamente en el medio externo.

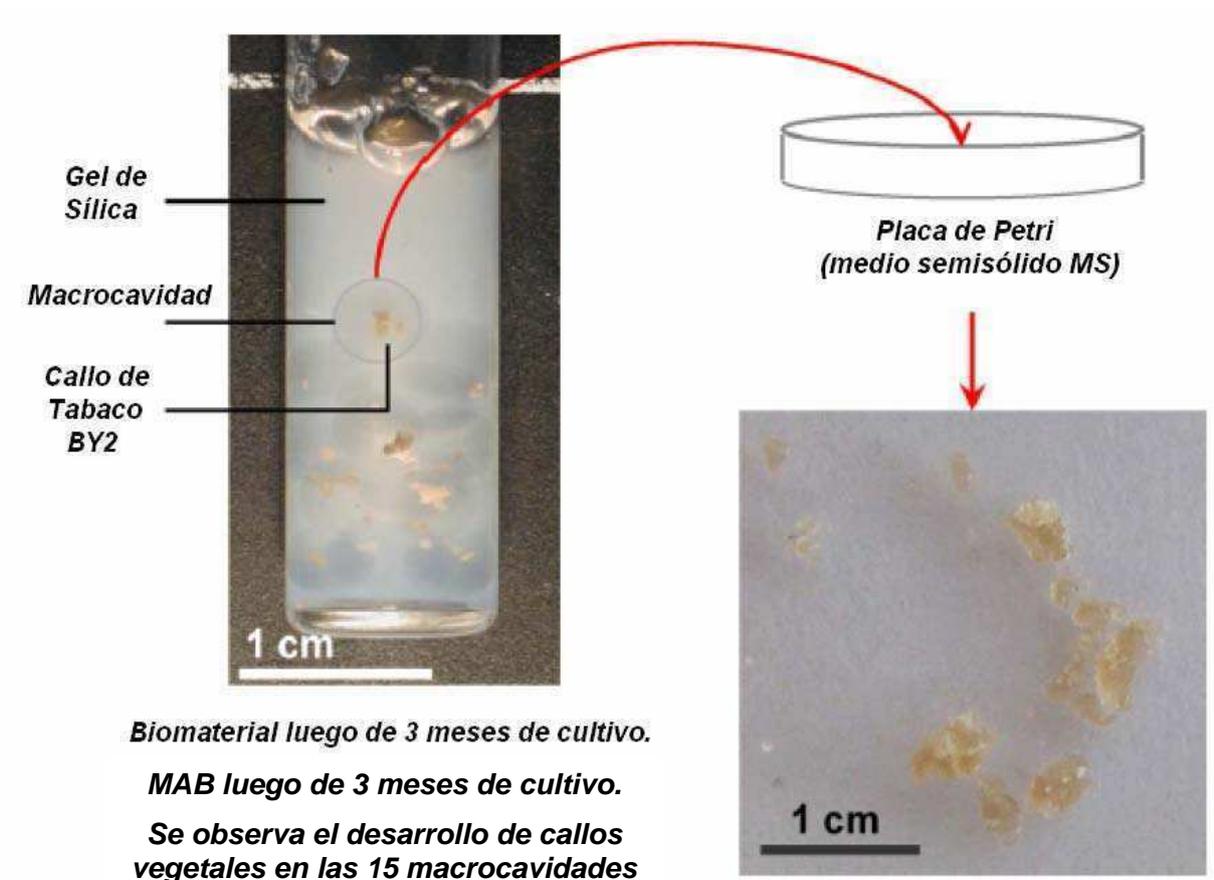


Figura III.3. Evaluación de la formación de callos vegetales dentro de las cavidades de las matrices.

Izquierda: fotografía de un tubo de vidrio de base plana conteniendo un MAB con 15 cavidades en su interior (en incubación con medio de cultivo durante 3 meses). Se puede observar a simple vista la formación de callos vegetales de células BY2 de tabaco dentro de las cavidades.

Derecha: fotografía de callos vegetales formados después de 2 meses luego de plaquear en medio MS semi-sólido el contenido de una única cavidad (luego de 3 meses de cultivo en encapsulación).

III.4. PRINCIPALES RESULTADOS DE ESTE CAPÍTULO

Se consiguió por primera vez una encapsulación exitosa de células de plantas superiores en una matriz de sílica, obteniendo una viabilidad inicial ($> 95\%$), muy superior a la reportada en bibliografía para estos tipos celulares.¹⁵

El crecimiento y división celular dentro del hospedador mineral, determinado por microscopía de fluorescencia, indica la formación progresiva de callos celulares en su interior. Si bien la tasa de crecimiento registrada (tiempo de generación de aproximadamente 250 h) es menor que la reportada en la bibliografía para cultivos en *batch*, los resultados obtenidos con los

MABs son alentadores para encarar una optimización del sistema, especialmente en lo referente al suministro de gases.

La ausencia de fisuras se verificó por la impermeabilidad a microorganismos luego de 6 meses de operación. Este resultado es relevante ya que se pueden mantener condiciones de asepsia a largo plazo.

En estos MABs la comunicación célula-célula no se inhibiría ya que las moléculas de bajo peso molecular pueden viajar vía plasmodesmos en los callos alojados dentro de cada cavidad. Más aun, la porosidad de la matriz de sílica podría controlarse para disminuir el transporte de mensajeros intercelulares fuera de la cavidad, contribuyendo así a que éstos alcancen una concentración efectiva que induzca la síntesis de metabolitos secundarios.

Los resultados presentados en este capítulo son alentadores en cuanto a la utilización de los MABs en procesos donde cada uno puede ser considerado como un mini-biorreactor. Sobre esta base, podría construirse un sistema modular a partir de un arreglo de MABs que provea condiciones homogéneas para el cultivo.

III.5. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Daniell, H., Streatfield, S., Wycoff, K., Medical molecular farming: production of antibodies biopharmaceuticals and edible vaccines in plants, *Trends in Plant Science*, **2001**, *6*, 219-226.
- ² Ma, J., Drake, P., Christou, P., The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants, *Nature Rev.*, **2003**, *4*, 794-805.
- ³ Gomord, V., Faye, L., Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants, *Curr. Op. Biotechnol.*, **2004**, *7*, 171-181.
- ⁴ Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., Carter A., Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals, *Nature Biotechnology*, **2000**, *18*, 1151-1155.
- ⁵ Giddings, G. Transgenic plants as protein factories, *Curr. Op. Biotechnol.*, **2001**, *12*, 450-454.
- ⁶ Abranches, R., Marcel, S., Arcalis, E., Altmann, F., Fevereiro, P., Stoger, E., Plants as bioreactors: a comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system, *J. Biotechnol.*, **2005**, *120*, 121-134.
- ⁷ Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R.M., Fischer, R., Plant cell cultures for the production of recombinant proteins, *Nat. Biotechnol.*, **2004**, *22*, 1415-1422.
- ⁸ Kieran, P.M., MacLoughlin, P. F., Malone, D. M., Plant cell suspension cultures: some engineering considerations, *J. Biotechnol.*, **1997**, *59*, 39-52.
- ⁹ Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M.H. Editors. *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*, **1977**, Springer-Verlag, Berlin, pp. 85-94.
- ¹⁰ Shuler, M. L., Kargi, F., *Bioprocess engineering*, Prentice Hall PTR: New York, **2002**.
- ¹¹ Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Sci.*, **2001**, *161*, 839-851.
- ¹² Dörnenburg, H., Evaluation of immobilization effects on metabolic activities and productivity in plant cell processes, *Process Biochem.*, **2004**, *39*, 1369-1375.
- ¹³ Onishi, N., Sakamoto, Y., Hirose, T., Synthetic seed as an application of mass production of somatic embryos, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **1994**, *39*, 137-145.
- ¹⁴ Vaněk, T., Valterová, I., Vánková, R., Vaisar, T. Biotransformation of (-)limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* immobilized plant cells, *Biotechnol. Lett.*, **1999**, *21*, 625-628.

- ¹⁵ Kuncova, G., Podrazky, O., Ripp, S., Trögl, J., Saylor, G.S., Demnerova, K. y Vankova, R. J. Monitoring of the Viability of Cells Immobilized by Sol-Gel Process, *Sol-Gel Sci. Technol.*, **2004**, *31*, 1–8.
- ¹⁶ Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S., Tobacco BY-2 cell line as the hela-cell in the cell biology of higher-plants, *Int. Rev. Cytol.*, **1992**, *132*, 1–30.
- ¹⁷ Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, **1962**, *15*, 473–497.
- ¹⁸ Widholm, J. M., The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for determining viability of cultured plant cell, *Stain Technol.*, **1972**, *47*, 189-194.

CAPÍTULO IV

**CARACTERIZACIÓN DE LOS
HIDROGELES:**

**PROPIEDADES ÓPTICAS,
MECÁNICAS Y DE TRANSPORTE**

CAPITULO IV:

CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES: PROPIEDADES ÓPTICAS, MECÁNICAS Y DE TRANSPORTE

« When scientists have learned how to control the arrangement of matter at very small scale, they will see materials take an enormously richer variety of properties.»

Richard Feynman (1959)

El método de síntesis en dos pasos, con inmovilización previa en alginato de calcio, en principio posibilitaría el diseño de MABs con cualquier tipo celular. Al mantener las células protegidas durante la síntesis sol-gel se logra una buena viabilidad aun aumentando la concentración de los precursores a niveles de citotoxicidad que el encapsulado tradicional (sin protección) no admite. Una clara ventaja del método, es que al poder extender la ventana de formulaciones en los precursores sol-gel, se pueden sintonizar las propiedades ópticas, mecánicas o de transporte del hidrogel resultante para satisfacer requerimientos específicos, tales como tasa de fotosíntesis, transporte de nutrientes o metabolitos de alto peso molecular y estabilidad mecánica a largo plazo.

En este capítulo se presentan los estudios realizados con matrices sintetizadas por las vías de alcóxido y acuosa, variando el pH, la proporción de precursores o el agregado de aditivos, con el fin de evaluar la relación entre los parámetros de síntesis y las propiedades del hidrogel.

IV.1. PROPIEDADES Y ESTRUCTURA DE GELES

La materia blanda presenta propiedades macroscópicas distintivas, intermedias entre las de los sólidos cristalinos y los líquidos. En el caso de las propiedades mecánicas, de acuerdo con la fuerza ejercida sobre el material y el tiempo que ésta se ejerce, se puede pasar desde un material elástico hasta un fluido. La presencia de partículas densas en el esqueleto del gel influye tanto en las propiedades mecánicas como en la calidad óptica del material. En este último caso, la

variación del tamaño de las partículas a través de la síntesis modifica la intensidad de la luz dispersada que es la propiedad óptica más relevante para sistemas que absorben en el UV. A su vez, la gelificación y consolidación del gel se produce en una fase líquida que pasa a ocupar el volumen disponible dentro de la matriz.¹ El transporte a través del gel está relacionado con el tamaño y la conectividad de estas cavidades líquidas (porosidad), que dependen del grado de entrecruzamiento y de la interacción del esqueleto con el solvente.

Estas tres propiedades de los geles son muy sensibles a la distribución de enlaces entre monómeros, oligómeros, polímeros y partículas, así como a la magnitud de las interacciones intermoleculares entre estas especies y, por lo tanto, a las condiciones en que se realiza la síntesis.

El análisis estructural de geles y polímeros no es trivial² y es un desafío establecer relaciones entre propiedades y estructura por las diferentes escalas de distancia involucradas. En los geles de sílica, a distancias cortas los vecinos de un átomo de Si pueden ser grupos alcóxido, $-OR$, hidroxilo, $-OH$, o un puente de oxígeno, $-OSi$. Para distancias intermedias, los oligómeros pueden ser lineales, ramificados o cíclicos, mientras que en las escalas más grandes, las estructuras pueden ser densas con interfaces sólido-líquido bien definidas, uniformemente porosas o redes tenues con dimensión fractal. Los métodos empleados para determinar la estructura en cada escala se basan en espectroscopías, RMN, Raman e IR, UV-visible, para distancias cortas y dispersivos, RX, neutrones y luz para las más largas.

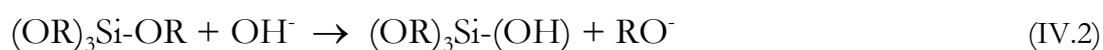
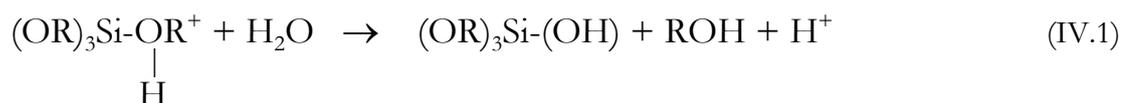
En este trabajo sólo se presenta una relación entre las variables de síntesis y las propiedades macroscópicas de las matrices. Un análisis estructural que permita vincular estructura y propiedades escapa a los objetivos de esta tesis.

IV.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para esta parte del trabajo se sintetizaron hidrogeles de sílica por las dos vías descritas en el capítulo I, variando algunos de los parámetros de síntesis dentro de rangos que permiten obtener materiales que pueden ser manipulados sin romperse. En estas muestras no se encapsularon células, pero el procedimiento general está pensado para maximizar la biocompatibilidad. En el capítulo V se presentarán los ensayos de evaluación del nivel de estrés desarrollado por microorganismos encapsulados en estos geles.

IV.2.a. Síntesis de hidrogeles por la vía de los alcóxidos

En la síntesis a partir de alcóxidos, la hidrólisis procede por un mecanismo de sustitución nucleofílica, que puede ser catalizado tanto por ácidos como por bases. En el primer caso estaría involucrado un grupo alcóxido protonado (ecuación IV.1) y, en el segundo, el grupo hidroxilo mediaría el ataque nucleofílico (ecuación IV. 2).



Como se mencionó en el capítulo I, el punto isoeléctrico de la sílica está alrededor de $\text{pH} = 2$ y, por lo tanto, por encima de este valor la velocidad de condensación es proporcional a la concentración de oxhidrilos, mientras que para $\text{pH} < 2$ es proporcional a la concentración de protones.³ Por este motivo, se eligió trabajar a pH entre 2 y 4 para combinar una hidrólisis rápida con una condensación muy lenta.

Los geles por la ruta de alcóxidos se obtuvieron prehidrolizando la mezcla de precursores con cantidad estequiométrica de agua para hidrólisis completa (relación molar $\text{H}_2\text{O}:\text{Si} = 4:1$).⁴ Se preparó una solución *stock* mezclando vigorosamente durante 30 min los siguientes reactivos: 5,58 ml de Tetraetoxisilano (TEOS, Sigma-Aldrich), 1,9 ml de agua y 0,125 ml de HCl (Sigma Aldrich). Esta mezcla fue posteriormente sonicada para asegurar una adecuada progresión de la reacción de hidrólisis. A continuación se realizó una dilución al medio con agua y se eliminó el etanol generado durante la hidrólisis, colocando la muestra en rotavapor para la destilación fraccionada a presión reducida. Para la obtención de geles híbridos se reemplazó parte del TEOS por 5, 10 ó 20% de GPTMS. Estas soluciones *stock* son estables durante al menos 30 días conservadas a -15°C .

A partir de las soluciones *stock* se sintetizaron hidrogeles de TEOS con composición de sílica en el rango 7 a 16% e hidrogeles mixtos TEOS-GPTMS de composición variable, pero manteniendo constante la composición de sílica total en el hidrogel.

Para simular la situación en la cual se encapsula un sistema biológico se trabajó con un pH final entre 6,0 y 6,5. Para alcanzar estas condiciones, se mezclaron volúmenes de solución *stock* y de *buffer* fosfato (0,5 M; pH 6,5) según la composición deseada en el hidrogel final.

Para los ensayos de compresión se sintetizaron una serie de muestras partiendo de TEOS, con contenido de sílica variable, en moldes cilíndricos de acrílico de 3 mm de alto y 3 cm de diámetro. Se dejaron envejecer durante 2 horas y fueron inmersos en exceso de *buffer* fosfato (pH 6.5, 0.1 M) a 298 K durante 24 horas antes de realizar las medidas. Si bien estas condiciones de envejecimiento se alejan de las empleadas en los MABs, permiten realizar un estudio más controlado de las propiedades mecánicas.

Para la evaluación de las propiedades ópticas se sintetizaron una serie de hidrogeles a partir de TEOS con contenido total de sílica variable y otra serie de hidrogeles mixtos TEOS-GPTMS. Estas muestras se moldearon en cubetas de cuarzo de 1cm de camino óptico y se dejaron envejecer durante 24 h en el medio de síntesis.

IV.2.b. Síntesis de hidrogeles por la vía acuosa

Realizando ligeras variantes sobre el procedimiento de gelificación en presencia de sílica coloidal empleado en el capítulo II, se partió de soluciones de silicato de sodio, SIL, (Riedel-de Haën; NaOH 10%, SiO₂ 27%) y suspensión de sílica coloidal, COL, (LUDOX HS-40, 40% en agua) con concentración total de sílice ajustada a 12,7% en peso en la mezcla inicial de precursores. En una serie se sintetizaron tres hidrogeles diferentes a pH constante (pH= 6,5 ajustado con HCl), variando la relación molarⁱ de precursores SIL:COL 1:3, 1:4 y 1:5. En otra serie se mantuvo constante la relación molar de precursores (SIL:COL = 1:4), variando el pH de síntesis entre 4,5 y 9,0 con HCl.

En esta última serie de muestras, una vez sintetizadas se dejaron envejecer 24 h al pH de síntesis y 48 h más en *buffer* fosfato (0,1 M; pH 6,5). Posteriormente se lavaron durante 5 días con agua Milli-Q, (con recambio diario del agua de lavado). Con este tratamiento se buscó que la superficie de los hidrogeles estuviera estabilizada al mismo pH (en las tres formulaciones durante las mediciones). Desde el punto de vista estructural, el pH de síntesis es mucho más importante que el pH de lavado.

IV.3. PROPIEDADES ÓPTICAS

Algunas de las potenciales aplicaciones de los MABs, tales como biosensores ópticos-fotoquímicos, disminuyen su eficiencia a medida que aumenta la absorción o la dispersión

ⁱ Relación molar en sílice.

(*scattering*) de la luz por la matriz. También en el caso de los biorreactores que se basan en la inmovilización de organismos fotosintéticos, se requieren matrices con buena longitud de penetración de la luz visible. Si bien la absorptividad de SiO₂ es prácticamente despreciable en el visible, el *scattering* producido por la presencia de inhomogeneidades en el gel, tales como partículas o burbujas en una escala de tamaño del orden de la longitud de onda de la luz incidente, es importante.

En sistemas dispersivos se suele emplear el término “extinción” para cuantificar la fracción de luz incidente que es transmitida en la dirección de propagación cuando atraviesa la muestra:

$$e = -\log(I_T / I_0) \quad (\text{IV.3})$$

$$I_T = I_0 - I_A - I_S$$

donde I es la intensidad de luz y los subíndices 0, T, A y S, refieren a incidente, transmitida, absorbida y dispersada, respectivamente. En adelante se refiere a la calidad óptica como extinción.

En la aproximación de Lambert-Beer, la intensidad de luz absorbida cuando el haz incidente recorre una distancia l a través de un material con absorptividad $\alpha(\lambda)$ está dada por:

$$I_A(\lambda) = I_0 \exp(-\alpha(\lambda)\ell) \quad (\text{IV.4})$$

Para SiO₂ (vidrio) $\alpha = 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$, prácticamente independiente de la longitud de onda (entre 400 y 1200 nm).⁵

En la aproximación de Rayleigh, válida cuando el diámetro de un centro dispersor esférico (*d*) es mucho menor que la longitud de onda, la intensidad de la luz dispersada es:

$$I_S(\lambda) \propto \frac{d^6}{\lambda^4} \quad (\text{IV.5})$$

IV.3.a. Calidad óptica de geles sintetizados por la vía de los alcóxidos

En los hidrogeles de TEOS con distintos contenidos totales de sílica se observaron diferencias en las propiedades ópticas a ojo desnudo y con medidas de extinción a 400 y 500 nm,

como se ve en la figura IV.1. A medida que aumenta la concentración total de sílica en las formulaciones, mejoran las propiedades ópticas del hidrogel. En estos sistemas, una alta concentración de precursor favorece la nucleación frente al crecimiento. Al formarse partículas más pequeñas, predomina la gelificación por enlaces covalentes entre partículas, usualmente mediadas por oligómeros.⁶ Por el contrario, el menor contenido de sílica favorece el crecimiento de las partículas, aumentando entonces la cantidad de luz dispersada.

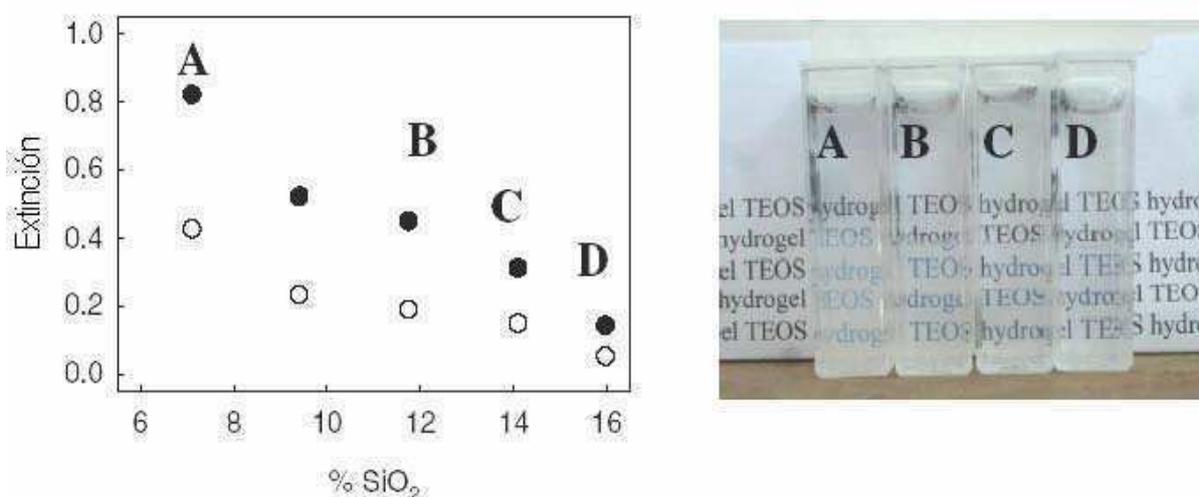


Figura IV.1.

Izquierda: extinción a 400nm (●) y a 500nm (○) de geles de TEOS con distinto porcentaje de sílica total (entre el 7 y el 16%).

Derecha: foto de algunas de estas muestras donde se puede observar a simple vista el mejoramiento en las propiedades ópticas con el aumento en el porcentaje de sílica en la formulación.

IV.3.b. Calidad óptica de geles sintetizados por vía de alcóxidos con aditivos

Una estrategia para aumentar la biocompatibilidad es la utilización de aditivos que contengan grupos no hidrolizables. El glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS) cumple esta función, disminuyendo el contacto con grupos silanoles terminales, debido al impedimento estérico que brindan las cadenas R-OH no hidrolizables en el seno del gel. Si bien de esta manera se logra efectivamente aumentar la viabilidad celular, muchas veces es a expensas de una disminución en la calidad óptica y/o mecánica del material.

Las propiedades ópticas de geles sintetizados por la vía de alcóxidos con 12,7% de sílica total y cantidades crecientes de GPTMS se muestran en la figura IV.2. Con un pequeño agregado de aditivo (5% con respecto a TEOS) ya se puede apreciar una disminución importante de la calidad óptica, observándose opacidad casi total para mayores cantidades. Este aumento del

scattering indicaría la formación de dominios de glicidoxipropilato (menos polares) en el seno del material que darían lugar a las inhomogeneidades dispersoras.

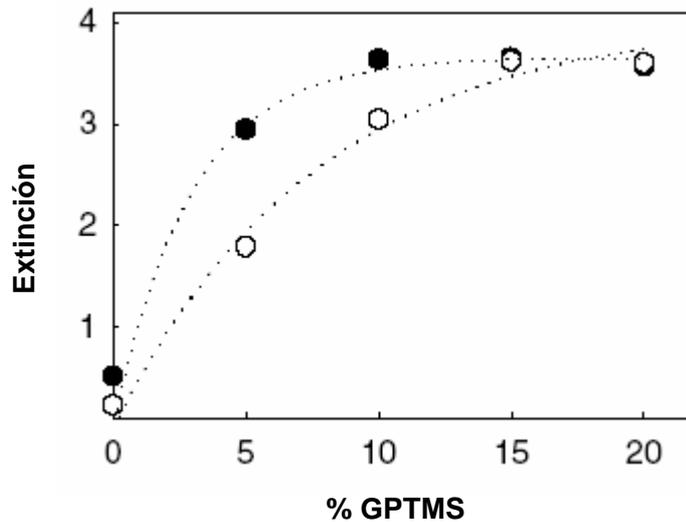


Figura IV.2. Extinción a 400nm (●) y a 500nm (○) de geles de TEOS con un contenido de sílica total fijo en 12,7%, en función del porcentaje de sílica que corresponde al precursor GPTMS.

IV.3.c. Calidad óptica de geles sintetizados por la vía acuosa

En la figura IV.3 se muestran las medidas de extinción a 400 y 500 nm obtenidas para tres formulaciones con distinta proporción SIL/COL.

En sistemas con una alta proporción de precursor particulado (SIL:COL=1:10), las imágenes de TEM de muestras liofilizadas muestran un diámetro medio de partícula en el gel final que coincide con el calculado suponiendo que el silicato soluble condensa sobre las partículas preformadas.⁷ Esto es, a bajas concentraciones de silicato soluble predomina la nucleación heterogénea sobre las partículas preexistentes. Es posible que para muestras con mayores concentraciones de silicato soluble (mayor grado de sobresaturación) la nucleación homogénea esté favorecida, con la consiguiente formación de partículas pequeñas, que luego coalescen junto a las partículas preformadas. De esta forma, se explicaría la menor dispersión de luz observada para estas últimas.

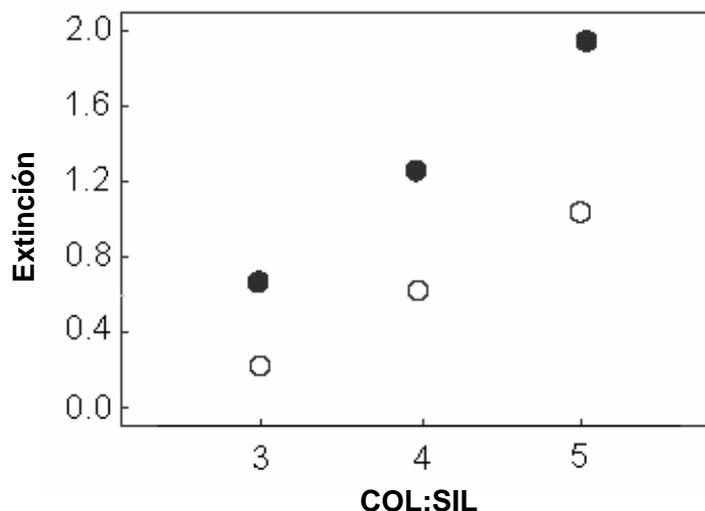


Figura IV.3. Extinción a 400nm (●) y a 500nm (○) de hidrogeles sintetizados por la vía acuosa, con contenido de sílica total fijo en 12,7%, en función de la relación molar COL:SIL entre precursor particulado y polimérico.

IV.4. PROPIEDADES MECÁNICAS

La respuesta viscoelástica de un material sometido a un esfuerzo (*stress*, en inglés)ⁱⁱ produce una deformación (*strain*, en inglés) que puede ser transitoria o permanente de acuerdo con el tiempo durante el cual se aplica la fuerza. La función que relaciona el cambio en el esfuerzo con la variación de la deformación relativa es el módulo de compresión, G .

Un modo de realizar experimentos en una escala de tiempo suficientemente amplia para observar respuesta viscosa, predominante a tiempos largos, y respuesta elástica en tiempos cortos es imponer un esfuerzo periódico con frecuencia ω . En estos casos, la respuesta viscoelástica también es periódica, con frecuencia ω , pero desfasada en δ (ángulo de fase). En esta situación el módulo de compresión es un número complejo que depende de ω :

$$G(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (\text{IV.6})$$

ⁱⁱ Se denomina esfuerzo una fuerza aplicada por unidad de área. Hay varios tipos de esfuerzos: compresión en volumen (presión), estiramiento, de corte

La parte real en la ecuación IV.6, $G(\omega)$, es el módulo de almacenamiento que está relacionado con la energía almacenada en contribuciones elásticas en el material. La parte imaginaria, $G''(\omega)$, módulo de pérdida, es una medida de la energía disipada al aplicar la fuerza. En la figura IV.4 se esquematiza la dependencia de $G'(\omega)$ y de $G''(\omega)$ con la frecuencia para el caso de un material con respuesta viscoelástica lineal. Esta respuesta lineal se pierde para fuerzas y deformaciones altas, hasta que se llega al límite de fractura.ⁱⁱⁱ

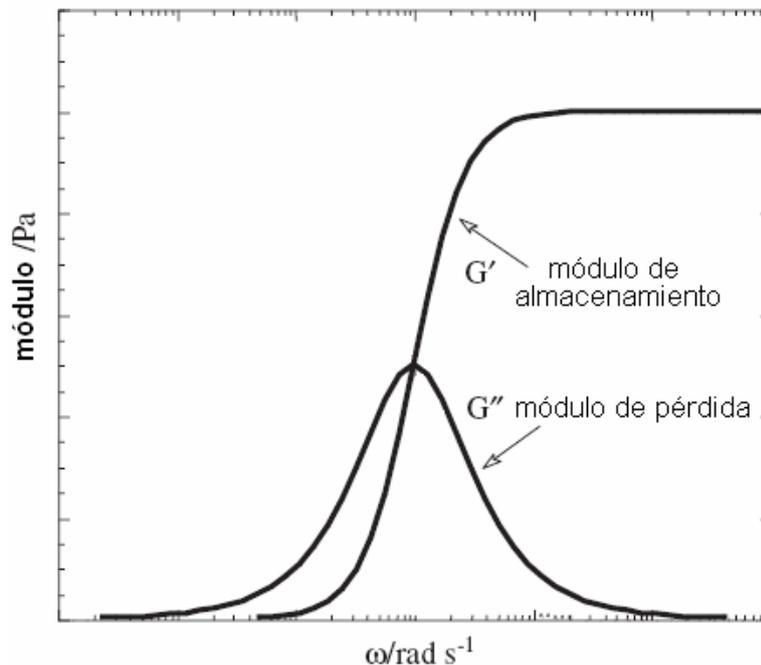


Figura IV.4. Diagrama esquemático de la variación del módulo de almacenamiento, G' , y del módulo de pérdida, G'' , vs. la frecuencia de medición, ω .

La evolución de las propiedades viscoelásticas durante el envejecimiento de geles de sílica está directamente asociada con el aumento en las uniones Si-O-Si debido a las reacciones de condensación. A medida que el gel envejece, el módulo de almacenamiento aumenta mientras que el módulo de pérdida aumenta en estadios tempranos de envejecimiento y luego se mantiene constante.⁸

En las aplicaciones en biorreactores, los geles de sílica están sometidos a estrés hidrodinámico (por agitación continua en los medios de cultivo) y, simultáneamente, deben soportar la presión ejercida por las células o grupos de células encapsuladas, lo cual requiere geles

ⁱⁱⁱ máximo estrés soportado por la muestra antes de mostrar fracturas.

con buena resistencia a la deformación. La mayor limitación para optimizar las propiedades viscoelásticas de estos geles se debe a la imposibilidad de envejecer el sistema antes de someterlo a las condiciones hidrostáticas del medio de cultivo.

IV.4.a. Viscoelasticidad de geles sintetizados por vía acuosa

Las mediciones se realizaron con hidrogeles envejecidos durante 30 min de manera tal de simular las condiciones en las cuales se realiza el encapsulado. Se utilizó un reómetro Anton-Paar MCR-300 con sistema de medición cilíndrico (PP 30/S; 2,65 mm de diámetro).

En las figuras IV.5 y IV.6 se muestran las medidas de estrés-deformación para dos muestras con idéntico contenido total de sílica (12,7%) pero distinta relación COL:SIL.

A partir de la pendiente de estas curvas en la zona lineal se obtuvieron valores de módulo de compresión de 8100 ± 300 y $0,18 \pm 0,02$ Pa para las muestras con relación SIL:COL 1:3 y 1:5, respectivamente. Esta disminución de la capacidad de almacenar energía es esperable para un sistema más particulado, menos flexible a nivel molecular.

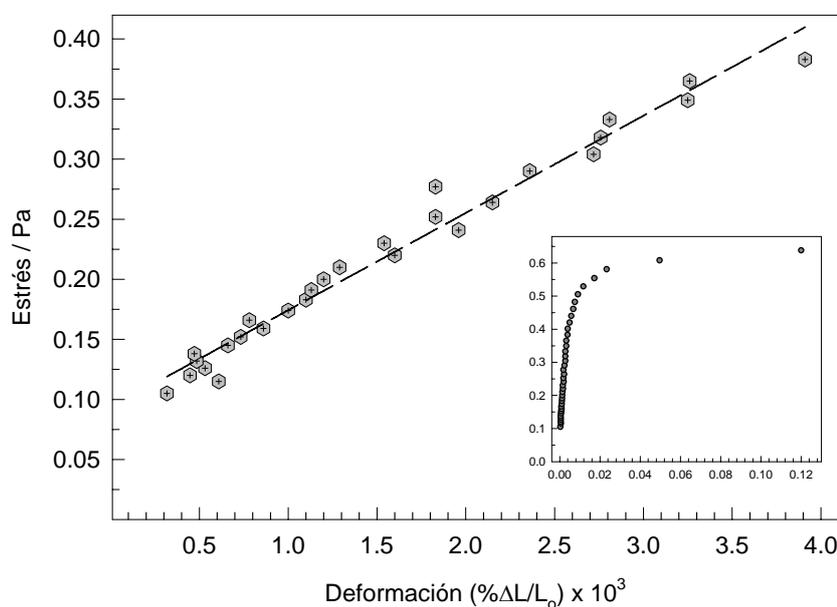


Figura IV.5. Relación de estrés-deformación en la zona lineal para una muestra de hidrogel sintetizada por la vía acuosa con 12,7% de sílica total y relación SIL:COL = 1:3. En el inserto se grafican todos los datos.

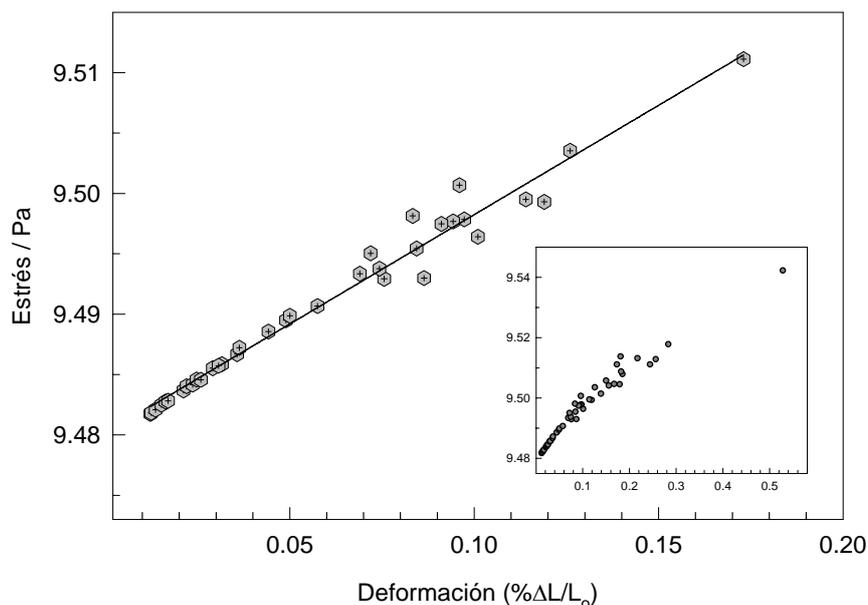


Figura IV.6. Relación de estrés-deformación en la zona lineal para una muestra de hidrogel sintetizada por la vía acuosa con 12,7% de sílica total y relación SIL:COL = 1:5. En el inserto se grafican todos los datos.

IV.4.b. *Viscoelasticidad de geles sintetizados por la vía de los alcóxidos*

Las curvas estrés-compresión se realizaron a 25°C con un analizador de textura Stable Microsystems TA-XT2i con sistema de medición cilíndrico (P/36R 36mm de diámetro). Las muestras se comprimieron en forma creciente, desde un 10 hasta un 30% de la altura inicial a una velocidad de 0,5 mm/s, hasta la observación de fracturas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.7, en la cual las flechas indican el punto de fractura.

Se observa que a medida que aumenta la concentración total de sílica en las formulaciones, aumenta la elasticidad del gel y su resistencia a la compresión. De la pendiente de estas curvas se obtuvieron los valores de módulo de compresión que se grafican en la figura IV.8 en función del contenido de sílica.

Estos resultados son consistentes con las propiedades ópticas analizadas en la sección anterior. Para los geles sintetizados por la vía de los alcóxidos una menor concentración de precursores previene el crecimiento por agregación, produciéndose geles particulados con partículas densas y de mayor tamaño. En el otro extremo, en los geles más concentrados en sílica se produce una agregación más temprana, resultando en una red más entramada de partículas pequeñas, más flexible⁹ y por lo tanto con mayor posibilidad de almacenar energía frente a una perturbación mecánica.

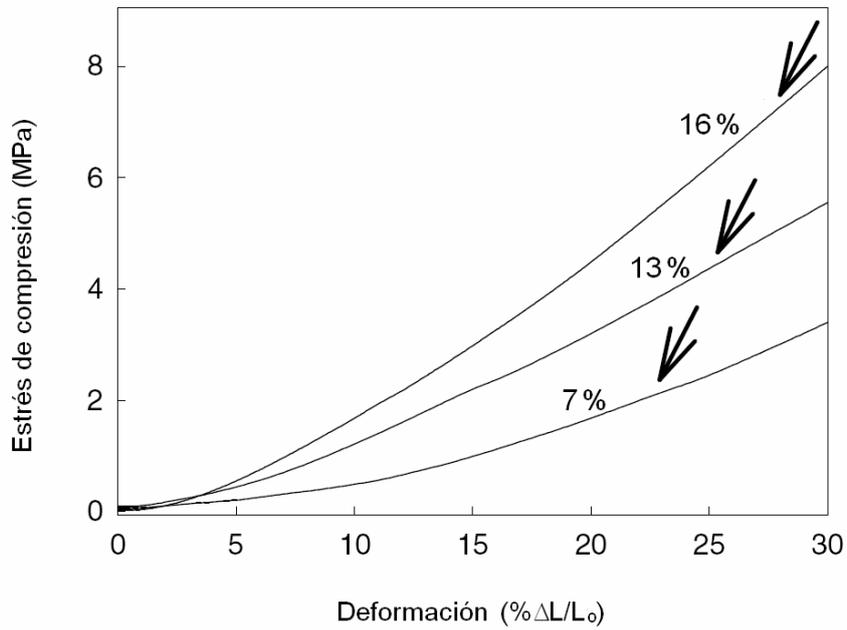


Figura IV.7. Curvas estrés-deformación de hidrogeles basados en TEOS con cantidad de SiO_2 variable: 16%, 13% y 7%. Las flechas indican la aparición de fracturas masivas.

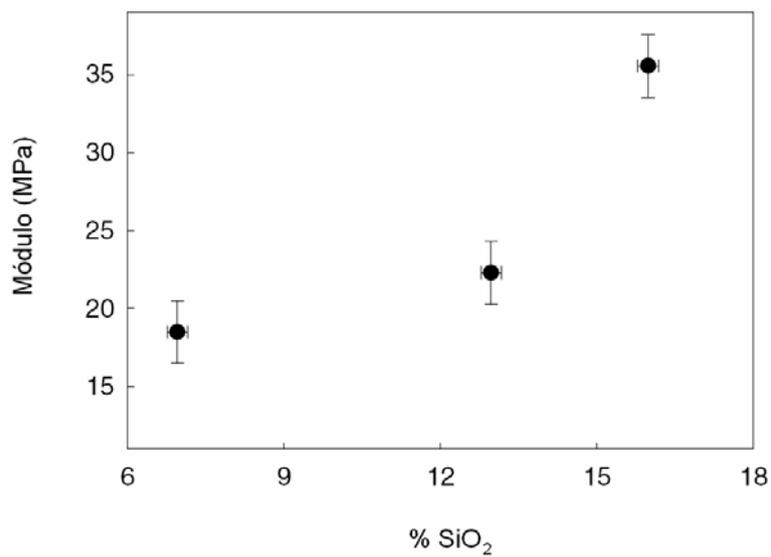


Figura IV.8. Evolución del módulo de compresión en función del contenido de sílica. Los módulos fueron obtenidos a partir de las pendientes de los gráficos de estrés-deformación, medidas entre el 10 y el 20% de compresión.

IV.5. PROPIEDADES DE TRANSPORTE

El transporte en estas matrices resulta, literalmente, de vital importancia. Por un lado se necesita que difundan los nutrientes presentes en el medio de cultivo externo hacia el seno del material donde se encuentran las células encapsuladas. Por otro lado, si se diseña un biorreactor para la producción de algún metabolito de interés, se requerirá que este último difunda hacia el medio externo. Otra aplicación de estos biorreactores modulares, está relacionada con la remediación de medios líquidos contaminados. En este último caso el transporte de contaminante hacia el interior del gel debe estar controlado para regular la concentración de contaminante en contacto con el organismo remediador encapsulado. En el capítulo VI se describe un caso de biorreactor basado en estas propiedades del MAB.

En sistemas porosos, el gradiente de concentración involucra dos procesos: difusión y adsorción. Este último es particularmente importante en los geles de sílica debido a la alta superficie específica, hidrofiliidad y carga superficial de las paredes de los poros.

IV.5.a. Isotermas de adsorción

A partir de la naturaleza de la interacción entre la molécula adsorbida (adsorbato) y la superficie (adsorbente), los fenómenos de adsorción pueden clasificarse como fisisorción y quimisorción. En el primer caso, la unión es por fuerzas de tipo Van der Waals, sin redistribución significativa de la densidad electrónica ni en el adsorbato ni en el adsorbente. Por el contrario, la quimisorción involucra un reordenamiento de la densidad electrónica.

El modelo de quimisorción más simple es el de Langmuir, que considera que: (i) todos los sitios del adsorbente son idénticos, (ii) los adsorbatos están fijos en los sitios (no hay difusión superficial), (iii) sólo se adsorbe una monocapa y (iv) las moléculas adsorbidas no interactúan entre sí. Con estas suposiciones, igualando las velocidades de adsorción (IV.7) y desorción (IV.8), se obtiene una función que relaciona la fracción de superficie cubierta (θ) con la concentración de equilibrio en la solución o isoterma de adsorción (IV.9).

$$v_a = k_a(1 - \theta)C \quad (IV.7)$$

$$v_d = k_d\theta \quad (IV.8)$$

$$\theta = \frac{KC_e}{(1 + KC_e)} \quad (IV.9)$$

donde K es la constante de equilibrio de adsorción ($K = k_a/k_d$) y C_e , la concentración de equilibrio en la solución.

Suponer que la energía de adsorción es independiente del sitio en el cual se adsorbe la molécula es poco realista, especialmente para superficies que exponen diferentes grupos a la interfaz, como es el caso de óxidos en soluciones acuosas. Para considerar la heterogeneidad superficial hay que definir la función de distribución de energía de activación de los sitios de adsorción. Considerando una distribución gaussiana de ancho α , la isoterma de adsorción toma la forma de la ecuación IV.10.¹⁰

$$\theta = \frac{(KC_e)^{\frac{kT}{\alpha}}}{1 + (KC_e)^{\frac{kT}{\alpha}}} \quad (\text{IV.10})$$

Esta ecuación, cuando se aplica a bajos cubrimientos converge a la isoterma empírica, propuesta por Freundlich a fines del siglo XIX:

$$S = KC_e^n \quad (\text{IV.11})$$

donde S es la masa adsorbida por unidad de masa de adsorbente, K es la constante de adsorción, y n una constante cuyo valor varía entre 0 y 1.

La isoterma de Freundlich describe la adsorción de muchos sistemas, especialmente aquellos que contienen solutos en una interfaz sólido/líquido.¹¹ Otras isotermas, como la de Temkin, que refleja una heterogeneidad superficial importante,¹² se verifica mayormente para adsorción de gases en superficies metálicas.

IV.5.b. Adsorción de colorantes en geles sintetizados por la vía acuosa

Las isotermas de adsorción de VM se determinaron para tres hidrogeles sintetizados con relación SIL:COL = 1:4 y pH 4,5 (hidrogel I), 7,0 (hidrogel II) y 9,0 (hidrogel III). Cada muestra se preparó en cubetas de espectrofotómetro, pesando una porción de hidrogel y solución de colorante VM. Para cada hidrogel se emplearon 10-15 concentraciones iniciales de VM. Se agitó en agitador orbital (120 rpm durante 48 h), se dejó que decantaran las partículas más pequeñas resultantes de la fragmentación del gel, y se midió la absorbancia del sobrenadante en equilibrio con el gel. La concentración de colorante en equilibrio con el gel se determinó por el área de la banda de absorción.

El máximo valor de concentración inicial estuvo determinado por la estabilidad del gel, que presentó disgregación por encima de cierta cantidad de colorante. En la figura IV.6 se muestran, a modo de ejemplo, los espectros de absorción medidos para construir la isoterma de adsorción del colorante VM en el hidrogel I.

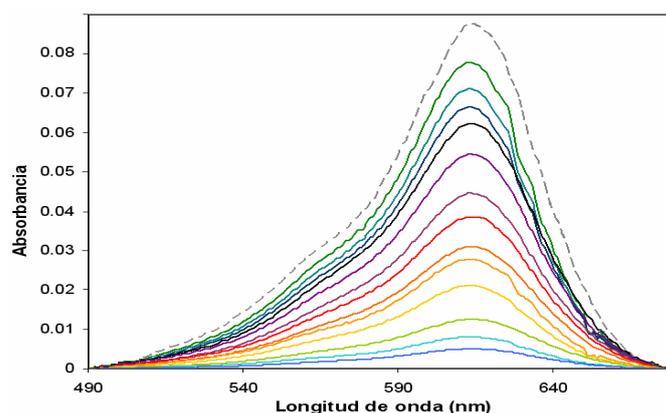


Figura IV.6. Espectros de absorción de soluciones de colorante verde de malaquita (VM) en equilibrio con muestras de hidrogel I, medidas para construir la isoterma de adsorción de VM. En línea de puntos se muestra el espectro de VM en solución.

La concentración de colorante VM adsorbido para una dada masa de hidrogel se midió por diferencia entre los valores de concentración inicial y concentración de equilibrio en solución. En la siguiente figura se grafica la concentración de colorante VM adsorbido ($\mu\text{moles/g}$ de hidrogel) en función de la concentración de colorante remanente en la solución en equilibrio, C_e , para los hidrogeles I, II y III. Se muestra también el ajuste con la ecuación IV.11 del cual se obtienen los parámetros de la tabla IV.1. Se observa que, en los tres casos, no se alcanza saturación de la superficie, lo cual permite suponer que se está en un límite de bajo cubrimiento.

La validez del ajuste con el modelo de Freundlich se confirma a partir de los valores de n , cercanos a 1. Esto implica que se puede suponer una heterogeneidad débil en la pared de los poros originada por átomos de silicio con diferente coordinación superficial.

Los valores de n y K obtenidos para el gel sintetizado a $\text{pH} = 4,5$ son significativamente distintos a los obtenidos para los sintetizados en medio neutro o básico. Dado que en la ecuación IV.11 la constante de equilibrio de adsorción no está normalizada por el área real del adsorbente, se pueden atribuir las diferencias encontradas a una mayor área del gel sintetizado en medio ácido, compuesto por partículas más pequeñas (ver figura I.2). A su vez, es razonable suponer que este gel, con entramado más polimérico, presente mayor heterogeneidad superficial, como se desprende del menor valor del parámetro n .

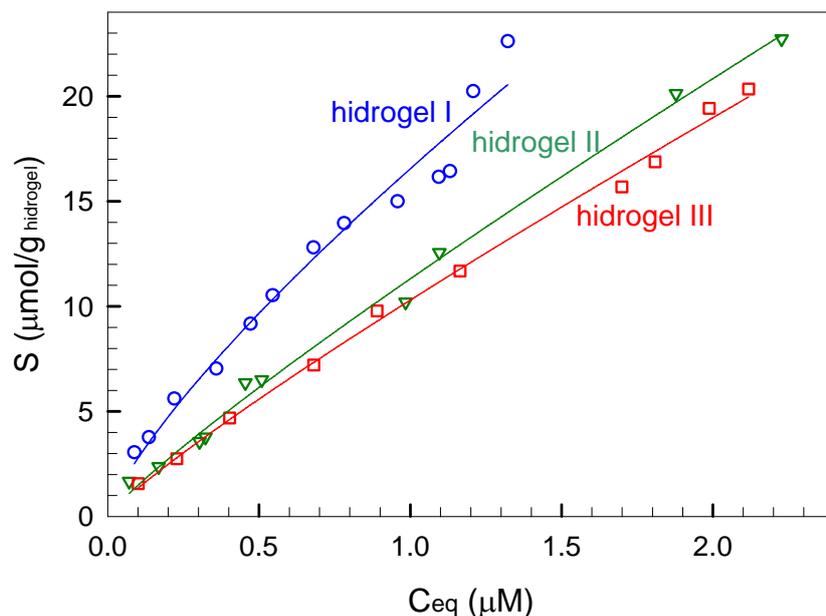


Figura IV.7. Colorante VM adsorbido ($\mu\text{mol/g}$) en función de la concentración de colorante en la solución en equilibrio con el gel. La línea es el ajuste según la ecuación IV.11 del cual se obtienen los parámetros de la tabla IV.1.

Tabla IV.1. Parámetros obtenidos por ajuste con la ecuación IV.11 para hidrogeles sintetizados a diferentes pH con relación SIL:COL = 1:4

Hidrogel	I	II	III
pH de síntesis	4,5	7,0	9,0
n	$0,78 \pm 0,06$	$0,88 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,03$
K	$16,5 \pm 0,4$	$11,3 \pm 0,2$	$10,3 \pm 0,2$

IV.5.c. Difusión en medios porosos

Una diferencia de concentración de soluto entre dos puntos de una solución implica un movimiento del soluto que se describe con las leyes de Fick. La primera (ecuación IV.12) relaciona el flujo con el gradiente de concentración y la segunda (ecuación IV.13) tiene en cuenta que, al cambiar la concentración en un punto, el flujo depende del tiempo.

Para el caso de difusión lineal semi-infinita, a partir de una fuente puntual, de la ecuación IV.14 se obtiene la dependencia de la concentración con el tiempo para cada punto.

$$\vec{J} = -D\nabla C \quad (\text{IV.12})$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C \quad (\text{IV.13})$$

$$C(x, t) = \frac{M}{\sqrt{\pi D t}} e^{-\frac{x^2}{4D t}} \quad (\text{IV.14})$$

El coeficiente de difusión de iones en soluciones acuosas se calcula a partir de medidas conductimétricas, relacionándolo con la conductancia a través de la ecuación de Nernst-Einstein.

Para describir la difusión en medios porosos hay que considerar tres factores adicionales: (i) el volumen disponible para la fase líquida (porosidad, ϵ), (ii) el recorrido no lineal entre dos puntos debido a la tortuosidad (τ) del camino y (iii) el tamaño y forma irregular de los poros (constrictividad, δ). Este último es importante para la difusión en medio con poros del orden del diámetro molecular. Teniendo en cuenta estos factores, el coeficiente de difusión que se obtiene a partir de las leyes de Fick es un coeficiente de difusión efectivo:

$$D_{ef} = \frac{\epsilon D \delta}{\tau^2} \quad (\text{IV.15})$$

Para medir las propiedades de transporte de solutos en hidrogeles se han implementado dispositivos o métodos más o menos complejos,^{13,14} como por ejemplo, el monitoreo por métodos electroquímicos de las sondas libres en solución.^{15,16} Sin embargo, la interpretación de los datos no es directa cuando existen procesos acoplados en la misma escala de tiempo (adsorción, transferencia de carga, reacciones químicas).

IV.5.d. Difusión de colorantes en geles sintetizados por la vía acuosa.

La difusión de solutos a través de los hidrogeles de sílica se estudió con un protocolo basado en la manipulación de imágenes digitales¹⁷ utilizando el software libre ImageJ.¹⁸ Para ello, los hidrogeles I, II y III se moldearon entre portaobjetos paralelos, con un espesor (camino óptico) de 1 mm, como se esquematiza en la figura IV.8. Se utilizaron como sondas distintos

colorantes, que fueron sembrados descargando 6 μl de solución acuosa del colorante sobre la interfaz hidrogel/aire (tiempo 0). Las muestras de hidrogel soportadas se colocaron sobre un escáner digital, con el cual se tomaron sucesivas imágenes del perfil difusional a distintos tiempos.

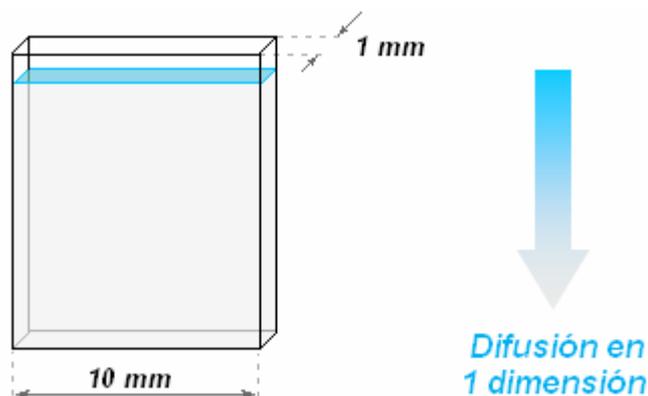


Figura IV.8.

Esquema de muestra en la celda diseñada para medir el transporte de colorantes. En celeste se muestra la cara superior, donde se siembra el colorante a tiempo 0. La geometría del arreglo determina una difusión en una dimensión.

Para realizar la cuantificación se analizó la intensidad de rojo (I_R), verde (I_V) y azul (I_A) de cada imagen y se procesaron estos datos para obtener un valor de intensidad de color normalizada independiente del escáner y la matriz empleados. Para cada colorante empleado, se buscó la expresión que diera un mejor coeficiente de correlación para la relación lineal entre la intensidad de color y la concentración. Para el VM, que tiene como componentes mayoritarios al verde y al azul, se utilizó la siguiente expresión para calcular la intensidad de VM normalizada ($I_{VM,N}$):

$$I_{VM,N} = 1 - \frac{I_R}{I_R + I_V + I_A} \quad (\text{IV.16})$$

Las medidas fueron realizadas a 25°C y se consideró despreciable el cambio de temperatura así como la fotodegradación de los colorantes durante el escaneo. Se comprobó que el sellado de cada celda fuera suficiente para evitar evaporación del solvente en el tiempo del experimento. Los

tiempos de medición fueron seleccionados de forma tal de obtener un perfil difusional con suficiente cantidad de puntos en el rango de respuesta lineal.

Para conocer el rango de respuesta lineal se realizó una calibración moldeando, en las mismas celdas, hidrogeles sintetizados con distintas concentraciones de colorante. En la figura IV.9 se muestra una curva de calibración representativa.

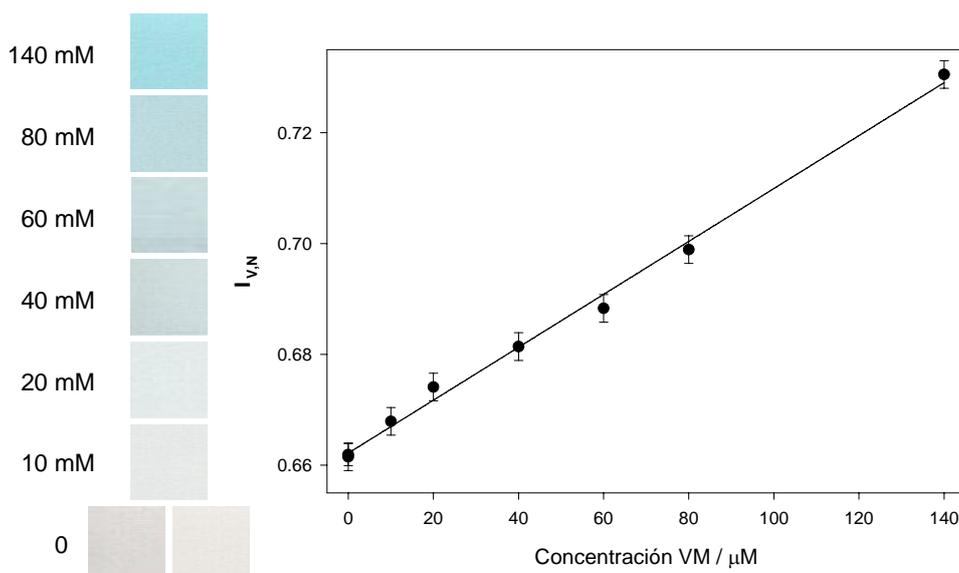


Figura IV.9. Calibración del sistema de medición con colorante verde de malaquita (VM). Los puntos fueron medidos a partir de imágenes escaneadas de hidrogeles con agregado de distintas concentraciones de VM durante la síntesis. A la izquierda, junto a cada imagen se indica la concentración de colorante en el hidrogel.

Se trabajó con los tres colorantes cuyas estructuras moleculares se muestran en la figura IV.10. Uno de ellos, el naranja de xilenol (NX), es aniónico y en consecuencia no se adsorbe sobre la pared de los poros que, para las 3 muestras, está con carga neta negativa. Los otros colorantes, verde de malaquita (VM) y cristal violeta (CV), son catiónicos y, por lo tanto, se adsorben fuertemente sobre sílica a $\text{pH} > 2$.

Dadas las dimensiones del gel y el hecho de que el colorante se coloca y se esparce homogéneamente por la cara superior, puede considerarse que la difusión ocurre sólo en una dimensión, como se esquematizó en la figura IV.8 y puede emplearse la ecuación IV.14.

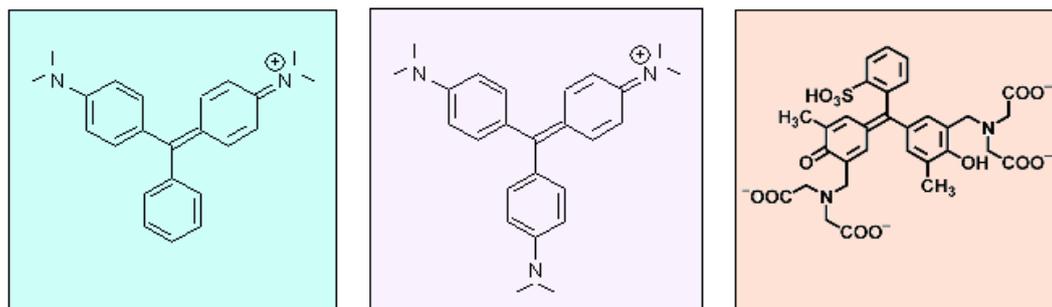


Figura IV.10. Fórmulas de los colorantes utilizados: de izquierda a derecha, verde de malaquita (VM), cristal violeta (CV) y Naranja de xilenol (NX).

En la figura IV.11 se muestran los perfiles difusionales de NX medidos en el hidrogel I a 660, 720 y 780 s y el ajuste con la ecuación IV.4 para un coeficiente de difusión efectivo optimizado $D_{ef} = (2,5 \pm 0,3) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Con el mismo procedimiento se obtuvieron coeficientes de difusión $(3,3 \pm 0,3) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ y $(2,9 \pm 0,3) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, en los hidrogeles II y III, respectivamente. Estos valores son comparables a los reportados para otras moléculas que no son adsorbidas en hidrogeles de sílica. Por ejemplo, se ha determinado que para Cr(VI) en hidrogeles sintetizados a partir de sílica coloidal D_{ef} está entre $1,76$ y $8,48 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, según el contenido de sílica de la matriz.

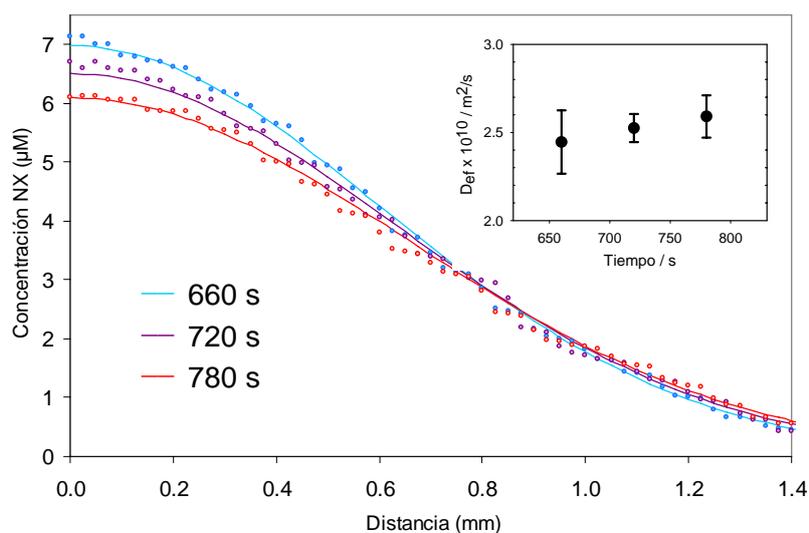


Figura IV.11. Evolución del perfil difusional de NX en la muestra de hidrogel I. Se muestran los perfiles difusionales medidos a distintos tiempos (indicados en el gráfico). La línea corresponde al ajuste con la ecuación IV.14. En el inserto se grafica el coeficiente de difusión optimizado a partir de cada una de las curvas.

Por otro lado, de acuerdo con lo esperado para geles particulados con tamaños de poro relativamente grandes, los coeficientes de difusión efectivos medidos en las tres muestras no presentan diferencias significativas. El coeficiente de difusión efectivo del ión Ni^{3+} en matrices de sílica sintetizadas a partir de TEOS es del orden del coeficiente de difusión acuosa, entre $4,1$ y $7,0 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, cuando los poros tienen diámetro mayor a 5 nm . Por debajo de este valor, se determinaron factores de retardo entre 100 y 1000 .¹⁹ Cabe aclarar que estos geles son más poliméricos que los hidrogeles preparados a partir de sílica coloidal, incluso en el caso del hidrogel I sintetizado a pH 4,5.

Del mismo modo, se midieron los perfiles difusionales de los colorantes VM y CV para cada hidrogel a distintos tiempos (320 , 369 y 911 min). En la figura IV.12 se muestran, a modo de ejemplo, los perfiles difusionales de VM a dos tiempos distintos.

Para los colorantes catiónicos el proceso de difusión está acoplado con la adsorción. En este caso, el perfil difusional queda descrito por la expresión:²⁰

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ef} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - \frac{\partial S}{\partial t} \quad (\text{IV.17})$$

donde C es la concentración de colorante en solución y S la concentración de colorante adsorbido.

Dado que la adsorción del colorante es lenta (en los experimentos de adsorción presentados en la sección anterior fueron necesarias más de 36 h para alcanzar el equilibrio) y el grado de cubrimiento superficial es bajo ($\theta \rightarrow 0$), la ecuación IV.17 puede reescribirse:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ef} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - k_a C \quad (\text{IV.18})$$

La ecuación IV.18 se ajusta a los perfiles difusionales con los parámetros de la tabla IV.2.

Tabla IV.2. Constantes de adsorción (k_a) y coeficientes de difusión efectiva (D_{ef}) de los colorantes verde de malaquita (VM) y cristal violeta (CV) extraídos del ajuste de los perfiles difusionales medidos al modelo propuesto (ecuación IV.16), en muestras de hidrogeles sintetizadas a distinto pH.

Hidrogel		I	II	III
pH de síntesis		4,5	7,0	9,0
VM	k_a	$(1,15 \pm 0,05) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	$(7,8 \pm 0,4) \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$	$(7,1 \pm 0,4) \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$
	D_{ef}	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$(2,0 \pm 0,2) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
CV	k_a	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$
	D_{ef}	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$(2,2 \pm 0,2) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$

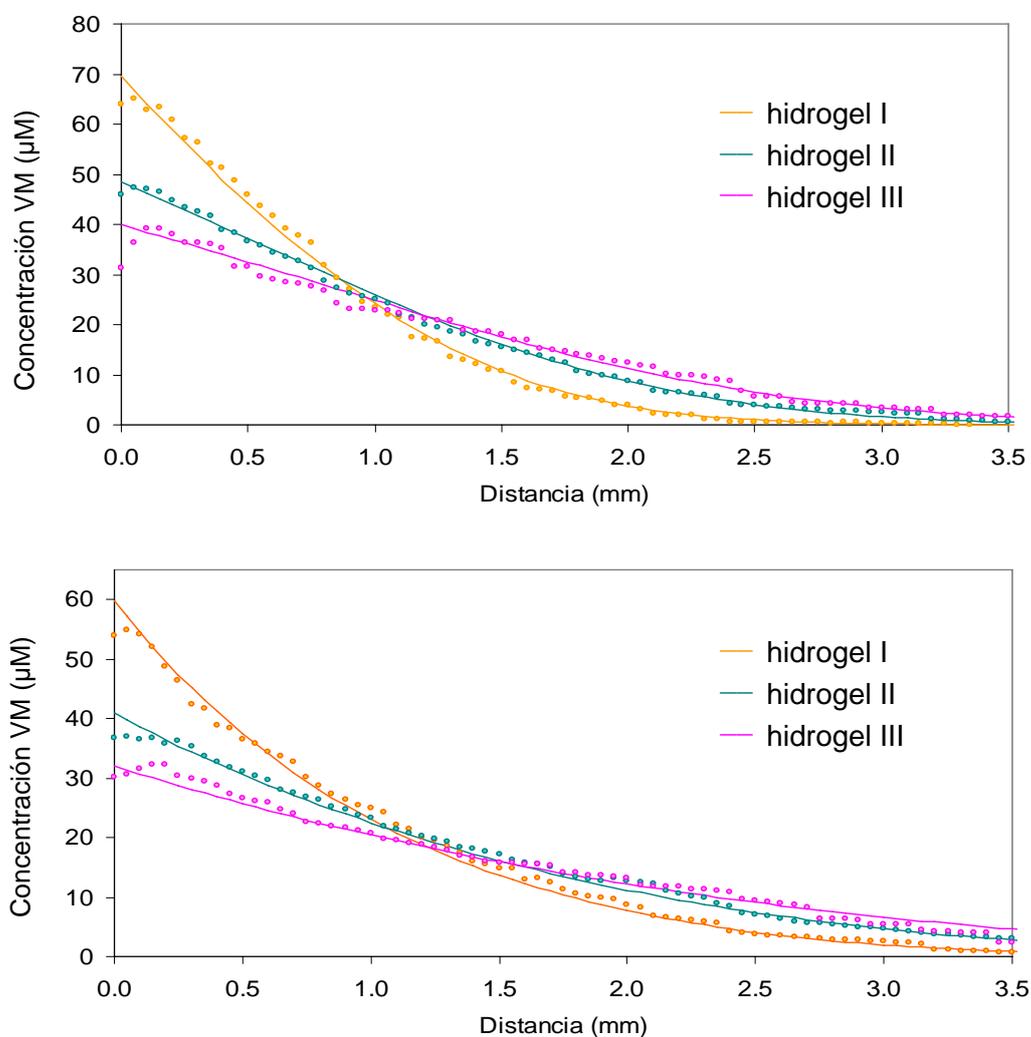


Figura IV.12. Perfiles difusionales del colorante VM en las muestras de hidrogeles, medidas a dos tiempos distintos: 369 min (arriba) y 911 min (abajo). La línea corresponde al ajuste con la ecuación IV.16 y los parámetros de la Tabla IV.2

No se observaron diferencias significativas entre los hidrogeles II y III, tanto para los valores de constantes cinéticas de adsorción, como para los coeficientes de difusión efectivos obtenidos para ambos colorantes. Para el hidrogel I, se obtuvieron constantes cinéticas de adsorción mayores y coeficientes de difusión menores que para los geles sintetizados a mayor pH. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en la sección anterior ya que, al ser mayor el área es esperable una constante de velocidad (no normalizada) mayor. Por otra parte, la estructura más cerrada de los geles más poliméricos, como los sintetizados en medio ácido, puede estar generando una fracción no despreciable de poros con diámetro suficientemente pequeño como para inhibir el transporte del soluto libre (no adsorbido).

Si bien no hay diferencias significativas entre los D_{ef} para los 3 hidrogeles, el efecto de la adsorción genera un retardo en el transporte del colorante a través de la matriz.

Estos parámetros permiten estimar, a partir de simulaciones numéricas, la concentración de colorante en solución en función de la distancia y el tiempo transcurrido. Este dato es necesario para el diseño de MABs en los cuales se quiere controlar la concentración de especies en la interfaz entre la matriz y la cavidad.

IV.6. PRINCIPALES RESULTADOS DE ESTE CAPÍTULO

El estudio de las propiedades ópticas, mecánicas y de transporte de hidrogeles sintetizados por distintas vías permite afirmar que los geles más particulados presentan mayor opacidad, menor elasticidad y, probablemente menor área y tamaño de poro, que los formados por partículas más pequeñas (geles poliméricos).

Estos resultados ponen condiciones de contorno adicionales para la preparación de MABs y los parámetros a emplear dependerán, no sólo de las mejores condiciones biocompatibles, sino también de las que provean las mejores propiedades operativas. Los casos presentados en este capítulo permiten una racionalización de la síntesis a través del ajuste de las variables que llevan a un gel más polimérico o más particulado.

En el siguiente capítulo se mostrarán los experimentos realizados para evaluar el estrés desarrollado por los microorganismos encapsulados en las distintas matrices sol-gel, lo cual brinda herramientas para estimar la biocompatibilidad del proceso de síntesis.

IV.7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Marchi, M. C., *Tesis doctoral: Estudio de la transición sol-gel y de la estructura de geles de titanía con sondas fotofísicas*, Universidad de Buenos Aires, **2001**.
- ² Borsali, R., Pecora, R. *Soft matter characterization*, Springer, **2008**.
- ³ Brinker, C.J., Scherer, G., *Sol Gel Science*, cap. 3, Academic Press: San Diego, CA, **1990**.
- ⁴ Ferrer, M. L., Yuste, L., Rojo, F., del Monte, F. Biocompatible sol-gel route for encapsulation of living bacteria in organically modified silica matrices, *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 3614-3618.
- ⁵ Fox, M. *Optical properties of solids, Oxford master series in condensed matter physics*, Oxford University Press: New York, **2001**.
- ⁶ Livage, J., Henry, M., Sanchez, C. Sol-gel chemistry of transition metal oxides, *Prog. Solid St. Chem.*, **1988**, *18*, 259-341.
- ⁷ Nadine Nassif, *Encapsulation de bactéries dans des gels de silice*, tesis doctoral, Universidad Pierre et Marie Curie-Paris VI, **2003**.
- ⁸ Scherer, G. W., Pandenek, S. A., Swiateck, R. M. Viscoelasticity in silica gel, *J. Non-Cryst. Sol.*, **1988**, *107*, 14-22.
- ⁹ Scherer, G. W., Influence of viscoelasticity and permeability on the stress response of silica gel, *Langmuir*, **1996**, *12* (5), 1109-1116.
- ¹⁰ Rudzinski, W., Panczyk, T., Kinetics of isothermal adsorption on energetically heterogeneous solid surfaces: a new theoretical description based on the statistical rate theory of interfacial transport, *J. Phys. Chem.*, **2000**, *104*, 9149-9162.
- ¹¹ Hamdaoui, O., Chiha, M., Naffrechoux, E, Ultrasound-assisted removal of malachite green from aqueous solution by dead pine needles, *Ultrasonics Sonochemistry*, **2008**, *15*, 799–807.
- ¹² Cerofolini, G., A unified theory for Freundlich, Dubbin-Radushkevich and Temkin behaviors, *J. Coll. Interf. Sci.*, 1981, *86*, 204-212.
- ¹³ Westrin, B. A., Axelssonb, A. Zacch, G., Diffusion measurement in gels, *Journal of Controlled Release*, **1994**, *30*, 189-199.
- ¹⁴ Jianhong Pei, J., Tercier-Waeber, M. L., Buffle, J., Fiaccabrino, G. C., Koudelka-Hep, M., individually addressable gel-integrated voltammetric microelectrode array for high-resolution measurement of concentration profiles at interfaces, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 2273-2281.

- ¹⁵ Howells, A. R., Zambrano, P. J., Collinson, M. M., Diffusion of redox probes in hydrated sol-gel-derived glasses, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 5265-5271.
- ¹⁶ Kanungo, M., Collinson, M. M., Diffusion of redox probes in hydrated sol-gel-derived glasses. Effect of gel structure, *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 6555-6559.
- ¹⁷ Tantemsapya, N., Meegoda, J. N., Estimation of diffusion coefficient of chromium in colloidal silica using digital photography, *Environ. Sci. Technol.*, **2004**, 38, 3950-3957.
- ¹⁸ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).
- ¹⁹ Takahashi, R., Sato, S., Sodesawa, T., Nishida, H., Effect of pore size on the liquid-phase pore diffusion of nickel nitrat, *Phys.Chem. Chem. Phys.*, **2002**, 4, 3800-3805.
- ²⁰ Crank, J., *The Mathematics of Diffusion*, cap. 14, 2da. Ed., Clarendon Press: Oxford, **1975**.

CAPÍTULO V

**ESTRÉS CELULAR EN EL
DESARROLLO DE LOS MABs**

CAPITULO V:

ESTRÉS CELULAR EN EL DESARROLLO DE LOS MABs

La Nature est un temple où de vivants piliers
laissent parfois sortir de confuses paroles;
l'homme y passe à travers des forêts de symboles
qui l'observent avec des regards familiers.

[...]

Charles Boudelaire

La célula, como mínima unidad viva, muestra un patrón complejo de respuestas a las variaciones de su entorno. Los cambios en factores externos del ambiente son captados por las células y esa información, procesada mediante complejos mecanismos de transducción de señales, modula la biosíntesis de productos metabólicos y regula la expresión del fenotipo celular.¹

La mayoría de los trabajos publicados evalúan la biocompatibilidad de los diferentes procedimientos de encapsulación en base a medidas de la viabilidad inicial y al grado de supervivencia en el tiempo de las células encapsuladas, sin considerar la complejidad inherente a la interacción de una célula con un entorno o una matriz foráneos.² Sin embargo, para ciertas aplicaciones, toda la maquinaria biosintética puede estar comprometida. En este caso una evaluación del estado fisiológico de las células es de gran importancia ya que la célula, aunque viva, puede estar lo suficientemente dañada como para no generar la respuesta esperada.

En este capítulo se presenta el diseño y desarrollo de un método para evaluar la influencia de las principales variables del procedimiento de síntesis sobre el nivel de estrés celular de levaduras encapsuladas en hidrogeles de SiO₂.

V.1. RESPUESTA A ESTRÉS AMBIENTAL

La respuesta al estrés es una respuesta a cualquier cambio ambiental desfavorable, mediante la cual el organismo se prepara para enfrentar las posibles demandas generadas por la nueva situación. Por ejemplo, la alta salinidad, la escasez de agua, la no disponibilidad de

nutrientes y las temperaturas extremas son variables ambientales comunes que condicionan significativamente el crecimiento y desarrollo de animales, plantas y microorganismos.

Estas respuestas favorecen el procesamiento más rápido y eficaz de la información disponible, posibilitando la selección de conductas adecuadas y preparando al organismo para actuar de forma más rápida y vigorosa. Dado que se activan gran cantidad de recursos, hay una importante demanda energética asociada.

Numerosos genes aumentan su expresión en estas situaciones. Éstos pueden clasificarse en dos grandes grupos: a) genes cuyos productos protegen directamente, contrarrestando el estrés experimentado y b) genes que actúan indirectamente, regulando la expresión génica de otros genes de estrés o modulando las vías de señalización.³ El primer grupo incluye genes que codifican enzimas requeridas para la producción de osmolitos intracelulares, proteínas del grupo LEA (*Late Embryogenesis Abundant proteins*), chaperonas, proteínas anticongelantes, proteínas de unión a mRNA y enzimas involucradas en la detoxificación. El segundo grupo incluye genes que codifican, entre otros, factores de transcripción, proteínas kinasas y enzimas involucradas en el metabolismo del fosfoinositol.^{4,5}

Las levaduras son organismos modelo para el estudio de la respuesta a estrés de células eucariotas.⁶ Los factores que causan estrés en levaduras son muchos: variaciones de presión, fuerza iónica, pH, temperatura, presencia de agentes oxidantes o reductores, etc. Como se muestra esquemáticamente en la figura V.1., para cualquiera de dichos parámetros existe un valor óptimo, en el cual el microorganismo mantiene una alta tasa de división. Pequeñas variaciones en un parámetro generan cambios leves en la fisiología celular: dentro de este rango de tolerancia, disminuye la tasa de división celular. Cuando un parámetro se aparta significativamente del valor óptimo, se disparan señales de arresto del ciclo celular. Dentro de ciertos valores límite, el microorganismo ya no se reproduce pero permanece viable durante un lapso de tiempo acotado. Una vez superados los límites de viabilidad, el microorganismo muere.

En levaduras se identificaron diversos factores de transcripción tales como *Sko1* que se inducen ante un estímulo muy específico (estrés osmótico, en el caso del factor citado).⁷ Sin embargo, muchos otros genes se inducen ante una variedad de factores. Cuando el microorganismo pasa de un metabolismo fermentativo a uno oxidativo, el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS, de su sigla en inglés) aumenta considerablemente en el espacio intracelular, pero esto también ocurre cuando se expone a determinados factores ambientales, tales como metales pesados, radiaciones nocivas o especies que generen radicales libres. Diversos mecanismos fisiológicos mantienen la homeóstasis de óxido-reducción intracelular: estos incluyen la síntesis de antioxidantes y de enzimas que destruyen los oxidantes o reparan el daño por ellos

causado. El estrés oxidativo aumenta, por ejemplo, a medida que el cultivo envejece pasando de la etapa de crecimiento exponencial a la fase estacionaria.⁸



Figura V.1. La doble flecha en bloque simboliza la variación de un determinado parámetro (pH, temperatura, fuerza iónica, presión) en torno al valor óptimo para el desarrollo del microorganismo (verde). Dentro de un cierto rango de tolerancia, el organismo se divide con una tasa menor (amarillo). Dentro de ciertos límites, se detiene la división celular, pero aún así el microorganismo puede mantenerse viable (naranja). Si las condiciones son muy adversas, el microorganismo muere (rojo).

Un tipo de estrés de relevancia en aplicaciones biotecnológicas es el causado por un aumento en la presión, como el que ocurre en confinamiento, el cual influencia procesos moleculares importantes tales como el plegamiento de proteínas, la transición de fase de la bicapa lipídica y la unión de ligandos a sitios específicos. Éstos últimos, a su vez, afectan significativamente la fisiología celular. Dado que existen efectos comunes causados por distintos agentes, la célula genera un patrón de respuesta general a estrés. Dentro de este tipo de genes se encuentra la familia de las proteínas de shock térmico (*Hsp*, de su sigla en inglés: *Heat Shock Proteins*), las cuales mantienen ese nombre por motivos históricos, ya que fueron identificadas analizando el cambio en el perfil de expresión al someter al organismo a *shocks* de temperatura aunque más tarde se verificó que aumentaban su expresión ante prácticamente cualquier causa de estrés celular. La Hsp12p es una proteína hidrofílica pequeña de respuesta general a estrés, cuya transcripción está regulada positivamente por una gran variedad de factores, que incluyen estrés osmótico y oxidativo, presión, temperatura, presencia de etanol y limitación de nutrientes.

De esta forma, analizando el nivel de expresión de un único gen de respuesta general a estrés, es posible tener información sobre el nivel de estrés al cual está expuesto el microorganismo sin importar el agente que lo causa.

La ingeniería genética permite generar microorganismos transgénicos en los cuales se adiciona una copia del gen de interés fusionada al gen que codifica para una proteína “reportera”, esto es una proteína que pueda ser identificada con facilidad. De esta manera se obtienen microorganismos transgénicos que muestran una señal claramente visible ante un estímulo determinado, constituyendo verdaderas sondas biológicas. Se utilizó como gen de respuesta general a estrés *Hsp12*, y el gen reportero usado codifica una proteína fluorescente verde, *GFP*, de su sigla en inglés: *Green Fluorescent Protein*. Este sistema fue propuesto como herramienta para monitorear el estado general de estrés en levaduras.⁹

V.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El sistema de medición se desarrolló en base a trabajos en los cuales se encapsularon¹⁰ o se inmovilizaron sobre la superficie de sílica¹¹ cepas de *E. coli* que expresaban proteínas recombinantes fluorescentes. A partir de esos MABs, se desarrollaron biosensores para el monitoreo del nivel de estrés ambiental.¹² En este último trabajo se pudieron sensar compuestos mutagénicos midiendo la expresión del gen *RecA*ⁱ acoplado a GFP. También se estudió la viabilidad celular, medida a partir de la intensidad de fluorescencia en presencia del inductor, en función del tiempo para distintas condiciones de síntesis de geles secos.¹³ Otra cuestión analizada con estos sistemas fue la distribución de células en el seno de las matrices sol-gel en los encapsulados directos, ya que las poblaciones encapsuladas pueden observarse fácilmente mediante sondas fluorescentes. En otro de los trabajos citados se estudió la citotoxicidad del alcohol liberado como subproducto en la condensación de alcóxidos, utilizando el gen de shock térmico *GrpE*.

V.2.a. Cepas y condiciones de cultivo

Como control se utilizó otra cepa de *S. cerevisiae* que codifica para la proteína de fusión Gln3::GFPP. Gln3 es una proteína de expresión constitutiva, citoplasmática, que se expresa normalmente en bajos niveles. Sin embargo, cuando la cepa es crecida con fuentes pobres de nitrógeno, adquiere señal de exportación al núcleo. Mediante la observación de la fluorescencia localizada en el núcleo se puede identificar si la célula se encuentra metabólicamente activa en las condiciones del ensayo.

ⁱ El gen *RecA* se induce cuando hay daño al ADN.

En la figura V.2 se esquematiza la estrategia de construcción de las cepas comerciales utilizadas, ambas genoma Mata *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*.

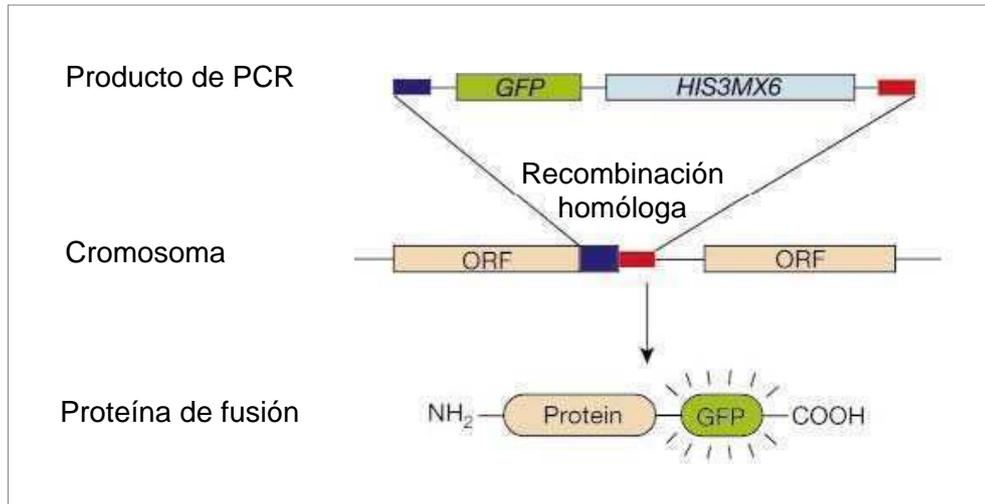


Figura V.2. Estrategia para la construcción de las cepas de levadura que expresan las proteínas recombinantes Hsp12::GFP y Gln3::GFP.¹⁴

Las levaduras se cultivaron en medio de cultivo líquido YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa). Todos los cultivos se incubaron a (30 ± 1) °C con agitación permanente en agitador orbital para mantener adecuada aireación.

Al incubar los materiales con actividad biológica (MABs) en el medio de cultivo anterior se observó una fuerte emisión en el verde probablemente debido a la interacción de alguno de sus componentes con la matriz. Para eliminar esta interferencia, la incubación en MABs se realizó en medio mínimo YNB (Yeast Nitrogen Base; Difco) al 0,67%, sin aminoácidos y con el agregado de sulfato de amonio, 2% de glucosa y las auxotrofías necesarias.

V.2.b. Procedimientos de encapsulación directa en hidrogeles de sílica

Los hidrogeles por la ruta de los alcóxidos se obtuvieron según se describe en la sección IV.2.a. Para la incorporación de células de levadura se partió de 2,0 ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento (absorbancia a 570 nm: 0,6 a 0,8), el que se cosechó por centrifugación y se resuspendió en 2,0 ml del *buffer* fosfato.

La síntesis de los hidrogeles por la ruta acuosa se realizó según se describe en la sección IV.2.b. Las levaduras se cosecharon a partir de un cultivo líquido como se describe más arriba, pero se resuspendieron en agua. Las observaciones se realizaron esparciendo una alícuota de esta mezcla sobre un portaobjetos. Inmediatamente, se colocó un cubreobjetos sobre la muestra antes de que la misma alcanzara la gelificación. Se generaron así geles de 1 mm de espesor entre ambos vidrios. Previo a la observación microscópica, las muestras se incubaron a (25 ± 1) °C por un lapso de 30 min. Este último tiempo fue fijado en base a los resultados que se detallan más adelante en este capítulo.

V.2.c. Procedimiento con inmovilización previa en alginato

Las muestras se prepararon siguiendo el procedimiento general detallado en la sección II.3.a. Además de evaluar el estrés celular en los MABs terminados, se midió el estrés en cada una de las etapas intermedias del proceso de síntesis. En la etapa I, se cosechó por centrifugación una alícuota de 500 µl de cultivo en fase exponencial de crecimiento y se resuspendió en 2,0 ml de solución de alginato de sodio, Na-alg, (las concentraciones empleadas en los distintos tratamientos fueron 0,5%, 1,0%, 2,0% y 4,0%). En la etapa II, se prepararon cápsulas de alginato de calcio poniendo en contacto las suspensiones celulares con CaCl_2 0,1 M durante 30 min. A continuación, en la etapa III, se cortaron las cápsulas en secciones de 0,2 a 0,3 mm de espesor y se vertió sobre ellas una mezcla de precursores de sílica (relación molar SiO_2 :agua 4:100; proporción de precursores particulados a poliméricos 4:1) instantes antes de alcanzar el punto de gelificación, de forma tal de obtener, como en el caso anterior, un gel de aproximadamente 1 mm de espesor. Estas muestras fueron expuestas por 15 min a una solución de citrato de potasio 5 mM. Por último, se enjuagaron dos veces con agua y se incubaron en medio líquido YNB a (25 ± 1) °C con agitación orbital (120 rpm) por un lapso de 30 min.

V.2.d. Análisis de Na(I)

Para monitorear el proceso de gelificación de alginato, se llevaron a cabo medidas directas de la concentración de Na(I) por Espectroscopia de Absorción Atómica (AAS, de su sigla en inglés) tanto en la solución de Na-alg como en la solución externa (CaCl_2 0,1 M) en función de el tiempo de entrecruzamiento. Las concentraciones de Na(I) dentro de la cápsula de alginato fueron calculadas a partir de la diferencia entre la concentración de Na(I) presente en la gota

inicial de solución de Na-*alg* y las medidas en la solución externa de CaCl_2 , teniendo en cuenta el cambio en volumen de la cápsula en función del tiempo.

V.2.e. Cuantificación de la fluorescencia

Dado que el método se basa en la expresión de proteínas *de novo*, se requiere un tiempo de inducción entre el sensado del factor de estrés y la manifestación de la fluorescencia debida al aumento en la expresión de la proteína de fusión. Para estudiar la dependencia en el tiempo de la expresión de Hsp12:GFPp, se realizaron mediciones directas de suspensiones de células enteras mediante un espectrofluorómetro QuantaMaster QM1 estacionario (la longitud de onda de excitación fue 466 nm y el rango de integración de emisión, 490 a 525 nm). Estos ensayos, realizados con células preincubadas en distintas concentraciones de cloruro de sodio como factor de estrés, permitieron determinar tanto el tiempo de incubación previo a la observación de las muestras en microscopio confocal como el rango de tolerancia a sodio de las cepas empleadas.

Las observaciones microscópicas fueron realizadas con un microscopio confocal Olympus FV300 (fuente de láser: Ar, 488 nm) equipado con *software* que permite una variación continua de la intensidad incidente. Los parámetros con los cuales se tomaron las imágenes en el microscopio confocal fueron configurados en forma tal de obtener una señal baja pero discernible para el tratamiento de menor concentración de sodio y, a partir de ésta, dichos parámetros se fijaron para todas las demás muestras.

Para la adquisición de la imagen se hizo en cada caso un barrido en profundidad. Para cada célula se cuantificó la intensidad de fluorescencia correspondiente al plano focal utilizando el *software* de procesamiento de imágenes *ImageJ* (version 1.37v).¹⁵ Se recortaron los contornos de las imágenes de células y se cuantificó la intensidad dentro de dicho contorno (en unidades arbitrarias). En todos los casos, las medidas resultan del procesamiento de al menos 10 imágenes de células en su plano focal.

V.3. INTENSIDAD DEL ESTRÉS DURANTE LA ENCAPSULACIÓN

De acuerdo con trabajos previos, no se detectó expresión de Hsp12:GFPp durante la fase exponencial de crecimiento de levaduras cultivadas en presencia de glucosa (medio YPD). El estudio de la expresión inducida de la proteína de fusión Hsp12:GFPp en nuestro sistema se realizó en función de fuerza iónica creciente (concentraciones de NaCl: 200, 400 y 800 mM). En la figura V.3 se muestran los valores de expresión en función del tiempo para cada uno de los

tratamientos. A cada tiempo de incubación especificado, una alícuota de 1 ml fue cosechada por centrifugación y resuspendida en medio YNB.

En ausencia de sales, se puede detectar un nivel basal de fluorescencia que no es observado en las imágenes de microscopía de fluorescencia confocal. Esto puede atribuirse a un nivel basal de expresión del constructo. Sin embargo, estos niveles fueron lo suficientemente bajos como para permitir la observación de un aumento significativo de la expresión de GFP al aumentar la fuerza iónica.

Se alcanzó un nivel alto de expresión de Hsp12:GFPp al cabo de 30 minutos de inducción y se verificó que la regulación ocurre en forma dependiente de la concentración de sales, excepto para la concentración más alta (800 mM), la cual se postula que causa un estrés severo en la célula e inhibe la maquinaria transcripcional y translacional (con la posible excepción de los sistemas de exclusión de sodio). Si bien se han obtenido resultados similares en estos sistemas,⁹ debido a la especificidad de respuesta de cada organismo, resulta importante constatar los mismos en condiciones específicas. A partir de los resultados obtenidos se estableció para los ensayos siguientes un tiempo de observación de (30±5) minutos.

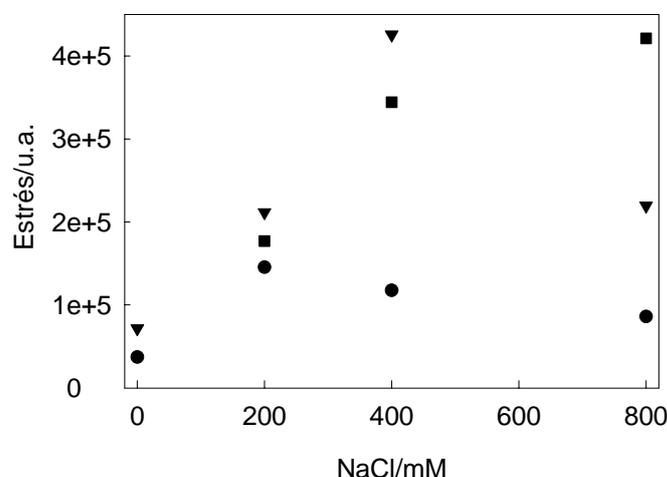


Figura V.3.: Dependencia en el tiempo de la inducción de Hsp12-GFPp Integración del pico de fluorescencia de GFP medido en suspensiones de células enteras expuestas a distintas concentraciones de NaCl para los siguientes tiempos de muestreo: 5 min (●), 30 min (▼) y 60 min (■).

Para correlacionar el nivel de fluorescencia de GFP medido en las imágenes de microscopía confocal con el nivel de estrés sufrido por las células, se construyó una curva de referencia tomando como variable la fuerza iónica del medio (NaCl 100, 200, 300 y 400 mM). Estas concentraciones se encuentran dentro de los límites de viabilidad de las células de levadura, puesto que en observaciones en microscopio confocal de fluorescencia se constató actividad

metabólica en la cepa control (Gln3:GFPp) en medio adicionado con NaCl 800 mM, concentración que duplica la fuerza iónica máxima empleada en el trabajo.

La curva de referencia (figura V.4.) muestra una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia de GFP y la concentración de sodio a la cual está expuesta la población de levaduras ($R^2= 0,995$).

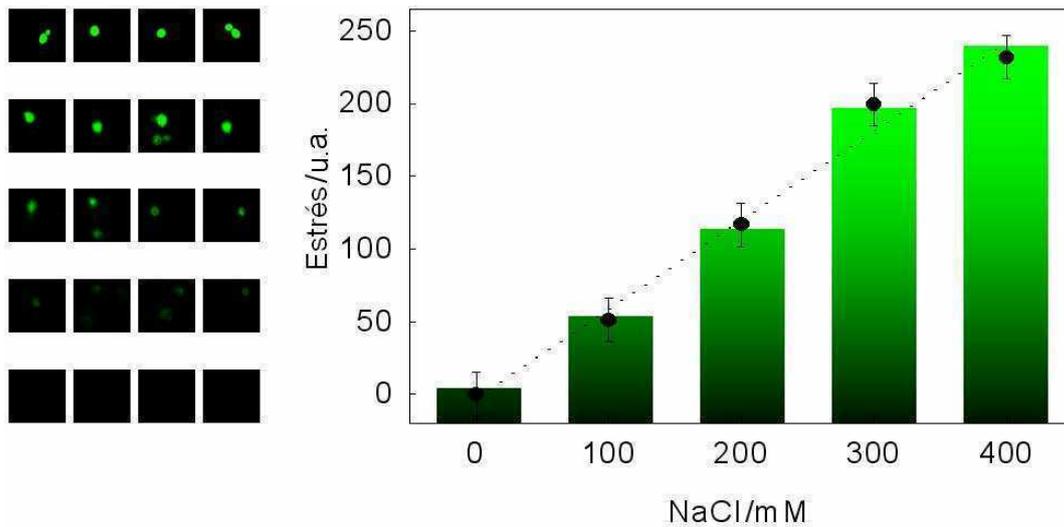


Figura V.4: Curva de referencia del nivel de estrés (en unidades arbitrarias)

A la izquierda se muestran imágenes de microscopía confocal representativas de cada uno de los tratamientos (NaCl 0, 100, 200, 300 y 400 mM). A la derecha se presentan los valores de intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) analizados con el software *ImageJ* a partir de las imágenes adquiridas.

V.3.a. Encapsulación directa

Si bien algunos trabajos de encapsulación de microorganismos en matrices de sílica sintetizadas por la vía acuosa emplean exclusivamente silicato de sodio como precursor,¹⁶ como se mencionó en el capítulo 1, parte del SiO₂ puede ser agregado en forma de partículas preformadas, disminuyendo la concentración de sodio y silicatos, lo cual aumenta la viabilidad celular.¹⁷

Como se vio en el capítulo anterior, las mejores propiedades ópticas y mecánicas se obtendrían empleando una mayor proporción de silicato. Sin embargo, el exceso de sodio proveniente de este último, generaría mayor estrés celular. Con el objetivo de encontrar condiciones óptimas para el encapsulado, se evaluó en qué magnitud la relación entre precursores poliméricos y particulados afecta el nivel de estrés de las células encapsuladas.

Como puede observarse en la figura V.5, para todas las proporciones SiO₂ polimérico a SiO₂ particulado ensayadas se observó un alto nivel de estrés. Para la menor relación (figura V.4.-A), la cuantificación de fluorescencia de GFP es comparable a la observada cuando las células se exponen a una concentración de cloruro de sodio en el rango 200 a 300 mM. Al incrementar la proporción de silicato de sodio (figura V.4.-B y C), aumenta el estrés celular, llegando a ser comparable al generado por una concentración de Na⁺ 400 mM. Si bien estos resultados correlacionan con los ensayos de viabilidad realizados por otros autores, en el sentido de que a mayor fuerza iónica y concentración de silicatos se observa un mayor nivel de estrés, también demuestran que aún para una alta proporción de precursor particulado a polimérico, donde se reportó una viabilidad alta, las células presentan elevados niveles de estrés.

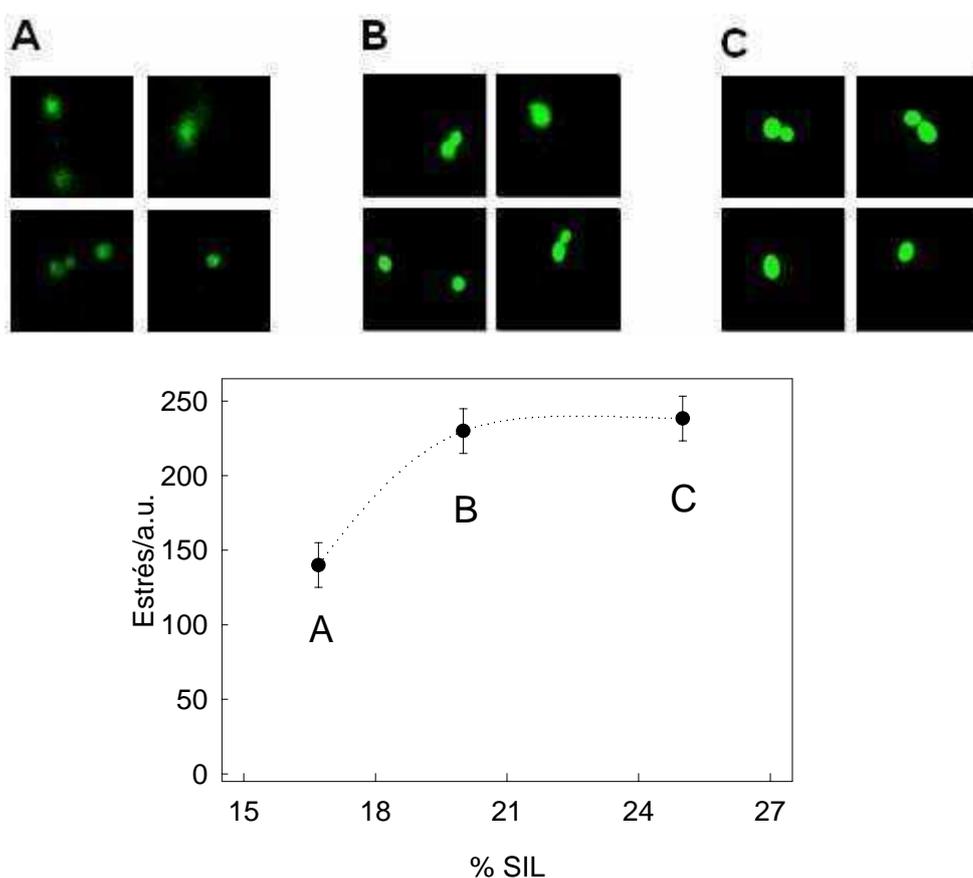


Figura V.5. Estrés generado por encapsulación directa por la vía acuosa.

Arriba: Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia que corresponden a la encapsulación directa por la vía acuosa para una relación molar SiO₂:agua fija (4:100) variando la relación COL:SIL (5:1, 4:1 y 3:1 para las figuras A, B y C, respectivamente).

Abajo: cuantificación del nivel de estrés a partir de la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) analizados con el software *ImageJ* a partir de las imágenes adquiridas.

En el encapsulado directo por la ruta de los alcóxidos no hay componente de estrés por sodio y el estrés observado sería debido exclusivamente a silicatos. En la figura V.6 se muestran en forma conjunta los resultados de la cuantificación del nivel de estrés y la viabilidad inicial medida para geles de tetraetoxisilano (TEOS) de distinta concentración. El punto de concentración de sílica 0% corresponde al cultivo en medio líquido.

Al igual que en el caso anterior (hidrogeles sintetizados por vía acuosa), con el aumento de la concentración de sílica se observa un aumento del estrés y una disminución de la viabilidad inicial. El estrés celular rápidamente alcanza un valor de saturación del sistema de medición para concentraciones de sílica a partir de 9% y para la menor concentración de sílica ensayada (7%), que presenta una viabilidad aceptable (70%), el nivel de estrés desarrollado es importante (comparable a la exposición a concentración de Na^+ 300 mM). En síntesis, las medidas de estrés brindan información adicional sobre el estado de las células que permanecen viables.

En la figura V.7 se muestran los valores del nivel de estrés desarrollado por las células encapsuladas en hidrogeles mixtos TEOS-GPTMS con contenido total de sílica fijo (9,4%) en función del porcentaje agregado del derivado orgánico. El agregado de pequeñas fracciones de GPTMS (menos del 20%) en la mezcla de reactivos disminuye significativamente el nivel de estrés generado por la matriz de sílica sobre las células encapsuladas. Esto confirma la mayor biocompatibilidad de este procedimiento que ya había sido observada en trabajos anteriores en términos de viabilidad.¹⁸

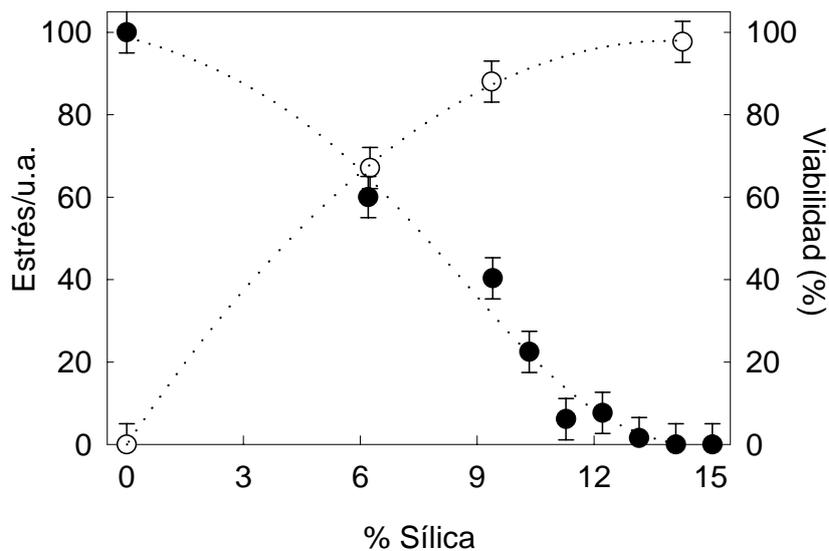


Figura V.6. Encapsulación directa por la vía de los alcóxidos en hidrogeles de TEOS. Cuantificación del nivel de estrés a partir de la intensidad de fluorescencia de GFP de imágenes de microscopía confocal, en unidades arbitrarias, para encapsulados de TEOS con concentración de sílica variada (○). Viabilidad hallada por recuento de UFC (●).

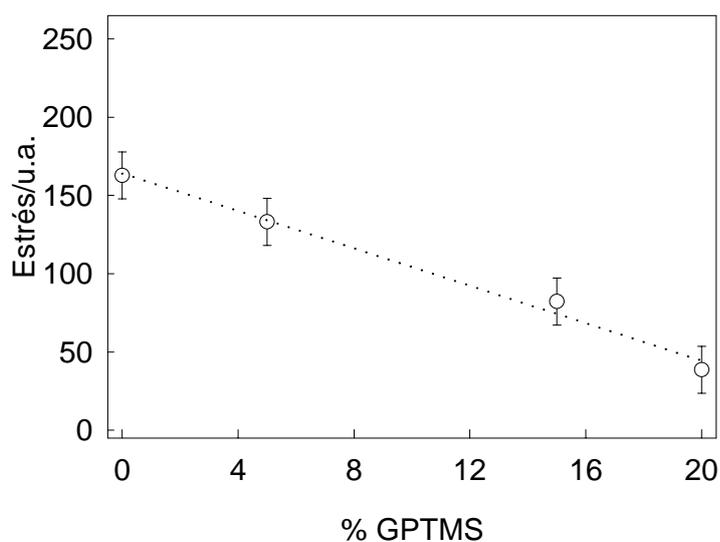


Figura V.7. Encapsulación directa por la vía de los alcóxidos en hidrogeles mixtos TEOS-GPTMS. Cuantificación del nivel de estrés a partir de la intensidad de fluorescencia de GFP de imágenes de microscopía confocal, en unidades arbitrarias, para encapsulados de concentración de sílica constante (9,4%) y porcentaje de GPTMS variable.

V.3.b. Encapsulación con inmovilización previa en alginato

Habiendo cuantificado el estrés propio de los métodos tradicionales, corresponde ahora analizar en qué medida las estrategias diseñadas en este trabajo de tesis contribuyen en su disminución. Como se describió en el capítulo II, el procedimiento de encapsulación indirecta consiste en una inmovilización previa en Ca-alg con el fin de proteger a las células frente a la toxicidad de los reactivos inorgánicos. No obstante, esta primera inmovilización en el polímero de origen natural también tiene incidencia sobre el estrés del cultivo encapsulado, siendo el factor determinante la concentración de Na^+ .

En la figura V.8 se muestran los resultados obtenidos para el nivel de estrés generado por las etapas I y II del procedimiento de encapsulación indirecta. Se observa que el nivel de estrés correlaciona perfectamente con la concentración de Na^+ aportada por el Na-alg, según se determinó por AAS. Como se describe en el capítulo II, la adición de cationes Ca^{2+} al alginato resulta en la coordinación de éstos por el polímero cargado negativamente para formar un gel. Como consecuencia el Na^+ difunde hacia la solución de CaCl_2 . Por lo tanto, la fuerza iónica sensada por las células disminuye al formarse el gelato.

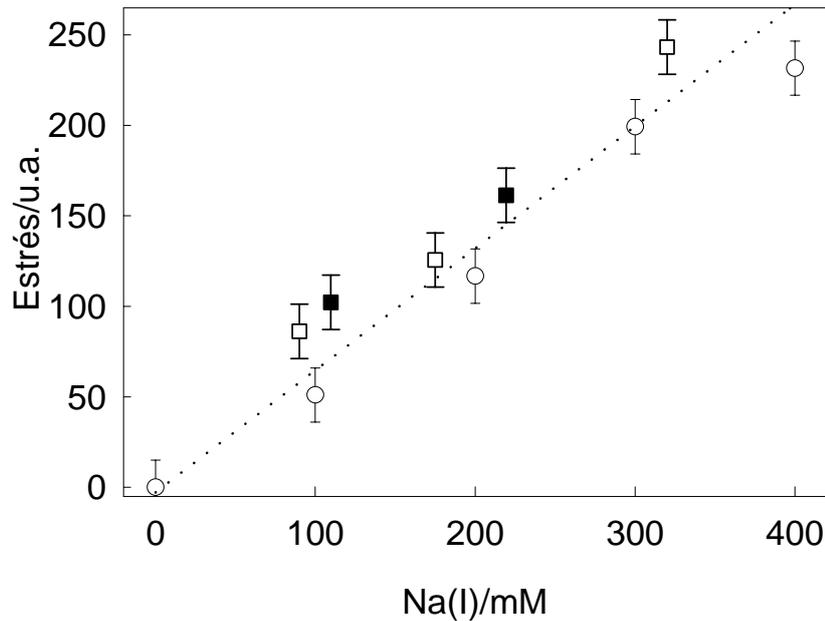


Figura V.8. Etapas I y II de la encapsulación indirecta (inmovilización en alginato). Cuantificación del nivel de estrés a partir de la intensidad de fluorescencia de GFP de imágenes de microscopía confocal, en unidades arbitrarias, para suspensiones de alginato de sodio 1% y 2% (■) e inmobilizaciones generadas a partir de alginato de sodio 1%, 2% y 4% en CaCl_2 0,1M (□). Los círculos corresponden a la calibración realizada con NaCl.

En la figura V.9 se grafican los resultados de las etapas III y IV del procedimiento de encapsulación indirecta en función de la concentración de Na-alg de la suspensión celular de partida. El punto de concentración 0 corresponde a la encapsulación directa en la matriz sol-gel. Se puede apreciar el efecto protector de la inmovilización en alginato. No obstante, las diferencias en el nivel de estrés observado entre los distintos tratamientos no pueden explicarse exclusivamente a partir de la concentración de Na^+ aportada por el Na-alg. Otro factor importante a tener en cuenta es la difusión de los precursores sol-gel en el gelato de calcio.

El mayor o menor grado de entrecruzamiento del Ca-alg a un tiempo dado está directamente relacionado con la concentración inicial de la solución de Na-alg. Esta dependencia se analizó estimando el volumen alcanzado a los 30 min por la estructura de gelato en formación, respecto del volumen extrapolado a tiempo infinito, el cual puede considerarse el termodinámicamente estable (figura V.10). Estos datos fueron extraídos de las curvas de evolución de tamaño de las cápsulas de alginato en función del tiempo de contacto con la solución de CaCl_2 0,1M a 25 °C para distintas concentraciones de Na-alg mostradas en el capítulo II (figura II.9). A partir de estos datos en la figura V.11 se graficó el volumen relativo de la esfera de alginato respecto del volumen de la gota inicial de Na-alg para distintas concentraciones del

polímero y a distintos tiempos de contacto con la solución de CaCl_2 . También se muestra en línea de puntos en el mismo gráfico una extrapolación del volumen a tiempo infinito en función de la concentración de Na-alg de partida. No se cuenta con mediciones para la menor concentración de 0,5% dado que las muestras resultaron sumamente laxas y no permitieron su manipulación, pero una extrapolación a partir de los datos de la figura V.9 arroja un valor de 600% para el volumen a 30 minutos respecto del volumen final. En el otro extremo, para la mayor concentración (4,0% de alginato) la estructura de Ca-alg a los 30 minutos tiene un volumen sólo un 40% mayor al volumen final esperado. Para la menor concentración del polímero la estructura formada a los 30 minutos aún se encuentra con un grado de entrecruzamiento muy bajo. Esto permite suponer un transporte relativamente rápido de Na^+ y silicatos desde la mezcla de precursores a través del gel de alginato, causando un nivel de estrés más elevado para el tratamiento de 0,5% de alginato.

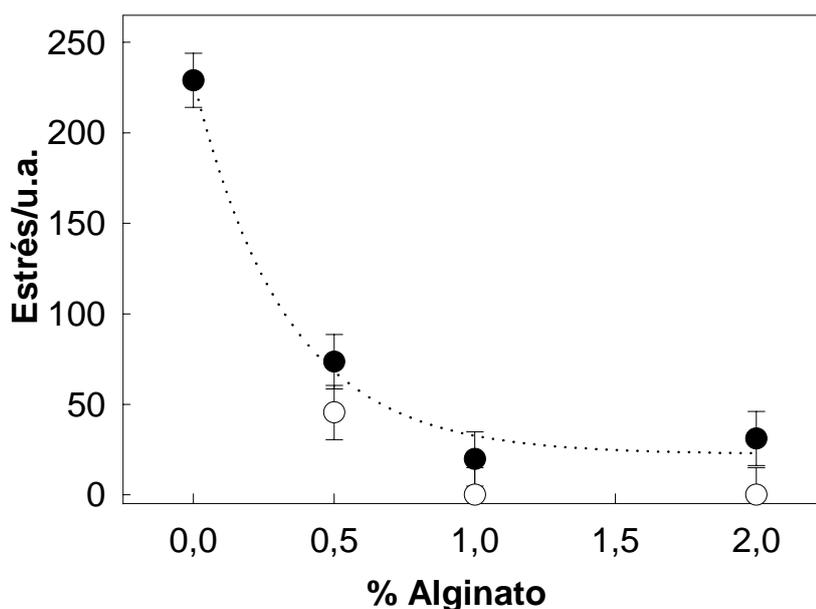


Figura V.9.: Etapas III y IV de la encapsulación indirecta.

Cuantificación del nivel de estrés a partir de la intensidad de fluorescencia de GFP de imágenes de microscopía confocal, en unidades arbitrarias, para la encapsulación sol-gel por vía acuosa de cultivos inmovilizados previamente en alginato (●) y para los mismos tratamientos posteriormente incubados en medio YNB durante 2 horas (○) en función de la concentración de alginato empleada en la inmovilización.

En la etapa IV del procedimiento de encapsulación indirecta se observó una disminución significativa de la señal de fluorescencia luego de incubar las distintas muestras en medio YNB durante 2 h. Esto implica que, con el procedimiento en dos pasos (alginato / sílica) no sólo se

logra una protección a tiempo inicial, durante la síntesis del material, sino que el nivel de estrés de las células encapsuladas baja aun más durante las primeras horas de cultivo en el encapsulado.

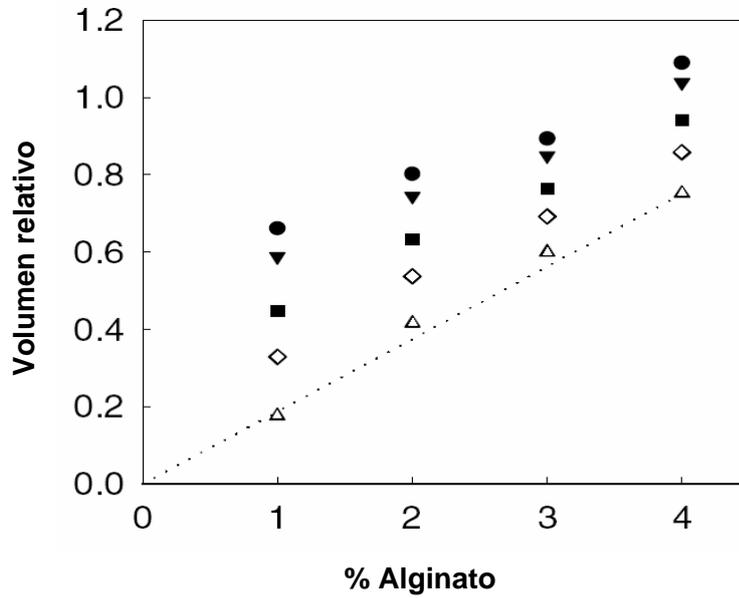


Figura V.10.: Volumen relativo de la esfera de Ca-alg respecto del volumen de la gota inicial de Na-alg para distintas concentraciones del polímero.

Se presentan series de medidas a distintos tiempos de contacto con la solución de CaCl_2 0,1 M a 25 °C: 10 min (●), 30 min (▼), 10^3 min (■), 10^5 min (◇) y 10^{14} min (△). Los símbolos llenos corresponden a medidas realizadas y los símbolos vacíos corresponden a una extrapolación realizada sobre las curvas de evolución de tamaño presentadas en el capítulo II (figura II.9).

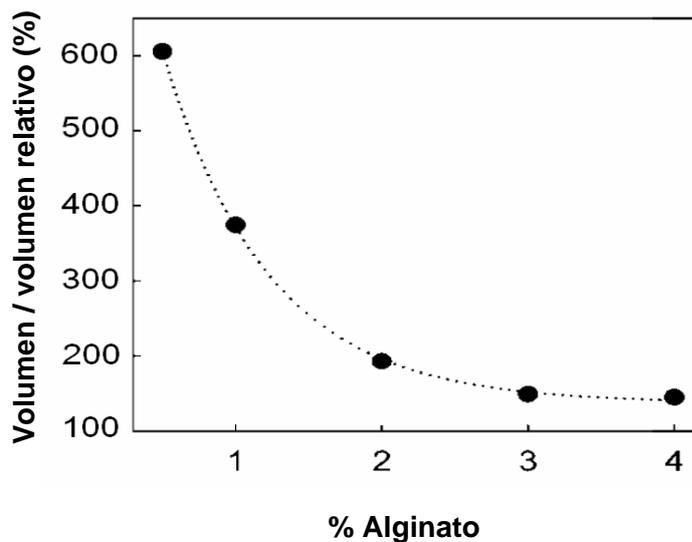


Figura V.11. Volumen alcanzado a los 30 minutos de entrecruzamiento en CaCl_2 0,1 M a 298 K respecto del volumen esperado en el equilibrio, calculado por extrapolación a tiempo infinito de las curvas de evolución de volumen en función del tiempo de entrecruzamiento, presentadas en el capítulo II (figura II.9).

V.4. PRINCIPALES RESULTADOS DE ESTE CAPÍTULO

Durante el proceso de encapsulación en matrices de sílica, aun cuando se realicen formulaciones que den una alta viabilidad, el estrés sufrido por las células puede deteriorar las funciones que se busca aprovechar de un MAB. Una primera aproximación a este problema fue comparar el estrés, medido como intensidad de fluorescencia de GFP del microorganismo *S. cerevisiae* modificado con el gen de respuesta general a estrés *Hsp12*, cuando se encapsula directamente en sílica (procedimiento convencional) o en dos pasos (alginato/sílica). Este método, simple y rápido, requiere el empleo de matrices con buenas propiedades ópticas para la obtención de resultados cuantitativos pero, aun para matrices particuladas, es posible establecer tendencias y comparaciones. Por otra parte, la metodología es suficientemente versátil como para emplear otros sistemas celulares, para analizar respuestas de estrés más específicas.

La principal conclusión del conjunto de resultados presentados en este capítulo y en el anterior es que el diseño de estos MABs requiere un compromiso entre biocompatibilidad, transporte, estabilidad mecánica y, en ciertos casos, calidad óptica. Por ejemplo, para la vía de síntesis a partir de silicato/ sílica la primera mejora con el agregado de partículas preformadas, en detrimento de la calidad óptica y mecánica. Por otra parte, la síntesis por vía de alcóxidos que da geles muy elásticos y con buenas propiedades ópticas, genera productos citotóxicos. El agregado de pequeñas fracciones de GPTMS (menos del 20%) en la mezcla de reactivos disminuye significativamente el nivel de estrés generado por la matriz de sílica sobre las células encapsuladas en forma directa, pero simultáneamente deteriora su calidad.

Cuando la síntesis se realiza en dos pasos, la inmovilización previa en alginato de calcio provee una protección que disminuye el estrés que genera el proceso sol-gel. En este caso, el estrés está relacionado con la concentración de sodio que entra en contacto con las células durante la etapa previa de inmovilización. Sin embargo, las diferencias en el nivel de estrés observado entre los distintos procesos no pueden explicarse exclusivamente a partir de la concentración de Na^+ aportada por el alginato de sodio. Otro factor importante a tener en cuenta es la difusión de los precursores sol-gel en el gelato de calcio.

V.5. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Klipp, E., Nordlander, B., Krüger, R., Gennemark, P., Hohmann, S., Integrative model of the response of yeast to osmotic shock, *Nature Biotechnol.*, **2005**, *23*, 975-982.
- ² Kuncova, G., Podrazky, O., Ripp, S., Trögl, J., Sayler, G.S., Demnerova, K. y Vankova, R. Monitoring of the Viability of Cells Immobilized by Sol-Gel Process, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **2004**, *31*, 1-8.
- ³ Motoaki Seki, A.K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2003**, 194-199.
- ⁴ Yamaguchi-Shinozaki, K.S., Molecular responses to drought and cold stress, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1996**, 161-187.
- ⁵ Xiong, L., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K., Cell signaling during cold, drought, and salt stress, *Plant Cell*, **2002**, *14*, 165-183.
- ⁶ Fernández, P.M.B., How does yeast respond to pressure?, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2005**, *38*, 1239-1245.
- ⁷ Proft, M., Gibbons, F. D., Copeland, M., Roth, F. P., Struhl, K., Genomewide Identification of Sko1 Target Promoters Reveals a Regulatory Network That Operates in Response to Osmotic Stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eukariotic Cell*, **2005**, *4*, 1343-1352.
- ⁸ Drakulic, T., Temple, M. D., Guido, R., Jarolim, S., Breitenbach, M., Attfield, P. V., Dawes, I. W., Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Res.*, **2005**, *5* (12), 1215-1228.
- ⁹ Karreman, R. J., Lindsey, G. G., A rapid method to determine the stress status of *Saccharomyces cerevisiae* by monitoring the expression of a Hsp12:green fluorescent protein (GFP) construct under the control of the Hsp12 promoter, *J Biomol Screen*, **2005**, *10*, 253-259.
- ¹⁰ Premkumar, J., Lev, O., Rosen, R., Belkin, S. Encapsulation of Luminous Recombinant *E. coli* in Sol-Gel Silicate Films, *Adv. Mater.*, **2001**, *13*, 1773-1775.
- ¹¹ Premkumar, J. R., Lev, O., Marks, R. S., Polyak, B., Rosen, R., Belkin, Sh., Antibody-based immobilization of bioluminescent bacterial sensor cells, *Talanta.*, **2001**, *55*, 1029-1038.
- ¹² Premkumar, J. R., Rosen, R., Belkin, Sh., Lev, O. Sol-gel luminescence biosensors: encapsulation of recombinant *E. coli* reporters in thick silicate films, *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *462*, 11-23.

- ¹³ Premkumar, J. R., Sagi, E., Rosen, R., Belkin, Modestov, A. D., Lev, O., Fluorescent bacteria encapsulated in sol-gel derived silicate films, *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *462*, 11-23.
- ¹⁴ Huh, W-K, Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., O'Shea, E. K., Global analysis of protein localization in budding yeast, *Nature*, **2003**, *425*, 686-691.
- ¹⁵ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>).
- ¹⁶ Chen, J., Xu, J., Xin, J., Li, S., Xia, Ch., Cui, J. Efficient immobilization of whole cells of *Methylomonas* sp. Strain GYJ3 by sol-gel entrapment, *J. Molec. Catal. B: Enzym.*, **2004**, *30*, 167-172.
- ¹⁷ Coiffier, A., Coradin, T., Roux, C., Bouvet, O., Livage, J., Sol-gel encapsulation of bacteria: a comparison between alkoxide and aqueous routes, *J. Mater. Chem.*, **2001**, *11*, 2039-2044.
- ¹⁸ Ferrer, M. L., Yuste, L., Rojo, F., del Monte, F., Biocompatible sol-gel route for encapsulation of living bacteria in organically modified silica matrices, *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 3614-3618.

CAPÍTULO VI

BIORREACTORES MODULARES

CAPÍTULO VI:

BIORREACTORES MODULARES

«Verdaderamente son pocos los que saben de la existencia de un pequeño cerebro en cada uno de los dedos de la mano, en algún lugar entre falange, falangina y falangeta. Ese otro órgano al que llamamos cerebro, ese con el que venimos al mundo, ese que transportamos dentro del cráneo y que nos transporta a nosotros para que lo transportemos a él, nunca ha conseguido producir algo que no sean intenciones vagas, generales, difusas y, sobre todo, poco variadas, acerca de lo que las manos y los dedos deberán hacer..»

José Saramago, La Caverna.

El método de encapsulación presentado en los capítulos anteriores, al permitir la división y crecimiento celular dentro de la matriz y, por lo tanto, el cultivo de líneas celulares podría ser extendido a organismos pluricelulares. Por otra parte, la encapsulación biocompatible de células eucariotas en matrices con buenas propiedades ópticas amplía las posibilidades de aplicación de los MABs al cultivo de organismos fotosintéticos.

En este capítulo se presentan dos casos en los cuales se aplicó esta metodología al diseño de biorreactores modulares. El primero se basa en la encapsulación de un organismo pluricelular, el hongo *Stereum hirsutum*, utilizado en procesos de biorremediación, sistema para el cual las propiedades de transporte son relevantes. En el segundo caso, se propone el uso de MABs con propiedades ópticas optimizadas para el desarrollo de un organismo fotosintético, como el alga verde unicelular *Chlorella vulgaris*.

VI.1. DISPOSITIVOS PARA BIORREMEDIACIÓN

VI.1.a. Biorremediación

Como parte de su ciclo biológico, muchos organismos degradan compuestos que pueden resultar nocivos tanto para sí mismos como para otros seres vivos, contribuyendo a disminuir el impacto ambiental negativo.

La biorremediación, un proceso de biodegradación controlada promovido por el hombre, ha sido propuesta como una buena alternativa para la degradación de una amplia variedad de contaminantes. No obstante, pueden señalarse varios inconvenientes relacionados con el uso de organismos foráneos en contacto directo con el ambiente natural.¹ Por un lado, no es posible degradar todos los contaminantes. Por ejemplo, los metales pesados no son degradados sino adsorbidos y/o incorporados por los organismos que los bioacumulan, empeorando la situación al introducir estos metales en la cadena alimentaria. Por otro lado, la introducción de cepas implica un riesgo ecológico inherente puesto que un organismo exótico puede favorecer desequilibrios respecto al crecimiento de especies autóctonas. En contraposición, el organismo seleccionado puede ser inhibido por los organismos nativos. Adicionalmente, los niveles basales del contaminante pueden ser suficientemente altos como para inhibir las funciones metabólicas del organismo biorremediador empleado.

Se intentó mejorar los procesos de biorremediación por inmovilización de los organismos activos en diferentes soportes tales como esferas de alginato de calcio,² materiales sintéticos biodegradables³ y esponjas de acero inoxidable.⁴ Sin embargo, para lograr un avance significativo es necesario asegurar el aislamiento del organismo biorremediador, lo cual se logra mediante la encapsulación en una matriz física y químicamente estable. Por otro lado, ésto sería de gran utilidad para la encapsulación de microorganismos modificados genéticamente, ya que existen fuertes limitantes para la aplicación de organismos con genes foráneos en este ámbito.⁵

VI.1.b. Hongos ligninolíticos

El hongo *S. hirsutum* es un basidiomicete, distribuido en todo el planeta, particularmente activo en los ecosistemas forestales, donde produce una extensiva pudrición en los árboles caídos. El tipo de pudrición que origina se denomina “pudrición blanca” debido a que degrada la lignina eficientemente, dejando en el sustrato el componente celulósico de color blancuzco. La eficacia de estos hongos para degradar la lignina y otros compuestos de estructura química similar está

relacionada con su capacidad para secretar ligninasas, enzimas ligninolíticas extracelulares, tales como lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa o lacasa. *S. hirsutum* es un excelente productor de ligninasas, razón por la cual se ha propuesto su uso en biorremediación.⁶

Una ventaja del empleo de basidiomicetes de pudrición blanca en diversos procesos de biorremediación es la baja especificidad de sustrato de dichas enzimas.^{7,8} La capacidad degradativa de estos hongos fue demostrada sobre hidrocarburos aromáticos,⁹ dibenzo-*p*-dioxina, dibenzofuran, bifenilo y difenil éter¹⁰ y en la reducción de contaminantes derivados de la industria del papel.¹¹ La degradación de colorantes por enzimas fúngicas también es eficiente debido a la similitud entre las estructuras moleculares de éstos y de los monómeros de la lignina.^{12,13} A partir de esta propiedad se puede pensar que un dispositivo basado en estos hongos puede ser promisorio para el tratamiento de efluentes de la industria textil. Esta última es una importante fuente de contaminación que alcanza volúmenes de alrededor de 800 kt/año.

VI.1.c. Cepa y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa BAFC 2234 de la colección de cultivos micológicos del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, (FCEN-UBA). Los cultivos *stock* fueron mantenidos a 4 °C en placas de medio semi-sólido de extracto de malta. Las suspensiones de micelio fueron incubadas por 12 días en oscuridad a (28 ± 1) °C en condiciones estacionarias en medio mínimo GA de cultivo líquido (10 g/l de glucosa, 3 g/l de asparragina, fosfato disódico 0,25 M; pH final ajustado a 4,5 con ácido cítrico 0,5 M).

Una vez obtenida una biomasa apreciable (5 mg de masa de micelio seco en 1 ml de cultivo), el micelio en suspensión se disgregó con cuchillas metálicas a fin de disminuir el tamaño de los trozos de micelio en suspensión.ⁱ Para concentrar el contenido de micelio en la muestra, se centrifugó a 2000 g durante 5 min y se descartó la mitad del volumen ubicada en la fracción media que consistía en medio de cultivo con escaso micelio en suspensión. La suspensión concentrada en micelio (1,0 % en peso de micelio seco) se fraccionó en dos porciones, reservando una de éstas para la preparación de un material control.

ⁱ Se utilizó una mini-procesadora comercial, marca Braun, 160 watt de potencia, previamente esterilizada en forma superficial con solución de alcohol al 70%.

VI.1.d. Determinación de la actividad de Manganese peroxidasa

La actividad de la enzima manganese peroxidasa fue medida usando como sustrato rojo fenol en *buffer* succinato de sodio 0,1 M (pH 4,5) a 30 °C ($\epsilon_{610} = 22/\text{mM cm}$) sobre muestras extraídas del interior de las cavidades y sobre muestras tomadas del medio externo a los MABs.¹⁴ Los resultados se expresan en unidades enzimáticas, UE, definidas como μM de producto/h.

VI.1.e. Procedimiento de encapsulación

La inmovilización se realizó mezclando igual volumen de la suspensión de micelio 1,0% con solución de Na-*alg* 2,5 %. La suspensión resultante (1,25 % de alginato y 0,5 % en peso de micelio seco) se agregó en forma de gotas (velocidad de flujo de 0,5 ml/min, diámetro de aguja 0,8 mm) en solución de CaCl_2 0,1 M, con agitación continua. Luego de 10 min de agitación se recolectaron por filtración cápsulas esféricas de alginato de calcio, Ca-*alg*, de $(3,4 \pm 0,1)$ mm de diámetro, con un contenido de micelio seco de $(0,10 \pm 0,02)$ mg/cápsula. En adelante estas cápsulas con micelio inmovilizado en Alginato se denominan “A”.

Para la preparación de los MABs empleados en el proceso en *batch* se utilizaron como moldes cilindros de vidrio con un diámetro interno de 0,9 cm y 1,0 cm de altura, colocando 4 esferas A por molde. Para la síntesis de la matriz de sílica se siguieron los pasos I, II y III del procedimiento general detallado en la sección II.3.c, en las condiciones especificadas en la sección IV.2.b, con concentración total de sílica 12,7%, relación molar de precursores (SIL : COL = 1:4). Se realizó la síntesis a pH = 4,5 porque en esta condición el hidrogel resultante es un buen adsorbente (ver isoterma de adsorción, figura IV.7) y además este valor de pH es tolerado por el hongo. Estos MABs se dejaron envejecer 2 h al pH de síntesis y a continuación se los mantuvo durante 2 h en *buffer* fosfato (0,1 M; pH 6,5) y en agua Milli-Q durante otras 2 h adicionales. En lo sucesivo éstos se denominan MAB-B (Materiales con Actividad Biológica para proceso en Batch).

El proceso de obtención de los materiales control fue idéntico al descripto para el MAB-B, excepto que la suspensión 1,0% en micelio se autoclavó previamente para su inactivación (20 min a 1,2 atmósferas de presión). Esto dio como resultado a los Materiales Control para proceso en Batch, MC-B, idénticos en cuanto a su composición a los MAB-B excepto por el hecho de contener encapsulado micelio de hongo muerto.

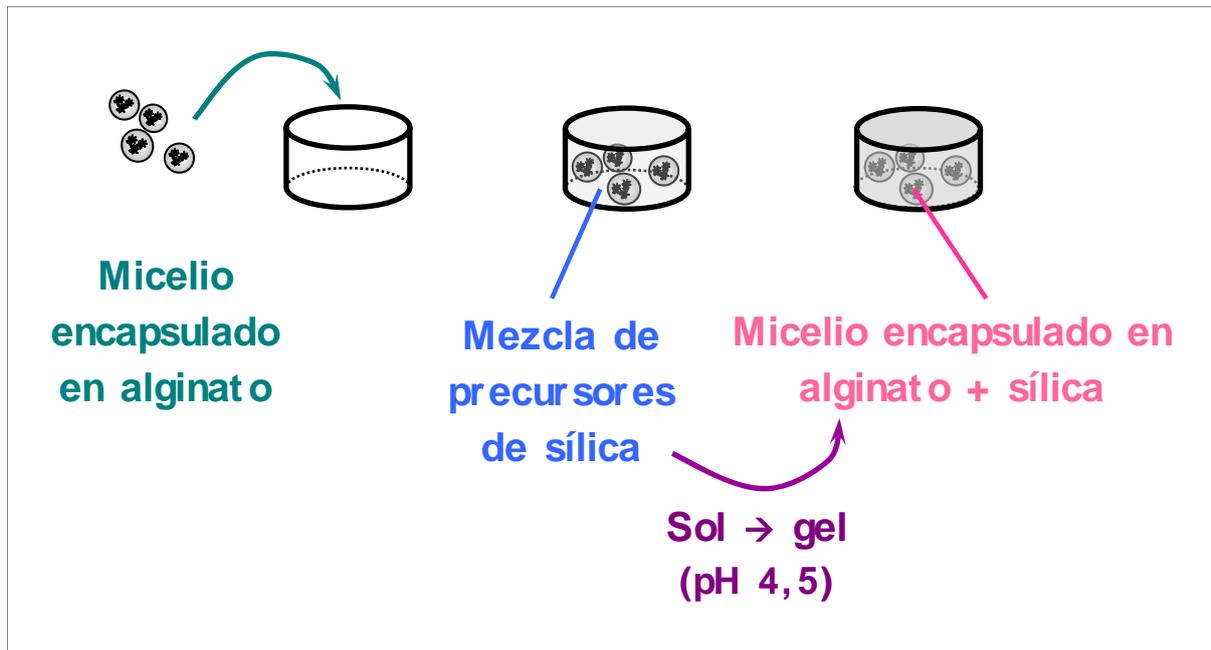


Figura VI.1. Esquema de síntesis de los materiales bioactivos MAB-B, empleados como módulos del biorreactor para proceso en *batch*.

Para la construcción de los módulos empleados en el proceso Continuo, se prepararon unidades bioactivas (MAB-C) y unidades control (MC-C) de la misma manera que los MAB-B y MC-B, pero colocando 16 esferas A por módulo y un volumen total de mezcla de precursores de sílica de 2,0 ml en frascos de vidrio, con tapa de polietileno perforada, de 1,8 cm de diámetro interno.

VI.1.f. Ensayos preliminares

La eficiencia del sistema se evaluó por la degradación del colorante verde de malaquita (VM), aceptado como modelo para la evaluación de la capacidad de bioremediación de hongos ligninolíticos.¹⁵

Por encima de ciertos niveles críticos de concentración de contaminante, éste resulta tóxico para el organismo biorremediador, originando un arresto de la actividad metabólica que inhibe el proceso de biodegradación. Por este motivo, previamente se estudió la inhibición del crecimiento de hongo libre y su eficiencia de degradación en función de la concentración de VM.

En la figura VI.2 se muestra el crecimiento del hongo (sin encapsular) a distintas concentraciones de VM. Se comprobó que el crecimiento del hongo se inhibe totalmente a concentraciones tan bajas como 10 μM de colorante; sin embargo, la concentración de VM disminuyó significativamente para concentraciones hasta 40 μM . Este último efecto podría ser por la adsorción inespecífica de VM sobre el micelio del organismo metabólicamente inactivo y/o por enzimas ligninolíticas secretadas por el hongo durante los primeros estadios.

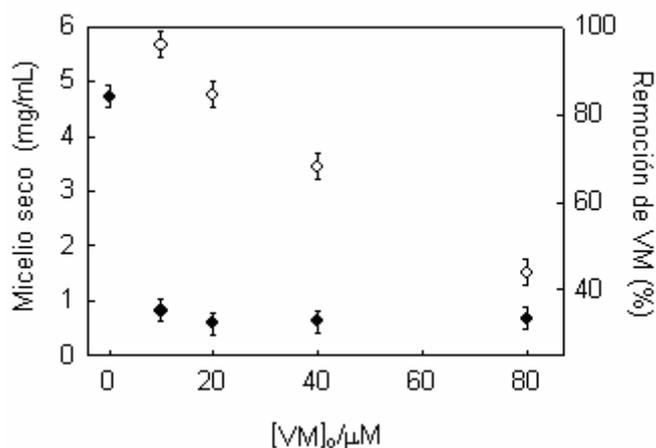


Figura VI.2. Crecimiento del micelio de *S. hirsutum* en función de la concentración de VM expresado como masa de micelio seco (●) y porcentaje de remoción de colorante en función de la concentración inicial de VM (○).

Si bien el transporte de colorante en estos hidrogeles fue estudiado y presentado en el capítulo IV, en este trabajo se realizó un ensayo para determinar el transporte de una de las enzimas que participa en el proceso de biorremediación (MnP, manganeso peroxidasa). El experimento consistió en encapsular 5 esferas de alginato (cada una de 20 μl de volumen) con una alta concentración inicial de enzima, correspondiente a $(29,6 \pm 0,8)$ UE, en hidrogeles de sílica en las mismas condiciones empleadas para la preparación de MABs. La distancia aproximada entre las esferas de alginato y la superficie del material fue de 4-5 mm.

Una vez sintetizada la matriz de sílica, se agregó un volumen de 300 μl de agua y se almacenó en heladera. Al cabo de 48 h se tomaron muestras del medio externo y se recuperaron las esferas de alginato y se licuaron. Se determinó la actividad enzimática en ambas muestras, obteniéndose una actividad de $(11,3 \pm 1,0)$ UE en las esferas y de $(2,4 \pm 0,7)$ UE en el medio externo. Estos resultados demuestran que la enzima puede atravesar la matriz de sílica, pero que su transporte a través de la misma es lento.

VI.1.g. Diseño de biorreactor en batch

La evaluación de remoción de VM en un proceso en *batch*, a escala de laboratorio, se realizó para una biomasa total correspondiente a $(0,40 \pm 0,08)$ mg de micelio seco. El experimento se realizó colocando en un Erlenmeyer 250 ml de solución $80 \mu\text{M}$ de VM y 4 MAB-B. Se utilizó el mismo procedimiento para los dos experimentos control, uno con 4 MC-B y otro con 16 esferas A (denominado “C-A”, Control de micelio inmovilizado en Alginato). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) y en oscuridad. En la figura VI.3 se muestra un esquema del experimento.

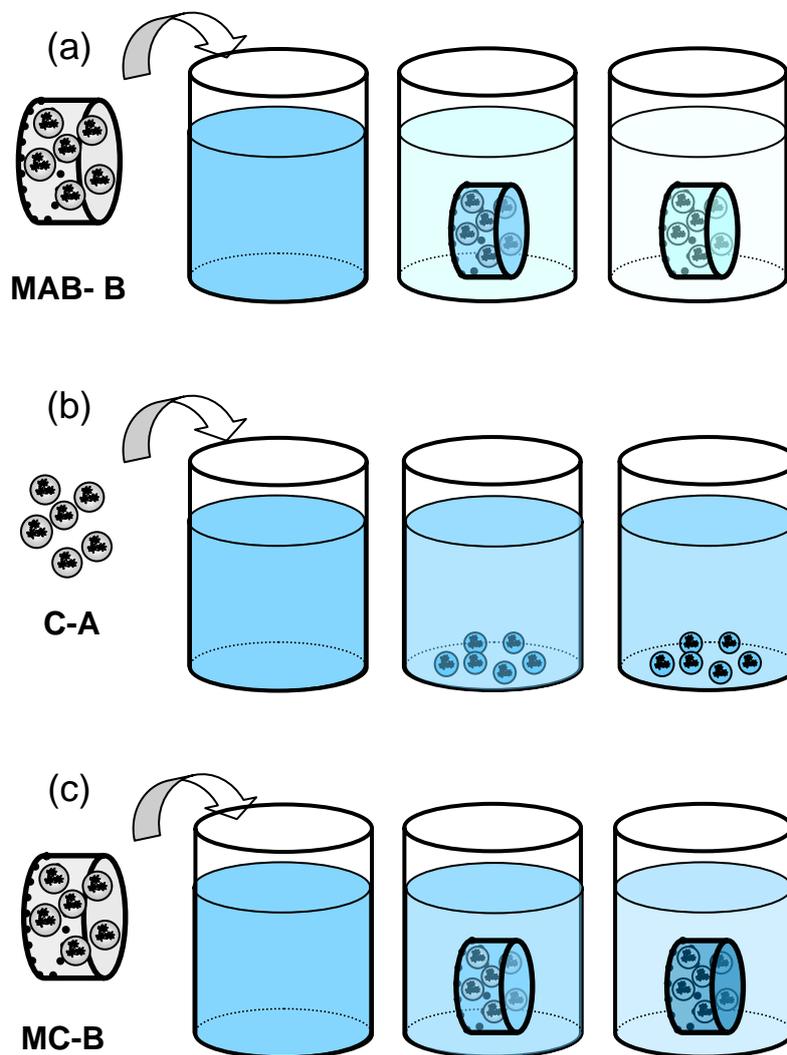


Figura VI.3.

Esquema del proceso en *batch*. (a) MAB-B (encapsulación de micelio activo en alginato-sílica), (b) control C-A (inmovilización de micelio activo en alginato) y (c) control MC-B (encapsulación de micelio inactivo en alginato-sílica).

La eficiencia del proceso se evaluó sobre 3 ciclos sucesivos, de 20 h (1^{er} ciclo), 18 h (2^o ciclo) y 16 h (3^{er} ciclo), expresando la concentración de VM como porcentaje con respecto a la concentración al inicio de cada ciclo.

Los resultados reunidos en la figura VI.4 muestran que los cilindros de MAB-B presentan un alto porcentaje remoción de VM en los 3 ciclos, secuestrando alrededor del 60% del VM presente al inicio de cada ciclo. En los controles se observa una cierta disminución de la concentración de colorante, sobre todo en el primer ciclo. En el segundo y tercer ciclo la disminución de la concentración de VM en ambos controles es muy baja. En la figura VI.5 se muestra una fotografía de MAB-B, MC-B y C-A, junto con las esferas de alginato extraídas del interior de un cilindro MAB-B, recuperadas luego del tercer ciclo de operación.

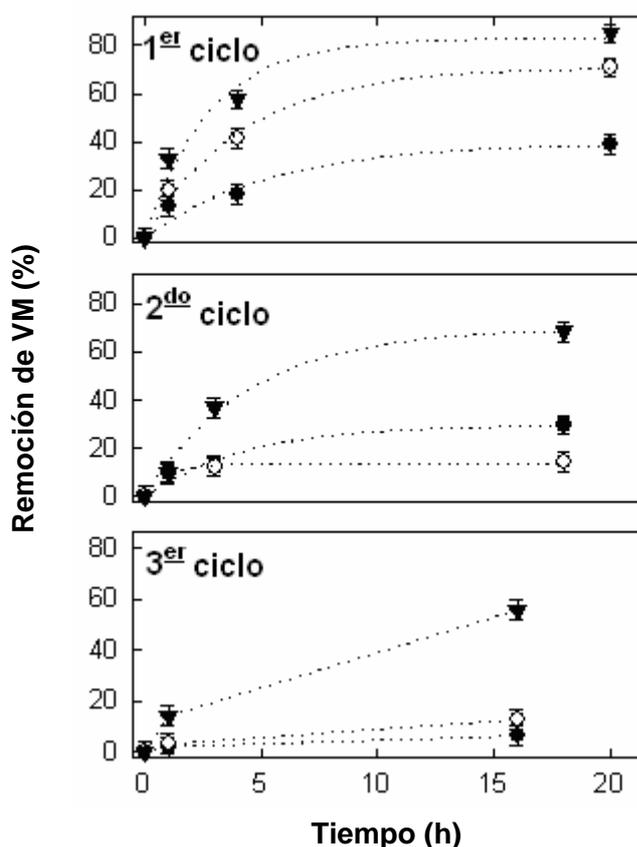


Figura VI.4. Degradación de verde de malaquita (VM) evaluado en tres ciclos de funcionamiento de un proceso en batch (volumen = 250 ml; concentración de VM inicial = 80 μ M). El reactor a base de MAB-B continúa siendo efectivo aún después de tres ciclos de operación (▼). Los controles MC-B (○) y C-A (●), se muestran inefectivos a partir del segundo ciclo de operación.

El dispositivo más eficiente es el MAB-B, tanto por la capacidad de remoción del colorante como por su *performance* en operación. Para este arreglo, hay una concertación entre la presencia del hongo activo y el transporte del colorante a través de la matriz de sílica. El control de la relación entre la velocidad de biodegradación y de transporte de VM permiten mantener una concentración suficientemente baja en las cercanías del organismo remediador, minimizando la inhibición de su crecimiento. La biodegradación de VM es realmente efectiva ya que, visualmente, no se detecta colorante en las esferas de alginato conteniendo el micelio activo extraídas del gel.

En los controles, la remoción de VM en el 1er ciclo se debe a la adsorción sobre la superficie de sílica en MAB-B y a una actividad metabólica mínima del hongo inmovilizado en alginato (C-A). El hecho que para el 2do ciclo la remoción de VM en el sistema C-A sea mayor que para el control MC-B es indicativo de biodegradación por el hongo, que inmovilizado en alginato es metabólicamente activo. Sin embargo, la acumulación de colorante en las esferas de alginato inhibe el crecimiento del hongo, disminuyendo la actividad a medida que transcurre el tiempo. Para MC-B, la remoción observada en el 1er ciclo es debida a la adsorción de VM en la sílica que, por ser un proceso lento (ver capítulo IV), continúa en los ciclos siguientes.

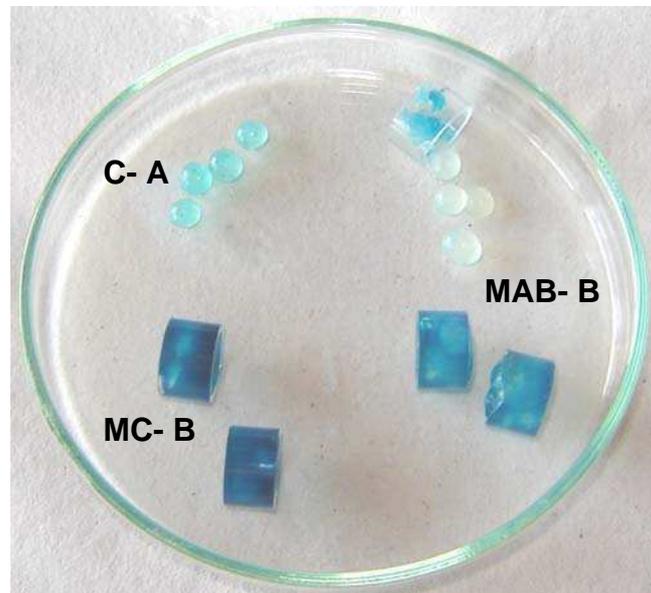


Figura VI.5.: Fotografía de MAB-B, MC-B y esferas de alginato C-A recuperados luego del tercer ciclo de operación en proceso en *batch*.

A la derecha, abajo, se observan 2 MAB-B intactos y arriba de éstos, las esferas de alginato extraídas de un MAB-B donde se ve que el colorante fue completamente biodegradado, aun cuando hay una fracción importante en el gel. A la izquierda se observan los controles: C-A que presenta VM no biodegradado en la superficie y MC-B, cuyo color más intenso indica que la remoción de colorante se debe a la adsorción de éste en el hidrogel.

VI.1.b. *Diseño de biorreactor para proceso continuo*

Se construyó un prototipo de biorreactor a escala de laboratorio para estudiar la eficacia de la remoción de VM en un proceso continuo. En la figura VI.6 se muestra una fotografía del sistema armado, que se compone de: (I) un recipiente donde se almacena la solución de colorante de concentración inicial $80 \mu\text{M}$, (II) una bomba peristáltica para regular el flujo de solución; (III) los módulos MAB-C y MC-C y (IV) dos recipientes donde se colecta la solución procedente de cada uno de los módulos, respectivamente. Los parámetros de operación y los resultados obtenidos para los dos experimentos realizados se presentan en la tabla VI.1. Al igual que en el caso anterior, el dispositivo permaneció en oscuridad para evitar la fotodegradación del colorante.

Tabla VI.1. Condiciones operativas y resultados obtenidos en dos experimentos de remoción de VM para MAB conteniendo micelio activo (MAB-C) y material control con micelio inactivo (MC-C). En ambos casos se partió de una solución de VM $80\mu\text{M}$.

Experiencia	I	II
Volumen total de muestra tratada	1000 ml	2000 ml
Número de módulos operando en serie	1	5
Flujo de operación	1,0 ml / min	0,5 ml / min
Tiempo medio de residencia / módulo	10 min	20 min
Concentración final de VM Módulo MAB-C	$62 \mu\text{M}$	$15 \mu\text{M}$
Concentración final de VM Módulo MC-C	$73 \mu\text{M}$	$48 \mu\text{M}$

En la primer experiencia, si bien se observa una diferencia significativa entre la concentración final de VM tratada en el módulo activo ($62 \mu\text{M}$) respecto de la solución colectada a la salida del módulo control ($73 \mu\text{M}$), se obtuvo un porcentaje muy bajo de degradación. Esto se atribuyó a la baja área de contacto entre la sílica y la solución del colorante y al bajo tiempo de residencia en el módulo.

En la segunda experiencia se mejoró la eficiencia ampliando el diseño para incluir 5 módulos operando en serie (tanto de MAB-C como de MC-C). También se disminuyó a la mitad

el flujo de operación para aumentar el tiempo de residencia del colorante. En estas condiciones se obtuvo un porcentaje de degradación del 81% sobre un volumen total de muestra que duplica el volumen total tratado en la primera experiencia.

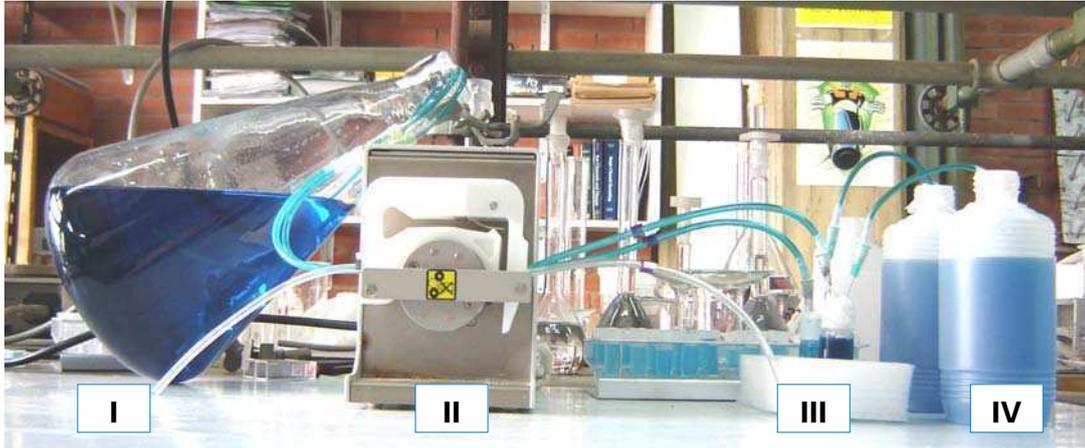


Figura VI.6.: Fotografía del sistema de medición de biorremediación en proceso continuo. De izquierda a derecha se observan: I. el recipiente que contiene la solución de contaminante VM, II. la bomba peristáltica que regula el flujo, III. los módulos MAB-C y MC-C y IV. los recipientes que colectan la solución tratada en cada uno de los módulos.

Si bien los resultados presentados para este biorreactor son preliminares, es importante destacar que hay una biodegradación, por encima de la remoción por adsorción por el hidrogel, que, a diferencia de los sistemas con hongo no encapsulado o inmovilizado en alginato de calcio, se puede mantener durante tiempos largos.

VI.2. FOTOBIORREACTORES

VI.2.a. Cultivos fotosintéticos

El empleo de algas unicelulares en los procesos biotecnológicos presenta la clara ventaja de la utilización de la luz solar como fuente de energía. El mayor interés por la utilización de las microalgas radica principalmente en la obtención de bioproductos para la nutrición humana y animal, y en la obtención de fármacos. Su potencial como fuente de metabolitos secundarios está

siendo explorado en los últimos años. En un trabajo publicado en 2004,¹⁶ se detectó actividad antimicrobiana de amplio espectro y actividad antitumoral (ensayada sobre 4 líneas tumorales) en 10 cepas algales, pertenecientes a los géneros *Desmococcus*, *Scenedesmus* y *Chlorella*. Otras aplicaciones de interés se basan en la gran capacidad de acumulación de metales pesados y otros contaminantes.¹⁷

Para la mayoría de las aplicaciones es importante lograr una remoción, fácil y controlable, del producto. Se propusieron distintos métodos, tales como el anclado covalente de las células a un soporte, adsorción de las células por afinidad con el soporte, separación por membranas semipermeables, partición en una emulsión líquido-líquido y encapsulación en polímeros de origen natural y artificial.¹⁸ En muchos casos, se halló que las tasas de división en condiciones de confinamiento eran menores a las correspondientes a los cultivos líquidos convencionales. En otros casos, se observaron mayores tiempos de latencia para el cultivo encapsulado, seguidos por una fase exponencial con igual tasa de división que el control. Este último efecto se observó, por ejemplo, en experimentos de encapsulación de *Chlorella vulgaris* en cápsulas de alginato y otros polímeros de origen natural.¹⁹

La inmovilización en matrices de sílica de estos tipos celulares es muy reciente. La primera comunicación de encapsulación algal en sílica fue un trabajo de nuestro grupo, presentando parte de los resultados mostrados en este capítulo.²⁰ Hay antecedentes de un procedimiento para la inmovilización de microalgas en películas delgadas de sílica²¹ en el cual las células no quedan completamente cubiertas por la sílica, debido al pequeño espesor de la película. En estas condiciones, en experimentos de estabilidad mecánica se observó que, tras 5 min de agitación vigorosa en medio de cultivo líquido un porcentaje elevado (mayor al 10%) de las células se desprendería del soporte. Si bien la estabilidad mecánica de estas películas puede mejorarse con el agregado de aditivos durante la síntesis, en estas películas delgadas, al no haber un aislamiento completo de las células, el MAB está expuesto a contaminación y no está libre de pérdidas por agitación.

VI.2.b. *Chlorella vulgaris*

Chlorella es una microalga verde (organismo unicelular) que pertenece al filo *Chlorophyta*. La célula tiene forma esférica, con un tamaño que oscila entre 5 y 10 μm en diámetro, sin flagelo. *Chlorella* contiene los pigmentos fotosintéticos verdes clorofila-a y -b en su cloroplasto. Tiene una

alta tasa de división celular, y un ciclo asexual. Tiene una eficiencia fotosintética que puede alcanzar el 8%, comparable a la de otros cultivos de alta eficiencia, tales como la caña de azúcar.

VI.2.c. Cepa y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa BAFC CA 4 de la colección de cultivos del Departamento de Fisiología y Biología Molecular (FCEN-UBA). Las suspensiones celulares *stock* fueron incubadas por 18 días a (22 ± 2) °C en agitador orbital (180 rpm) en medio mínimo BBM (Bold Basal Medium),²² con un ciclo luz-oscuridad de 12-12 h. Previo a cada experimento, se inoculó medio BBM recientemente preparado con una alícuota del cultivo *stock* y se incubó por 24 h a temperatura ambiente en agitador orbital (180 rpm) y con iluminación continua (suspensión S). Para el cultivo en medio semi-sólido, se empleó medio BBM con el agregado de agar al 0,7%.

VI.2.d. Procedimiento de encapsulación

Para el paso de inmovilización se mezcló igual volumen de la suspensión S con solución de alginato de sodio 2,0 % y a partir de la suspensión resultante se prepararon esferas de alginato $(3,3 \pm 0,2)$ mm de diámetro, con un contenido de (100 ± 15) células/esfera (esfera “Ch-A”).

Para la preparación de los MAB-Ch se utilizaron moldes cilíndricos de acrílico fabricados *ad hoc*, compuestos por una parte central, con un diámetro interno de 2,5 cm y 1,0 cm de altura, con dos anillos de acrílico idénticos (diámetro interno de 2,5 cm y 0,1 cm de altura) en la base y la parte superior. Se colocaron 100 esferas Ch-A por molde. En la figura VI.7 se esquematiza el proceso de síntesis de los módulos MAB-Ch. Las esferas Ch-A quedan protegidas entre entramadosⁱⁱ y distribuidas a una distancia mayor o igual a 1 mm de la superficie del hidrogel.

La matriz de sílica se obtuvo siguiendo los pasos I- IV esquematizados en la figura II.7. Las condiciones de síntesis fueron las detalladas en IV.2.b, con concentración total de sílica 12,7%, pH de síntesis 6,5 y relación molar de precursores (SIL:COL) entre 1:3 y 1:5. Se eligió trabajar con estos sistemas para evaluar si las diferencias en la calidad óptica de las matrices (ver capítulo IV) tienen influencia en la tasa de división de este organismo fotosintético encapsulado.

ⁱⁱ se empleó como entramado gasa medicinal

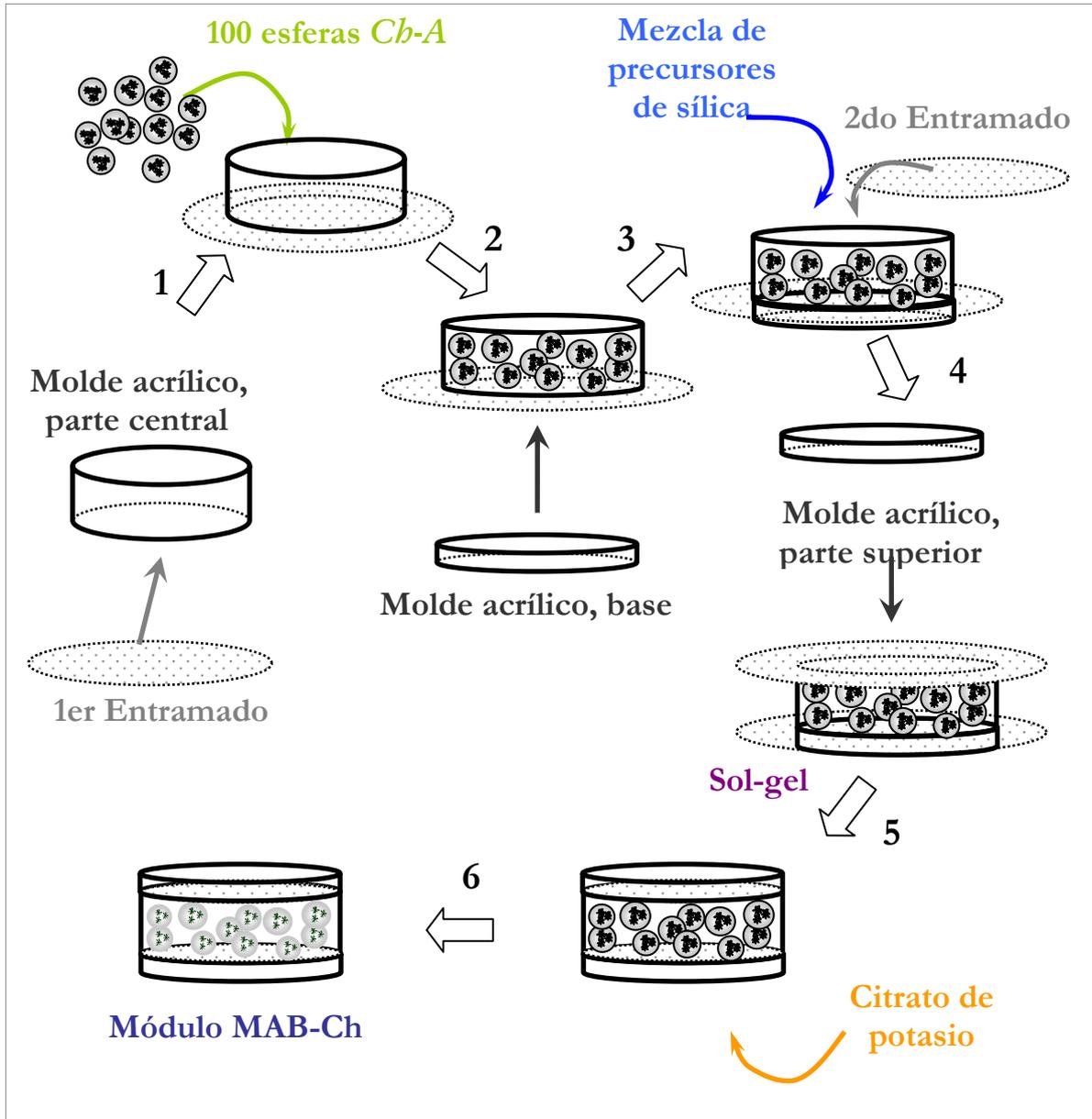


Figura VI.7. Esquema de síntesis de los MAB-Ch empleados como módulos del foto-biorreactor.

En la figura VI.8 se muestra una fotografía tomada a un módulo MAB-Ch (SIL:COL = 1:4) luego de 7 días de incubación en medio líquido donde se observa a simple vista el desarrollo algal en el interior de las cavidades.

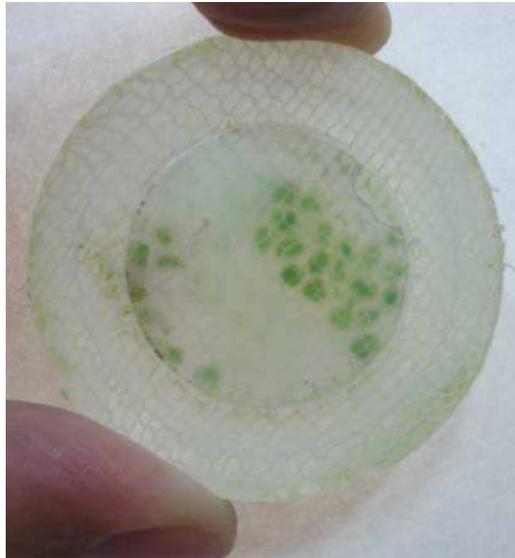


Figura VI.8. Fotografía de un módulo MAB-Ch luego de 7 días de cultivo, visto de arriba. Se observa el crecimiento de la población algal en el interior de las cavidades.

VI.2.e. *Recuento de células en las cavidades*

En este caso, como las células son coloreadas, se utilizó para el recuento la cámara de Neubauer, un instrumento utilizado en cultivo celular para realizar conteo de células en un medio de cultivo líquido. La cámara consta de dos placas de vidrio, entre las cuales se confina un volumen conocido de líquido. Una de las placas posee una grilla de dimensiones conocidas que es visible al microscopio óptico. Para contar las células, se agrega una gota del cultivo entre las dos placas y se observa al microscopio óptico la cantidad de células presentes en un campo determinado de la grilla. En base a la cantidad de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo de la grilla, se calcula la concentración de células por unidad de volumen de la suspensión de medio de cultivo inicial.

El número de células inicialmente presentes en cada cápsula de alginato se calculó en base al contenido celular de la suspensión S y a los siguientes datos: i) densidad de la suspensión celular en Na-alg 1% determinada por picnometría ($\delta = 1,040$ g/ml), ii) masa de cada esfera ($n = 20$).

Para la determinación del número de células por cavidad al final de un experimento, se muestreó el contenido total de cada cavidad (aproximadamente 15 μ l). Éste se extrajo

introduciendo una jeringa dentro de la matriz semisólida, succionando cuidadosamente para evitar disrupciones en el gel. Se diluyó con medio BBM hasta un volumen final de 1000 μl .

VI.2.f. Crecimiento algal en los foto-biorreactores

Se estudió el crecimiento algal dentro de MAB-Ch sintetizados con distintas formulaciones de matrices de sílica. Para ello se muestrearon cavidades individuales de estos módulos luego de 7 días de cultivo en medio líquido. Para el análisis de los datos, se agruparon las cavidades muestreadas en función de la distancia a la superficie de sílica.ⁱⁱⁱ En la tabla VI.2 se presentan los resultados obtenidos del número de células por cavidad a distintas distancias de la superficie del módulo, para hidrogeles con distinta relación SIL:COL. Teniendo en cuenta la cantidad de células inicial (10^2 células / cavidad), en promedio se obtuvo un grado de amplificación de 10^4 .

Tabla VI.2. Cantidad de células por cavidad (expresadas en potencias de 10) a distintas distancias de la superficie para geles con diferente relación SIL:COL

Distancia a la superficie del gel	SIL:COL 1 : 3	SIL:COL 1 : 4	SIL:COL 1 : 5
1 mm	$5,8 \pm 0,5$	$6,2 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,5$
2 mm	$5,8 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,4$	$6,2 \pm 0,5$
3 mm	$6,1 \pm 0,4$	$6,5 \pm 0,5$	$5,1 \pm 0,4$
4 mm	$6,0 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,3$

Según se desprende del análisis de los resultados, dentro del error experimental, se observa que al aumentar la proporción de precursor particulado, disminuye la tasa de crecimiento de *Chlorella*, contenida en las cavidades más alejadas de la superficie del gel. En la matriz con menor proporción de precursor particulado la cantidad de células por cavidad es independiente de la distancia a la superficie del módulo. Teniendo en cuenta que los hidrogeles más poliméricos presentan una difusión más retardada, se puede descartar cualquier limitación por difusión de micronutrientes desde el medio de cultivo. En consecuencia, la disminución del crecimiento algal

ⁱⁱⁱ La estimación de la distancia se realizó midiendo la longitud de la aguja de muestreo que penetra en el MAB-Ch sin el soporte.

con la distancia se debe a la mayor dispersión de luz cuando aumenta la proporción de sílica coloidal (figura IV.3), limitando el número de fotones que penetran en el hidrogel. Es interesante notar que para el caso de estos organismos fotosintéticos la disponibilidad de luz es más importante que el estrés que sufrirían las células durante el encapsulado.

Un ensayo adicional, relacionado con la estabilidad mecánica de las matrices, consistió en tomar alícuotas del medio externo y sembrarlas en placas de Petri con medio semi-sólido BBM. No se observó el desarrollo de agregados celulares, confirmando que las células se encuentran completamente confinadas dentro de la matriz de sílica.

VI.3. PRINCIPALES RESULTADOS DE ESTE CAPÍTULO

En este capítulo se presentaron dos estudios de casos de posibles aplicaciones de MABs como módulos de biorreactores: (i) un dispositivo para biorremediación empleando un hongo ligninolítico; (ii) un posible módulo de un biorreactor fotosintético. En ambos casos, la construcción se basó en un control de la síntesis para alcanzar MABs con propiedades ajustadas al uso.

El sistema de encapsulación aplicado a biorremediación presenta la ventaja de remoción rápida del contaminante de la muestra acuosa a tratar, debido a la gran área de la matriz de sílica y la capacidad de adsorción de colorantes catiónicos. Al mismo tiempo, como consecuencia de la porosidad del hidrogel, se logra una difusión lenta de éste hacia el organismo biorremediador que permiten alcanzar alta eficiencia operativa aún en presencia de concentraciones elevadas de contaminante. Se puede considerar que los diseños preliminares en *batch* o en flujo continuo son un buen punto de partida para aplicaciones de bio-remediación sin introducción de organismos exóticos en el medio.

El diseño preliminar de un módulo para biorreactor fotosintético con un alga verde permitió evaluar la influencia de la calidad óptica de la matriz. Al mantener las células protegidas durante la síntesis sol-gel y proveer espacio para el crecimiento y división celular dentro de la matriz, se logra encapsular una alta cantidad de biomasa activa, aún llevando los parámetros de síntesis a niveles de citotoxicidad que el encapsulado tradicional no admite. Estos resultados preliminares son promisorios para operar con biorreactores basados en microorganismos modificados genéticamente. Con esto, se demuestra que el encapsulado en dos pasos permite el diseño de biorreactores para la extracción de metabolitos producidos por cultivos fotosintéticos.

VI.4. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Boopathy, R., Factors limiting bioremediation technologies, *Biores. Technol.*, **2000**, *74*, 63–67.
- ² Arica, M. Y., Kacar, Y., Genc, Ö., Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Calcium alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution, *Biores. Technol.*, **2001**, *80*, 121-129.
- ³ Bennett, J., Childress, A., Wunch, K., Connick Jr., W., Patente US 6 204 049, **2001**.
- ⁴ Rodriguez Couto, S., Sanromán, M. A. Hofer, D., Gübitz, G. M., Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes, *Biores. Technol.*, **2004**, *95*, 67-72.
- ⁵ Slayer, G., Ripp, S. Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2000**, *11*, 286-289.
- ⁶ Mouso, N., Diorio, L., Forchiassin, F., Acción de *Stereum hirsutum* (wild) en la degradación de colorantes, *Rev. Iberoam. Micol.*, **2007**, *24(4)*, 294-298.
- ⁷ Pointing, S. B., Feasibility of bioremediation by white-rot fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2001**, *57*, 20-33.
- ⁸ Levin, L., Viale, A., Forchiassin, F., Degradation of organic pollutants by the white-rot basidiomycete *Trametes trogii*, *Int. Biodeterior Biodegrad*, **2003**, *52*, 1–5.
- ⁹ Song, H. G., Biodegradation of aromatic hydrocarbons by several white-rot fungi, *J. Microbiol.*, **1997**, *35*, 66-71.
- ¹⁰ Mori, T, Kondo, R., Oxidation of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by white-rot fungus *Phlebia lindtneri*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, *60*, 200-205.
- ¹¹ Ali, M., Sreekrishnan, T. R., Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review, *Adv. Environ. Res.*, **2001**, *5*, 175-196.
- ¹² Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, *Biores. Technol.*, **2001**, *77*, 247-255.
- ¹³ Yang, Q., Yang, M., Pritsch, K., Yediler, A., Hang, A., Schloter, M., Kettrup, A. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates, *Biotechnol. Lett.*, **2003**, *25*, 709-713.

- ¹⁴ Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., Gold, M. H., Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Lett.*, **1984**, *169*, 247-250.
- ¹⁵ Papinutti, V. L., Forchiassin, F., Modification of malachite green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **2004**, *231*, 205-209.
- ¹⁶ Ordog, V., Stirk, W. A., Lenobel, R., Bancirova, M., Strnad, M., van Staden, J., Szigeti, J., Nemeth, L., Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites, *J. Appl. Phycol.*, **2004**, *16*, 309-314.
- ¹⁷ Moreno-Garrido, I., Campana, O., Lubián, L. M., Blasco, J., Calcium alginate immobilized marine microalgae: Experiments on growth and short-term heavy metal accumulation, *Marine Pollution Bulletin.*, **2005**, *51*, 823-829.
- ¹⁸ Nirupama, M., Biotechnological potential of immobilizes algae for wastewater N, P and metal removal: a review, *BioMetals*, **2002**, *15*, 377-390.
- ¹⁹ Lau, P. S., Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*, *Biores. Technol.*, **1998**, *63*, 115-121.
- ²⁰ Perullini, M., Bilmes, S. A., Jobbágy, M., Rivero Pérez, M. M., Mentaberry, A. N., Biomaterials: *Chlorella* spp. Cells growth inside silica matrices, *Proceedings Bairesbiotec2005*, **2005**.
- ²¹ Fiedler, D., Hager, U., Franke, H., Soltmann, U., Böttcher, H., Algae biocers: astaxanthin formation in sol-gel immobilised living microalgae, *J. Mater. Chem.*, **2007**, *17*, 261-266.
- ²² Bold HC, Wynne MJ, **1971**, *Cultivation of algae in the laboratory*. In: Mc Elroy WD, Swanson CP (Eds.) Prentice Hall, Englewood Cliffs, p. 571.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se desarrolló un método para la obtención de materiales con actividad biológica, MABs. Éste se basa en dos pasos: uno de pre-encapsulado en alginato de calcio seguido por la síntesis sol-gel de una matriz de sílica.

La estrategia diseñada incluye la posterior redisolución del alginato de calcio, resultando espacios o cavidades dentro del material, que permiten el crecimiento y división celular dentro de éste y posibilitan la encapsulación de tejidos y organismos pluricelulares. Ambos logros constituyeron un avance significativo en el área de biomateriales. Los cultivos encapsulados crecen sin limitación aparente de nutrientes.

Se comprobó la eficacia del proceso a partir de la alta viabilidad inicial y el cultivo exitoso de diversos sistemas biológicos encapsulados: microorganismos procariontes (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) y eucariotes (*Saccharomyces cerevisiae*), hongos (*Stereum hirsutum*), microalgas (*Chlorella vulgaris*) y tejidos vegetales (*Daucus carota*, *Nicotiana tabacum*). En cada uno de estos casos se adaptaron las condiciones de síntesis de la matriz para lograr una alta biocompatibilidad conjuntamente con buenas propiedades operativas.

Al mantener las células protegidas durante la síntesis sol-gel, se pudieron extender los parámetros de síntesis a niveles de citotoxicidad que el encapsulado tradicional (sin protección) no admite. Así, se pudieron sintonizar las propiedades del hidrogel resultante para satisfacer requerimientos específicos.

La calidad y performance de los MABs resulta de un compromiso entre la biocompatibilidad del proceso, la estabilidad mecánica, la porosidad y, para ciertas aplicaciones, de la longitud de penetración de la luz. La influencia de cada uno de estos parámetros se evaluó para la vía de síntesis por alcóxidos, incluyendo aditivos, y para la vía acuosa, con distintas proporciones de silicato de sodio y sílica coloidal.

La calidad óptica y la respuesta viscoelástica se evaluaron por métodos convencionales. Para la determinación del coeficiente de difusión de moléculas con distinta estructura y carga neta se desarrolló un método novedoso para monitorear el transporte de colorantes en las matrices de sílica por digitalización de imágenes obtenidas con un escáner.

Por otra parte, el grado de biocompatibilidad del proceso se evaluó a partir del estrés desarrollado por *S. cerevisiae* modificada genéticamente para expresar hsp12-GFP encapsulada en

los hidrogeles. Estos experimentos aportaron una información que complementa los estudios de viabilidad que se emplean habitualmente.

De este modo se comprobó la efectiva protección del cultivo encapsulado por el alginato, aun cuando se genere un cierto estrés durante el pre-encapsulado debido a la presencia de iones Na^+ o porque la barrera de alginato de calcio no sea totalmente impermeable a los precursores de la síntesis sol-gel.

Para encapsular células de líneas vegetales con vías a una aplicación en biorreactores, fue de primordial importancia obtener matrices de sílica viscoelásticas y con alta resistencia a las fracturas en tiempos largos. De esta forma, la estabilidad mecánica de la matriz, frente al estrés hidrodinámico propio de los biorreactores, impidió la entrada de microorganismos contaminantes garantizando condiciones de asepsia a largo plazo. Esto último es relevante ya que, en muchos casos, se requieren de 4 a 6 meses para la formación de los callos que participan en la producción de metabolitos secundarios de interés.

Por último, a partir de los resultados obtenidos, se diseñaron y se construyeron dos biorreactores modulares. El primer desarrollo consistió en la aplicación de estos sistemas a biorremediación. Se encapsularon hongos ligninolíticos (organismos pluricelulares) y la eficiencia del método se probó con la degradación de un colorante modelo. Dada la alta superficie específica y la afinidad intrínseca de la superficie por los contaminantes catiónicos, se verificó la remoción rápida del contaminante de la muestra acuosa y la lenta liberación de éste hacia el organismo biorremediador. Esto permitió desarrollar operaciones eficaces aún en presencia de altas concentraciones de contaminante, que resultaron tóxicas para el micelio inmovilizado en los métodos tradicionales. Por otra parte, la estabilidad mecánica de la matriz garantiza el aislamiento del organismo remediador, lo cual minimiza el riesgo de alteraciones biológicas en ecosistemas contaminados. En el segundo biorreactor, el trabajo se centró en el diseño de un prototipo de módulo para construir un foto-biorreactor, encapsulando un alga verde. En este caso, se demostró que la calidad óptica de la matriz es un requerimiento que se suma a los mecánicos, de transporte y biocompatibilidad.

La conclusión más importante del trabajo es que, a partir de los métodos de síntesis y los diseños modulares, se pueden sintonizar los parámetros de operación de un biorreactor para lograr que el proceso que en sí sea eficiente. En cierta medida, este trabajo de tesis sienta una base para la síntesis racional de MABs y es un paso hacia el desarrollo de bio-reactores modulares, con cultivos celulares aislados, que puedan operar durante largos tiempos en condiciones de asepsia y de bioseguridad.