



**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.**

**OLIGOSACÁRIDOS DE QUITOSANO EN  
MICROESFERAS DE ALBÚMINA COMO TRATAMIENTO  
ALTERNATIVO CONTRA *Vibrio harveyi***

---

Por:

Cindy Melina Colosio López

TESIS APROBADA POR LA:

**COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Hermosillo, Sonora.

Enero de 2015

## APROBACIÓN

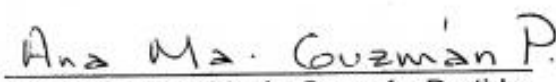
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de la Q.B.C Cindy Melina Colosio López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en ciencias.

  
Dra. Luz Vázquez Moreno  
Director de Tesis

\_\_\_\_\_  
Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez  
Asesor

  
Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort  
Asesor

  
M. en C. María del Refugio Robles Burgueño  
Asesor

  
M. en C. Ana María Guzmán Partida  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la ayuda económica otorgada para realizar estos estudios.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por haberme dado la oportunidad de ingresar al programa de Maestría en Ciencias.

A la Coordinación de Docencia del CIAD en especial a la Dra. Gloria Yépez y a las Lic. Verónica Araiza, Argelia Marín y Laura García por sus atenciones y asesorías en los trámites realizados.

A la Dra. Luz Vázquez Moreno por haberme aceptado e integrado en el proyecto del cual deriva esta investigación. Adicionalmente le agradezco por todo el conocimiento y asesorías brindadas además de impulsarme a seguir adelante.

A la Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort por su gran disposición, asesorías y conocimiento brindados. Además le agradezco el impulso y constancia que tuvo conmigo.

A la Dra. Sonia Soto Rodríguez por su tiempo dedicación y consejos. Además de proporcionarme las cepas bacterianas para mi trabajo.

A las M.C. Ana María Guzmán Partida y María del refugio Robles Burgueño por el tiempo dedicado, asesorías, apoyo técnico y sobre todo su paciencia y amistad brindada.

A la M.C. Ana María Domínguez por todo su apoyo técnico y asesorías, pero sobre todo le agradezco por su amistad y consejos que hicieron más alegre mi estancia.

Al Dr. Roberto Guzmán de la Universidad de Arizona por permitirme utilizar sus instalaciones así como equipos para la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Jaime Lizardi Mendoza por permitirme usar su laboratorio y equipo de FTIR. Además le agradezco por su amistad y asesoría.

Al Dr. Humberto Aztiazaran por permitirme el uso de su equipo de microscopia.

Un agradecimiento especial al Dr. Andrei Sarabia por sus asesorías, artículos proporcionados, disponibilidad y consejos. Además de su gran paciencia, cariño y amistad brindada.

Un muy especial agradecimiento a mis compañeros de laboratorio, Nancy, Daniel, Idalia, Abril, Martín, Gerardo, Carolina e Irlanda por todo su amor y cariño. Hicieron mucho más agradable mi estancia en el laboratorio y nos llevamos una amistad para toda la vida.

A todos mis compañeros de maestría y estudio, por todo el apoyo y convivencia durante todo este proceso.

A toda mi familia por todo el apoyo y confianza que han depositado en mí, que me inspira a seguir día con día.

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo con mucho amor y cariño a mis padres, quienes me han apoyado incondicionalmente y sin quienes esto nunca hubiera sido posible.*

*A mi mamá Luz del Socorro López, porque siempre has creído en mí aunque yo misma no lo haga. Porque constantemente me enseñas a soñar en grande y que no existen los límites.*

*A mi papá Rafael Colosio, porque con tu dedicación y coraje me has enseñado a ser la mejor persona posible. Porque me inspiras a querer crecer y convertirme en una profesionista digna.*

*A mi hermano Rafael Colosio porque gracias a ti aprendí a no rendirme y siempre querer ser la mejor. Te agradezco todo tu apoyo y cariño.*

*A mi sobrina Sofía Colosio porque eres pura alegría.*

*A todos ustedes  
¡Muchas gracias!*

## CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
1.1 <i>Vibrio</i> en la Acuicultura.....	3
1.2 Resistencia Bacteriana a Antibióticos Usados en la Camaronicultura.....	4
1.3 Ventajas y Desventajas del uso de Fármacos Libres en la Acuicultura.....	5
1.4 Alternativas para la Administración de Fármacos.....	7
1.5 Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos.....	8
1.6 Métodos de Microencapsulación para Sistemas de Transporte de Fármacos.....	9
1.7 Polímeros para Elaboración de Transportadores de Fármacos en Sistemas de Liberación Controlada.....	11
1.8 Aplicación de Antibióticos con Liberación Controlada.....	12
1.9 Alternativas Antimicrobianas en Acuicultura.....	13
1.10 Quitosano.....	14
1.10.1 Propiedades Biológicas.....	14
1.10.2 Características Físico-químicas.....	15

## CONTENIDO (Continuación)

	Página
1.10.2.1 Grado de acetilación.....	16
1.10.2.2 Masa molecular promedio.....	17
1.10.2.3 Solubilidad.....	17
1.11 Quito-oligosacáridos.....	17
1.11.1 Elaboración.....	18
1.11.2 Caracterización.....	19
1.11.2.1 Análisis por espectroscopia FTIR.....	20
1.11.2.2 Determinación de COS por electroforesis de carbohidratos marcados con un fluoróforo (FACE).....	20
1.11.2.3 Determinación del grado de polimerización por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC- ESI-MS).....	21
1.11.2.4 Separación de COS en columnas de carbón grafitado.....	23
1.11.3 Actividad Antimicrobiana.....	24
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>27</b>
Objetivos Particulares.....	27
<b>CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 Esquema General de Trabajo.....	28
2.2 Materiales.....	28
2.3 Elaboración de COS de por Hidrólisis Ácida.....	29
2.4 Caracterización de los COS Mediante la Determinación del Grado de Polimerización por FACE y la Masa Molecular por HPLC-ESI-MS.....	30



## CONTENIDO (Continuación)

	Página
2.4.1 Caracterización por Electroforesis de Carbohidratos Marcados con un Fluoróforo (FACE).....	30
2.4.2 Análisis de COS por HPLC-ESI-MS.....	30
2.4.3 Pruebas de Actividad Antibacteriana.....	31
2.4.4 Análisis Estadístico.....	32
2.5 Elaboración y Caracterización de ME de Albúmina Cargadas con COS.....	32
2.5.1 Preparación de ME (COS/BSA).....	32
2.5.2 Caracterización de las ME (COS/BSA).....	33
2.5.3 Determinación de la Presencia de COS por Espectroscopia Infrarroja.....	34
2.6 Elaboración y Caracterización de ME de Albúmina Cargadas con Nanoesferas de PLGA que Contienen COS.....	34
2.6.1 Preparación de ME (COS/PLGA/BSA).....	34
2.6.2 Caracterización de las ME (COS/PLGA/BSA).....	35
2.7 Cinética de Liberación de COS.....	36
2.8 Determinación de la Carga Eléctrica Superficial de las ME.....	36
2.9 Pruebas de Actividad Antibacteriana de COS Encapsuladas.....	36
<b>CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
3.1 Caracterización de los COS.....	38
3.1.1 Caracterización de COS por FACE.....	38
3.1.2 Caracterización de COS por HPLC-ESI-MS.....	39
3.1.3 Pruebas de Actividad Antimicrobiana.....	44
3.2 Caracterización de ME de Albúmina Cargadas con COS.....	48

## CONTENIDO (Continuación)

	<b>Página</b>
3.2.1 Determinación de la Presencia de COS por Espectroscopia Infrarroja.....	<b>50</b>
3.2.2 Cinética de Liberación de COS.....	<b>51</b>
3.3 Caracterización de ME de Albúmina Cargadas con Nanoesferas de PLGA con COS.....	<b>52</b>
3.3.1 Cinética de Liberación de COS.....	<b>54</b>
3.4 Determinación de la Carga Eléctrica Superficial de las ME.....	<b>57</b>
3.5 Actividad Antibacteriana de COS Encapsulados.....	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO IV. RESUMEN DE HALLAZGOS Y CONCLUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
4.1 Resumen de Hallazgos.....	<b>62</b>
4.2 Conclusión.....	<b>64</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Derivatización de un azúcar reductor por ANTS .....	21
2	Esquema general de trabajo.....	29
3	Pérfil electroforético de carbohidratos marcados por ANTS.....	39
4	Cromatograma de iones totales de hidrolizados de quitosano.....	41
5	Espectro de masas del pico 1(1.2-1.4 min).....	44
6	Comparación del efecto de gentamicina, quitosano y oligómeros de quitosano en el crecimiento de <i>Vibrio harveyi</i> patógeno (CAIM 1792).....	46
7	Comparación del efecto de gentamicina, quitosano y oligómeros de quitosano en el crecimiento de <i>Vibrio harveyi</i> no patógeno (CAIM 79).....	46
8	Comparación del efecto de gentamicina, quitosano y oligómeros de quitosano en el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> H104007 ATCC 3540.....	48
9	Distribución de tamaños de las microesferas de albúmina cargadas de oligómeros de quitosano.....	49
10	Micrográficas tomadas por microscopía electrónica de Barrido (SEM) de las microesferas de albúmina cargadas con oligómeros de quitosano .....	49
11	Espectro infrarrojo de los controles albúmina y oligómeros de quitosano libres.....	50

## LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
12	Espectro infrarrojo de oligómeros de quitosano libres, mezcla de albúmina/oligómeros de quitosano (5:1) y microesferas de albúmina cargadas con oligómeros de quitosano (5:1).....	51
13	Distribución de tamaños de microesferas de albúmina cargadas de nanoesferas de PLGA con oligómeros de quitosano .....	53
14	Micrografías tomadas por microscopía óptica de microesferas de albúmina cargadas con nanoesferas de PLGA con oligómeros de quitosano .....	54
15	Gráfica de liberación de oligómeros de quitosano a partir de microesferas de albúmina elaboradas por la técnica de doble emulsión a pH 7.4.....	55
16	Gráfica de liberación de oligómeros de quitosano a partir de microesferas de albúmina elaboradas por la técnica de doble emulsión a pH 5.5.....	56
17	Esquema ilustrativo del mecanismo de adsorción o conjugación químico del quitosano y PLGA.....	56
18	Medición de la carga superficial de las microesferas de albúmina, albúmina con gentamicina y albúmina con oligómeros de quitosano .....	57
19	Medición de la carga superficial de las microesferas de albúmina cargadas con nanoesferas de PLGA con oligómeros de quitosano.....	58

### LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
20	Comparación del efecto de gentamicina, microesferas de albúmina y microesferas cargadas con nanoesferas de PLGA en el crecimiento de <i>Vibrio harveyi</i> patógeno (CAIM 1792).....	60
21	Comparación del efecto de gentamicina, microesferas de albúmina y microesferas de albúmina cargadas con nanoesferas de PLGA en el crecimiento de <i>Vibrio harveyi</i> no patógeno (CAIM 79).....	60

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Gradiente de elución de análisis de HPLC de oligómeros de quitosano .....	31
2	Tratamientos de elaboración de microesferas de albúmina cargadas con nanoesferas de PLGA que contienen oligómeros de quitosano .....	35
3	Identificación de compuestos obtenidos de cada pico del espectro de iones totales.....	41
4	Comparación de las Fases Lag del crecimiento bacteriano de distintas cepas utilizando quitosano nativo y oligómeros de quitosano .....	47
5	Comparación de las Fases Lag del crecimiento bacteriano de <i>Vibrio harveyi</i> utilizando microesferas COS/BSA y microesferas COS/PLGA/BSA.....	61

## RESUMEN

En acuicultura, el uso indiscriminado de antibióticos ha facilitado la aparición de cepas bacterianas resistentes. Este hecho, ha llevado a la necesidad de una búsqueda de antibacterianos alternativos como puede ser el quitosano y sus oligosacáridos. Sin embargo, estos compuestos requieren de un vector para su transporte, protección y permanencia en el sitio diana. En este estudio, se propuso el uso de quito-oligosacáridos (COS) encapsulados en un acarreador proteico como opción de tratamiento antimicrobiano. Para lo anterior se obtuvieron COS por hidrólisis ácida y se caracterizaron mediante las técnicas de FACE y HPLC-ESI-MS. Se probó el efecto antibacteriano frente a cepas patógenas e inoñas para camarón (*V. harveyi* CAIM 1792 y 79 respectivamente). Los COS presentaron masas moleculares entre 544 y 2150 Da (trímeros a undecameros). Se encontró actividad bacteriostática frente a ambas cepas con un retraso de la fase Lag de 8 a 14 horas, teniendo un mayor efecto los COS ( $p < 0.05$ ) comparados con el quitosano. Adicionalmente, se elaboraron microesferas (ME) de albúmina (BSA) cargadas con COS (ME-BSA/COS) por la técnica de emulsión simple. En su caracterización se encontraron esferas homogéneas de entre 7 y 12  $\mu\text{m}$ . La presencia de los COS en las ME se confirmó por espectroscopia infrarroja, donde se obtuvo la banda característica de los grupos N-acetilo de los COS. Se analizó la capacidad de liberación de los COS por medio de una cinética, sin embargo se determinó que el porcentaje de liberación era muy bajo para detectarlo. Por lo tanto, se elaboraron otras ME de BSA con la técnica de emulsiones múltiples (ME-BSA/PLGA/COS). Las ME presentaron un diámetro de  $9.42 \pm 0.36 \mu\text{m}$ ; la técnica de elaboración no afectó la morfología de las partículas. Sin embargo, mejoró la capacidad de liberación de los COS. Se midió la carga de las ME para determinar la forma de dispersión de los COS. Se obtuvieron cambios en

la carga superficial de las partículas, al pasar de -32 mV con ME-BSA a -25 mV con la mezcla ME-BSA/COS, lo que nos indica la presencia tanto en el interior como en la superficie de las ME. El utilizar una técnica distinta para la elaboración de ME no cambió su comportamiento en cuanto a carga superficial, donde las ME-BSA/PLGA/COS obtuvieron una carga de 28mV. Las pruebas de inhibición bacteriana de los COS encapsulados mostraron actividad bacteriostática la cual fue más efectiva cuando los COS se los encapsularon por emulsiones múltiples (ME-BSA/PLGA/COS).

**Palabras clave:** Microesferas, liberación controlada, albúmina, quitooligosacáridos



## ABSTRACT

In aquaculture, the indiscriminate use of antibiotics has facilitated in the emergence of resistant bacterial strains. This fact has resulted in the need to search for alternative antibacterials compounds such as chitosan and its oligosaccharides. However, they require a vector for transport, protection, and retention at the target site. In this study, we proposed the use of chitoligosaccharides (COS) encapsulated in a carrier protein (albumin) as antimicrobial treatment. COS were obtained by acid hydrolysis and characterized by FACE and HPLC-ESI-MS techniques. The possible antibacterial effect was tested using pathogenic and innocuous bacterial shrimp strains (*Vibrio harveyi* CAIM 1792 and 79, respectively). Obtained COS showed molecular masses that ranged from 544 to 2150 Da. Bacteriostatic activity found against both strains showed a delay of the Lag phase of 8-14 hours, COS having a greater effect ( $p < 0.05$ ) when compared to chitosan. Additionally, COS loaded with albumin microspheres (ME-BSA/COS) were prepared by the single emulsion technique and presented homogeneous spheres of 7 and 12  $\mu\text{m}$  in diameter. The presence of COS in ME-BSA/COS was assayed by infrared spectroscopy technique and the characteristic band of the N-acetyl groups of the COS was observed. COS's ability to release from ME-BSA-COS was so low to be detected. Therefore, other albumin ME was prepared by a multiple emulsions technique (ME-BSA/PGLA/COS). ME-BSA/PGLA/COS presented a diameter of  $9.42 \pm 0.036 \mu\text{m}$ , thus showing that the changes in the technique of the preparation did not affect the particle morphology. Charge superficial changes (Z potential) was measured to determine the form of dispersion of COS in the ME. Changes in the charge of the surface of particles were obtained, from -32 mV on ME-BSA to -25 mV BSA/COS mixing, which indicates its presence both inside and on the surface. Using a different technique for making ME did not change

their behavior in surface charge, where ME-BSA/PLGA/COS got a load of 28mV. However, ME-BSA-PGLA-COS did improve the COS's ability to release. Bacterial inhibition testing of encapsulated COS was performed and showed bacteriostatic activity, whereas ME-BSA-PGLA-COS, the multiple emulsion encapsulation technique, was more effective as presented increased activity.

**Keywords:** Microspheres, controlled release, albumin, chito-oligosaccharides.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades que afectan a la industria acuícola provocan anualmente pérdidas millonarias. Por ello es importante su investigación, para encontrar alternativas en la resolución de este problema. Aparte de las infecciones virales, las enfermedades bacterianas están entre los principales factores que afectan a este sector industrial. En la acuicultura, el agua y los organismos acuáticos como las microalgas y *Artemia spp*, además de servir como alimento, son considerados vectores potenciales de bacterias patógenas (Álvarez et al., 2000; Rendón; Balcázar, 2003; Soto-Rodríguez et al., 2010).

Las bacterias Gram negativas, principalmente las pertenecientes al género *Vibrio*, constituyen la mayor parte de la microbiota intestinal de peces y crustáceos. Esto, puede causar enfermedades conocidas como vibriosis en las distintas especies de camarones, provocando altas mortalidades año con año (Álvarez et al., 2000; Rendón; Balcázar, 2003; Soto-Rodríguez et al., 2010).

*Vibrio harveyi* ha sido reconocido como un patógeno para una variedad de organismos acuáticos importantes en la acuicultura en todo el mundo. Se le considera como uno de los patógenos más virulentos y sobre todo frecuente en la fase de desarrollo del camarón de cultivo en México (Soto-Rodríguez et al., 2012).

Para tratar las enfermedades infecciosas que se presentan en la acuicultura, se han usado diversos antibióticos y quimioterapéuticos. Dentro de los más utilizados en México se encuentran oxitetraciclina, enrofloxacina y florfenicol (Roque et al., 2001; Soto-Rodríguez et al., 2006; Aguilera et al., 2010). Sin embargo, el uso indiscriminado de estos fármacos ha propiciado la generación de bacterias resistentes, así como multirresistencia en los patógenos, lo que se ha convertido en uno de los desafíos más grandes de la terapia (Li et al., 2010). Asimismo, los antibióticos residuales permanecen en

el sedimento de los tanques de cultivo, alterando con ello la composición de la microflora. Lo que conlleva a efectos tóxicos, desarrollo de defensas antibacterianas en los patógenos de los organismos y transferencia de resistencias antibacterianas a patógenos humanos (Cabello, 2006). Por lo tanto, los métodos tradicionales de tratamiento contra infecciones con antibióticos, han sido cuestionados y se ha tenido que buscar alternativas.

El uso de quitosano como antimicrobiano ha tenido un creciente interés debido a su fácil obtención e inocuidad. Sin embargo su escasa solubilidad hace difícil su uso en sistemas biológicos (Pillai et al., 2009). Por tanto, se ha pensado en el uso de oligosacáridos de quitosano, los cuales han reportado tener mayor actividad antimicrobiana, así como mejor solubilidad (Xia et al., 2011). Sin embargo, debido a esta mejora en la solubilidad, es necesario utilizar vehículos de liberación controlada para que su administración sea eficiente.

La vía de administración de los fármacos es determinante para la eficacia de un tratamiento. En la acuicultura, una práctica común para su administración es vía el alimento, sin embargo, esta vía de administración puede ser inefectiva si el antibiótico no es estable o se encuentra protegido (Anónimo, 1997; Auró y Ocampo, 2006). El diseño de sistemas que controlen la liberación y entrega de antibióticos, podría ayudar a proteger los agentes bioactivos, así como a disminuir las dosis empleadas de estos fármacos, reduciendo el riesgo de resistencia bacteriana, contaminación del medio ambiente y toxicidad. Por lo que el objetivo de esta investigación, fue analizar la viabilidad de alternativas para combatir infecciones microbianas en camarón de cultivo (*Litopenaeus vannamei*). Se propuso como opción antimicrobiana el uso de oligosacáridos de quitosano, vectorizados por medio de ME de BSA. Esto con el propósito de evitar la aplicación directa o en alimento de antibióticos o reducir sus dosis y mantener concentraciones más constantes.

## CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

### 1.1 *Vibrio* en la Acuicultura

La vibriosis sistémica está dentro de las principales enfermedades que afectan a todas las especies de camarón de cultivo, especialmente cuando se encuentran en condiciones de estrés. Se caracteriza por ser una infección generalizada que involucra a distintos órganos. Las manifestaciones clínicas del Síndrome de rojos vivos (BRS por sus siglas en inglés), una de las enfermedades más peligrosas en camarón, incluyen, manchas rojas brillantes bilaterales, en la región central del abdomen, opacidad en el músculo, anorexia, inflamación del hepatopáncreas y tejido muscular, letargo y la muerte (Soto-Rodríguez et al. 2010).

Las vibriosis han sido recurrentes en la camaronicultura en México, lo que ha provocado pérdida en los sistemas de producción (Soto-Rodríguez et al. 2010b). Las bacterias pertenecientes a la familia Vibrionaceae son bacilos Gram negativo, en forma de “coma”, con movilidad por medio de un flagelo polar único. Forman parte de las Gammaproteobacterias, son mesófilas (temperatura óptima entre 15 y 35 °C) y quimiorganótrofas (obtienen su energía de reacciones de óxido-reducción y utilizan sustratos orgánicos). Además, poseen un metabolismo facultativo fermentativo y su hábitat es acuático, asociado a organismos eucariontes (Leyton y Riquelme, 2008).

Se pueden encontrar distintas especies del género *Vibrio* como patógenos oportunistas en los crustáceos marinos. Éstas se tornan patógenas, cuando los mecanismos de defensa natural del hospedero están suprimidos.

Las bacterias de la familia *Vibrionaceae* se han asociado con grandes mortalidades de camarones peneidos de cultivo. Sin embargo, sólo unas cuantas especies han demostrado ser el agente etiológico de la enfermedad.

Regularmente, representan la microbiota normal de los camarones o del medio ambiente marino (Soto-Rodríguez et al. 2010b). Las cepas de *Vibrio* que han demostrado ser patógenos para el camarón incluyen *V. parahaemolyticus*, *V. penaeicida*, *V. nigripulchritudo*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. campbellii*. Se ha observado que pueden afectar cualquiera de las etapas de desarrollo del camarón (Soto-Rodríguez et al. 2010). Las mortalidades causadas por las bacterias del género *Vibrio* en peces y crustáceos en cultivo, son comunes durante las primeras etapas larvarias y pueden ocurrir de forma repentina, ocasionando la muerte de toda la población (Thompson et al., 2004). *Vibrio harveyi* es un patógeno importante para peces e invertebrados marinos. Se encuentra entre las principales especies de *Vibrio* que contribuyen a la mortalidad en masa y afecta a estadios larvarios, causando a menudo una mortalidad del 100%. Las hemolisinas, proteasas y sideróforos son los factores de virulencia más importantes de *V. harveyi* (Soto-Rodríguez et al. 2010).

## 1.2 Resistencia Bacteriana a Antibióticos Usados en la Camaronicultura

Casi todas las manipulaciones que sufren los organismos mientras son cultivados se consideran como factores de estrés. Debido a esto, hay una disminución en la eficacia del sistema inmune para la eliminación de patógenos bacterianos. Cuando se utilizan antimicrobianos de forma rutinaria, incluso cuando no hay problemas de infecciones aparentes, se originan problemas adicionales generando contaminación y resistencia (Cabello, 2006; Defoirdt et al., 2011). Su uso en grandes cantidades, incluyendo antibióticos no degradables de uso en medicina humana, aseguran la permanencia de estos antimicrobianos en el medio ambiente acuático, provocando daños al ambiente y susceptibilidad a resistencias cruzadas (Cabello, 2006; Defoirdt et al., 2011).

El uso indiscriminado de los antibióticos, ha dado lugar a la aparición de bacterias resistentes en ambientes acuáticos y al aumento de patógenos acuáticos resistentes. Este abuso de fármacos, también facilita la transferencia

de determinantes de resistencia a bacterias de animales terrestres y patógenos humanos. Además, interviene en las alteraciones de la microbiota bacteriana del ambiente marino, tanto en los sedimentos como en las columnas de agua (Angulo, 2000; Cabello, 2006; Defoirdt et al., 2011).

Por otra parte, diversas malas prácticas han aumentado las posibilidades de propagar las infecciones con rapidez. Entre otras, están las deficiencias sanitarias en los métodos de cultivo, incluyendo el aumento de la densidad de siembra, cercanía de los estanques en las aguas costeras, la falta de barreras sanitarias y de aislamiento de las unidades con animales infectados (Cabello, 2006). Este escenario también se traduce en el aumento del uso de antibióticos profilácticos, a menudo con el objetivo inapropiado, de cubrir estas deficiencias sanitarias (Cabello, 2006; (Soto-Rodríguez et al. 2006; Lyle-Fritch et al., 2006).

Debido a la transferencia de las bacterias resistentes a los antibióticos y los determinantes de resistencia desde el medio acuático hacia el medio terrestre, ha resultado en una serie de restricciones drásticas en la utilización de antibióticos en la acuicultura. Actualmente se tiene un mayor control de la prescripción de antibióticos terapéuticos, una casi total eliminación del uso de la profilaxis antibiótica y la prohibición de usar antibióticos para la terapia de infecciones humanas. Sin embargo, estas prácticas aun no son reguladas en México, de ahí que para un desarrollo sostenible de la industria acuícola, son necesarias nuevas estrategias para el control de las infecciones bacterianas (Angulo, 2000; Cabello, 2006; Defoirdt et al., 2011).

### 1.3 Ventajas y Desventajas del Uso de Fármacos Libres en la Acuicultura

La vía de administración de los fármacos es determinante para la eficacia de un tratamiento. Por cuestiones de manejo y de economía, la vía oral es la más utilizada en la camaronicultura. Por ello, las terapias antimicrobianas para el camarón se suministran a través del alimento. Sin embargo, se ha documentado ampliamente que la medicación vía el alimento, puede ser inefectiva si el antibiótico no está conformado por moléculas estables o con

recubrimientos especiales (Auró y Ocampo, 2006). Ya que se ha observado, que los terapéuticos se pierden de la alimentación como resultado de la lixiviación antes de la ingesta por los organismos. La lixiviación del antibiótico fuera del “pellet” de alimento es dependiente de la temperatura, el pH del medio y la relación de superficie-volumen de los pellets. Otros problemas asociados es que el uso de altas concentraciones del antibiótico en el alimento disminuyen su palatabilidad. Por eso, hay que prevenir la disminución de su eficacia y biodisponibilidad cuando se expone en medios acuáticos a una alta concentración de minerales, al calor o la luz, así como los agentes quelantes (Duis, et al., 1995; Anónimo, 1997; Auró y Ocampo, 2006).

Actualmente, existe una gran variedad de métodos para la administración de antibióticos a camarones, que se seleccionan de acuerdo a los requerimientos de cada sistema de cultivo, tomando en cuenta sus beneficios. Dentro de los principales métodos de administración de antimicrobianos se encuentran los baños y la oral.

La administración de un fármaco por medio de baños, se caracteriza por ser simple, de fácil aplicación y baja inversión. Los baños son empleados generalmente para la eliminación o reducción de bacterias presentes en el agua y se utilizan principalmente durante la fase larval del camarón. El principal inconveniente es que una cantidad considerable del antibiótico, se pierde por lixiviación o quelación al unirse con algunos compuestos en el agua de mar o salobre. Esto ocasiona que se utilice una mayor cantidad del antibiótico, para asegurar la eficiencia del tratamiento (Auró y Ocampo, 2006; Guía para la Gestión Sanitaria en Acuicultura, 2011). También representa un peligro potencial de contaminación del medio ambiente

La administración oral es reconocida como la técnica más práctica para la aplicación de terapias a organismos acuáticos, empleando dietas medicadas. Este método permite suministrar el fármaco a grandes poblaciones, sin realizar modificaciones mayores en las condiciones de cultivo. La desventaja de este procedimiento es que al administrar el medicamento, no todos los organismos consumen la misma cantidad. Provocando así, que los organismos enfermos y



más débiles no ingieran la dosis necesaria. Además de que los organismos enfermos disminuyen su tasa alimenticia, por lo que es muy baja la concentración del antibiótico que se incorpora en los tejidos. Mientras que los organismos sanos y más aptos, consumen una mayor cantidad pudiendo morir por intoxicación (Soto-Rodriguez et al., 2006b). Además, la hidrosolubilidad del antibiótico provoca lixiviación fuera del “pellet” de alimento, por lo que no se alcanza la concentración necesaria del fármaco en los organismos (Auró y Ocampo, 2006; Guía para la Gestión Sanitaria en Acuicultura, 2011).

#### 1.4 Alternativas Para la Administración de Fármacos

La eficacia de un fármaco depende, en gran medida, del alcance de la concentración óptima y de su forma de dosificación. Sin embargo, las técnicas convencionales utilizadas generalmente, son impredecibles e ineficaces. De esta manera, frecuentemente se necesitan dosis altas del medicamento, para asegurar que el agente farmacológico llegue finalmente al sitio de acción (Edlund y Albertsson, 2002).

Los sistemas tradicionales de dosificación en organismos superiores, generalmente son por medio de tabletas o inyecciones parenterales. Esta forma de administración, puede provocar que los medicamentos alcancen concentraciones plasmáticas altas, generando toxicidad, e induciendo reacciones adversas. Por otro lado, los fármacos que poseen un tiempo de vida media corto, requieren de administraciones consecutivas, con el riesgo de generar fluctuaciones en la concentración del fármaco en el organismo (Edlund y Albertsson, 2002).

La actividad farmacológica de un compuesto no es suficiente para asegurar una buena terapia (Mainardes y Silva, 2004). Para optimizar los efectos terapéuticos hay que mantener y controlar el perfil adecuado de concentración-tiempo del medicamento en el sitio de acción. Por lo que los

sistemas controlados de administración de fármacos pueden ser una buena opción (Siepmann y Siepmann, 2006).

### 1.5 Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos

Un sistema de administración de fármaco se define como una formulación o un dispositivo que permite la introducción de una sustancia terapéutica en el cuerpo. Este sistema mejora su eficacia y seguridad mediante el control de la tasa, el tiempo y el lugar de liberación de los fármacos en el cuerpo. El propósito de la liberación prolongada es extender la duración de la acción de la droga y reducir la frecuencia de la dosificación, minimizando las fluctuaciones en el nivel plasmático para que se presenten menos efectos adversos (Jain y Médecin, 2008).

Los sistemas controlados se basan en la incorporación del fármaco alrededor o dentro de una matriz (frecuentemente polimérica), donde procesos como la difusión, la erosión y/o hinchamiento pueden estar involucrados en la tasa de liberación del fármaco, resultando en un amplio espectro de patrones de expulsión posibles. Por ejemplo, se puede generar un suministro continuo del medicamento, compensando la eliminación del agente activo fuera del organismo, logrando mantener la concentración del fármaco constante en el sitio de acción durante más tiempo (Siepmann y Siepmann, 2006).

Dentro de los sistemas de dosificación de fármacos con liberación controlada se pueden emplear diversos métodos para la elaboración de vehículos, incluyendo procesos físicos (secado por aspersion), químicos (emulsiones simples y múltiples e inclusión molecular) y fisicoquímicos (coacervación, liposomas y gelificación iónica). En conjunto, estos métodos ofrecen control sobre parámetros básicos tales como el diámetro de la partícula, la eficiencia de encapsulación, polidispersidad y porosidad (Champion et al., 2007).

## 1.6 Métodos de Microencapsulación para Sistemas de Transporte de Fármacos

Los sistemas fisicoquímicos de transporte y liberación controlada corresponden a estructuras sintetizadas a partir de materiales poliméricos, biocompatibles y biodegradables (Makadia y Siegel, 2011). Estos vectores se dividen en hidrogeles, dendrímeros y estructuras coloidales, las cuales se pueden dividir en nano y micropartículas (Zimmer y kreuter, 1995). Las micropartículas y nanopartículas poliméricas son estructuras circulares sólidas, fabricadas de polímeros naturales o artificiales, biodegradables. En estas estructuras, los medicamentos pueden ser absorbidos, disueltos, encapsulados y/o unidos por enlaces covalentes a la partícula (Calderón et al., 2010).

Dentro de los distintos métodos para la elaboración de micropartículas se encuentra el secado por aspersion, el cual es la transformación de un fluido en material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado en caliente. Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad, es que es apropiado para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (Champion et al., 2007; Calderón et al., 2010).

La coacervación, es un método físico-químico que se basa en la separación de fases. Con esta técnica, se pueden obtener microcápsulas esféricas muy pequeñas, de hasta 4  $\mu\text{m}$  y con una carga de material a encapsular de alrededor del 90%. Además, proporcionan una buena protección contra las pérdidas por volatilización y contra la oxidación (Champion et al., 2007).

Los liposomas son partículas microscópicas hechas de lípidos y agua principalmente. Son estructuras compuestas de una bicapa de lípidos que engloban un volumen acuoso. En la fase acuosa, se coloca en material a encapsular cuando es hidrofílico o bien se agrega en el solvente orgánico donde se disuelven los fosfolípidos, si es lipofílico (Champion et al., 2007).

La encapsulación por emulsificación se utiliza principalmente cuando el polímero y el principio activo son miscibles en soluciones acuosas (Giunchedi et al., 2001). En este proceso se produce la polimerización de un monómero en la interfase de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana, que dará lugar a la pared de las microcápsulas. Este proceso tiene lugar en tres pasos:

1. Dispersión de una solución acuosa de un reactante soluble en agua, en una fase orgánica para producir una emulsión agua en aceite.

2. Formación de una membrana polimérica en la superficie de las gotas de agua, iniciada por la adición de un complejo soluble en aceite a la emulsión anterior.

3. Separación de las microcápsulas de la fase orgánica y su transferencia en agua para dar una suspensión acuosa. La separación de las microcápsulas se puede llevar a cabo por centrifugación (Champion et al., 2007).

Dentro de la encapsulación por emulsificación existen diversas variantes, como es el caso de las emulsiones múltiples, o "emulsiones de emulsiones". Estas mezclas, son sistemas complejos en los que gotas dispersas contienen gotitas más pequeñas dentro. Son ampliamente utilizadas para encapsular ingredientes activos en numerosas aplicaciones, incluyendo la administración de fármacos. La monodispersidad del tamaño y un control preciso de la estructura interna son críticos para la versatilidad de tales emulsiones, debido a que estos atributos permiten la manipulación precisa de los niveles de carga y la cinética de liberación y de transporte de las sustancias encapsuladas (Chu et al., 2007).

Uno de los métodos más comunes de la preparación de ME es el método de emulsión agua en aceite (W/O por sus siglas en inglés). Este sistema se basa en la dispersión de una solución acuosa del polímero y fármaco en una fase orgánica continua. Sin embargo, se han estudiado procedimientos alternativos basados en emulsiones múltiples, como el de agua-en-aceite-en-agua (W/O/W), esta metodología innovadora permite la preparación de ME multifase que da la ventaja de un mayor control de liberación así como de mayor eficiencia de encapsulación (Couvreux et al., 1997).

## 1.7 Polímeros para Elaboración de Transportadores de Fármacos en Sistemas de Liberación Controlada

En la mayoría de los sistemas de liberación controlada, el fármaco se introduce en el interior de lo que se denomina transportador, que generalmente es un material polimérico. La velocidad de liberación de la sustancia deseada está prácticamente controlada por las propiedades del polímero, aunque existen otros factores de menor influencia como el pH del medio de liberación. Una vez conocidos estos factores, es posible establecer sistemas de liberación que actúen lentamente y de forma continua durante largos periodos (Sáez et al., 2004).

Aun cuando el número de polímeros biodegradables es diverso, solamente unos cuantos son adecuados para la administración de fármacos (Edlund y Albertsson, 2002). Los sistemas poliméricos ideales para aplicaciones biomédicas deben contar con una biocompatibilidad alta, deben ser capaces de resistir procesos de esterilidad y mantener la estabilidad en el almacenamiento (Edlund y Albertsson, 2002; Mansour et al., 2010). Los polímeros empleados principalmente en el suministro de medicamentos pueden ser tanto de origen natural como sintético. El primer grupo incluye los polisacáridos (dextranos o celulosa), quitina, quitosano y las proteínas (colágeno, fibrina, gelatina y BSA) (Edlund y Albertsson, 2002).

La BSA ha sido utilizada para la síntesis de micropartículas con fines terapéuticos, debido a que es una proteína versátil y relativamente fácil de obtener. Las ME de BSA son partículas biodegradables que se pueden producir en un intervalo de tamaño de 1 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, mediante la solidificación térmica o química de una emulsión de BSA en una fase orgánica (Mathew et al., 2007). Estas ME se metabolizan en el cuerpo, debido principalmente a factores como el tamaño de las partículas, el grado de estabilización y el sitio de asimilación. La liberación del fármaco desde las ME de BSA, puede ser controlado tomando en cuenta el alcance y la naturaleza del entrecruzamiento, el tamaño y el nivel de incorporación del medicamento (Mathew et al., 2007).

El PLGA (ácido poli-láctico-co-glicólico) es uno de los polímeros utilizados con más éxito para el desarrollo de medicina biodegradable. Esto se debe, a que el PLGA sufre hidrólisis en el cuerpo para producir los monómeros de metabolitos biodegradables, ácido láctico y ácido glicólico. Dado que el cuerpo se ocupa eficazmente de estos dos monómeros, la toxicidad sistémica asociada con la administración de fármacos o biomateriales es mínima (Chu et al., 2007).

Se han elaborado partículas de PLGA principalmente por difusión-emulsificación, evaporación del disolvente de emulsificación y método de deposición interfacial. Generalmente en el método de difusión de emulsificación los polímeros de PLGA se disuelven en un disolvente orgánico (EtAc, MEK, PC, BA, etc.) y se vierten y separan en la fase acuosa que tiene un estabilizador, posteriormente se emulsifica por homogeneización. En el método de evaporación de disolvente, los polímeros se disuelven en un disolvente orgánico volátil (DCM, acetona, CHCl<sub>3</sub>, EtAc, etc.) y se vierten agitando continuamente en la fase acuosa con o sin emulsificante/estabilizador y se sonicán (Couvreur et al., 1997). Partículas de PLGA se han utilizado para desarrollar medicamentos basados en proteínas y péptidos, nano-vacunas, y nanopartículas que contienen genes para sistemas de administración in vivo (Singh y Mishra, 2013).

### 1.8 Aplicación de Antibióticos con Liberación Controlada

El interés de encapsular sustancias para la formulación de los dispositivos de entrega de medicamentos se ha incrementado en la última década. Estos sistemas, aumentan el tiempo de permanencia del medicamento, al reducir la velocidad de tránsito, para que el fármaco sea efectivo durante más tiempo. Esto, permite formular sistemas de liberación prolongada o controlada de sustancias activas (Rodríguez *et al.*, 2000).

Las terapias con antibióticos empleando un sistema controlado, disminuyen la carga bacteriana en el sitio de la infección, minimizando la toxicidad renal, hepática y sistémica. Algunos de los antibióticos que han sido incorporados en los sistemas de liberación controlada son: clorhexidina, vancomicina, anfotericina B, gentamicina y doxiciclina (Siepmann y Siepmann, 2006).

### 1.9 Alternativas Antimicrobianas en Acuicultura

El uso amplio y frecuente de antibióticos en la acuicultura resulta en el desarrollo y la propagación de resistencia bacteriana. Debido a los riesgos de salud asociados con el uso de antibióticos en la producción animal, existe una creciente conciencia de que los antibióticos deben utilizarse con más cuidado. Esto se refleja en la reciente puesta en marcha de regulaciones más estrictas en sobre el uso profiláctico y la presencia de residuos de antibióticos en la acuicultura (Defoirdt et al., 2011). Aunque México no es el caso, por lo que es necesaria la concientización y la búsqueda de alternativas.

Para promover el desarrollo sostenible de la industria de la acuicultura, se necesitan nuevas estrategias para controlar las infecciones bacterianas. Dentro de las alternativas antimicrobianas que se han analizado está el uso de probióticos, péptidos antimicrobianos, inmunoreguladores antimicrobianos, así como el uso de sustancias de origen natural como plantas y hongos (Alderman y Hastings, 1998; McGeer, 1998; Defoirdt et al., 2011).

Dentro del campo de la investigación ha habido un creciente interés por el uso de sustancias naturales con propiedades antimicrobianas como los polisacáridos, donde el quitosano y algunos de sus derivados como son los oligosacáridos de quitosano (COS) son unos de los más estudiados en los últimos años (Nwe et al., 2009).

## 1.10 Quitosano

El quitosano es un biopolímero natural biodegradable y no tóxico que presenta propiedades funcionales importantes tanto desde el punto de vista tecnológico como biológico. La molécula de quitosano es un copolímero compuesto de unidades de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y D-glucosamina (GlcN). Se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina, el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Pillai et al., 2009; Dash et al., 2011). La quitina se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos, insectos y algunos hongos. Sus principales fuentes comerciales son los residuos de cáscara de los camarones, langostas y cangrejos. En el mundo se producen varios millones de toneladas de quitina anualmente y por lo tanto, este biopolímero representa una fuente barata y de fácil disponibilidad (Nwe et al., 2009; Dash et al., 2011).

### 1.10.1 Propiedades Biológicas

El quitosano ha atraído un creciente interés debido a sus actividades biológicas tales como acción hipocolesterolémica, fortalecimiento inmunitario, efecto antitumoral y actividad antimicrobiana. Los diferentes derivados de quitosano tienen distintas estructuras y propiedades fisicoquímicas, lo que resulta en compuestos y actividades diferentes (Dash et al., 2011; Xia et al., 2011).

La actividad antimicrobiana es su propiedad funcional más importante, ya que corresponde directamente a posibles aplicaciones en la industria farmacobiológica. El quitosano presenta un amplio espectro antimicrobiano que incluye bacterias, levaduras y hongos (Xia et al., 2011). Se han sugerido dos mecanismos principales para explicar el efecto de los quitosanos sobre las células microbianas. El primero, es que la naturaleza policatiónica del quitosano interfiere con el metabolismo bacteriano por apilamiento electrostático en la superficie celular de las bacterias, al interactuar las cargas positivas del grupo amino de COS con el ácido carboxílico de las macromoléculas de la superficie



celular bacteriana (Kim y Rajapakse, 2005; Benhabiles et al., 2012). El otro, es el bloqueo de la transcripción de ARN a partir del ADN por la adsorción de quitosano a las moléculas de ADN (Benhabiles et al., 2012).

La actividad antimicrobiana del quitosano depende del tipo de pared celular, debido a que los grupos aniónicos presentes, establecen interacciones con el quitosano. En las bacterias Gram-positivas las interacciones se dan a través de los grupos aniónicos del ácido lipoteícoico con los grupos catiónicos del quitosano, bloqueando así las funciones de la membrana lipídica. En el caso de las bacterias Gram-negativas, los grupos catiónicos del quitosano compiten con los metales divalentes por el establecimiento de interacciones con los grupos aniónicos de los lipopolisacáridos y las proteínas de la membrana externa (Chen y Cooper, 2002; Kim y Rajapakse, 2005).

Cuando el pH está por arriba del pKa del quitosano (6.3), entonces se produce un efecto de quelación por parte del polímero. Como consecuencia del reemplazo de iones  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  se perturba la integridad de la pared celular o se interfiere en la actividad de las enzimas de degradación. De tal manera, que se puede producir la penetración del quitosano dentro de la bicapa fosfolipídica, con la consiguiente salida de sustancias intracelulares y la pérdida de estabilidad de la membrana, provocándose así la muerte de la bacteria (Kim y Rajapakse, 2005; Takahashia et al., 2008).

### **1.10.2 Características Físico-Químicas**

El quitosano es un copolímero lineal de 2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranososa (N-acetil-D-glucosamina) y 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glicopiranososa (D-glucosamina) unidas por un enlace  $\beta$ -(1-4). La composición de las cadenas dependen de la fuente y del método de obtención, es por ello que el grado de acetilación (DA) y la masa molecular (Mw) son dos parámetros que son necesarios conocer en la caracterización de este polímero y para su empleo en las diferentes aplicaciones. Se obtiene por desacetilación termoquímica de la quitina en presencia de un álcali. La mayoría de los métodos implican la

hidrólisis de la posición acetilada, dejando libre el grupo amino del carbono 2, utilizando soluciones de hidróxido de sodio o de potasio. Las condiciones usadas para la desacetilación determinan la masa molecular del polímero y el grado de desacetilación (DD) (Pillai et al., 2009; Dash et al., 2011).

1.10.2.1 Grado de acetilación (DA). Es el total de residuos GlcNAc presentes en la cadena polimérica con respecto al contenido en residuos de GlcN, expresado en porcentaje. El proceso de desacetilación nunca llega al 100% y en función del porcentaje alcanzado se habla de DA del quitosano o DD de la quitina. Algunos autores consideran que quitosano es el polímero con al menos 60% de residuos desacetilados en su molécula (Aiba, 1991).

El DA es un parámetro estructural que influye en las propiedades fisicoquímicas tales como el peso molecular, el alargamiento a la rotura y la resistencia a la tracción. Este valor también determina el límite de solubilidad del polímero en soluciones ácidas diluidas e influye en las propiedades biológicas y de solución (Alonso et al., 1983).

En la quitina, el DA es típicamente (90%) lo que indica la presencia de algunos grupos amino, ya que durante la extracción puede tener lugar una cierta cantidad de desacetilación. Por lo tanto, la quitina también puede contener aproximadamente 5-15% grupos amino. El quitosano posee un DA típico de menos de (35%), por lo tanto, con mayor cantidad de grupos amino se afectan drásticamente sus propiedades físicas (Pillai et al., 2009). Para determinar esta relación, se han hecho intentos con muchas herramientas de análisis, que incluyen la espectroscopia de IR, pirolisis con cromatografía de gases, cromatografía de permeación en gel y espectrofotometría UV, espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ - RMN de estado sólido, análisis térmico, hidrólisis ácida y HPLC, métodos de espectrometría de separación y, más recientemente, la espectroscopia de infrarrojo cercano (No y Meyers, 1995).

1.10.2.2 Masa molecular promedio (Mw por sus siglas en inglés). Se expresa como una media de los pesos de las moléculas presentes. Los polisacáridos en solución exhiben una dinámica sensible a los tamaños de las

cadenas, por lo que afecta directamente a las propiedades químicas y biológicas del polímero. Se considera un quitosano de baja Mw entre 20 kDa y 190 kDa, mientras que uno de alta Mw está comprendido generalmente entre 190 kDa y 375 kDa (Nwe et al., 2009; Pillai et al., 2009). Las distribuciones de peso molecular se pueden determinar usando HPLC, dispersión de luz, cromatografía de permeación en gel, Viscosimetría y HPLC-MS (No y Meyers, 1995).

1.10.2.3 Solubilidad. El quitosano se disuelve fácilmente en soluciones diluidas de ácido por debajo de un pH 6,0, a diferencia de la quitina, que es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, por lo que es difícil encontrarle aplicaciones prácticas. Esta discrepancia de solubilidad se debe a la cuaternización de los grupos amino, los cuales tienen un valor de pKa de 6,3 convirtiendo al quitosano en un polielectrolito catiónico soluble en agua. A pH bajo, las aminas presentes se protonan y se cargan positivamente, lo que vuelve al quitosano soluble. Por otra parte, cuando el pH aumenta por encima de 6, las aminas del quitosano se desprotonan y se vuelve insoluble (Nwe et al., 2009; Pillai et al., 2009), lo cual limita en gran medida su aplicación. Sin embargo, su insolubilidad ya sea en disolventes orgánicos o agua puede ser resuelto utilizando oligómeros del quitosano (Yin et al., 2010).

## 1.11 Quito-oligosacáridos

Los quito-oligosacáridos (COS) son los productos hidrolizados del quitosano, obtenidos por varios métodos tales como la hidrólisis ácida y enzimática. En general, las masas moleculares de COS son de 10 kDa o menos y además se disuelven perfectamente en agua (Xia et al., 2011). El quitosano contiene tres tipos de grupos funcionales reactivos, un grupo amino/acetamido, así como grupos hidroxilo primarios y secundarios ambos en las posiciones C-2, C-3 y C-6, respectivamente. Los contenidos aminoácidos son la razón principal de las

diferencias entre sus estructuras y las propiedades físico-químicas, así como se correlacionan con su quelación, floculación y funciones biológicas (Xia, 2003).

Los COS han atraído gran interés debido a una amplia gama de aplicaciones biológicas, incluyendo estimulación del crecimiento de las plantas, aditivo para alimentos, agente antimicrobiano, entre otros (Aam *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011). Además, los diferentes derivados de quitosano y productos enzimáticos tienen diferentes estructuras y propiedades fisicoquímicas, que pueden resultar en nuevas bioactividades o nuevos hallazgos en los compuestos bioactivos conocidos (Xia *et al.*, 2011).

### **1.11.1 Elaboración**

El quitosano se puede disociar por agentes hidrolíticos, debido a la presencia de enlaces glicosídicos inestables. El rompimiento de los enlaces O-glucosídicos de quitosano por diferentes métodos conduce a la producción de COS que varían en el grado de polimerización (DP), así como el número y la secuencia de unidades GlcN y GlcNAc. Algunos de estos métodos incluyen, hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática, degradación oxidativa, degradación ultrasónica, y enfoques quimio enzimáticos (Kim y Rajapakse, 2005).

La hidrólisis ácida del quitosano genera fragmentos de bajo peso molecular y con un grado bajo de desacetilación, por lo que este método representa una ventaja con respecto a otros para generar compuestos con mayor actividad biológica. Sin embargo, los ácidos utilizados pueden causar desacetilación e hidrólisis del polímero. De igual manera los COS pueden ser obtenidos por hidrólisis enzimática con lisozimas, quitosanasas, glucosaminidasas y quitinasas. La especificidad de estas enzimas permite hidrolizar quitosanos parcialmente acetilados produciendo principalmente dímeros, trímeros y tetrámeros de N-acetil-D-glucosamina. Sin embargo, estas enzimas presentan como desventaja que a la hora de aplicarlas a gran escala, no están disponibles en grandes cantidades y tienen un costo elevado (Cabrera y Van-Cutsem, 2005)

Por otra parte, la radiación electromagnética, sonicación y la energía mecánica generada por microfiltración, también se pueden utilizar para la producción de COS sin el empleo de agentes químicos. La absorción de la energía por las moléculas de quitosano en cualquiera de los métodos anteriores da como resultado la disociación de los enlaces químicos. Si el enlace roto pertenece a la cadena principal del polímero (O-glucosídico), se produce una disminución de la masa molecular (Kim y Rajapakse, 2005).

### **1.11.2 Caracterización**

Dado que la actividad biológica de los quitoooligómeros a menudo se ha determinado usando mezclas de oligómeros heterogéneas relativamente mal caracterizadas, los requisitos de tamaño y estructura para que estos compuestos tengan una actividad biológica son difíciles de determinar. Sin embargo, parece que los quitoooligómeros generalmente deben tener un DP de al menos 4 para inducir respuestas biológicas, pero más allá de ese requisito, no es posible generalizar acerca de las características estructurales esenciales para su actividad biológica. Por lo tanto, es de interés creciente para generar quitoooligómeros bien definidos para determinar la relación entre su bioactividad y sus parámetros estructurales (DA, DP, y su distribución GlcNAc/GlcN ) (Trombotto et al., 2008).

Varios métodos han sido reportados para la determinación de las características de quitosano y sus derivados, dentro de las que destacan espectroscopia infrarroja, espectrofotometría UV, resonancia magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR), titulación por conductimetría, titulación potenciométrica, calorimetría diferencial de barrido, cromatografía de permeación en gel y Cromatografía líquida de alta resolución (Aranaz et al., 2009).

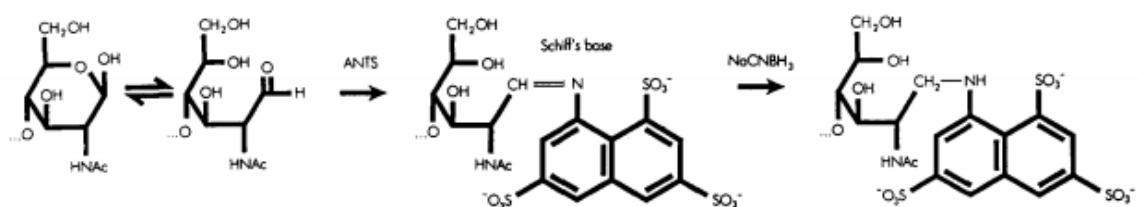
1.11.2.1 Análisis por espectroscopia FTIR. La espectroscopia FTIR es una forma de espectroscopia vibracional que por medio de un espectro refleja tanto la estructura molecular como el medio ambiente molecular. En esta

técnica, la muestra es irradiada con radiación infrarroja y la absorción de ésta estimula movimientos vibratorios. Por lo tanto, cuando una molécula se expone a la radiación producida por la emisión térmica de una fuente de calor (una fuente de energía IR), absorbe sólo a frecuencias correspondientes a sus modos de vibración molecular, en la región del espectro electromagnético entre visible (rojo) y ondas cortas (microondas). Estos cambios en el movimiento vibracional dan lugar a bandas en el espectro de vibración; cada banda espectral se caracteriza por su frecuencia y amplitud (Duygu et al., 2010). Debido a que cada material diferente es una combinación única de átomos, no hay dos compuestos que produzcan el mismo espectro infrarrojo exacto. Por lo tanto, la espectroscopia infrarroja puede resultar en una identificación positiva (análisis cualitativo) de cada tipo diferente de material. Además, el tamaño de los picos en el espectro es una indicación directa de la cantidad de material presente. Con algoritmos de software modernos, la espectroscopia infrarroja es una excelente herramienta para el análisis cuantitativo. Esto hace a la espectroscopia infrarroja útil para la identificación de materiales desconocidos, la determinación de la calidad o la consistencia de una muestra y cuantificación componentes.

Hasta ahora, varias bandas de absorción se han propuesto como referencia interna para la caracterización de quitosano, como la banda de estiramiento OH a  $3450\text{ cm}^{-1}$ ; las bandas de estiramiento C-H en  $2870\text{-}2880\text{ cm}^{-1}$ ; la banda amida III a  $1315\text{-}1320\text{ cm}^{-1}$ ; la banda de flexión de NH<sub>2</sub> a  $1620\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$  –NH, así como los enlaces glucosídicos existentes  $890\text{ - }900\text{ cm}^{-1}$  (Kasaai, 2008). A través de la determinación de los coeficientes de absorción se pueden conocer las características de las fracciones de quitosano.

1.11.2.2 Determinación de COS por electroforesis de carbohidratos marcados con un fluoróforo (FACE). FACE combina la tecnología de alta resolución y la simplicidad de la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con la sensibilidad y la visibilidad de la fluorescencia. El término reductor de los hidratos de carbono (carbono aldehídico) se hace reaccionar con un fluoróforo que tiene un grupo amino primario (Figura 1). La base de Schiff resultante se

estabiliza por aminación reductiva con cianoborohidruro de sodio para dar los derivados finales estables marcados con fluorescencia que son separados por PAGE en geles de alta densidad donde se alcanza una alta resolución. El perfil oligosacárido puede ser visualizado y cuantificado bajo iluminación UV apropiada (Hu, 1995; Jackson, 1997).



**Fig. 1.** Derivatización de un azúcar reductor por ANTS (Hu, 1995)

Los fluoróforos para marcaje que se han utilizado con más frecuencia son 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonato disódico (ANTS) y 2-aminoacridona (AMAC). ANTS tiene tres grupos de ácido sulfónico, un máximo de excitación a 365 nm y una emisión de 515nm. El marcaje con ANTS no sólo confiere fluorescencia al carbohidrato, sino que también le añade tres cargas negativas que le permiten migrar en un campo eléctrico. El ANTS puede ser utilizado con los sacáridos ácidos y neutros, los cuales en la electroforesis serán separados de acuerdo a su carga y a su tamaño. La conformación de los sacáridos y la configuración de sus grupos hidroxilo también pueden contribuir a su migración al perturbar su tamaño y la interacción efectiva con la matriz de gel (Hu, 1995; O'Shea et al., 1998, Jackson, 1997).

1.11.2.3 Determinación del grado de polimerización por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLCI-MS). Ésta es una técnica poderosa microanalítica para la identificación de compuestos desconocidos, cuantificación de compuestos conocidos y elucidación de estructura de una amplia variedad de compuestos orgánicos no volátiles o semi-volátiles en una mezcla. Utiliza la separación de los componentes de la muestra en el HPLC basándose en la afinidad intrínseca de un compuesto tanto para una "fase móvil" (típicamente un disolvente

regulado) y una "fase estacionaria" (soporte sólido poroso con un revestimiento especial). Esencialmente, se utiliza una bomba para proporcionar un flujo continuo de un disolvente en el que se introduce una muestra disuelta. Una vez que la muestra se encuentra en el flujo del disolvente, viaja a través de una columna analítica. Los compuestos presentes en la mezcla de la muestra se separan a continuación en función de su afinidad con las partículas recubiertas de la columna. Tan pronto como los compuestos se van eluyendo de la columna son introducidos a la fuente de ionización del espectrómetro de masas en donde las moléculas son ionizadas en fase gaseosa. Inmediatamente los iones son guiados hacia el analizador del espectrómetro donde son separados y analizados de acuerdo a su relación masa-carga ( $m/z$ ). Finalmente, la corriente de iones son monitoreados, amplificados y su señal es transmitida al sistema de datos en donde es registrada en forma de espectro de masas. Los valores de  $m/z$  de los iones son graficados contra su intensidad para mostrar el número de componentes en la muestra, la masa molecular de cada componente y la abundancia relativa de los componentes de la muestra.

La espectrometría de masas utilizando una fuente de ionización por electrospray (ESI-MS) es un método de elección para llevar a cabo la determinación de masa de las biomoléculas. Es ideal para el análisis bioquímico, ya que permite grandes moléculas, no volátiles ser analizadas directamente de la fase líquida, y por lo tanto puede ser acoplada a técnicas de separación tales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Vishu-kumar et al., 2005; Cech y Enke, 2001).

La ionización por electrospray (ESI) es una técnica de ionización a presión atmosférica adecuada para el análisis de moléculas polares en un rango de masa molecular de menos de 100 Da a mas de 1 000 000 Da. El proceso inicia al bombear una solución diluida del analito a través de un capilar ó aguja del nebulizador en cuya punta se aplica un voltaje alto (2-5 kV) a una velocidad de flujo muy baja (0.1–10  $\mu\text{L}/\text{min}$  utilizando bomba de jeringa) y flujos altos (1ml/min acoplado a un HPLC). Este voltaje puede ser negativo o positivo, dependiendo de los analitos seleccionados. El voltaje aplicado proporciona el



gradiente de campo eléctrico requerido para producir la separación de cargas en la superficie del líquido. Las gotitas que contienen un exceso de carga positiva o negativa se desprenden de su punta y se mueven a través de la atmósfera hacia la entrada del espectrómetro de masas, y generan moléculas del analito cargadas (iones). El mecanismo de fisión coulomb supone que el aumento de la densidad de carga debido a la evaporación del disolvente produce gotas grandes que se dividen en gotitas más pequeñas, que eventualmente se componen sólo de iones individuales. El proceso ESI genera iones en fase de vapor que pueden ser analizados para la relación de masa a carga dentro del espectrómetro de masas (Cech y Enke, 2001).

ESI-MS es significativamente más rápida, sensible y precisa que las técnicas tradicionales de determinación de masa para moléculas biológicas tales como electroforesis en gel y sedimentación de equilibrio. Como resultado, la técnica se ha vuelto indispensable en el análisis y la secuenciación de proteínas y oligonucleótidos y otras moléculas pequeña (Cech y Enke, 2001).

1.11.2.4 Separación de COS en columnas de carbón grafitado. Los oligosacáridos altamente polares son notoriamente difíciles de separar por HPLC sin derivatización previa o el uso de sistemas de eluyentes altamente alcalinos. Esto se debe a que no contienen cromóforos, por lo que se retiene poco o nada del analito en columnas de HPLC de fase reversa. Esta problemática de falta de detección se ha solucionado a través de la derivatización del reductor terminal de los carbohidratos. Sin embargo, esto presupone que todos los carbohidratos se están reduciendo, además de que este paso adicional requiere tiempo y manejo de la muestra e implica pérdidas inevitables, así como el cambio de la estructura original del analito (Robinson et al., 2007; Ruhaak et al., 2010)

Las columnas empacadas con carbón grafitado se han utilizado principalmente para separaciones preparativas de oligosacáridos. Sin embargo, hasta hace poco, no estaban disponibles columnas de carbón que poseyeran la forma apropiada, el tamaño de partícula y la estabilidad mecánica necesaria para la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Hace varios años,

Shandon Scientific desarrolló una columna de HPLC de carbono grafitado, Hypercarb, y demostró que tenía una capacidad única para resolver isómeros compuestos y estrechamente relacionados. (Ruhaak et al., 2010).

La retención en CCG es principalmente por un mecanismo de adsorción. El mecanismo de retención se basa principalmente en la interacción hidrofóbica y la interacción electrón donador-aceptor. Hypercarb es estable a lo largo de todo el rango de pH de 0-14, y no se ve afectada por fases móviles agresivas. Su compatibilidad con sistemas para todo disolvente permite la separación de una amplia gama de polaridades en un solo procedimiento cromatográfico (Robinson et al., 2007; Applications Notebook Issue 1, June 2009 de Thermo Scientific). Las columnas de carbón grafitado (CCG) se han utilizado para los análisis y las separaciones preparativas de oligosacáridos lineales neutros, oligosacáridos cíclicos, N-oligosacáridos, glicopéptidos y quito-oligosacáridos.

### **1.11.3 Actividad Antimicrobiana**

El efecto antimicrobiano del quitosano se puede ver afectado por factores químicos, físicos y biológicos. Dentro de éstos, se incluyen la concentración de quitosano, el Mw, DA, pH, temperatura, salinidad y la presencia de cationes divalentes. Además, otros factores que también influyen son el solvente en el que se encuentra disuelto el quitosano, el medio de suspensión, la fase de crecimiento del microorganismo, así como el número de grupos amino primarios disponibles (Chen y Cooper, 2002; Kim y Rajapakse, 2005).

Existen diversos reportes donde se discute la actividad antimicrobiana del quitosano en diferentes condiciones, con resultados contradictorios. Estudios como el de Lin et al. (2009) demuestran que la tasa de mortalidad de las células bacterianas tiende a elevarse al aumentar el DD de los COS. Se ha señalado que un 85-95% de desacetilación de COS es responsable de llevar a cabo la actividad antibacteriana más alta. Por otro lado, los COS con una masa molecular promedio mayor a 50 kDa no son capaces de suprimir el crecimiento microbiano, pero los de masa molecular entre 5 y 27 kDa exhiben una acción

antibacteriana efectiva. Esto podría deberse a la carga positiva del grupo amino en la posición C-2 de los monómeros de glucosamina que interactúan con la superficie celular bacteriana. Esta actividad, dependerá considerablemente de la especie bacteriana (Kim y Rajapakse, 2005; Lin et al., 2009).

En contraste, existen estudios (Ueno et al., 1997) que indican que una masa molecular menor de 2.2 KDa tiene poco efecto inhibitorio, mientras que un peso entre 5.5 y 9.3 KDa tuvieron un mayor efecto. De ahí la importancia de la caracterización de los oligómeros para pruebas de actividad antibacteriana.

Por otra parte, existen estudios con resultados prometedores como el de Benhabiles et al. (2012), en donde midieron las actividades antibacterianas de quitina, quitosano y sus oligómeros contra *V. cholerae* y otras bacterias. En comparación con el grupo control, los oligómeros mostraron una acción antimicrobiana superior a los polisacáridos nativos, obteniendo una inhibición marcada del crecimiento de todas las bacterias probadas. En el caso de *Vibrio*, se observó que fue inhibido casi en su totalidad después de 1,5 h de incubación, en presencia de los quitooligómeros, en el medio de cultivo. Las diferencias en la actividad antimicrobiana de los oligómeros dependieron del tipo y/o peso molecular del material de quitina, así como de las especies bacterianas probadas (Benhabiles et al., 2012). Por lo anterior, los quitooligómeros tendrían ventajas como nuevos agentes antimicrobianos, debido a su mayor actividad y a que también son más fácilmente solubles en agua que los polisacáridos nativos. Sin embargo, debido a esa mayor solubilidad, estas moléculas requieren un vehículo de protección para su administración. De esta manera, el uso de sistemas poliméricos de liberación controlada, serían una buena estrategia de vectorización de los COS.

## HIPÓTESIS

Los oligosacáridos de quitosano en ME de BSA sintetizadas por emulsión simple o múltiple son una alternativa antimicrobiana contra cepas de *Vibrio harveyi* patógenas para camarón de cultivo

## OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y evaluar la actividad antimicrobiana de los oligosacáridos de quitosano en ME sintetizadas por emulsión simple o múltiple contra *Vibrio harveyi*.

### Objetivos Particulares

- Obtener oligosacáridos de quitosano (COS) por hidrólisis ácida.
- Caracterizar los COS por FACE y HPLC-MS
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los COS contra *V. harveyi* CAIM 1792 y 79 por técnica de microdilución en caldo.
- Elaborar ME de BSA cargadas con COS mediante la técnica de emulsión.
- Elaborar ME de BSA con nanoesferas de PLGA cargadas con COS mediante la técnica de emulsión múltiple.
- Caracterizar las ME por morfología, carga eléctrica y eficiencia de encapsulación.
- Probar el efecto antibacteriano *in vitro* contra *V. harveyi* CAIM 1792 y 79 de los COS liberados de las ME

## CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

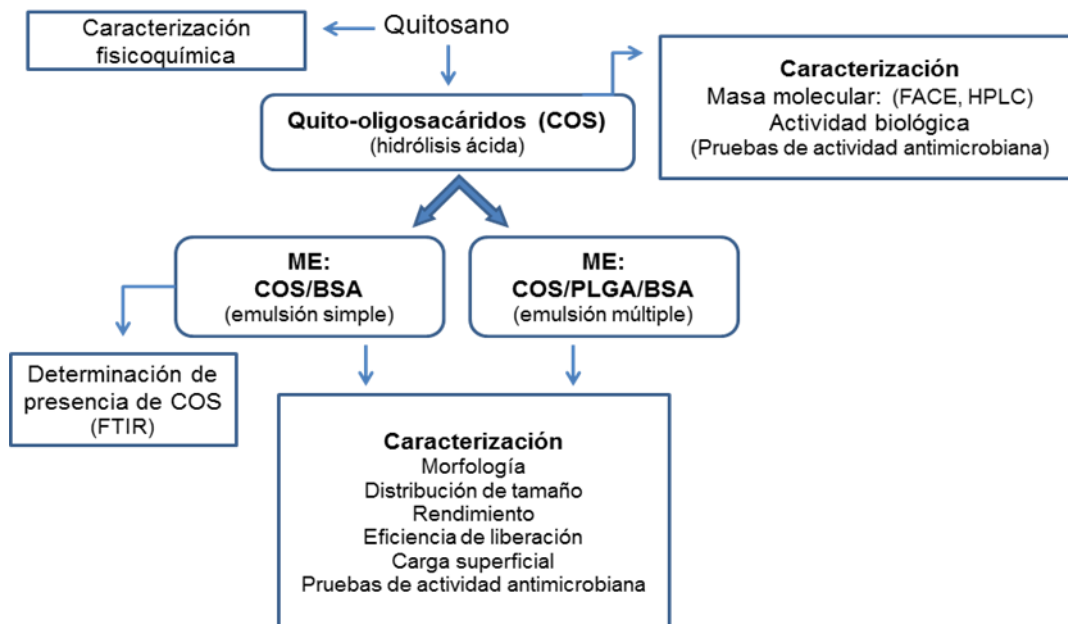
### 2.1 Esquema General de Trabajo

En la figura 2 se muestra el esquema general de trabajo. Se utilizó un quitosano comercial, previamente caracterizado, para la elaboración de COS por hidrólisis ácida. Estos oligómeros se caracterizaron por masa molecular y actividad biológica. Se sintetizaron dos tipos de ME a partir de los COS: ME de BSA cargadas con COS por emulsión simple (COS/BSA) y ME de BSA cargadas con nanoesferas de PLGA con COS por técnica de emulsión múltiple (COS/PLGA/BSA). Ambas formulaciones de ME se caracterizaron para conocer su forma, tamaño, eficiencia de liberación, carga superficial y actividad biológica.

### 2.2 Materiales

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica de Proteínas y Glicanos, Coordinación de Ciencia de los Alimentos en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. en Hermosillo, Sonora, México.

Los reactivos químicos utilizados fueron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, USA). Los solventes y el agua MilliQ fueron de grado espectrometría de masas. Los medios de cultivos se obtuvieron de Difco (Difco Laboratories/Bechton, Dickinson and Co, MD, USA). Las cepas de *Vibrio harveyi* CAIM 1792 y 79 utilizadas como modelos bacterianos, fueron proporcionadas por la doctora Sonia Soto Rodríguez del CIAD de Mazatlán. Se utilizó *E. coli* H10407 ATCC 35401 como cepa control.



**Fig. 2.** Esquema general de trabajo. Microesferas (ME), Quito-oligosacáridos (COS), albúmina (BSA)

### 2.3 Elaboración de COS por Hidrólisis Ácida

El quitosano utilizado posee un grado de acetilación del 79.7% y un porcentaje de nitrógeno de 7.02 g/100 g. Los COS se prepararon por hidrólisis ácida de la siguiente manera: se disolvieron 0.05g de quitosano con 5mL de ácido acético al 1%, seguido de su hidrolisis con HCL concentrado a 56°C por 3h. Para purificar los oligosacáridos (eliminar sales, amino ácidos y péptidos), el hidrolizado se pasó por una columna Carbohydrate de 1000mg/15 mL (Alltech Extract-Clean , Hesperia, CA), previamente acondicionada con 9 mL de acetonitrilo al 25% en agua. Se cargaron 0.025g del hidrolizado de quitosano y la columna fue lavada con 18 mL de agua. En seguida, se eluyó la muestra utilizando 30 mL de acetonitrilo al 25% en agua. El eluyente se evaporó con un flujo de N<sub>2</sub> a 45°C, se almacenó a -40°C para su posterior caracterización (Chang et al., 1997).

## 2.4 Caracterización de los COS Mediante la Determinación del Grado de Polimerización por FACE y la Masa Molecular por HPLC-ESI-MS

### 2.4.1 Caracterización por Electroforesis de Carbohidratos Marcados con un Fluoróforo (FACE)

Se marcaron los COS, previamente liofilizados (500 mg), mediante la adición de 5  $\mu$ l de una solución de ANTS 0.15 M en ácido acético/agua (03:17 v/v) y 5  $\mu$ l de cianoborohidruro de sodio en 1.0 M dimetil sulfóxido (DMSO) recientemente preparado, seguido de una incubación a 37°C durante 16 h, según el método descrito por Jackson (1994).

La mezcla de reacción se secó al vacío durante 45 min en un Speed-Vac a 40°C y se disolvió en 8  $\mu$ l de glicerol/agua (01:04 v/v). Los oligosacáridos marcados con ANTS (8  $\mu$ l) fueron cargados en un gel de 13x10 de poliacrilamida al 24% y sin SDS (0,5 mm de espesor), de acuerdo al método de Laemmli (1970). La electroforesis en gel fue llevada a cabo a 4°C durante 6 horas a 20 mA. El gel se visualizó utilizando un documentador de imágenes (Gel Doc<sup>TM</sup> XR<sup>+</sup> BIO-RAD). Para establecer el tamaño de los oligosacáridos, se inyectaron 800 pmol de estándares de oligómeros de glucosa (6 $\mu$ L) desde Maltotriosa (M3) hasta Maltoheptaosa (M7).

### 2.4.2 Análisis de COS por HPLC-ESI-MS

La muestra del hidrolizado se preparó de la siguiente manera: se pesó 0.0036g del hidrolizado seco, el cual se resuspendió en 200 $\mu$ L de agua mili-Q y se pasó por un filtro de 0.2  $\mu$ m. El análisis se llevó a cabo utilizando un sistema cromatográfico de HPLC Agilent de la serie 1100 (conformado por un degasificador, bomba cuaternaria, automuestreador, horno para columna y detector de arreglo de diodos) acoplado a un espectrómetro de masas Trampa de iones VL con fuente de ionización de electrospray ESI Agilent de la serie 1100.



Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes: columna Thermo Scientific Hypercarb 2.1 x 100 mm 5 $\mu$  unida a una precolumna Hypercarb 2.1 x 4mm 5 $\mu$ , la fase móvil consistió de agua (A), acetonitrilo (B) y 2-propanol (C), utilizando el gradiente que se presenta en la tabla 1; el flujo fue de 0.4 ml/min. El volumen de inyección fue de 30  $\mu$ L y la temperatura del horno de columna de 25°C. (Robinson et al., 2007). Las condiciones de la espectrometría de masas fueron siguiente: los datos fueron adquiridos en modo positivo. La temperatura de secado fue de 350°C, la presión del nebulizador fue 40 psi y el flujo del gas de secado de 11L/min y el escaneo de masas en un intervalo de 100-2200 m/z.

Tabla 1. Gradiente de elución de análisis de HPLC de oligómeros de quitosano

t min	%A*	%B*	%C*
0	94	3	3
10	92	4	4
20	85	6	9
30	82	8	10
30,3	94	3	3
50,6	94	3	3

\* A) agua, B) acetonitrilo y C) 2-propanol

### 2.4.3 Pruebas de Actividad Antibacteriana

Como parte de la caracterización de los COS, también se hicieron pruebas de actividad antibacteriana. Se midió la inhibición del crecimiento bacteriano por técnica de micro dilución seriada (Colosio-López, 2012). Como modelos bacterianos, se utilizaron una cepa patógena para camarón *Vibrio harveyi* CAIM 1792 y una cepa no patógena de *Vibrio harveyi* CAIM 79 (Soto-Rodríguez et al. 2012). Se realizaron diluciones seriadas de los quito-oligómeros en 250  $\mu$ l de caldo soya tripticasa, por triplicado, con una concentración de 1mg/mL hasta

0.125mg/mL. Se usó como control antibiótico gentamicina en las mismas concentraciones, previamente probado como bactericida de bacterias tipo Gram (-) y como control negativo caldo sin antibiótico. Las diluciones se hicieron en placas de poliestireno de 96 pozos conteniendo caldo soya tripticasa con 2 % de NaCl, y se inocularon con 2  $\mu$ L de la bacteria a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  (UFC/mL). Las placas se incubaron a 30°C por 24h. La cinética de crecimiento se evaluó a través de la densidad óptica a 620 nm en un lector de microplacas (Anthos Zenyth 340st, Cambridge UK). Las mediciones fueron cada 30 min, con agitación de las cajas previa a cada lectura (Colosio-López, 2012).

#### **2.4.4 Análisis Estadístico**

Se evaluó el efecto inhibitorio de gentamicina, quitosano y COS frente al crecimiento de las dos especies de *vibrio*. Para el análisis estadístico se utilizó un diseño aleatorio simple. Los valores obtenidos de densidad óptica se transformaron a minutos de retraso de la fase Lag de la curva de crecimiento bacteriano con el software DMFit 2009. Estos valores se sometieron a un análisis de varianza con el software NCSS 2007. Posteriormente se analizaron las medias con una prueba de Tukey-Kramer a un nivel de significancia de 95% ( $p < 0.05$ ).

### **2.5 Elaboración y Caracterización de ME de Albúmina Cargadas con COS**

#### **2.5.1 Preparación de ME (COS/BSA)**

Las ME se prepararon por el método de emulsión agua en aceite (w/o) de acuerdo a Mathew, et al. (2007) con modificaciones por Sarabia-Sainz et al. (2012). Se mezclaron los oligómeros con BSA de suero bovino (BSA) en una relación 1:5, dentro de una fase acuosa; ésta se añadió a 30 mL de aceite mineral que contenía 1% de Span 80. Se mantuvo en agitación constante por 1h a 1600 rpm en un

agitador RW20 (IKA, México) para obtener una emulsión homogénea. Posteriormente, se adicionó glutaraldehído al 24% saturado en tolueno (GST) en una relación 1:1 como agente entrecruzante y se mantuvo en agitación por 2.5 h adicionales. Las ME obtenidas se lavaron con n-hexano en una proporción 1:1 (p/v) y se recuperaron por centrifugación a 2,500 rpm en una centrifuga IEC Clinical Centrifuge (USA). Posteriormente se realizaron 4 lavados con 15 mL de n-hexano para remover el exceso de aceite mineral y glutarhaldeído. Finalmente las ME se dejaron secar a temperatura ambiente.

### **2.5.2 Caracterización de las ME (COS/BSA)**

La caracterización de las ME consistió en el análisis de la morfología, tamaño de partícula y porcentaje de rendimiento.

La forma de las ME se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) en un microscopio JEOL-JSM-5900LV (USA). Este análisis fue realizado por el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Alta Resolución de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

La determinación del tamaño de partícula se hizo con un microscopio invertido Axio Vert A1. Carl Zeiss (USA). Para la medición del diámetro de 1,000 ME se utilizó el software Zen (Blue edition) de Carl Zeiss Microscopy (GmbH, 2011). El rendimiento de la producción de ME se midió en porcentaje y se obtuvo utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso total de ME} \times 100}{\text{Peso de BSA} + \text{Peso de COS}}$$

### **2.5.3 Determinación de la Presencia de COS por Espectroscopia Infrarroja**

Se confirmó la presencia de COS en las ME mediante la técnica de espectroscopía infrarroja (FT-IR) según lo descrito por Parida et al. (2012). Se utilizó una muestra sólida, mezclando 4 mg de ME con 5 mg de bromuro de potasio (KBr). La muestra se comprimió en una prensa hidráulica hasta 6000 psi por unos pocos segundos para formar una pastilla. A cada pastilla se le realizaron 32 escaneos en un espectrofotómetro FT-IR Protégé System 460 ESP (Madison WI, USA). Como control, se analizó BSA y COS libres, además de una mezcla de ambos en una relación (5:1). Se compararon los espectros infrarrojos característicos de la muestra y los controles.

## **2.6 Elaboración y Caracterización de ME de Albúmina Cargadas con Nanoesferas de PLGA que Contienen COS**

### **2.6.1 Preparación de ME (COS/PLGA/BSA)**

Las ME se elaboraron por técnica de emulsión múltiple w/o/w/o, la cual consistió en solubilizar 10 mg de COS en 200  $\mu$ L de agua. La mezcla obtenida se añadió a una solución de 30 mg de PLGA en 600  $\mu$ L de diclorometano más una gota de Tween 80, para propiciar la emulsión. Posteriormente, se añadió la emulsión a una solución de 230 mg de BSA en 1 mL de agua. Esta emulsión final se adicionó a 50 mL de aceite mineral que contenía 100  $\mu$ L de Span 80. Se mantuvo en agitación constante por 1 h a 1600 rpm en un agitador RW20 (IKA, México) para obtener una emulsión homogénea. Se le adicionó GST (1:1) como agente entrecruzante y se mantuvo en agitación por 2.5 h adicionales. Se utilizaron las mismas condiciones para los 6 tratamientos (Tabla 2) y solo se varió la concentración de GST utilizado y/o el pH de la solución de BSA. El ajuste de pH se realizó sustituyendo el 1 mL de agua donde se disolvió la BSA, por PBS a pH 5.5 (Abdelghany et al., 2012).

Las ME se lavaron con n-hexano 1:1 y se recuperaron por centrifugación a 2,500 rpm. Posteriormente se realizaron 4 lavados con 15 mL de n-hexano para remover el exceso de aceite mineral y glutaraldeído. Finalmente las ME se dejaron secar a temperatura ambiente.

Tabla 2. Tratamientos de elaboración de microesferas de albúmina cargadas con nanoesferas de PLGA que contienen oligómeros de quitosano

Tratamiento	Peso *GST mg/g	pH
1 (a)	8.2	7.4
2 (b)	8.2	5.5
3 (c)	4.2	7.4
4 (d)	4.2	5.5
5 (e)	2.10	7.4
6 (f)	2.10	5.5

\*

GST= Glutaraldehido saturado en tolueno

### 2.6.2 Caracterización de las ME (COS/PLGA/BSA)

La caracterización de las ME consistió en el análisis del tamaño de partícula y porcentaje de rendimiento, estos análisis se realizaron por las mismas técnicas ya mencionadas en el apartado 2.4.2. El rendimiento en porcentaje se obtuvo utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso total de ME} \times 100}{\text{Peso de BSA} + \text{Peso de COS} + \text{Peso de PLGA}}$$

## 2.7 Cinética de Liberación de COS

Los estudios de liberación *in vitro* se realizaron en ambas formulaciones de ME según el protocolo descrito por Sarabia-Sainz et al. (2012), el cual consistió en un sistema de diálisis dinámico. Se realizó una cinética de liberación de los COS por difusión a través de una membrana para diálisis de celulosa (D9277 de 100  $\mu\text{m}$  Sigma-Aldrich) a una temperatura de 25 °C y con búfer salino de fosfatos (PBS) a pH 7.4 en agitación constante. Se pesaron 20 mg de ME y se resuspendieron en 1 mL de PBS. La membrana con la suspensión de ME se colocó en un tubo con 15 mL de PBS. Se tomaron muestras a las 1, 3, 6, 24, 30, 48, 72 y 96 h. Al mismo tiempo, se hizo otra cinética de liberación a 4°C, a la cual se le tomó una sola muestra a las 96 h. En cada punto se compensó el volumen tomado del medio de liberación con PBS pH 7.4.

Los COS liberados en el ensayo cinético fueron detectados por espectrofotometría de grupos amino disponibles (OPA) (Fayle et al, 2001), usando una curva de COS a distintas concentraciones (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 0.005  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

## 2.8 Determinación de la Carga Eléctrica Superficial de las ME

La carga eléctrica superficial de las ME se midió mediante el potencial Z con un Zetasizer Nano Zs (Malvern Instruments). Las muestras consistieron en una suspensión de 1 mg/mL de ME en agua milli-Q y se realizaron por triplicado (Manual 0107 Malvern Instruments, Issue 1.1, Abril 1997).

## 2.9 Pruebas de Actividad Antibacteriana de COS Encapsulados

Se realizaron pruebas de actividad biológica de los COS en sus diferentes formas de encapsulación. Se midió la inhibición del crecimiento bacteriano por la técnica de microdilución seriada (Colosio-López, 2012). Se utilizaron los mismos modelos bacterianos, *Vibrio harveyi* CAIM 1792 y una cepa de *Vibrio* no patógeno CAIM 79

(Soto-Rodriguez et al. 2012). Se realizaron diluciones seriadas por triplicado con concentraciones desde 1mg/ml hasta 0.125mg/mL de los oligómeros encapsulados bajo las mismas condiciones que las pruebas de inhibición bacteriana de COS libres (apartado 2.4.3) . La cinética de crecimiento se midió a una densidad óptica de 620 nm en un lector de microplacas (Anthos Zenyth 340st, Cambridge UK) tomando una medición cada 30 minutos, con agitación previa a cada lectura (Colosio-López, 2012). La inhibición fue analizada como lo descrito anteriormente.

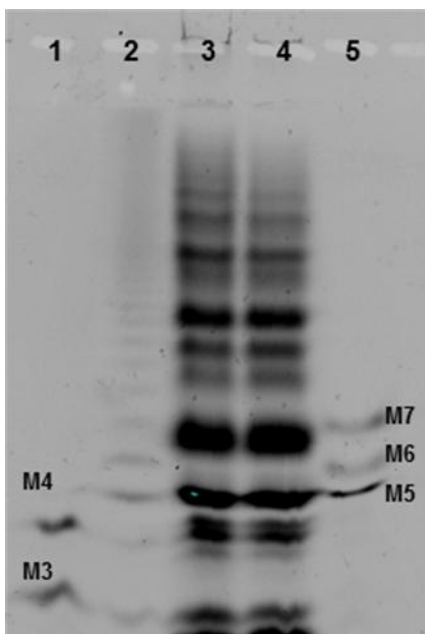
## **CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1 Caracterización de los COS**

#### **3.1.1 Caracterización de COS por FACE**

Para determinar el grado de polimerización de los oligómeros obtenidos por hidrólisis ácida de quitosano se realizó el análisis de electroforesis de carbohidratos marcados con un fluoróforo (Figura 3). La movilidad electroforética de los COS se comparó con estándares de oligómeros de glucosa. En el carril 1 Maltotriosa M3 (504.4 Da) y Maltotetrosa M4 (666.6 Da); en el carril 4 Maltopentosa M5 (828.7 Da), Maltohexosa M6 (990.9 Da) y Maltoheptosa M7 (1153 Da). En el perfil electroforético de los hidrolizados de quitosano (carriles 2 y 3) se encontraron oligosacáridos con un grado de polimerización (DP) menor a M3 y mayores a M7, razón por la cual se hizo indispensable la caracterización molecular de estos oligómeros mediante espectrometría de masas. Este estudio demostró que la metodología de hidrólisis de quitosano es reproducible, ya que se obtuvieron resultados muy similares en distintas preparaciones de COS.





**Fig. 3.** Perfil electroforético de carbohidratos marcados por ANTS. Carriles 1, estándares de oligómeros de glucosa M3 y M4; Carril 2 y 3 oligosacáridos de quitosano (20µg) obtenidos por hidrólisis ácida; Carril 4, oligómeros de glucosa M5, M6 y M7

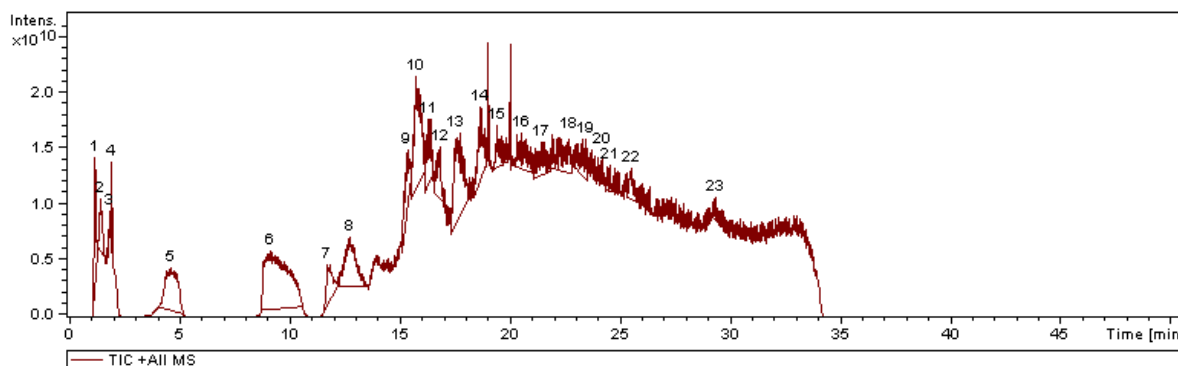
### 3.1.2 Caracterización de COS por HPLC-ESI-MS

La separación y detección de una mezcla de oligosacáridos es muy difícil debido a que estos analitos son muy polares, ramificados, no poseen cromóforos y son pobremente retenidos ó no retenidos en fase reversa. Se ha tratado de superar este problema de detección derivatizando el término reductor del oligosacárido. Sin embargo, esto requiere de pasos adicionales que demandan tiempo extra y manejo de muestra, lo que puede involucrar pérdidas y cambios en la estructura de la molécula. Por estas razones, en este trabajo se utilizó el método de separación cromatográfica reportado por Robinson et al., 2009, como un método exitoso para la separación de oligosacáridos (hexosas) sin derivatizar y que utiliza una fase estacionaria altamente selectiva de carbón grafitado poroso en un sistema de LC acoplado a un espectrómetro de masas con una fuente de ionización ESI (PGC-LC-ESI-MS por sus siglas en inglés). Los datos generados

fueron graficados como cromatograma de iones totales (TIC por sus siglas en inglés) (Figura 4) en donde el eje de las Y representa la abundancia de los iones presentes en el hidrolizado de quitosano, expresada como intensidad en el orden de  $10^{10}$  y en el eje de las X el tiempo de retención (Tr) en minutos. Esta figura nos muestra la separación de 23 picos, de los cuales al analizar sus espectros de masas se pudieron identificar los oligosacáridos presentes en los primeros 18 picos. Los resultados de este análisis se presentan en la tabla 3 que muestra que: efectivamente hubo una hidrólisis del quitosano observándose desde trímeros (DP3) hasta undecámeros (DP11) como iones protonados  $(M+H)^+$ , con aducto de sodio  $(M+23)^+$  y algunos también con aducto de potasio  $[(M+39)^+]$  (datos no mostrados), asimismo se logró la separación de isómeros. En los primeros minutos de la separación cromatográfica se eluyeron los trímeros, tetrámeros y pentámeros en la fase móvil de más de 90% acuosa. Conforme al suave incremento de la concentración del 2-propanol en el gradiente, los COS de DP6, DP7, DP8 y DP9 eluyeron y finalmente, a partir de los 19.3 minutos los COS de DP10 y DP11. Estos resultados concuerdan con los de Robinson et al. (2007) quienes usaron oligosacáridos de trigo.

Por otra parte, de los espectros de masas de cada pico se elucidó el grado de polimerización de los productos del hidrolizado de quitosano, y la composición de cada isómero (Tabla 3). Esto fue logrado debido a que los rompimientos de las moléculas fueron principalmente en los enlaces glucosídicos (iones B y Z de acuerdo a la nomenclatura de Domon y Costello (1988). Por mencionar un ejemplo, en la figura 5 se muestra el espectro de masas del pico 1(1.2-1.4 min), en donde el eje de las X representa la  $m/z$  en el rango de 100 a 2200 y en el eje de las Y la abundancia del ion expresado como intensidad en el orden de  $10^8$ . De este espectro se pudo identificar a 6 de los 8 posibles isómeros de los COS DP3 (3  $\text{GlcN}_2\text{-GlcNAc}_1$  y 3  $\text{GlcN}_1\text{-GlcNAc}_2$ ) y a 2 de los 16 isómeros de los COS DP4 ( $\text{GlcN}_3\text{-GlcNAc}_1$  y  $\text{GlcN}_2\text{-GlcNAc}_2$ ). Además se observó que el ion más abundante en este pico fue el  $\text{GlcN}_2\text{-GlcNAc}_1$  como se observa la figura 5 y en la tabla 3. De la misma manera se realizó el análisis para cada uno de los picos del cromatograma de iones totales y los resultados fueron resumidos en la tabla 3.

Los resultados antes descritos confirmaron los datos obtenidos por el análisis por FACE, donde se puede observar masas moleculares de 544 Da atribuibles a trímeros, hasta 2.12 KDa de undecámeros. Con una gran abundancia de trímeros, tetrámeros y hexámeros. Estos datos concuerdan con los posibles masas moleculares que reportan tener una mayor actividad antibacteriana (Benhabiles et al., 2012). Por medio de este análisis se pudo elucidar la composición de los hidrolizados, los isómeros así como sus masas moleculares, lo que enriquece el estudio de actividad biológica de los hidrolizados de quitosano.



**Fig. 4.** Cromatograma de iones totales de hidrolizados de quitosano

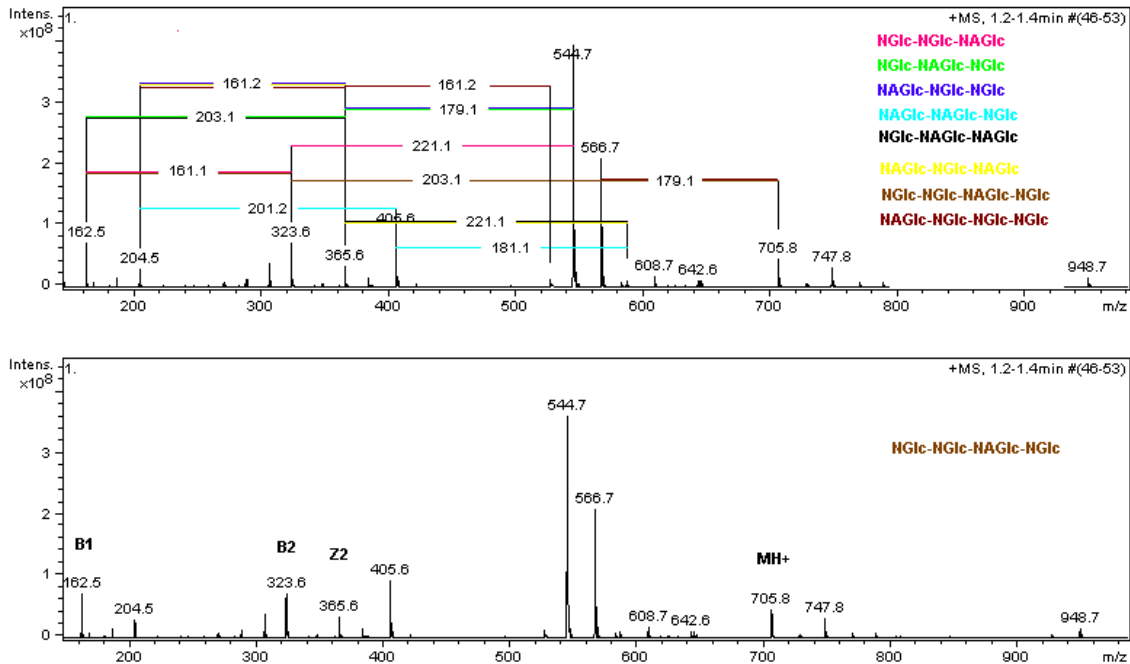
**Tabla 3.** Identificación de oligómeros de quitosano obtenidos del espectro de los picos del cromatograma de iones totales

No. Pico	Tr min	M+	MNa+	oligómero	Estructuras Identificadas
1	1.2-1.4	544	566	trímeros	2NGlc-1NAGlc +++
		586	608	trímeros	1NGlc-2NAGlc +
		705	727	tetrámeros	3NGlc-1NAGlc ++
		747	769	tetrámeros	2NGlc-2NAGlc ++
2	1.4-1.7	747	769	tetrámeros	2NGlc-2NAGlc ++++
		866	890	pentámeros	4NGlc-1NAGlc ++
		908	931	pentámeros	3NGlc-2NAGlc ++
		1027	1049	hexámeros	5NGlc-1NAGlc +

Caracterización del hidrolizado de quitosano por HPLC-MS (Continuación)					
No.					Estructuras
Pico	Tr min	M+	MNa+	oligómero	Identificadas
3	1.8-2.0	1069	1091	hexámeros	4NGLc-2NAGlc +
4	2.0-2.1	908	930	pentámeros	3NGLc-2NAGlc +
		1069	1091	hexámeros	4NGLc-2NAGlc
5		789	811	tetrámeros	1NGLc-3NAGlc +++
		950	973	tetrámeros	2NGLc-3NAGlc +
		1069	1091	hexámeros	4NGLc-2NAGlc+
6	8.0-10.6	950	973	tetrámeros	2NGLc-3NAGlc +++
		1111	1133	hexámeros	3NGLc-3NAGlc+
7	11.6-12.3	789	811	tetrámeros	1NGLc-3NAGlc +++
		1111	1133	hexámeros	3NGLc-3NAGlc+
8	12.3-13.5	1153	1175	hexámeros	2NGLc-4NAGlc+
9	13.7-14.7	1111	1133	hexámeros	3NGLc-3NAGlc++
		1153	1175	hexámeros	2NGLc-4NAGlc+
10	15.1-15.6	1111	1133	hexámeros	3NGLc-3NAGlc+++
		1153	1175	hexámeros	2NGLc-4NAGlc+++
		1272	1294	heptámeros	4NGLc-3NAGlc +
		1314	1336	heptámeros	3NGLc-4NAGlc +
11	15.6-16.2	1111	1133	hexámeros	3NGLc-3NAGlc++
		1153	1175	hexámeros	2NGLc-4NAGlc+++
		1314	1336	heptámeros	3NGLc-4NAGlc +
12	16.2-16.6	1111	1133	hexámeros	3NGLc-3NAGlc++++
		1153	1175	hexámeros	2NGLc-4NAGlc+++
		1356	1378	heptámeros	2NGLc-5NAGlc ++
		1559	1581	octámeros	2NGLc-6NAGlc+
13	16.6-17.2	1111	1133	hexámeros	3NGLc-3NAGlc+++
		1153	1175	hexámeros	2NGLc-4NAGlc++
		1272	1294	heptámeros	4NGLc-3NAGlc +
		1314	1336	heptámeros	3NGLc-4NAGlc +
		1356	1378	heptámeros	2NGLc-5NAGlc +
Caracterización del hidrolizado de quitosano por HPLC-MS (Continuación)					

No. Pico	No. Pico	No. Pico	No. Pico	No. Pico	No. Pico
14	17.3-18.1	1195	1217	hexámeros	1NGLc-5NAGlc ++
		1153	1175	hexámeros	2NGLc-4NAGlc+
		1272	1294	heptámeros	4NGLc-3NAGlc ++
		1314	1336	heptámeros	3NGLc-4NAGlc ++
		1356	1378	heptámeros	2NGLc-5NAGlc ++
		1517	1539	octámeros	3NGLc-5NAGlc +
15	18.4-19.0	1111	1133	hexámeros	3NGLc-3NAGlc+
		1195	1217	hexámeros	1NGLc-5NAGlc ++
		1153	1175	hexámeros	2NGLc-4NAGlc+
		1272	1294	heptámeros	4NGLc-3NAGlc ++
		1314	1336	heptámeros	3NGLc-4NAGlc ++
		1356	1378	heptámeros	2NGLc-5NAGlc ++
		1398	1420	heptámeros	1NGLc-6NAGlc ++
		1475	1498	octámeros	4NGLc-4NAGlc
		1517	1539	octámeros	3NGLc-5NAGlc +
		1559	1581	octámeros	2NGLc-6NAGlc+
		1678	1700	nonámeros	4NGLc-5NAGlc+
		1720	1742	nonámeros	3NGLc-6NAGlc+
16	19.3-20	1923	1945	decámeros	3NGLc-7NAGlc+
+ los mismos isómeros del minuto 15					
17	20.2-21.0	igual que los isómeros del minuto 16			
18	21.1-21.8	2042	2064	undecámeros	5NGLc-6NAGlc+
		2085	2108	undecámeros	4NGLc-7NAGlc+
		2126	2149	undecámeros	3NGLc-8NAGlc+

+ representa la abundancia del oligómero por pico



**Fig. 5.** Espectro de masas del pico 1(1.2-1.4 min).

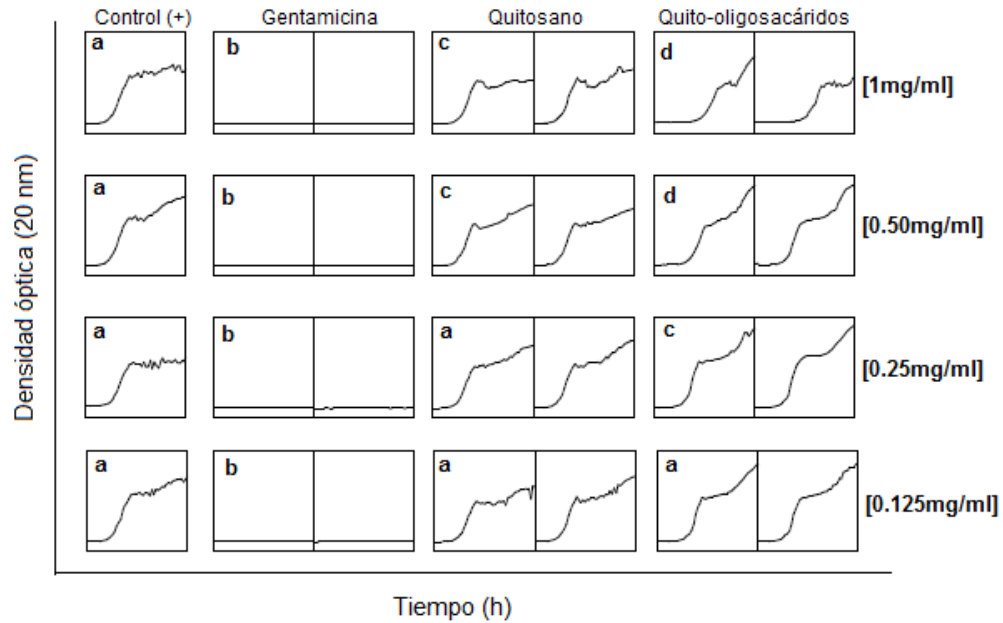
### 3.1.3 Pruebas de Actividad Antimicrobiana

Como pruebas de actividad biológica, se evaluó la susceptibilidad de una cepa patógena *Vibrio harveyi* (CAIM 1792) y *V. harveyi* no patógeno (CAIM 79) (Figuras 6 y 7) (Soto-Rodríguez et al. 2012). Se utilizó como control al antibiótico gentamicina y como alternativas antibacterianas al quitosano nativo y los COS. De igual manera se incluyó un control negativo sin antimicrobiano, del cual se representa su cinética de crecimiento en la primera columna de las figuras. Donde se observa el crecimiento natural de la bacteria, con un comportamiento de crecimiento bifásico para el *vibrio* patógeno y de una sola fase para *Vibrio* inocuo. En la columna 2 (Figuras 6 y 7) se observa el comportamiento en presencia de gentamicina. Como era de esperarse no hubo crecimiento por su sensibilidad a ese antibiótico. En cuanto a quitosano, el polisacárido nativo y los COS (columnas 3 y 4), presentaron actividad bacteriostática ya que no se observó una inhibición, pero si un retraso en el crecimiento bacteriano.

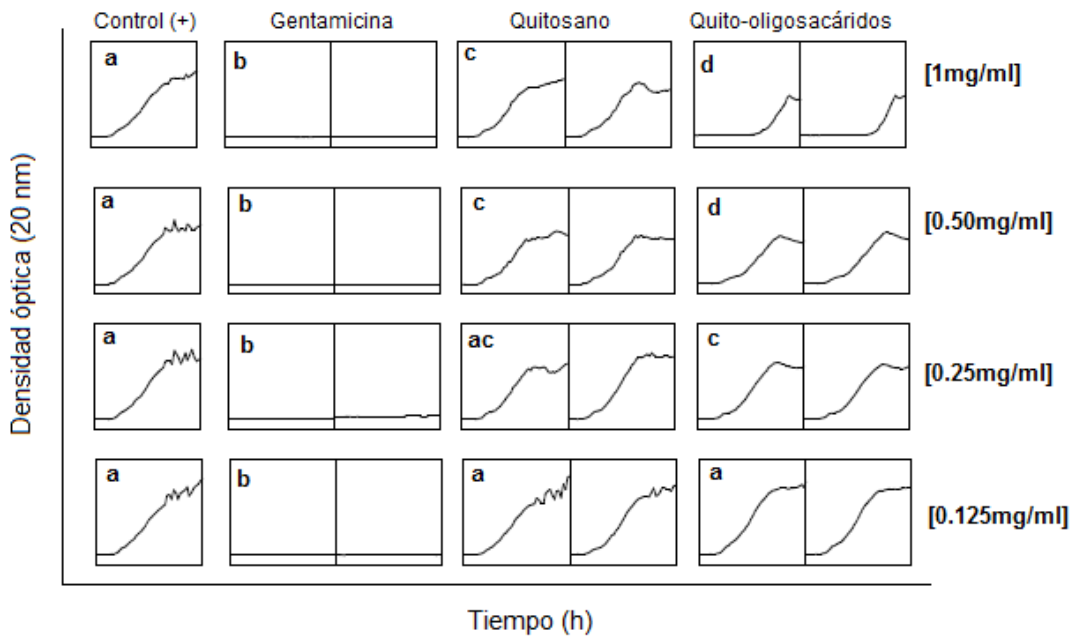
En la tabla 4 se reporta el retraso de la fase Lag de la cinética de crecimiento de las distintas bacterias, donde quitosano retrasó levemente el crecimiento ( $8.2 \pm 0.013$  y  $7.8 \pm 0.011$  h) de *V. harveyi* CAIM 79 y CAIM1792 respectivamente. Mientras que los COS tuvieron una fase Lag a las  $10.3 \pm 0.023$  y  $14.6 \text{ h} \pm 0.024$  mostrando un mayor retraso para las mismas bacterias. Se pudo observar que, en comparación con el control bacteriano y el polímero nativo, los COS mostraron un mayor retraso. Llegando a detener el crecimiento hasta 6.8 h más con respecto al quitosano. Estos resultados nos demuestran que aunque no se alcanzó una inhibición total del crecimiento, el hidrolizar el quitosano y generar moléculas de menor masa presenta una ventaja en la inhibición de las bacterias en la primera fase de su crecimiento. Ya que los COS poseen una serie de grupos aminos policatiónicos que pueden interactuar con los residuos cargados negativamente de carbohidratos, lípidos y proteínas localizadas en la superficie celular de las bacterias, lo cual lleva a la muerte bacteriana (Kim y Rajapakse, 2005).

Además, si la masa molecular del quitosano es baja, sus cadenas de polímero tienen una mayor flexibilidad para unir más de una célula. Por lo tanto, los puentes entre las células bacterianas y las cadenas de polímero de quitosano se forman rápidamente, por lo que las bacterias son inmediatamente inactivadas (Lin et al., 2009).

Estos resultados concuerdan por los reportados por Benhabiles et al. (2012), donde se analizaron las actividades antibacterianas de quitina, quitosano y sus oligómeros contra *V. cholerae* y otras bacterias. Ellos determinaron que quitina y quitosano pueden ser caracterizados como agentes bacteriostáticos en vez de bactericidas. Quitina y quitosano mostraron un efecto bacteriostático en bacterias Gram-negativas como *E. coli* ATCC 25922, *V. cholerae* y *S. dysenteriae*. Mientras que sus oligómeros tuvieron un efecto bactericida en todas las cepas probadas. Sin embargo, aunque en este estudio se utilizaron condiciones similares para la elaboración de los COS, ellos no reportan la masa de sus oligosacáridos ni la concentración de bacteria utilizada, por lo que eso podría ser la razón por la que los resultados de nuestro trabajo son diferentes.



**Fig. 6.** Comparación del efecto de gentamicina, quitosano y oligómeros de quitosano en el crecimiento de *Vibrio harveyi* patógeno (CAIM 1792). Letras distintas en cada columna indica diferencias estadísticas a un nivel de significancia del 5%.



**Fig. 7.** Comparación del efecto de gentamicina, quitosano y oligómeros de quitosano en el crecimiento de *V. harveyi* no patógeno (CAIM 79). Letras distintas en cada columna indica diferencias estadísticas a un nivel de significancia del 5%.

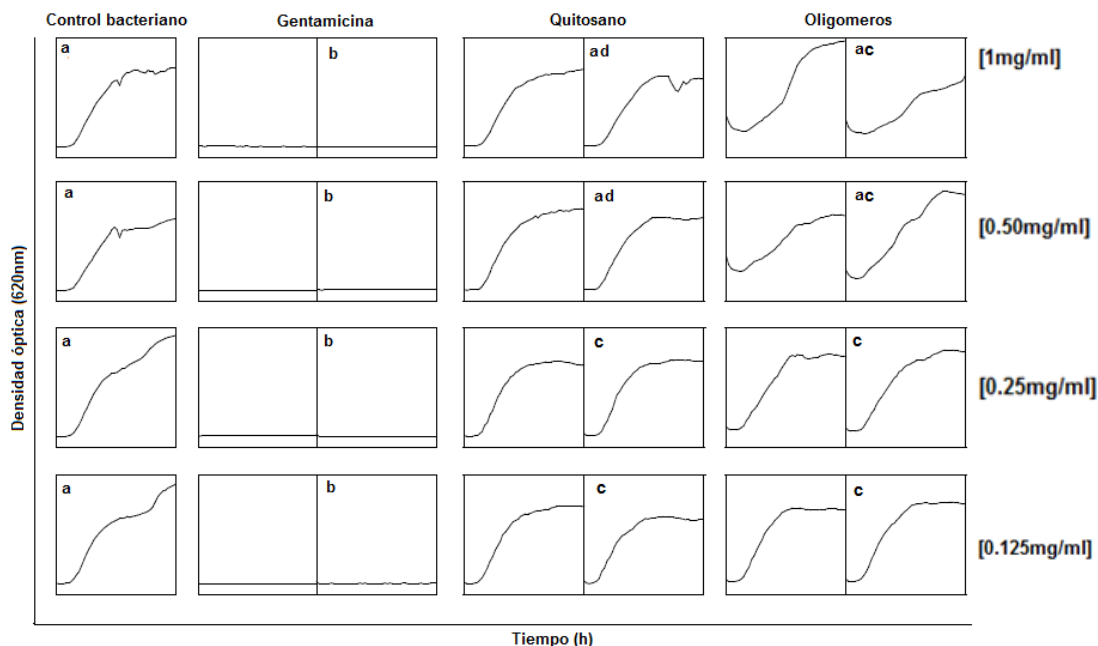


Tabla 4. Comparación de las Fases Lag del crecimiento bacteriano de distintas cepas utilizando quitosano nativo y oligómeros de quitosano.

<b>Fase Lag (h)</b>			
Bacterias	Control bacteriano	Quitosano	COS*
<i>V. harveyi</i> CAIM 79	7.4 ± 0.023	8.2 ± 0.013	14.6 ± 0.024
<i>V. harveyi</i> CAIM 1792	8.5 ± 0.016	7.8 ± 0.011	10.3 ± 0.023
<i>E. coli</i> (control)	2.5 ± 0.022	2.9 ± 0.0201	7.5 ± 0.027

Quito-oligosacáridos (COS). Las microesferas se ajustaron a una concentración de 1mg/mL

Adicionalmente se realizó la misma prueba de inhibición en una bacteria control, *Escherichia coli* H10407 ATCC 3540 (Figura 8). En este estudio se observó que también un efecto bacteriostático en el crecimiento bacteriano al utilizar tanto el quitosano nativo como los COS. Igualmente se analizaron los tiempos de retraso de la fase lag en la mayor concentración utilizada (Tabla 4) y se observó que el retraso de quitosano fue de 2.9 h, lo cual no tuvo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el crecimiento natural de la bacteria. En cambio, COS pudo retrasar hasta 7.5 h el crecimiento de *E. coli*, por lo que nos confirma que los COS poseen un efecto bacteriostático más que bactericida. Por lo tanto, sería importante realizar estudios con masas moleculares específicas para determinar si fracciones con baja o alta masa molecular mejoran la actividad biológica.



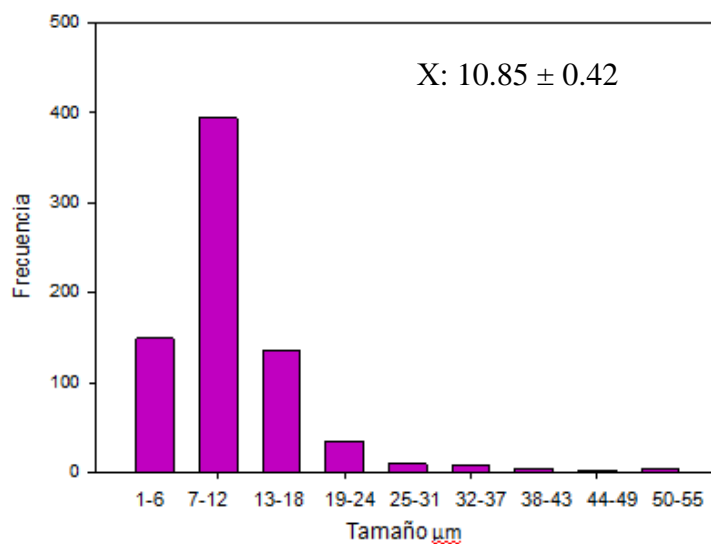
**Fig. 8.** Comparación del efecto de gentamicina, quitosano y oligómeros de quitosano en el crecimiento de *Escherichia coli* H10407 ATCC 3540. Letras distintas en cada columna indica diferencias estadísticas a un nivel de significancia del 5%.

### 3.2 Caracterización de ME de Albúmina Cargadas con COS

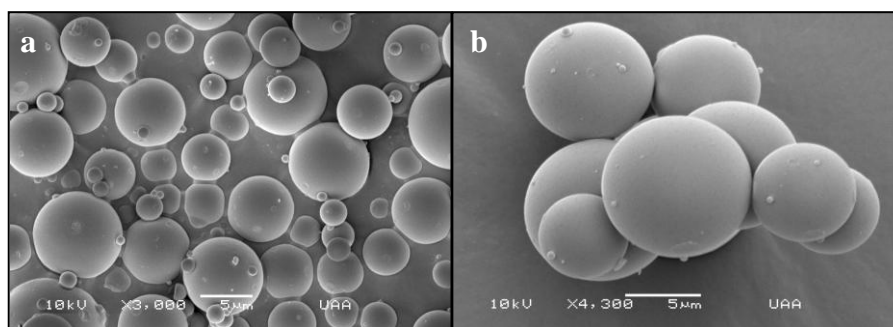
Se elaboraron ME de BSA cargadas con COS por la técnica de emulsión agua en aceite (Mathew et al. 2007). Se midió el diámetro de 1000 esferas por duplicado utilizando un microscopio invertido Axio Vert Al. Carl Zeiss (USA). Posteriormente se realizó un histograma para determinar su tamaño promedio (Figura 9). Se obtuvieron partículas con un diámetro promedio de 10.85  $\mu\text{m}$ , donde el 63% de las ME se encontró entre 7 y 12  $\mu\text{m}$ . Este resultado está dentro del intervalo de tamaño requerido para permanecer en el hepatopáncreas del camarón (Veri et al. 2001) y permitir la liberación del antibacteriano.

La micrografía por SEM (Figura 10) mostró, que las partículas son esféricas muy homogéneas y con superficie lisa, además confirmó los resultados obtenidos del diámetro promedio.

El porcentaje de rendimiento de las ME fue del 70.5%, lo cual concuerda con otros estudios (Sarabia-Sainz et al., 2012) donde se ha utilizado la misma matriz soporte (BSA) y la misma técnica de elaboración de esferas por emulsión agua en aceite (W/O). Mathew et al., (2007), Mathew et al., (2009) y Sarabia-Sainz et al., (2012) reportaron porcentajes de rendimiento desde un 70 hasta un 95%, lo cual indica que el método de recuperación de ME es eficiente.



**Fig. 9.** Distribución de tamaños de las microesferas de albúmina cargadas de oligómeros de quitosano.

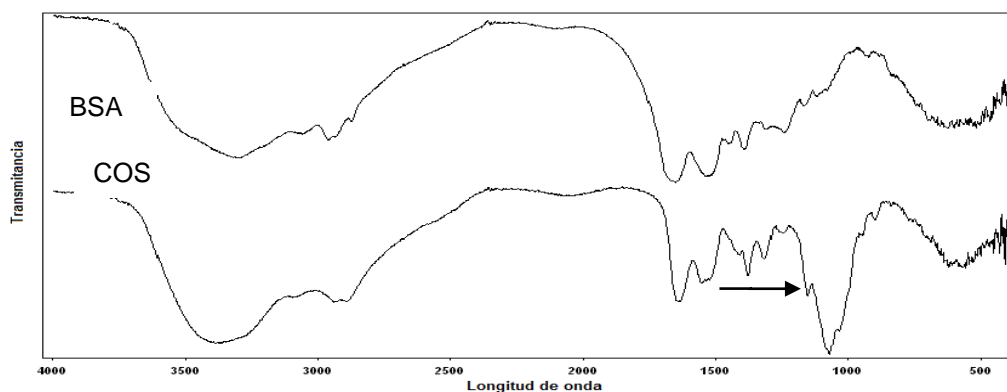


**Fig. 10.** Micrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de las microesferas de albúmina cargadas con oligómeros de quitosano. a (micrografía a X3,000) y b (micrografía a X4,300)

### 3.2.1 Determinación de la Presencia de COS por Espectroscopia Infrarroja

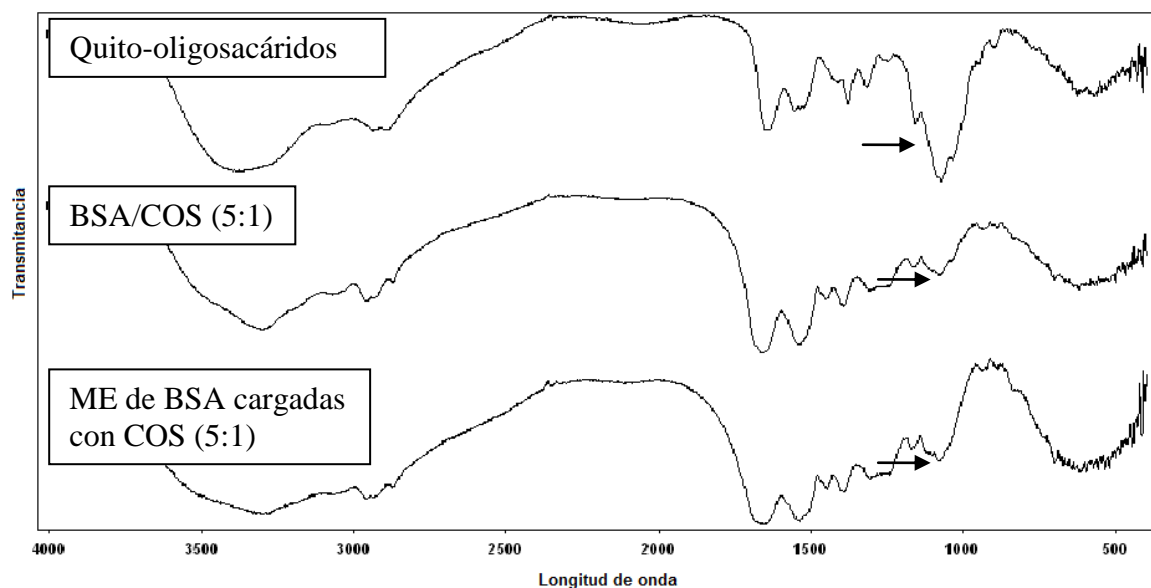
Se realizó un análisis por espectroscopia infrarroja para determinar la presencia de los COS en las ME de BSA. Como controles se utilizaron BSA y COS libres.

Al comparar el control de la BSA sola contra los COS libres, se pudo observar la aparición de la banda característica de los grupos N-acetilo presentes en los COS ( $1320\text{ cm}^{-1}$ ) y la banda entre  $1420$  y  $1435\text{ cm}^{-1}$  que se considera una región de conformación sensible para polisacáridos y depende de la orientación del grupo hidroxilo, lo cual nos ayuda a identificar a los COS (Figura 11) (Kishu-Kumar et al., 2005).



**Fig. 11.** Espectro infrarrojo de los controles albúmina y oligómeros de quitosano libres

Posteriormente se analizaron los espectros de infrarrojo de los COS libres, una mezcla de BSA y COS en una relación (5:1) y las ME de BSA cargadas con COS con una relación similar (Figura 12). Se pudo observar la misma banda característica de los grupos N-acetilo tanto en la mezcla como en las esferas. De tal manera que se concluye que los COS están presentes en las ME de BSA. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vishu-Kumar (2005), donde se obtuvo la misma banda de los grupos N-acetilo a una longitud de onda de  $1100\text{ cm}^{-1}$  tanto en quitosano como en COS. También se observó en los COS un cambio en la intensidad de la banda al aumentar la acetilación en el caso de los oligosacáridos (Vishu-Kumar et al., 2005)



**Fig. 12.** Espectro infrarrojo de oligómeros de quitosano libres, mezcla de albúmina/oligómeros de quitosano (5:1) y microesferas de albúmina cargadas con oligómeros de quitosano (5:1).

### 3.2.2 Cinética de Liberación de COS

Se realizó un ensayo por determinación de grupos amino disponibles (OPA) (Fayle et al, 2001) para establecer el porcentaje de liberación del fármaco a partir de las ME-COS/BSA. Sin embargo, al realizar el análisis no fue posible detectar la liberación de COS al menos por esta técnica.

Para la elaboración de las ME se utilizó la técnica de emulsión agua en aceite (W/O por sus siglas en inglés) (Griffin, 1949), donde el agua es la fase dispersa y el aceite es el medio de dispersión. Para llevar a cabo el microencapsulamiento del antibiótico con la proteína, es necesario estabilizar por entrecruzamiento las micropartículas formadas en la emulsión. Sin embargo, el uso de GST como entrecruzante, promueve la unión de grupos amino tanto de la BSA como de los COS de manera indiscriminada, por lo que hubo una retención del fármaco. Debido a lo anterior, creemos que esta falta de liberación se debió al grado de entrecruzamiento y no a la falta de encapsulación del agente activo. Al realizar el análisis por infrarrojo de las ME con COS se demostró que estos últimos

están presentes en las ME, por lo que se descartó una posible falta de encapsulación. Por esta razón, aunque los COS están presentes, su liberación es mínima o nula y no pueden ser detectados por el ensayo de OPA.

Esta estabilización por entrecruzamiento es dependiente del grado de entrecruzamiento. En este sentido, con grados muy altos de entrecruzamiento se puede obtener una mayor retención y protección del fármaco, sin embargo, esto podría ocasionar una mala liberación (Huopalathi et al., 2007). Por lo tanto, se buscaron otros métodos de encapsulación para promover una mayor liberación del fármaco. De ahí, que se decidió utilizar una técnica por emulsión W/O/W/O (Abdelghany et al., 2012) formando nanopartículas temporales de PLGA con los oligosacáridos para prevenir el entrecruzamiento de estos con la matriz de BSA.

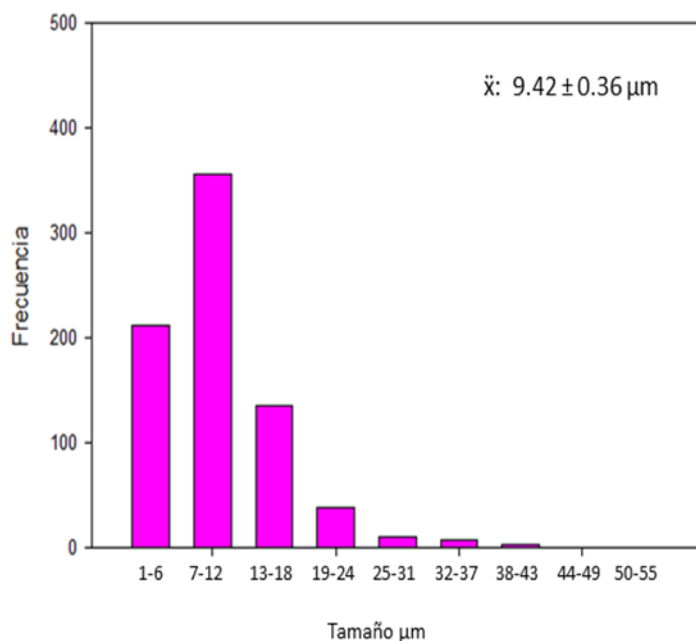
### 3.3 Caracterización de ME de Albúmina Cargadas con Nanoesferas de PLGA con COS

Entre las diferentes clases de polímeros biodegradables, el PLGA ha generado gran interés debido a sus propiedades favorables tales como una buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y resistencia mecánica. Además, es fácil de formular diferentes dispositivos para la realización de una variedad de clases de fármacos tales como vacunas, péptidos, proteínas y micromoléculas (Jain, 2000). Debido a lo anterior, se decidió utilizar el PLGA como polímero matriz para la formación temporal de nanopartículas cargadas de COS, con la finalidad de evitar el entrecruzamiento con la BSA y mejorar la liberación.

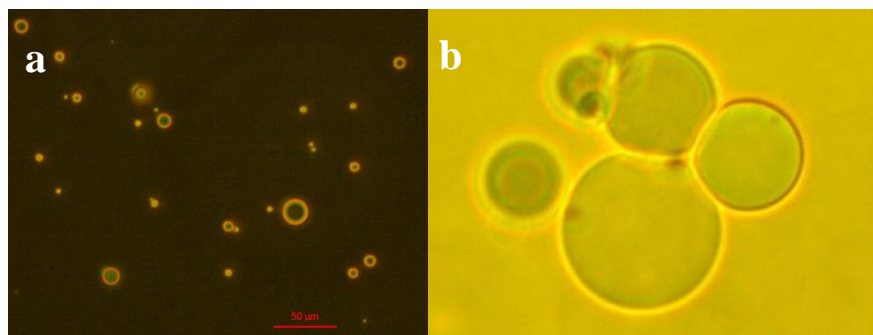
Se elaboraron ME de BSA cargadas con nanoesferas de PLGA con COS por la técnica de emulsión múltiple agua en aceite. Se midió el diámetro de 1000 esferas por duplicado utilizando un microscopio invertido Axio Vert Al. Carl Zeiss (USA). Posteriormente se realizó un histograma (Figura 13) para determinar el tamaño promedio. Se obtuvieron partículas con un diámetro promedio de  $9.42 \pm 0.36 \mu\text{m}$ , donde el 69% de las ME se encontró entre 7 y  $12 \mu\text{m}$ . Este resultado

muestra que aún con el cambio en la técnica de elaboración las esferas se mantienen en el mismo intervalo de tamaño que la técnica antes probada.

Se observaron por microscopía óptica (Figura 14) micropartículas esféricas muy homogéneas, parecidas a las obtenidas anteriormente, sin embargo a estas no se les analizó por SEM, pero muestran características similares. El porcentaje de rendimiento de ME obtenido fue del 72.7%, el cual es similar a los resultados obtenidos para las primeras esferas elaboradas por la técnica por emulsión W/O. Esto nos indica que ambos métodos de elaboración son similares y se pueden obtener partículas con características semejantes.



**Fig. 13.** Distribución de tamaños de ME de albúmina cargadas de nanoesferas de PLGA con COS.



**Fig. 14.** Micrografías tomadas por microscopía óptica de las microesferas de albúmina cargadas con nanoesferas de PLGA con oligómeros de quitosano. (a) micrografía a 10X y (b) micrografía a 40X

### 3.3.1 Cinética de Liberación de COS

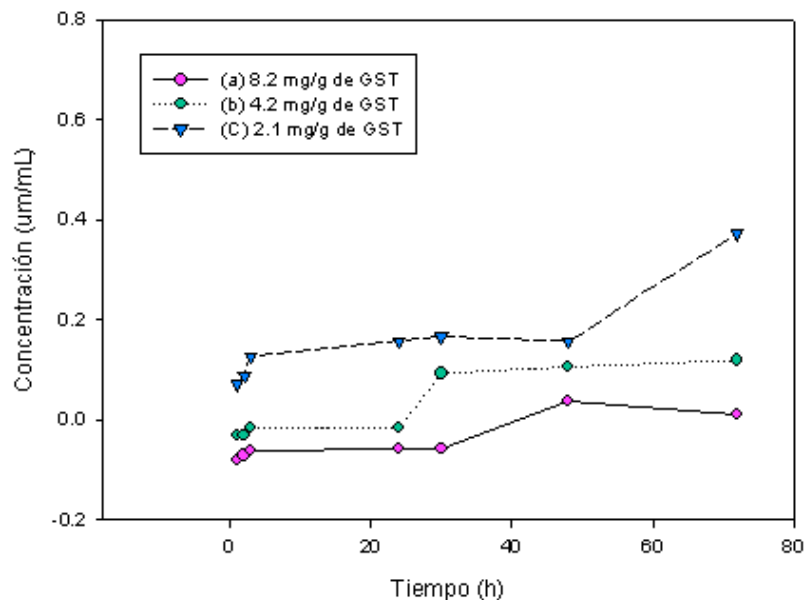
Se realizó un ensayo por determinación de grupos amino disponibles (OPA) (Fayle et al, 2001) para establecer el porcentaje de liberación del fármaco. Con este análisis se buscaba conocer cual tratamiento tenía una mayor liberación del agente bioactivo. Se analizaron 6 tratamientos preparados a partir de concentraciones diferentes del agente entrecruzante (glutaraldehído) (Tabla 2) y de pH, utilizados para evitar la unión de los grupos aminos de los COS con la matriz soporte.

Con las gráficas de liberación de los COS (Figuras 15 y 16), se pudo observar fue dependiente tanto de la concentración del entrecruzante como del pH. Al utilizar la menor concentración de GST (2.1mg/g), se mejoró la liberación del fármaco y fue suficiente para mantener estables las ME, es decir que no se deshicieran al momento del lavado. Además, se observó que el utilizar un menor pH (5.5) en la elaboración de las ME, también promovió una mejor liberación. Estos resultados se pueden deber a que los grupos carboxilo en el PLGA se ionizan y las partículas poseen una carga neta negativa en su superficie. Además, el pKa del grupo amino primario del quitosano es 6.3 a 7.0 y el polímero es soluble en agua a un pH por debajo de su pKa. Por lo tanto, el quitosano es soluble a pH 5 y sus grupos amino están protonados lo que resulta en una carga neta positiva.

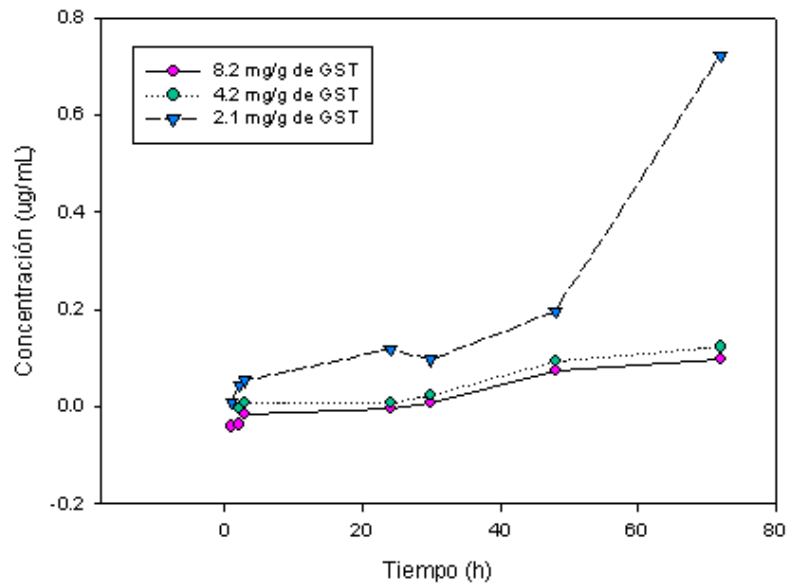


Una interacción electrostática entre las partículas de PLGA cargadas negativamente y el quitosano cargado positivamente resulta en la adsorción del quitosano sobre la superficie del PLGA (Figura 17). Además, el quitosano también reacciona con la superficie activada de los grupos carboxilo en la suspensión de partículas de PLGA para formar un enlace amino (Chakravarthi, 2008). De tal manera, que a un pH bajo se promueve una interacción temporal del PLGA con los COS de quitosano para evitar un entrecruzamiento con la matriz soporte al momento de estabilizar con glutaraldehído las ME de BSA.

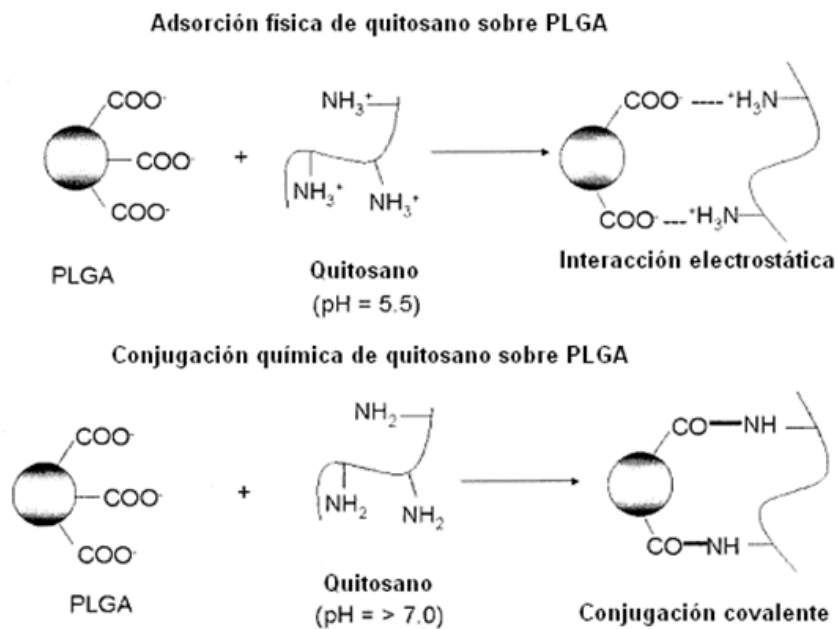
Una vez realizados estos estudios se determinó que la muestra con mayor liberación fue donde se utilizaron 2.10 mg/mL de GST a un pH de 5.5. Por lo tanto, decidimos utilizar estas ME para las pruebas de inhibición bacteriana.



**Fig. 15.** Gráfica de liberación de oligómeros de quitosano a partir de microesferas de albúmina elaboradas por la técnica de encapsulación por doble emulsión a pH 7.4. \*Glutaraldehído saturado en tolueno (GST)



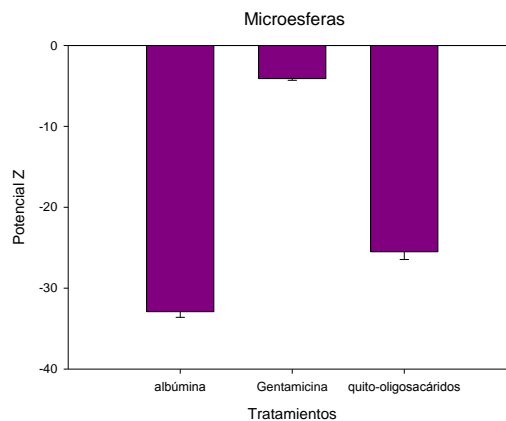
**Fig. 16.** Gráfica de liberación de oligómeros de quitosano a partir de microesferas de albúmina elaboradas por la técnica de encapsulación por doble emulsión a pH 5.5. \*Glutaraldehído saturado en tolueno (GST)



**Fig. 17.** Esquema ilustrativo del mecanismo de adsorción o conjugación química del quitosano y PLGA (Chakravarthi, 2008 con modificaciones)

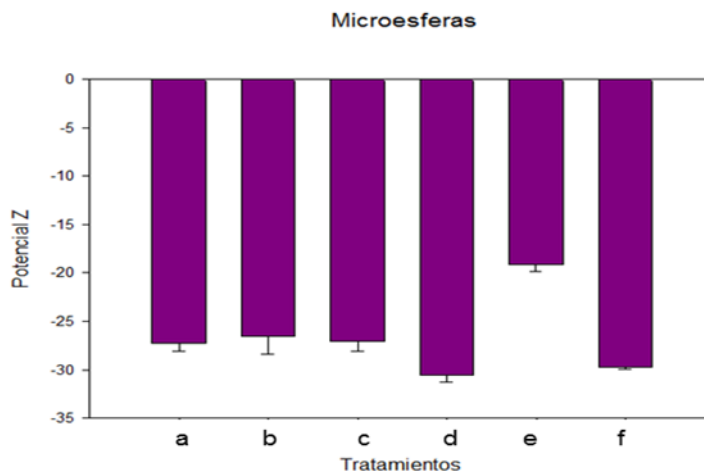
### 3.4 Determinación de la Carga Eléctrica Superficial de las ME

Se midió el potencial Z de las ME de BSA cargadas con COS para determinar su carga superficial (Figura 18). Se utilizaron como controles a las ME hechas solo de BSA y ME con un antibiótico control (gentamicina). Estos controles se compararon con la muestra de ME de BSA cargadas con COS. Se observó que en los 3 casos hubo una carga eléctrica superficial negativa. Sin embargo, en el caso de las ME cargadas con el agente bioactivo, hubo una variación en el potencial Z. Esta variación se debe a las características cationicas que poseen estos agentes bioactivos. Además, este cambio en la carga superficial nos indica que los fármacos incorporados en las ME se encuentran dispersos tanto dentro como en la superficie de la ME. Esto concuerda con otros estudios, donde se ha observado que la adición de algún agente bioactivo en matrices de encapsulamiento, puede provocar un cambio en la superficie de la partícula (Lecaróz, et al., 2006). Esto es importante ya que se deberá tomar en cuenta si se quisiera biodirigir estos vehículos de administración de fármacos, debido a que la superficie de estos vectores se puede conjugar con un ligando que posea actividad biológica con un receptor para un sitio diana específico y esto se puede llevar a cabo por medio de interacciones electrostáticas (Adams et al., 2001).



**Fig. 18.** Medición de la carga eléctrica superficial de las microesferas de albúmina, albúmina con gentamicina y albúmina con oligómeros de quitosano. Media  $\pm$  error estándar de 3 observaciones por tratamiento.

Posteriormente se midió el potencial Z de las ME de BSA cargadas con nanoesferas de PLGA con COS (Figura 19). Aquí se observó que todos los tratamientos independientemente de la concentración de GST o el pH mostraron una carga negativa, lo que nos indica que la superficie si está formada por nuestra matriz soporte, ya que a pesar de la naturaleza catiónica de los COS, la carga final se conservó negativa. También, se pudo observar que la concentración de GST y la variación en el pH si afecta la relación del agente bioactivo en la superficie de la esfera. Ya que a menor concentración de entrecruzante y pH se pudo ver un incremento en la negatividad de la carga superficial (-29.73 mV) comparado con el tratamiento con mayor concentración de GST y pH neutro (-26.53 mV), lo que nos indica que hay menor cantidad de COS en la superficie. Esto podría deberse a que una menor cantidad del GST y un menor pH disminuye el entrecruzamiento por lo que los COS no quedan tan expuestos en la superficie y la carga es más negativa debido a la BSA.



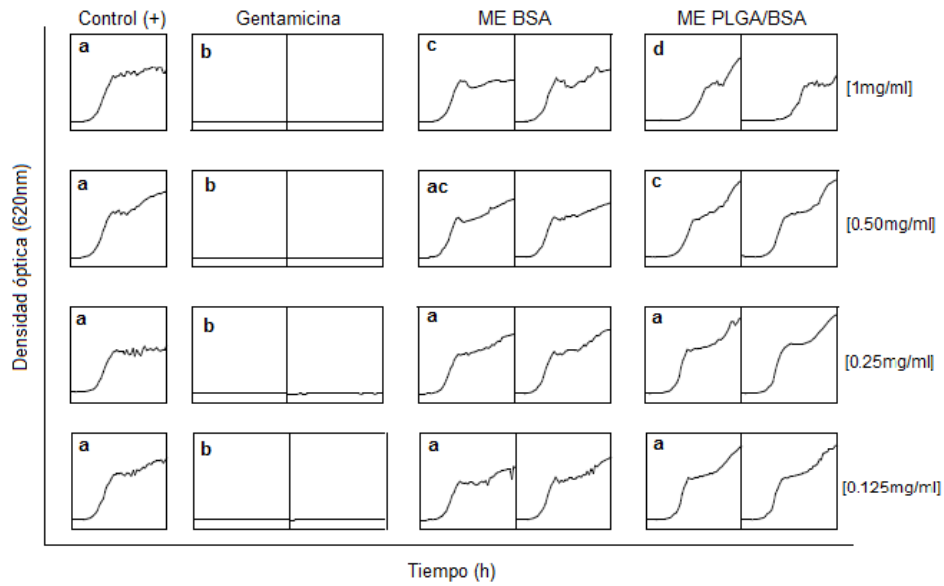
**Fig. 19.** Medición de la carga eléctrica superficial de las microesferas de albúmina cargadas con nanoesferas de PLGA con oligómeros de quitosano. Media  $\pm$  error estándar de 3 observaciones por tratamiento. \* a y b (8.2 mg/mL de glutaraldehído a pH 7.4 y 5.5 respectivamente), c y d (4.2 mg/mL pH 7.4 y 5.5), e y f (2.10 mg/mL pH 7.4 y 5.5).

### 3.5 Actividad Antibacteriana de COS Encapsulados

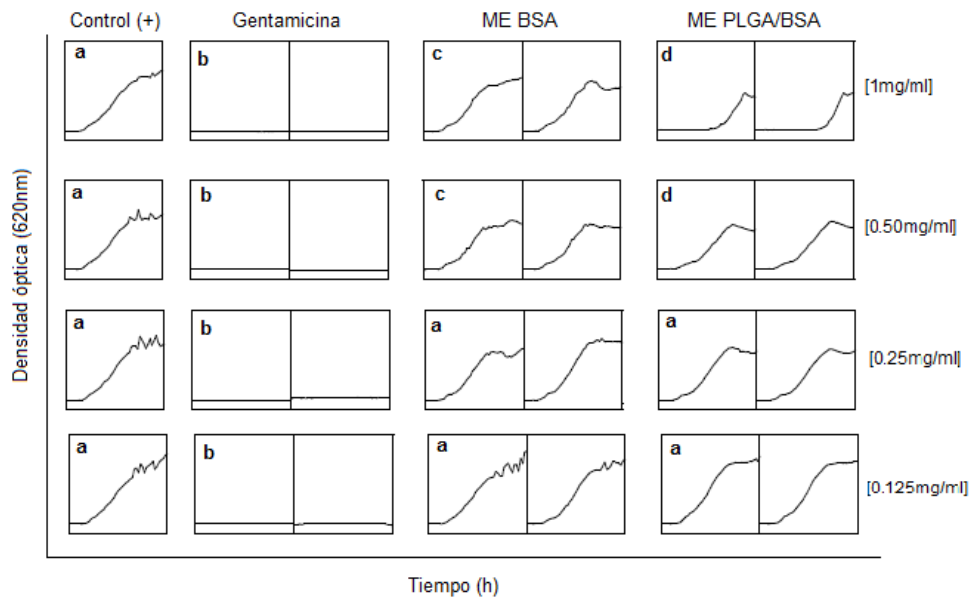
Se realizaron pruebas biológicas para determinar la capacidad antimicrobiana de los COS encapsulados (Figuras 20 y 21), utilizando la misma técnica de microdilución seriada. Como control positivo se incluyó el comportamiento natural de la bacteria (columna 1 de izquierda a derecha de las figuras). Como control antimicrobiano se usó gentamicina (columna 2). Al mismo tiempo, se probaron los COS encapsulados por las dos técnicas de síntesis (columnas 3 y 4): emulsión W/O (ME-COS/BSA) y emulsión múltiple W/OW/O, (ME-COS/PLGA/BSA).

Los gráficos muestran que los dos encapsulamientos de COS tuvieron actividad bacteriostática al retrasar la fase LAG del crecimiento bacteriano. Las ME-BSA/COS mostraron un retraso del crecimiento de  $8.1 \pm .032$  y  $7.9 \pm 0.019$  h frente a *V. harveyi* CAIM 79 y 1792, respectivamente. Las ME-COS/PLGA/BSA  $12.6 \pm 0.018$  y  $9.3 \pm 0.021$  h de retraso frente a las mismas bacterias (Tabla 5). Al comparar las horas de retraso entre las dos formulaciones de ME, se observó una mayor actividad bacteriostática ( $p < 0.05$ ) con los COS encapsulados por emulsiones múltiples. Como ambas técnicas de síntesis contenían COS, la diferencia de tiempo de retraso del crecimiento bacteriano se debe a la cantidad de liberación del agente activo.

Por lo tanto, se puede concluir que la formulación de ME por emulsiones múltiples libera una mayor concentración de COS. Esto se atribuye a que al haberse formado las nanopartículas temporales de PLGA cargadas con COS, se evita la interacción de los grupos amino de los oligómeros con la matriz de albúmina, lo cual propicia que los COS no estén entrecruzados de forma covalente y se puedan liberar por gradiente de concentración.



**Fig. 20.** Comparación del efecto de gentamicina, microesferas de albúmina y microesferas de albúmina cargadas con nanoesferas de PLGA en el crecimiento de *Vibrio harveyi* patógeno (CAIM 1792). Letras distintas en cada columna indica diferencias estadísticas a un nivel de significancia del 5%.



**Fig. 21.** Comparación del efecto de gentamicina, microesferas de albúmina y microesferas de albúmina cargadas con nanoesferas de PLGA en el crecimiento de *Vibrio harveyi* patógeno (CAIM 79). Letras distintas en cada columna indica diferencias estadísticas a un nivel de significancia del 5%.

De manera similar a lo que ocurrió con los COS sin encapsular se observó un retraso en la fase Lag. Sin embargo, es importante resaltar que los COS libres tuvieron un retraso de crecimiento mayor que los encapsulados. Este retraso fue muy cercano al obtenido por las ME sintetizadas por emulsiones múltiples, obteniendo una diferencia de retraso de alrededor de una hora con respecto a los COS libres. Esto nos confirma nuevamente que el haber sintetizado las ME utilizando PLGA si incrementa la liberación de COS

Tabla 5. Comparación de las Fases Lag del crecimiento bacteriano de *Vibrio harveyi* utilizando microesferas COS/BSA y microesferas COS/PLGA/BSA

<b>Fase Lag (h)</b>			
<b>Bacterias</b>	<b>Crecimiento control</b>	<b>ME BSA/COS*</b>	<b>ME PLGA/BSA/COS*</b>
<i>V. harveyi</i> CAIM 79	6.9 ± .038	8.1 ± 0.0321	12.6 ± 0.0176
<i>V. harveyi</i> CAIM 1792	7.6 ± .043	7.9 ± 0.0187	9.3 ± 0.0212

\*Microesferas (ME), albúmina (BSA), Quito-oligosacáridos (COS). Las ME se ajustaron a una concentración de 1mg/mL

## CAPÍTULO IV. RESUMEN DE HALLAZOS Y CONCLUSIÓN

### 4.1 Resumen de Hallazgos

Se elaboraron oligómeros de quitosano (COS) por hidrólisis ácida y se caracterizaron por grado de polimerización con FACE y por masa molecular con HPLC-ESI-MS.

La técnica por FACE demostró que la obtención de COS por medio de hidrólisis ácida es una técnica reproducible y se encontraron oligosacáridos con un grado de polimerización por debajo de 504.4 Da y por arriba de 1153 Da.

El análisis por HPLC acoplado a masas confirmó los resultados del grado de polimerización obtenido por FACE mediante la determinación de las masas moleculares de los COS y además se elucidó la composición de los COS y de sus isómeros. Donde podemos observar pesos moleculares de 544 Da atribuibles a trímeros, hasta 2.12 kDa de undecámeros.

El quitosano y sus hidrolizados mostraron actividad bacteriostática frente a *Vibrio harveyi* (*in vitro*). Quitosano retrasó el crecimiento  $8.2 \pm 0.013$  y  $7.8 \pm 0.011$  h de *V. harveyi* CAIM 79 y CAIM1792, respectivamente. Los COS obtuvieron una mayor actividad con un retraso de  $10.3 \pm 0.023$  y  $14.6 \pm 0.024$  h para las mismas bacterias.

Independientemente del método utilizado para la encapsulación, el rendimiento de encapsulamiento de las ME fue del 71%. El 66% de las ME tuvieron un diámetro entre 5 y 10  $\mu\text{m}$ , tamaño requerido para permanecer en el hepatopáncreas del camarón. Por lo tanto, los cambios en la técnica de elaboración no afectan la morfología de las partículas. Sin embargo, si se mejoró la capacidad de liberación de los COS.



Por el método de FTIR se estableció la presencia de COS en las ME de albúmina.

La diferencia del potencial Z de las ME de albúmina sin cargar y las cargadas con COS indica que los oligosacáridos cambian la superficie de la ME, ayudando a elucidar su comportamiento.

Los COS encapsulados mostraron actividad bacteriostática. Sin embargo la diferencia en la forma de síntesis de las ME sí afecta su porcentaje de liberación, siendo los COS encapsulados por emulsiones múltiples los de mayor actividad.

## 4.2 Conclusión

El quitosano y sus hidrolizados mostraron actividad bacteriostática frente a bacterias Gram negativas patógenas e inoñas para camarón. La diferencia en las técnicas de elaboración de ME de BSA e COS no afectó las propiedades físicas como rendimiento, tamaño o morfología de las ME sintetizadas. En cambio con la técnica de emulsiones múltiples se observó mejor eficiencia de liberación de los COS. El quitosano y los COS mostraron tener una actividad bacteriostática de forma tanto libre como encapsulada, por lo que se recomienda futuros estudios para probar su efecto de protección.

## REFERENCIAS

- Aam, B.B., Heggset, E.B., Norberg, A.L., Sørli, M., Vårum, K.M., Eijsink, V.G. (2010). Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine Drugs*. 8:1482-1517.
- Abdelghany, S. M., Quinn, D. J., Ingram, R. J., Gilmore, B. F., Donnelly, R. F., Taggart, C. C. & Scott, C. J. (2012). Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. *International journal of nanomedicine*. 7:4053-4063.
- Aemml, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Aguilera, C., Herrera, C., Ponce, J. (2010). Implementación, validación y aplicación de un nuevo método para la determinación de oxitetraciclina por HPLC en tejido muscular de salmónidos. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 38:227-233.
- Aiba, Sei-ichi. (1991). Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*. 13:40-44.
- Alderman, D. J., & Hastings, T. S. (1998). Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance—potential for consumer health risks\*. *International journal of food science & technology*. 33(2): 139-155.
- Alonso, J. G., Peniche-Covas, C., Nieto, J. M. (1983). Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan by thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 28(1):189-193.

- Angulo, F. (2000). Agentes antimicrobianos en acuicultura: Impacto potencial en la salud pública. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 20:217.
- Anónimo. (1997). World Aquaculture Society. Abstract 464, of the Annual international conference and exposition of the World Aquaculture Society and the National Aquaculture Conference and exposition of National Aquaculture Association. Feb. 19-23; Seattle, WA.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., ... & Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*. 3(2):203-230.
- Auró, A. A., Ocampo, C. L. (2006). *El libro del camarón. Uso de Fármacos en la Camaronicultura*. México D.F. Laboratorios Avi-Mex, S.A. de C.V.
- Benhabiles, M., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M., Mameri, N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*. 29:48-56.
- Cabello, F.C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. 8:1137-1144.
- Cabrera, J.C. y P. Van Cutsem. (2005). Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochemical Engineering Journal*. 25:165-172.
- Calderón, J. L., Ávila, E., Rivera, G. (2010). Confluencia de la nanotecnología y biomedicina en la neuroprotección. *BioTecnología*. 14:30-42.
- Cech, N. B., Enke, C. G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*. 20(6): 362-387.
- Colosio-López, C. M. (2012). Evaluación del Efecto Inhibitorio de Oxitetraciclina y Gentamicina Encapsuladas en Microesferas de Albúmina Sobre la Cepa de *Vibrio mimicus* 602 ATCC 33653. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.

- Couvreur, P., Blanco-Prieto, M. J., Puisieux, F., Roques, B. & Fattal, E. (1997). Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides. *Advanced drug delivery reviews*. 28:85-96.
- Chakravarthi, S. S. (2008). Effect of Size of PLGA and Chitosan-PLGA Particles on the Cellular Association, Cytotoxicity, and Anti-tumor Efficacy of Paclitaxel, ProQuest.
- Champion, J. A., Katare, Y. K. & Mitragotri, S. (2007). Particle shape: a new design parameter for micro-and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of Controlled Release*. 121:3-9.
- Chang, K.L.B., Tsai, G., Lee, J., Fu, W.R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*. 303:327-332
- Chen, C.Z. y S.L. Cooper. (2002). Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials*. 23:3359-3368.
- Chu, L. Y., Utada, A. S., Shah, R. K., Kim, J. W. & Weitz, D. A. (2007). Controllable monodisperse multiple emulsions. *Angewandte Chemie International Edition*. 46:8970-8974.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R., Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 36: 981-1014.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*. 14: 251-258.
- Duygu, D. Y., Baykal, T., Açıkgöz, İ., & Yildiz, K. (2010). Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies (REVIEW). *Gazi University Journal of Science*. 22(3):117-121.
- Edlund, U., Albertsson, A. C. (2002). Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery. *Advances in Polymer Science*. 157:67-112.

- Fayle, S. E., Healy, J. P., Brown, P. A., Reid, E. A., Gerrard, J. A. & Ames, J. M. (2001). Novel approaches to the analysis of the Maillard reaction of proteins. *Electrophoresis*. 22:1518-1525.
- Giunchedi, P., Conti, B., Genta, I., Conte, U. & Puglisi, G. (2001). Emulsion spray-drying for the preparation of albumin-loaded PLGA microspheres. *Drug development and industrial pharmacy*. 27:745-750.
- Griffin, W.C. (1949). Classification of surface-active agents by 'HLB'. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. 1:31
- Guía para la Gestión Sanitaria en Acuicultura. España: Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR). 2011 [consulta el 03 de mayo de 2013]. Disponible en:  
[http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/recursos\\_informacion/publicaciones\\_ficha.aspx?Id=es&IdPublicacion=232](http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/recursos_informacion/publicaciones_ficha.aspx?Id=es&IdPublicacion=232)
- Hu, G.-F. (1995). Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis technology and applications. *Journal of Chromatography A*. 705:89-103.
- Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M. & Schade, R. (2007). *Bioactive egg compounds*, Springer.
- Jain, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials*. 21(23): 2475-2490.
- Jain, K. K. & Médecin, N. (2008). *Drug delivery systems*, Springer.
- Kasaai, M. R. (2008). A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 71(4):497-508.
- Kim, Se-Kwon y N. Rajapakse. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*. 62: 357-368.

- Koizumi, K. (1996). High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrates on graphitized carbon columns. *Journal of Chromatography A*. 720(1): 119-126.
- Lecaróz, C., Blanco-Prieto, M. J., Burrell, M. A., & Gamazo, C. (2006). Intracellular killing of *Brucella melitensis* in human macrophages with microsphere-encapsulated gentamicin. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 58(3): 549-556.
- Leyton, Y., Riquelme, C. (2008). Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 43:441-456.
- Li, D., Yu, T., Zhang, Y., Yang, M., Li, Z., Liu, M., Q. R. (2010). Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environmental Microbiology*. 76:3444-51.
- Lin, S.B., Chen, S.H., Peng, K.C. (2009). Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of  $\beta$ -chitosan in a *Trichoderma harzianum* chitinase-hydrolysing process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89:238-244.
- Lyle-Fritch, L. P., E. Romero-Beltran, and F. Paez- Osuna. 2006. A survey on use of the chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico). *Aquaculture Engineering* 35:135–146
- Mainardes RM, Silva LP. (2004). Drug delivery systems: past, present, and future. *Current Drug Targets*. 5:449-455.
- Makadia, H. K. & Siegel, S. J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*. 3:1377-1397.
- Mansour, H. M., Sohn, M., Al-Ghananeem, A., DeLuca, P. P. (2010). Materials for pharmaceutical dosage forms: Molecular pharmaceuticals and controlled release drug delivery aspects. *International Journal of Molecular Sciences*. 11:3298-3322.

- Mathew, S. T., Devi, S. G., Sandhya, K. V. (2007). Formulation and evaluation of ketorolac tromethamine-loaded albumin microspheres for potential intramuscular administration. *AAPS Pharmaceutical Scientists Technology*. 8:14-22.
- Mathew, S. T., Gayathri Devi, S., Prasanth, V. & Vinod, B. (2009). Formulation and in vitro-in vivo evaluation of ketoprofen-loaded albumin microspheres for intramuscular administration. *Journal of microencapsulation*. 26:456-469.
- McGeer, A. J. (1998). Agricultural antibiotics and resistance in human pathogens: Villain or scapegoat?. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*. 159(9):1119.
- Nwe, N., Furuike, T., Tamura, H. (2009). The mechanical and biological properties of chitosan scaffolds for tissue regeneration templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri*. *Materials*. 2:374-398.
- O'shea, M. G., Samuel, M. S., Konik, C. M. & Morell, M. K. (1998). Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides: efficiency of labelling and high-resolution separation. *Carbohydrate Research*. 307:1-12.
- Parida, P., Mishra, S. C. y Sahoo, S. (2012). FTIR spectroscopic In vitro drug interaction study of nifedipine microsphere. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*. 3:2229-2232.
- Pillai, C., Paul, W., Sharma, C.P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 34:641-678.
- Rendón, L., Balcázar, J. L. (2003). Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*. 19:27-33.
- Robinson, S., Bergström, E., Seymour, M. & Thomas-Oates, J. (2007). Screening of underivatized oligosaccharides extracted from the stems of



- Triticum aestivum using porous graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 79:2437-2445.
- Rodríguez, I. C., Cerezo, A., Salem, I. I. (2000). Sistemas de liberación Bioadhesivos. *ArsPharmaceutica*. 41:115-128.
- Roque, A., Molina, A. A., Bolán, M. C., Gómez, G. B. (2001). *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 17:383–387.
- Ruhaak, L. R., Zauner, G., Huhn, C., Bruggink, C., Deelder, A. M., Wuhrer, M. (2010). Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 397(8): 3457-3481.
- Sáez, V., Hernández, E., Angulo, L. S. (2004). Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5:55-70.
- Sarabia-Sainz, A., Ramos-Clamont Montfort, G., Lizardi-Mendoza, J., Sánchez-Saavedra, M.D.P., Candia-Plata, M.D.C., Guzman, R.Z., Lucero-Acuña, A., Vazquez-Moreno, L. (2012). Formulation and characterization of gentamicin-loaded albumin microspheres as a potential drug carrier for the treatment of *E. coli* K88 infections. *International Journal of Drug Delivery* 4.
- Siepmann, J., Siepmann, F. (2006). Microparticles used as drug delivery systems. *Program Colloid Polymeric Science*. 133:15–21.
- Singh, K. & Mishra, A. (2013). Water soluble chitosan nanoparticle for the effective delivery of lipophilic drugs: A review. *Int J App Pharm*. 5:1-6.
- Soto-Rodriguez, S.A., B. Gomez-Gil and R. Lozano. R. (2010). 'Bright-red'syndrome in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *Diseases of aquatic organisms*. 92:11-19.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez Gil, Roque, A. and Lozano, R. (2010b). Density of vibrios in hemolymph and hepatopancreas of diseased Pacific White

- shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from northwestern Mexico. J. World Aquacult. Soc. 41: 76-83.
- Soto-Rodríguez, S.A., B. Gomez-Gil, R. Lozano, R. del Rio-Rodríguez, A.L. Diéguez and J.L. Romalde. (2012). Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Invertebrate Pathology 109: 307-317.
- Soto-Rodríguez, S.A., N. Simoes, A. Roque and B. Gómez Gil. (2006). Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. Aquaculture 258: 109-115.
- Sonia Soto-Rodríguez, Armenta, M. Gomez Gil, B. (2006b). Effects of enrofloxacin and florfenicol on survival and bacterial population in an experimental infection with luminescent *Vibrio campbellii* in shrimp larvae of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 255: 48-54.
- Takahashia,T., M. Imaia, I. Suzukia y J. Sawai. (2008). Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated by the deacetylation degree. Biochemical Engineering Journal. 40:485-491.
- Thompson, F. L., Lida, T., Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 68(3):403-31.
- Trombotto, S., Ladavière, C., Delolme, F. & Domard, A. (2008). Chemical preparation and structural characterization of a homogeneous series of chitin/chitosan oligomers. Biomacromolecules. 9:1731-1738.
- Ueno, k., Yamaguchi, T., Sakari, N., Nishi, N., Tokura, S. (1997). Advance in Chitin Science. 2:156.
- Verri, T., A. Mandal, L. Zilli, D. Bossa, P. Mandal, L. Ingrosso, et al. (2001). D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 130: 585-606.
- Vishu, K. A., Varadaraj, M., Gowda, L., & Tharanathan, R. (2005). Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolysis

with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochemistry Journal*. 391:67-175.

Xia, W., Liu, P., Zhang, J., Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*. 25: 170-179.

Yin, H., Zhao, X., Du, Y. (2010). Oligochitosan: a plant diseases vaccine—a review. *Carbohydrate Polymers*. 82:1-8.

Zimmer, A. & Kreuter, J. (1995). Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*. 16:61-73.