

USO DE MICROPARTÍCULAS DE COLOFONIA OBTENIDAS POR PROCESOS ELECTRO HIDRODINÁMICOS COMO PORTADOR DE PARTÍCULAS

Cristina Pavon^{1*}, Miguel Aldas^{1,2}, Harrison de la Rosa–Ramírez¹, Juan Alberola³, Juan López–Martínez¹

1) Instituto de Tecnología de Materiales, Universitat Politècnica de València (UPV), 03801 Alcoy–Alicante, España. Correo electrónico: crisppavonv@gmail.com

2) Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional (EPN), Quito 170517, Ecuador

3) Universitat de València, Av. de Blasco Ibáñez, 13, 46010 València, Valencia

Recibido: Enero de 2022; Aceptado:

RESUMEN

En este estudio, se utilizó colofonia en los procesos electrohidrodinámicos para producir micropartículas y además se analizó la capacidad de las micropartículas de colofonia para actuar como transportadores de nanopartículas. Para ello se prepararon dos soluciones de colofonia, una con 45% p/p y otra con 60% p/p. Se agregaron nanopartículas de plata y nanotubos de halloysita mediante el método de mezcla en 3% p/p de las soluciones. Las soluciones fueron sometidas a un proceso electrohidrodinámico (electrohilado o electropulverizado). Las micropartículas obtenidas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido. Se determinó que la distribución del tamaño de la anchura de las microfibras es estrecha mientras que la distribución del tamaño del diámetro de las microesferas era amplia y se pudo observar que las microesferas encapsulan satisfactoriamente las nanopartículas empleadas. Además, se observó que el cambio de morfología a microestructuras de colofonia aumenta significativamente el ángulo de contacto con el agua. Finalmente, se realizó una prueba antibacteriana, sin embargo, debido a la hidrofobicidad de la colofonia, no se observó ningún efecto de inhibición, excepto cuando las partículas fueron nanopartículas de plata, lo que implica que la colofonia podría actuar como portador de partículas activas.

Palabras clave: colofonia, micropartículas, encapsulación

ABSTRACT

In this study, gum rosin was used in in both, electrospinning and electrospraying processes. Moreover, the ability of gum rosin microparticles to act as nanoparticles carrier in a electrohydrodynamic process was analysed. For this purpose, two gum rosin solutions were prepared, one with 45 wt % of gum rosin and the other one with 60 wt.% of gum rosin, for electrospraying and electrospinning respectively. Silver nanoparticles and halloysite nanotubes were added by the blending method in 3 wt. % of the solutions. Then, the solutions were subject to an electrohydrodynamic process. The obtained particles were analysed by scanning electronic microscopy. It was determined that the width size distribution of the microfibers is narrow while the diameter size distribution of the microspheres was wide. Moreover, it was possible to observe that the microspheres satisfactorily encapsulate the employed nanoparticles. Additionally, it was seen that the change in morphology to microstructures significantly increase the water contact angle of raw gum rosin. Finally, antibacterial test was performed. However, due to gum rosin hydrophobicity, no inhibition effect was observed, except when the loaded particle was silver nanoparticles. This imply that gum rosin could act as carrier for active particles.

Key words: colofonia, micropartículas, encapsulación

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe una tendencia creciente a utilizar micro o nano partículas en diferentes campos ya que brindan características controlables como tamaño, morfología y densidad, que

podrían tener un impacto significativo en muchas aplicaciones como los portadores de administración de fármacos [1], en la incorporación de sustancias activas dentro de una matriz polimérica de empaque [2-3], y en aplicaciones nutraceuticas o alimentarias [4-5]. La colofonia es el componente no volátil de la resina de pino. Es un material de bajo peso molecular que presenta una forma sólida amorfa, es quebradizo, vítreo e insoluble en agua [6-9]. La colofonia de goma se compone principalmente de ácidos resínicos del tipo abiético y pimárico, diterpenos con formula molecular $C_{20}H_{30}O_2$ [10]. Su estructura está compuesta por anillos cíclicos, dobles enlaces conjugados y un grupo carboxílico, que permiten la modificación de la colofonia en una gran cantidad de derivados como ésteres, sales, colofonias hidrogenadas, entre otros *Mitchell et al.* [7], *Yao et al.* [11]. La colofonia y sus derivados se pueden utilizar en las industrias de adhesivos, papel, tintas, recubrimientos, cosméticos o alimentos. Además, la colofonia y sus derivados son biodegradables y biocompatibles [12]. Por tanto, su aplicación como recubrimientos farmacéuticos [13], portadores de fármacos [14], y en envasado de alimentos [15-16] está aumentando gradualmente. Adicionalmente, la colofonia se ha estudiado como matriz para partículas activas a nanoescala donde ha mostrado buenas propiedades como portador de partículas [17-19].

Una forma de sintetizar micro o nanopartículas con tamaños homogéneos son los procesos electrohidrodinámicos como la electropulverización y el electrohilado, que permiten obtener micro/nano esferas o fibras respectivamente [20-21]. Los procesos electrohidrodinámicos aplican un campo eléctrico de alta potencia a una solución que se mantiene dentro de un capilar. Las cargas en la solución polimérica generan fuerzas electrostáticas que se oponen a la tensión superficial dando lugar a una deformación en la forma de las gotas de líquido y, posteriormente, a la formación de un cono de lados convexos y punta redondeada. Cuando el campo eléctrico alcanza un valor umbral, las fuerzas electrostáticas superan la tensión superficial, el cono se deforma formando el cono de Taylor y emite un chorro de solución polimérica que fluye en la dirección del campo eléctrico [22-24].

Si bien el electrohilado y el electropulverizado se consideran tecnologías similares, hay aspectos que las diferencian, siendo la más relevante la concentración de la solución polimérica [21, 25]. El electrohilado se produce cuando la concentración de la solución polimérica es lo suficientemente alta como para permitir un alargamiento del chorro, donde el solvente se evapora rápidamente y se depositan fibras aleatorias en el colector, formando un no tejido. Por otro lado, la electro pulverización se produce cuando la concentración de la

solución es tan baja que el chorro se desestabiliza dando lugar a la formación de gotas, al evaporarse el disolvente, las gotas se contraen y solidifican formando esferas que se depositan en el colector [21]. Sin embargo, es necesario mencionar que cada polímero u oligómero tiene un rango de concentración para trabajar para cada uno de los procesos mencionados [26]. Por lo tanto, la forma y el tamaño óptimos de los productos no se pueden predecir a partir de los parámetros del líquido, por lo que es necesario realizar análisis experimentales [27].

Hay varios métodos que se pueden utilizar para cargar las nano / micro fibras o esferas con partículas activas mediante electro hilado o electro pulverización, como el método de emulsión, electro hilado coaxial o electro pulverización y el método de mezcla. El último es el método más fácil y predominante para cargar las micro o nanoestructuras. Consiste en mezclar las partículas activas con solución polimérica para lograr la carga en un método de un solo paso [28].

El presente estudio tiene como objetivo evaluar las condiciones de procesamiento para la obtención de fibras o esferas a partir de colofonia de goma cruda en un proceso electro hidrodinámico cambiando solo la concentración de la solución de polímero. Además, el estudio explora la capacidad de las micropartículas de colofonia de goma electro hiladas y electro pulverizadas para actuar como portadores de nanopartículas. Para ello, se añadieron nanopartículas de plata y nanotubos de halloysita a la solución polimérica. Asimismo, se analizó la morfología de las microestructuras para detectar la carga de las nanopartículas en las microfibras y esferas.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales. La colofonia (GR), de grado commercial (número ácido 167) fue suministrada por *Luresa Resinas S.L.* Las nanopartículas de plata (AgNPs) (CAS number 7440–22–4) y los nanotubos de haloisita (HNTs) (CAS number 1332–58–7) se obtuvieron de *Sigma Aldrich (Darmstadt, Alemania)*. El disolvente empleado fue cloroformo (densidad 1,325 g/cm³ a 20°C y 99,8% de pureza).

Métodos. Para el proceso de electrohilado, se prepararon soluciones de 45% p/p de colofonia según lo indicado por *Baek et al.* [6], usando chloroform y 3% p/p de AgNPs. Mientras que las soluciones para el proceso de electropulverización fueron de 30 % p/p de colofonia en cloroformo y 3% p/p de HNTs. Las soluciones se agitaron constantemente durante 24 h. Posteriormente, las soluciones se alimentaron a una bomba de jeringa (*SringePump, Nueva York, USA*). La jeringa se conectó a una aguja metálica con un diámetro

interno de 0,4 mm. La distancia a la placa recolectora se fijó en 15 mm para ambas soluciones. Se empleó una fuente de alta potencia (*Genvolt, Shropshire, Reino Unido*) para generar el campo electrostático. Se utilizó un caudal de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ con un voltaje de 10 kV (votlaje positivo y negativo = 5 kV y -5 kV, respectivamente). Las partículas se recogieron durante 1 hora en una hoja de aluminio, que se colocó sobre la placa recolectora metálica. La colofonia se etiqueto como GR, la mezcla entre las partículas de colofonia y nanopartículas de plata se etiquetó como GR–AgNP, y la mezcla de colofonia con los nanotubos de haloisita se etiquetaron como GR–HNT.

Caracterización microestructural. La morfología de las fibras electrohiladas y las esferas electropulverizadas se observó utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo. Los análisis se realizaron en un microscopio *Zeiss Ultra 55* a 1 kV sobre la superficie de las muestras. Antes de los análisis, las muestras se pulverizaron con una aleación de oro y paladio en un *Sputter Mod Coater Emitech SC7620, Quorum Technologies (East Sussex, Reino Unido)*.

Ángulo de contacto en agua. Los ángulos de contacto con el agua se midieron mediante el método de gota sésil de agua desionizada en la superficie de las muestras. Se depositaron aleatoriamente al menos seis gotas de agua ($\approx 1,5 \mu\text{L}$) sobre la superficie de la muestra con una jeringa de precisión a temperatura ambiente y se midió el ángulo de contacto del agua ocho veces para cada gota usando un goniómetro óptico *EasyDrop–FM140* de *Kruss Equipments (Hamburgo, Alemania)*.

Actividad de las nanopartículas. Para medir la actividad de las nanopartículas, se probó la actividad antibacteriana de las partículas de colofonia cargadas con partículas de nanoplata (GR–AgNP) frente a las bacterias indicadoras *Gram negativas* y *Gram positivas* *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Se utilizaron como referencias la colofonia pura (GR) y la colofnia cargada con nanotubos de halloysita (GR–HNT). Las pruebas de actividades se realizaron mediante el método de difusión en disco de agar [29–30]. Los indicadores se cultivaron a 37°C en caldo de lisogenia (LB), con agar al 1,5% para medios sólidos. Para las pruebas antibacterianas, las partículas se colocaron encima y las películas se cortaron en cuadrados del mismo peso para tener la misma cantidad de micro y nano partículas. Luego, se colocaron en discos de agar a de *E. coli* y *S. aureus* y se incubaron a 37°C . Los platos se visualizaron después de 24 horas de incubación para detectar las zonas de inhibición. A modo de comparación, también se determinó la actividad antibacteriana de la colofonia pura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización microestructural. En la Figura 1 se observan las micrografías de microfibras GR–AgNPs y microesferas GR–HNTs. Se ve que una variación en la concentración de solución polimérica de colofonia produce una variación en la forma de las microestructuras, microfibras y microesferas, obtenidas como se indica en la literatura [20,24]. Para las microfibras GR–AgNPs (Figura 1a), se puede observar que la distribución del tamaño del ancho es estrecha, con un tamaño medio de $3,1 \pm 1,0 \mu\text{m}$. Además, es posible detectar que las AgNP no están dentro de la fibra, sino que están adheridas a la superficie de la colofonia.

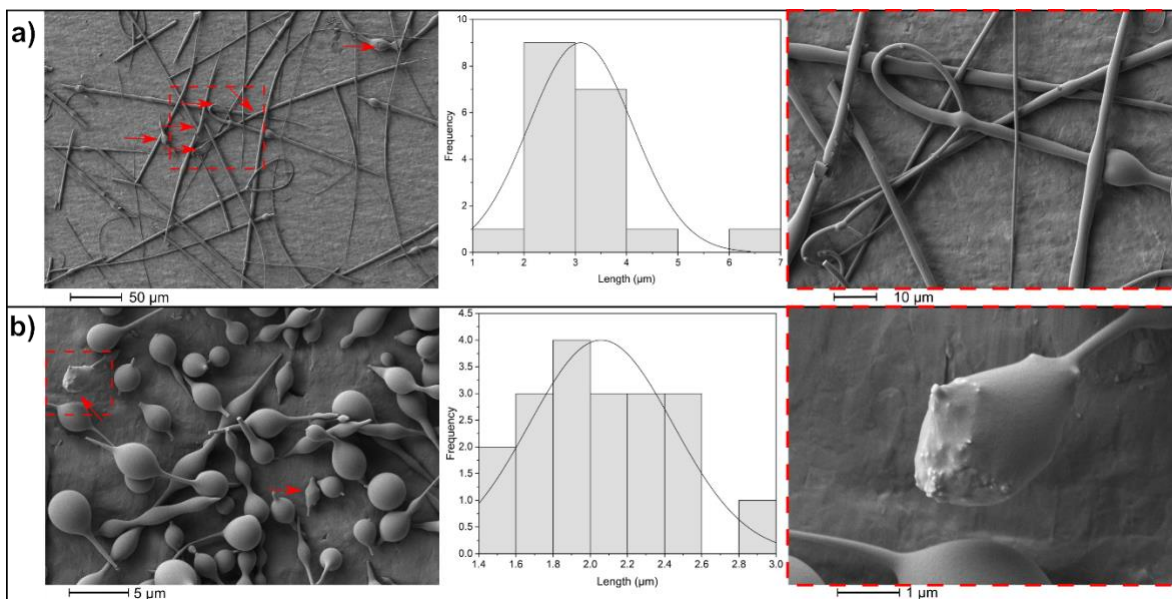


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido a) electrohilado de nanopartículas de GR–AgNPs y b) electro pulverización de GR–HNTs junto con su distribución de tamaño y un área expandida

Para las microesferas GR–HNT (Figura 1b), la distribución del tamaño del diámetro es amplia con un diámetro medio de $2,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$. En cuanto a los HNT, se ve que están encapsulados dentro de las microesferas de colofonia. Sin embargo, ambos procesos, electrohilado y electropulverización, han producido perlas en las estructuras formadas. Por esta razón, para optimizar la forma de las microestructuras, se deben realizar más experimentos modificando la concentración de la solución polimérica, el voltaje de trabajo y el flujo de trabajo. Los resultados obtenidos sugieren que las micropartículas de colofonia se pueden utilizar como portador de partículas y que el proceso de electro pulverización permite la encapsulación de las partículas en la matriz polimérica.

Ángulo de contacto con el agua. El ángulo de contacto con el agua de la colofonia, las microfibras de colofonia de goma (GR–AgNP) y las microesferas de colofonia (GR–HNT) se muestra en la Tabla 1. De acuerdo con el valor del ángulo de contacto, la colofonia de goma pura exhibe un comportamiento hidrofóbico, que está en de acuerdo con la literatura [31–32]. Como es bien sabido, una superficie hidrofóbica presenta valores de WCA superiores a 65° , mientras que los materiales hidrófilos muestran valores de WCA inferiores a 65° [33–34]. Se observa que la colofonia, ya sea como microfibras o como microesferas, presenta valores de ángulo de contacto con el agua más altos que la colofonia de goma en su estado pura.

Tabla 1. Ángulo de contacto con el agua de colofonia pura, microfibras de colofonia y microesferas de colofonia.

Muestra	Ángulo de contacto con el agua ($^\circ$)
GR	90 ± 3
GR–AgNPs	110 ± 2
GR–HNTs	140 ± 4

Según la literatura, el ángulo de contacto con el agua depende de las propiedades topográficas y químicas de la superficie [35]. Los resultados sugieren que el ángulo de contacto con el agua de la colofonia está influenciado por la morfología y el tamaño de partícula, lo que influye en la heterogeneidad de la superficie sólida y la rugosidad de la superficie aumentando el ángulo de contacto. De modo que en el caso de las microesferas GR–HNTs, la superficie se vuelve ultra hidrofóbica ($WCA > 120^\circ$) [36]. Además, el tamaño de partícula de las microfibras y microesferas podría favorecer la interacción de los grupos hidroxilo de la colofonia de goma mediante interacciones de enlaces de hidrógeno.

Actividad de las nanopartículas. Para medir la actividad de las nanopartículas, se realizaron pruebas antimicrobianas en GR, GR–AgNP y GR–HNT. La actividad antimicrobiana se evaluó frente a una bacteria gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y la bacteria gram negativa (*Escherichia coli*). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2. Se determinó que la colofonia (Figura 2a y Figura 2d) y GR–HNTs (Figura 2c y Figura 2f) son inactivas contra ambas bacterias porque no hay ningún halo de inhibición que rodee las muestras [37]. Además, es posible ver el crecimiento bacteriano sobre la superficie de las muestras de colofonia. Por lo tanto este material no presenta efecto de inhibición frente a los patógenos estudiados.

En cuanto a las microfibras GR–AgNPs, es posible observar que no se forma un halo

de inhibición. Sin embargo, se ve que se inhibió el crecimiento de bacterias sobre la superficie de las muestras (Figura 2b y Figura 2e), al contrario de las otras muestras (GR, and GR–HNTs). Este efecto se atribuye a la actividad antimicrobiana de las AgNP. Este resultado apoya la hipótesis de que la colofonia puede actuar como portador de partículas activas en microestructuras formadas por métodos electro hidrodinámicos. Sin embargo, es posible que el efecto de inhibición se haya visto comprometido por la baja cantidad de GR depositados a través de esta técnica, o por la naturaleza hidrófoba de las moléculas de GR. Por lo tanto, se recomienda usar otro método antimicrobiano como el método del matraz de agitación dinámica [30] para futuros trabajos.

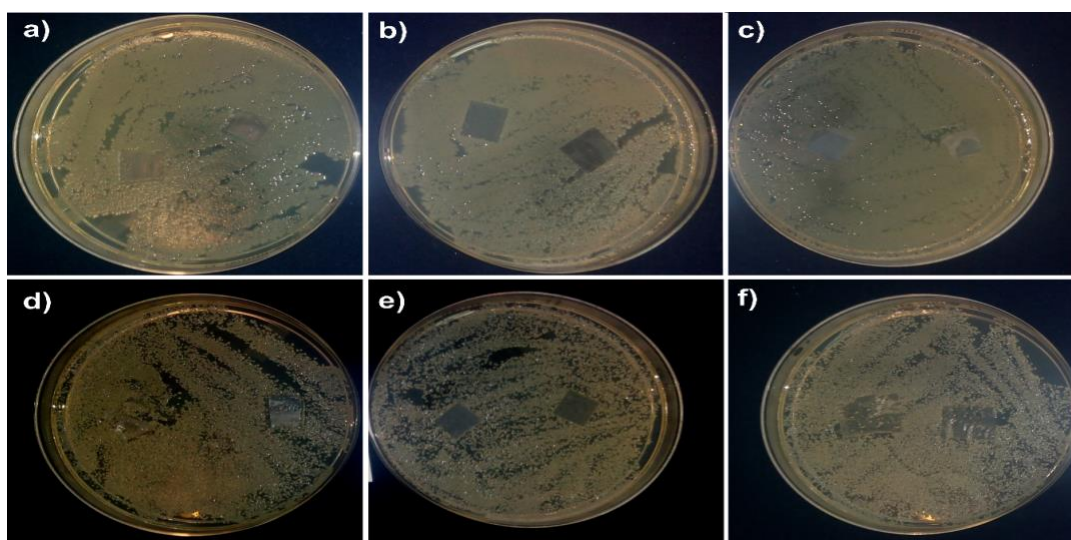


Figura 2. *E. coli* con a) GR, b) GR–AgNPs y c) GR–HNTs y *S. aureus* con e) GR, e) GR–AgNPs, y f) GR–HNTs.

CONCLUSIONES

La colofonia se procesó mediante procesos electro hidrodinámicos. La caracterización microestructural reveló que un cambio en la concentración de la solución produce una variación en la forma de las microestructuras. Una solución de 45% p/p de colofonia en cloroformo permite la formación de microfibras mientras que una solución de 30% p/p de colofonia en cloroformo permite la formación de microesferas. Además, las microestructuras mostraron capacidad para transportar nanopartículas. Cuando se produjeron las microfibras, las nanopartículas se encontraron en la superficie de las microfibras. Cuando se produjeron las microesferas, las nanopartículas se encontraron encapsuladas dentro de las microesferas. Los resultados sugieren que las microesferas son más adecuadas para actuar como transportadores de nanopartículas. Además, se estableció que los cambios de morfología en las microestructuras respecto a la colofonia de goma cruda sí influye en el

ángulo de contacto con el agua. En ambos casos, microfibras y microesferas, se midieron ángulos de contacto con el agua más altos que el de colofonia pura. En cuanto a la actividad de las nanopartículas, se determinó que las AgNPs presentan un efecto antimicrobiano, sin embargo, debido a la naturaleza de la colofonia y la baja cantidad de material depositado, la actividad antimicrobiana no pudo desarrollarse por completo.

Agradecimientos. Esta investigación fue financiada por El ministerio de Ciencia e Innovación proyecto: PID2020-116496RB-C22. *Cristina Pavon* agradece a la ayuda *Santiago Grisolia* (GRISOLIAP/2019/113) de la *Generalitat Valenciana*.

REFERENCIAS

- [1] Tanhaei A, Mohammadi M, Hamishehkar H, Hamblin MR, *J Control Release*, **330**, 851 (2021)
- [2] Echegoyen Y, Fabra M J, Castro-Mayorga JL, Cherpinski A, Lagaron JM, *Trends Food Sci Technol*, **60**, 71 (2017)
- [3] Fabra M J, López-Rubio A, Lagaron JM, *Food Hydrocoll*, **55**, 11 (2016)
- [4] López-Rubio A, Sanchez E, Wilkanowicz S, Sanz Y, Lagaron JM, *Food Hydrocoll*, **28**, 159 (2012)
- [5] Pérez-Masiá R, López-Nicolás R, Periago MJ, Ros G, Lagaron JM, López-Rubio A, *Food Chem*, **168**, 124 (2015)
- [6] Baek W Il, Nirmala R, Barakat NAM, El-Newehy M H, Al-Deyab SS, Kim HY, *Appl. Surf. Sci.*, **258**, 1385 (2011)
- [7] Mitchell G, Gaspar F, Mateus A, Mahendra V, Sousa D, *Adv. Mat. For.* (2018)
- [8] Termentzi A, Fokialakis N, Leandros Skaltsounis A, *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 1267 (2011)
- [9] Savluchinske-Feio S, Curto MJM, Gigante B, Roseiro JC, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **72**, 430 (2006)
- [10] Mitchell G R, Mahendra V, and Sousa D, *Curr. Res. Biopol.*, **2018**, 6 (2018)
- [11] Yao K, Tang C, *Macromolecules*, **46**, 1689 (2013)
- [12] Satturwar PM, Fulzele SV, Dorle AK, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **4**, (2003)
- [13] Satturwar PM, Fulzele SV, Panyam J, Mandaogade PM, Mundhada DR, Gogte BB, Labhassetwar V, Dorle AK, *Int. J. Pharm.*, **270**, 27 (2004)
- [14] Satturwar PM, Fulzele SV, Dorle AK, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **6**, E649 (2005)
- [15] Pavon C, Aldas M, Rosa-Ramírez H de la, López-Martínez J, Arrieta MP, De La Rosa-Ramírez H, López-Martínez J, Arrieta MP, *Polymers*, **12**, 2891 (2020)
- [16] Aldas M, Ferri JM, Lopez-Martinez J, Samper MD, Arrieta MP, *J. Appl. Polym. Sci.*, **137**, 48236 (2020)
- [17] Lee CM, Lim S, Kim GY, Kim DW, Joon HR, Lee KY, *Biotechnol. Lett.*, **27**, 1487 (2005)
- [18] Lee CM, Lim S, Kim GY, Kim D, Kim DW, Lee HC, Lee KY, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **9**, 476 (2004)
- [19] Pratapwar AS, Sakarkar DM, *J. Qual. Pharm.*, **1**, 100 (2015)
- [20] Jaworek A, Krupa A, Lackowski M, Sobczyk AT, Czech T, Ramakrishna S, Sundarrajan S, Pliszka D, *Fibres Text. East. Eur.*, **75**, 77 (2009)
- [21] Anu Bhushani J, Anandharamakrishnan C, *Trends Food Sci Technol*, **38**, 21 (2014)
- [22] Liu G, Gu Z, Hong Y, Cheng L, Li C, *J Control Release*, **252**, 95 (2017)
- [23] Haider A, Haider S, Kang I, *Arab. J. Chem.*, **11**, 1165 (2018)
- [24] Bhardwaj N, Kundu SC, *Biotechnol. Adv.*, **28**, 325 (2010)
- [25] Bock N, Woodruff MA, Hutmacher DW, Dargaville TR, *Polymers*, **3**, 131 (2011)

- [26] Zhenyu L, Ce W “Effects of Working Parameters on Electrospinning”. En: Wang ZM *One-Dimensional nanostructures*, p 36 (2015)
- [27] Jaworek A, *Powder Technol.*, **176**, 18 (2007)
- [28] Zamani M, Prabhakaran MP, Ramakrishna S, *Int J Nanomedicine*, **8**, 2997 (2013)
- [29] Leite LSF, Bilatto S, Paschoalin RT, Soares AC, Moreira FKV, Oliveira ON, Mattoso LHC, Bras J, *Int. J. Biol.*, **165**, 2974 (2020)
- [30] Niu X, Liu Y, Song Y, Han J, Pan H, *Carbohydr. Polym.*, **183**, 102 (2018)
- [31] Pavon C, Aldas M, López-Martínez J, Ferrándiz S, *Polymers*, **12**, 334 (2020)
- [32] Ba J, Jin L Q, Yao WR, *Open J. Adv. Mater. Res.*, **821-822**, 986 (2013)
- [33] Hambleton A, Fabra M J, Debeaufort F, Dury-Brun C, Voilley A, *J. Food Eng.*, **93**, 80 (2009)
- [34] Vogler EA, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **74**, 69 (1998)
- [35] Munshi AM, Singh VN, Kumar M, Singh JP, *J. Appl. Phys.*, **103**, 084315 (2008)
- [36] De Francisco R, Tiemblo P, Hoyos M, González-Arellano C, García N, Berglund L, Synytska A, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**, 18998 (2014)
- [37] Jindal R, Sharma R, Maiti M, Kaur A, Sharma P, Mishra V, Jana AK, *Polym. Bull.*, **74**, 2995 (2017)