

El ácido Poli(γ -glutámico): Producción y Aplicaciones Biomédicas

Jose A. Portilla-Arias¹, Sebastian Muñoz-Guerra², Dulce Ma. Barradas-Dermitz¹ y Ma. Guadalupe Aguilar-Uscanga^{1*}.

¹*Instituto Tecnológico de Veracruz, Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica-Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA). Av. Miguel A. de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar. CP. 91860. Veracruz, Ver. México. Tel. +52 229 9345701 ext. 211, Fax: +52 229 9345701 ext. 201. E-mail: gaguilar@itver.edu.mx*

² *Departament d'Enginyeria Química, Universitat Politècnica de Catalunya, ETSEIB.*

RESUMEN

El ácido poli (γ -glutámico), poli (Glu), (Glu)_n, (PGGA) se puede considerar una poliamida o el nylon-4 sustituido en el carbono 4 por un grupo carboxilo. El enlace peptídico que se forma entre el grupo amino y el grupo carboxilo en posición γ es el origen de la denominación gamma. Es producido en la naturaleza por una extensa variedad de bacterias, se puede sintetizar por vía química y a través de biosíntesis en el laboratorio en cantidades hasta de 90 g•L⁻¹. La excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad que presenta este biopolímero junto con el hecho de estar funcionalizado, le hacen atractivo para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas de uso temporal. Sin embargo, las dificultades que entraña su modificación química, determinan que el grado de desarrollo tecnológico del PGGA sea aún incipiente. En este artículo se describe la estructura y las propiedades del PGGA, se hace una revisión de los métodos de síntesis y biosíntesis que se conocen para su preparación, se reseñan y critican los distintos derivados y modificaciones químicas que se han realizado hasta el momento, con el objetivo de extender su uso a la fabricación de dispositivos biomédicos de última generación.

Palabras Clave: ácido glutámico, ácido poliglutámico, biopolímeros tecnológicos, polímeros biotecnológicos, polipeptidos, sistemas transportadores de fármaco.

ABSTRACT

Poly (γ -glutamic acid), poly (Glu), (Glu)_n, (PGGA) can be considered as a polyamide or nylon-4 with a carboxylic group substitution at carbon 4 . The peptide bond formed between the amino group and the gamma carboxylic group is the origin of the gamma denomination. It is

produced in nature by a wide variety of bacteria. PGGGA can be obtained by chemical synthesis or by laboratory biosynthesis attaining yields up to 90 g•L⁻¹. The excellent biodegradability and biocompatibility displayed by this innocuous biopolymer, along with the fact of being functionalized, has made it interesting for temporary biomedical and pharmaceutical applications. However, difficulties in chemical modification determine that the technological development of PGGGA is still incipient. In this paper, the structure and properties of PGGGA are described, and already known synthetic and biosynthetic methods for its preparation are reviewed. The different derivatives and chemical modifications carried out up to date are reported and critically analysed with the aim of extending its use to the manufacture of the latest generation biomedical devices.

Key words: Glutamic acid, poly (glutamic), technological biopolymers, biotechnological polymers, polypeptides, drug delivery systems.

INTRODUCCIÓN

Las contribuciones del trabajo conjunto y armónico de científicos e ingenieros están generando nuevas soluciones a problemas médicos relevantes vía los correspondientes desarrollos tecnológicos. Otro hecho singular es la aceptación en Biología y Medicina de la Ciencia Molecular (Química-Biológica, Biología Molecular) como base para interpretar los problemas de salud, y con ello la creación de nuevas formas para tratar y curar enfermedades. En forma paralela, el avance en investigación en biomateriales ha dado pauta a presentar alternativas terapéuticas y de extensión de calidad de vida.

De particular interés es el papel central que han tenido los biomateriales, en especial los biopolímeros, en el desarrollo de nuevos tratamientos durante los últimos

30 años. Los biopolímeros son ahora empleados en muchas preparaciones biomédicas y farmacéuticas, jugando un papel central en dispositivos extracorpóreos, desde lentes de contacto hasta riñones artificiales, son componentes esenciales de implantes, desde implantes vesiculares hasta marcapasos, y son la base de la liberación controlada de fármacos, desde hidrogeles a nanopartículas.

Una estrategia interesante para desarrollar biomateriales útiles, es la biosíntesis y posterior modificación química de biopolímeros. Estos biopolímeros modificados tienen muy diversas propiedades (Figura 1). El propósito de este artículo de revisión es estudiar el potencial como biomaterial del ácido poli(Poli(□-glutámico) y sus derivados.

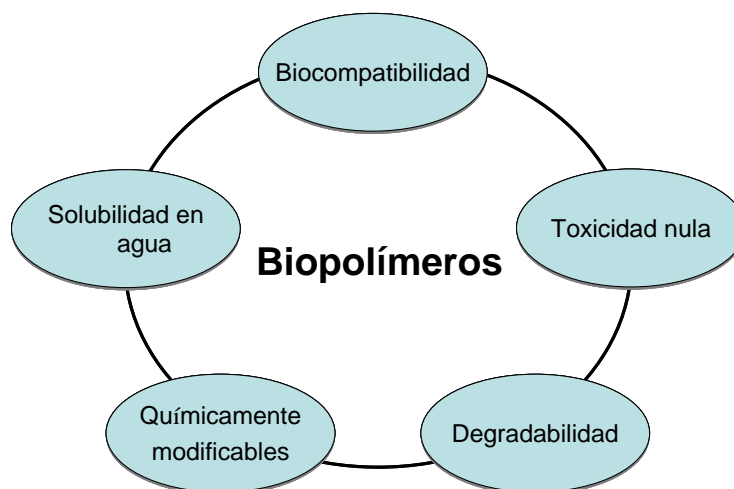


Fig. 1. Principales ventajas de los biopolímeros.

La nomenclatura IUPAC del ácido poli(γ -glutámico) es: Poli[imino-1-(2-carboxietil)-2-oxo-1,2-etanodiilo], (Chemical Abstract: Poly[imino-1-(2-carboxyethyl)-2-oxo-1,2-ethanediyl]) y su representación condensada o abreviada en base a la

IUPAC y a la IUB (1971): poli (Glu), (Glu)_n. De manera informal se le denomina ácido poli (γ -glutámico) o PGGA indicando con ello que el enlace peptídico se establece entre el grupo amino y el grupo carboxilo en posición γ (Figura 2).

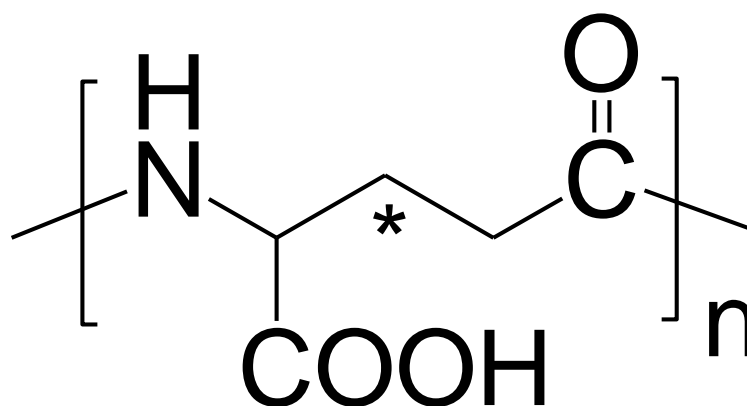


Fig. 2.-Estructura química del ácido poli(γ -glutámico) (PGGA).

El PGGA es el componente principal del mucílago conocido como natto, un alimento tradicional japonés consumido desde tiempos ancestrales y que también

es conocido en China como Dan-douchi (Hara et al., 1993). El "natto" mostrado en la Figura 3, goza de gran reconocimiento por sus efectos beneficiosos en la

asimilación del calcio por el organismo (Tanimoto et al., 2001). El hecho de que el PGGA sea comestible y de inocuidad

contrastada ha incentivado su interés como polímero biodegradable para aplicaciones biomédicas.



Fig. 3. Alimento asiático conocido como “Natto” cuyo principal ingrediente es el PGGA.

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

El PGGA es una poliamida modificada que tiene la particularidad de ser biodegradable, tener un centro asimétrico, y por consiguiente ofrecer un abanico de posibilidades sin precedentes en el campo de los nylons (poliamidas) tradicionales.

La conformación del PGGA en disolución es fuertemente dependiente de la concentración de polímero, pH, resistencia iónica y naturaleza de la sal añadida. Si se trabaja a concentraciones de 0.1 % p/v y pH superior a 7, las cadenas se encuentran en conformación extendida, en cambio a pH inferior a 3 y para las mismas concentraciones de polímero se encuentran estructuras más globulares.

El PGGA es un poliácido de $pK_a = 2.27$, un valor semejante al de los ácidos fosfórico y fluoroacético (Kubota et al.,

1992). El PGGA es por tanto un polielectrolito, pudiendo encontrarse sin ionizar cuando está como poliácido (PGGA-H) o ionizado cuando se encuentra en forma de sal (PGGA-Na o PGGA-K). La solubilidad del PGGA depende del grado de ionización y del grado de estructuración secundaria que posee. Las preparaciones frescas de PGGA-H suelen ser solubles en agua pero dejan de serlo cuando han transcurrido varios días; este fenómeno se debe a la existencia de reordenaciones moleculares y es común en polipéptidos y proteínas.

Los únicos disolventes orgánicos conocidos a temperatura ambiente para el PGGA-H son el sulfóxido de dimetilo (DMSO) y la hexametilfosforamida (HMPA). En caliente es soluble en dimetilformamida (DMF) y N-

metilpirrolidona (NMP) (Kubota et al., 1992).

EL PGGA es una poliamida y por tanto es susceptible a hidrólisis química tanto en medio ácido como en medio básico. Además, la presencia del segundo grupo carboxilo aumenta la hidrofiliidad del polímero y por consiguiente su accesibilidad por parte del agua.

PESO MOLECULAR

El PGGA se degrada rápidamente con agua a temperaturas por encima de 60°C; a temperaturas por debajo de 60°C la velocidad de degradación disminuye notablemente pero sigue siendo importante. (Kubota et al., 1996). Así, un PGGA de $M = 1,250,000$ Da pasa a tener la mitad de tamaño inicial cuando se deja 4 días en agua a 37° C (Kubota et al., 1995). La hidrólisis alcalina en caliente se utiliza como método para obtener PGGA fragmentado (Kubota et al., 1996).

Pérez-Camero et al. (1999) encontraron que mediante radiación por ultrasonido se puede reducir el peso molecular y al mismo tiempo estrechar la poli-dispersibilidad del PGGA de biosíntesis sin modificar la constitución química.

King et al. (2000), identificaron la enzima poliglutamil γ -hidrolasa la cual cataliza la hidrólisis del ácido poli(γ -glutámico) producido a partir de *Bacillus licheniformis* 9945A. Se encontró que la enzima estaba físicamente asociada al polímero por una fuerte interacción física no covalente y que se activaba con la presencia de sales de Zn(II) y Ca(II) (King et al., 2000).

En trabajo extenso sobre la biodegradación del PGGA se aislaron e identificaron 12 especies diferentes de bacterias capaces de degradar el ácido poli(γ -glutámico). Para poder verificar las posibles rutas de degradación, el crecimiento de las bacterias se realizó en distintos medios indicando que los procesos de degradación producidos seguían la misma ruta que el del ácido poli(γ -glutámico). En este mismo trabajo se estudió de forma exhaustiva la degradación con *B. licheniformis* ATCC9945, llegándose a la conclusión que el mecanismo de degradación se podía dividir en dos etapas. Una primera en la que hay una fragmentación aleatoria con formación de distintos oligómeros, y una segunda, en la que la proporción de ácido glutámico libre aumenta considerablemente (Opperman-Sanio et al., 2002).

BIOSÍNTESIS

Diversas especies del género *Bacillus* presentan la capacidad de fabricar PGGA como producto de secreción que o bien se retiene en la cápsula, o lo que es más frecuente, se excreta al medio circundante.

Thorne et al. (1954) realizaron un estudio sistemático para conocer los factores que afectan la producción de γ -PGGA con *B. licheniformis* ATCC 9945 (Figura 4), y ver en qué condiciones se obtienen los mejores rendimientos, los resultados de este estudio han sido validados y actualizados recientemente (Ashiuchi & Misono 2005). Los efectos de la composición del medio

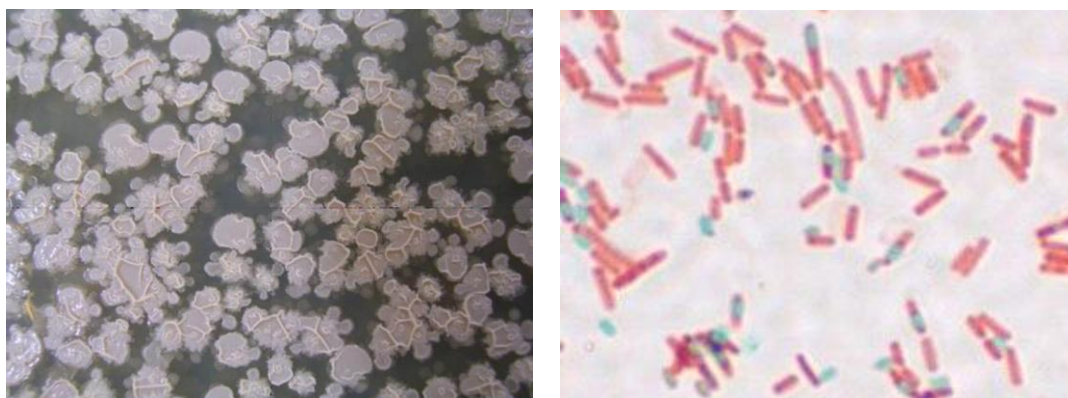


Fig. 4. Principales especies productoras de PGGA: Izq. *B. licheniformis* Der. *B. subtilis*.

sobre la fermentación son los siguientes: el contenido en sales inorgánicas, ácido glutámico, ácido cítrico y glicerol determinan notablemente el rendimiento, en ausencia de ácido glutámico la producción de PGGA resulta ser sensiblemente menor, el NH_4Cl es esencial para la producción de PGGA; su función primordial es suministrar el nitrógeno pero también sirve para mantener el pH a valores bajos, el K_2HPO_4 actúa como fuente del fósforo y en su ausencia no hay proliferación celular, el Mn(II) prolonga la viabilidad de las células e influye sobre la composición D/L del PGGA. La adecuada combinación Ca(II)-Mn(II) permite optimizar el rendimiento.

La mayoría de los procesos biosintéticos de PGGA se llevan a cabo en condiciones aeróbicas ya que esta comprobado que la presencia de oxígeno influye favorablemente en la productividad. Reemplazar el medio aeróbico por unas condiciones de cultivo en medio nitrificante supone un ahorro económico que ha

motivado el estudio de la obtención de PGGA en estas condiciones.

Con la bacteria denitrificante (*B. licheniformis* A35) se alcanzó un rendimiento de 8.1 g L^{-1} utilizando medio M como medio de cultivo (Cheng et al.,1989). El producto resultante de estas fermentaciones no contenía derivados polisacáridos y la relación D/L en el polímero final se veía claramente afectada por el contenido de Mn(II) en el medio. Una mayor concentración de Mn(II) aumentaba la proporción de ácido D-glutámico desde un 50 hasta un 80%. Hoppensack et al. (2003) han explorado la posibilidad de aprovechar el nitrógeno de estiércol para obtener PGGA. Respecto a la producción a gran escala, los trabajos mas recientes llegan a alcanzar una concentración de PGGA de 35 g L^{-1} con una productividad de $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Estos valores se consiguen por cultivo alimentado de *B. licheniformis* en medio E (Yoon et al.,2000).

En los años sesenta Omata y sus colaboradores estudiaron con detalle la

producción de PGGA en *B. subtilis* 5E (Figura 4), cultivado en un medio salino que contenía glucosa y ácido glutámico, descubriendo que se producía mucho más glutámico del que inicialmente se ponía en el medio. Más tarde encontró que se podía obtener hasta 18 g L⁻¹ de PGGA a partir de un medio compuesto exclusivamente de urea y glucosa (Sawa et al., 1971 y 1973).

Kubota et al. (1992) usaron en sus trabajos *B. subtilis* F-2-01, el cual puede producir PGGA con un rendimiento de 5-10 g L⁻¹ sin precisar que el ácido glutámico esté presente en el medio de cultivo. Este medio es un producto estándar constituido por polipeptona y cantidades variables de glucosa. No obstante, la adición de ácido glutámico hace aumentar notablemente la producción de PGGA (Kubota et al., 1992).

Estos autores han realizado recientemente un estudio consistente en añadir diversos aminoácidos al medio y determinar su influencia sobre el rendimiento y observan que en presencia de concentraciones de ácido L-glutámico entre 7 y 15 %, se llegan a alcanzar producciones de PGGA entre 45 y 50 g L⁻¹ (Kubota et al., 1993). Jung et al. (2005) han optimizado la producción de PGGA utilizando *B. subtilis* RKY3, un nuevo bacilo que con un suplemento de ácido L-glutámico de 90 g/L permite obtener un rendimiento máximo de 83.2 g/L. A diferencia de otros protocolos de producción descritos previamente, con el *B. subtilis* RKY3 parece que la producción depende más de la concentración de Mg²⁺ que de Mn²⁺ (Jung et al., 2005).

Wu y colaboradores (2011) aislaron una nueva cepa de *B. subtilis*, NX-2, cuya principal característica es que no produce PGGA en presencia de ácido cítrico, pero si lo hace utilizando otras fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, maltosa, almidón y glicerol; en este trabajo estudiaron a nivel molecular las propiedades de transporte del glutamato en la síntesis de PGGA (Wu et al., 2011). Thorne (1954) fue el primero en proponer un mecanismo de biosíntesis del PGGA mediado por el ácido pirúvico y basado en la intervención de las enzimas alanina-racemasa y de D y L-glutamil-transamidasa. En este mecanismo el ácido α -cetoglutarico juega un papel central. Las observaciones de Troy están en desacuerdo con esta interpretación y sugieren como alternativa un proceso basado en la formación de un hidroxamato de glutamilo (Gardner et al., 1979).

El mecanismo más consistente con la mayoría de las observaciones hasta ahora descritas gira alrededor del metabolismo de los ácidos tricarbónicos cítrico e isocítrico (ciclo TCA). Este mecanismo ha sido elaborado por Kunioka en base a sus estudios sobre *B. subtilis* IFO3335. El mecanismo incorpora el ciclo del pirúvico propuesto por Thorne et al. (1954) y explica la formación de polisacáridos a partir de la glucosa (Figura 5). Hay que señalar sin embargo que la producción de polisacárido no se observa en la fermentación de *B. licheniformis*.

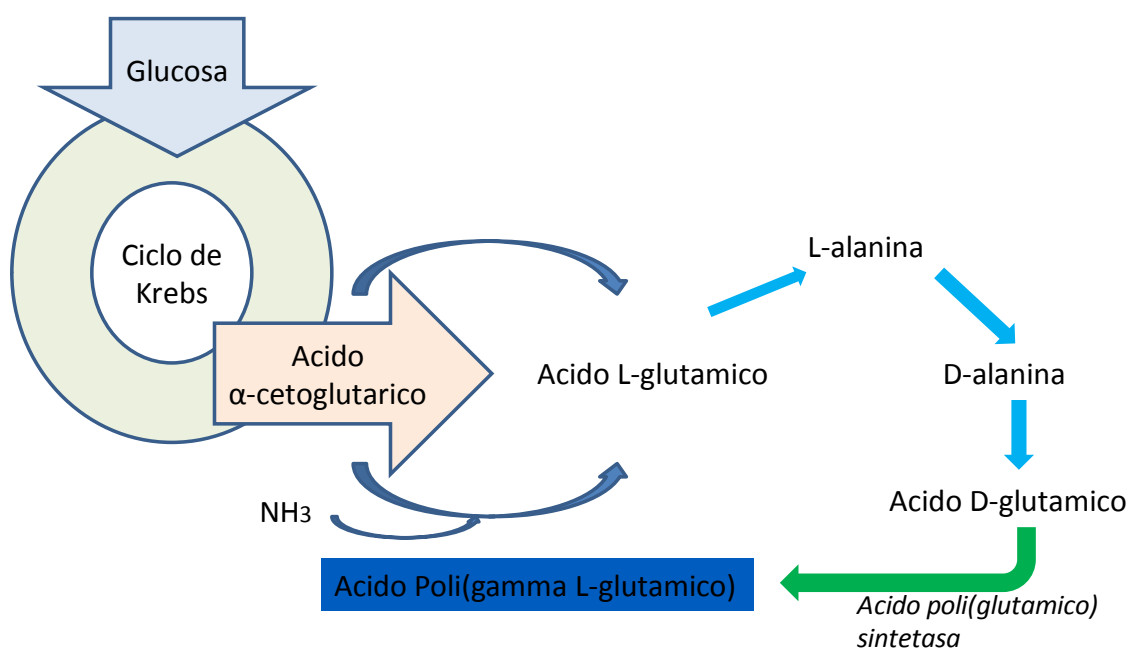


Fig. 5. Ruta metabólica de obtención de PGGa en *B. subtilis*.

DERIVADOS DEL PGGa

La esterificación del PGGa no es una reacción fácil de ejecutar debido a que la reactividad del grupo carboxilo está atenuada por la proximidad de éste a la cadena principal y porque las condiciones de reacción no pueden extremarse sin que se produzcan descarboxilaciones o roturas en la cadena polimérica. Además las posibilidades de selección del medio de reacción están severamente limitadas por la escasa solubilidad del PGGa. En consecuencia, la obtención de conversiones del 100% no es siempre factible, en particular cuando se trata de introducir grupos largos o voluminosos. La gran mayoría de los métodos se basan en

la reacción del bromuro de alquilo en presencia de bicarbonato sódico en un disolvente del PGGa, generalmente DMSO o NMP.

Una forma de preparación de Poli(α-alquil- γ-glutamato)s a través de dos pasos: primero esterificación del PGGa para obtener Poli(α-etil γ-glutamato) y posteriormente transesterificación de éste con el alcohol adecuado en presencia de catalizador de titanio para obtener PAAG-n (Mellis et al., 2001; Morillo et al., 2001). Este procedimiento es adecuado para la obtención de ésteres con grupos alquilos largos ($n > 8$) y su espectro de aplicación es general (Figura 6).

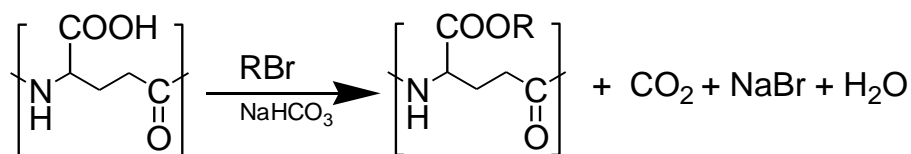


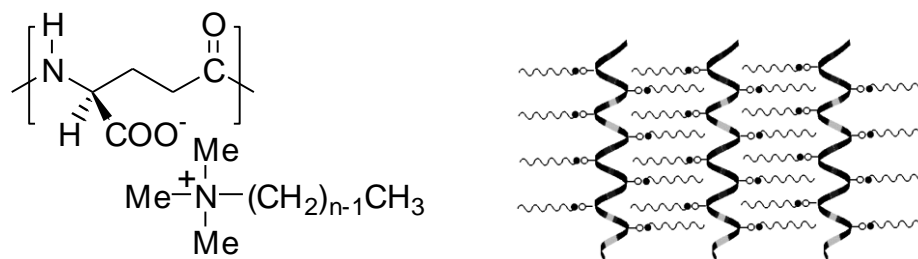
Fig. 6. Obtención de γ - poliglutamatos de alquilo.

Pérez-Camero et al. (2001) han llevado a cabo la preparación de ésteres solubles en agua por transesterificación del Poli(α -metil γ -glutamato) obtenido por el método del diazometano, con mono, di y trietilenglicoles que tienen el hidroxilo final bloqueado como metiléter.

Los complejos iónicos polielectrolito-tensioactivo constituyen un sistema de interés actual por su facilidad de preparación y capacidad para presentar propiedades tales como si fueran compuestos covalentes. Cao et al. (2011) describen la capacidad del PGGA para formar compuestos estables con productos de naturaleza catiónica tales como quitosano o aminas cuaternarias, pero se

refiere a ello como complejos resultantes de la formación intermolecular de puentes de hidrógeno y formación de films por capas.

Pérez-Camero et al. (1999) han realizado un estudio exploratorio de los complejos que forma el PGGA de *B. licheniformis* con tensioactivos catiónicos de alquiltrimetilamonio (Figura 7). Los complejos tienen composición muy próxima a la estequiométrica, son insolubles en agua y solubles en CHCl_3 , y presentan propiedades térmicas similares a las de los PAAG-n.



$n\text{ATMA} \cdot \text{PGGA}$ ($n = 12, 14, 16, 18, 20, 22$)

Fig. 7.- Fórmula química de los complejos iónicos y representación de su estructura molecular

Estos compuestos adoptan una estructura supramolecular de naturaleza bifásica característica de polímeros tipo peine, no estando claro si las cadenas polipeptídicas se encuentran en conformación helicoidal o extendida. Los complejos nATMA•PGGA presentan una morfología cristalina dependiente de la longitud de la cadena lateral con texturas que van desde la de mosaico propia de cristales líquido esmécticos ($n = 12$) hasta esferulíticas ($n = 22$) (Pérez-Camero et al., 1999).

García-Alvarez et al. (2005) han centrado su estudio en complejos nATMA•PGGA con configuración cercana a la racémica. Al comparar con los complejos prácticamente enantiomeros puros, estudiados con anterioridad, constatan un comportamiento similar, si bien existen ciertas diferencias en cuanto a cristalinidad de la cadena lateral y respuesta dimensional a la temperatura.

APLICACIONES BIOMÉDICAS

La mayor parte de las aplicaciones actuales del PGGA se sitúan en el sector de la alimentación. Los desarrollos como material floculante y gelificante están muy avanzados. Aunque se han iniciado numerosas investigaciones sobre la posible utilización del PGGA como material biomédico, estas aplicaciones sólo son potenciales por el momento.

La posibilidad de emplear PGGA en aplicaciones biomédicas ha sido estudiada por diferentes autores. Al igual que la Poli(lisina), el ácido Poli(glutámico) es

soluble en agua, biodegradable, comestible y no tóxico. Por ello el PGGA ha generado un interés creciente tanto a nivel de investigación como industrial. Su uso se ha estudiado en áreas tales como el transporte y liberación de fármacos o los bioadhesivos (Shih et al., 2001).

La capacidad del PGGA como dispensador de fármacos y proteínas ha sido investigada por diversos autores (Takajima et al. 2011). Se ha probado en particular el la ovoalbumina encapsulada en nanoesferas de PGGA observándose que la actividad de la proteína persiste por largos períodos y que es motivada por la hidrólisis lenta del grupo éster, teniendo una amplia aplicación potencial en la liberación de vacunas (Akagi et al., 2011).

Sung et al.(2005) exponen en su trabajo de revisión las múltiples aplicaciones del PGGA como agente immuno-estimulante y anti-tumoral especialmente en el caso del polímero de elevado peso molecular. En inmunoterapia anti-cáncer se han utilizado nanopartículas de PGGA como portadoras de antígenos, comprobándose que se incrementa la respuesta inmune respecto a cuando éstos se encuentran en solitario (Matsuo et al., 2007). En ratones la respuesta inmune provocada por nanopartículas de PGGA portadoras de ciertos antígenos de VIH ha sido superior a la provocada cuando se han empleado nanopartículas no-biodegradables de poliestireno. (Wang et al., 2007). La biodegradabilidad, no toxicidad y propiedades regulatorias del sistema inmune del PGGA de alto peso molecular

han sido revisadas recientemente por Poo et al. (2010).

En la actualidad, la administración de la vacuna contra el bacilo del ántrax (AVA), la única existente con licencia, comporta desventajas considerables. En este sentido, se ha probado un sistema formado por PGGa capsular portador de RNA y combinado con ciertas proteínas que han inducido respuesta inmune en ratones (Brian et al., 2006).

Liang et al. han preparado nanopartículas de copolímeros en bloque de PGGa-poli(láctida). Las partículas con un tamaño de 140 nm y un potencial zeta de -20 mV, presentan una forma esférica y una superficie adecuada, tal como revelan las técnicas de microscopía TEM (Transmission Electronic Microscopy) y AFM (Atomic Force Microscopy). Se ha evaluado su interacción con determinadas células hepáticas cancerosas comprobando su potencial aplicación en el reconocimiento celular en terapia anti-cáncer (Liang et al., 2005 y 2006).

Se ha estudiado el transporte paracelular, en células de carcinoma intestinal, mediante un nuevo sistema de nanopartículas de PGGa-quitano. Los resultados indican un incremento in vitro de la permeabilidad celular (Lin et al., 2007).

Estudios realizados en animales in vivo han revelado que el ibuprofeno incorporado a nanofibras de PGGa es significativamente efectivo en la prevención de la adhesión tisular e induce a la cicatrización de heridas, probablemente debido a la hidrofiliidad del PGGa y a sus

buenas propiedades barrera (Ko et al., 2007).

En relación a la absorción de insulina funcional administrada por vía oral, se ha comprobado que cuando se administra insulina en el interior de nanopartículas de PGGa a ratas diabéticas es posible la permeabilidad celular de dichos nanosomas ya que disminuyen los niveles de glucosa en sangre. Los perfiles de liberación de insulina dependen en gran medida de los valores de pH del entorno (Lin et al., 2007).

Por su parte, Karmaker et al. (2007) han comprobado que la complejación del Cu^{2+} con PGGa origina complejos cuya estructura depende del pH y ejercen in vitro un papel fisiológico similar al de la insulina.

La actividad del PGGa-sulfonato como factor de crecimiento se ha comparado con la heparina y con otros derivados heparinoides, teniendo potencial aplicación en ingeniería de tejidos y en concreto en el campo de los tratamientos vasculares. El análisis por Microscopía de Barrido Electrónico (SEM), revela la asociación entre fibroblastos y dicho material (Matsusaki et al., 2005).

Akagi y su grupo de investigación (2005) prepararon y caracterizaron nanopartículas a partir de copolímeros de injerto de PGGa con segmentos hidrofóbicos del éster etílico de la fenilalanina, cuya aplicación sería el transporte de fármacos o proteínas. Las partículas presentaron una distribución monodispersa con tamaños entre 150 y 200 nm. Este grupo también ha explorado la interacción PGGa-Proteínas, ensayando

tres métodos de conjugación proteína-nanopartícula, por encapsulación, por inmovilización covalente y por adsorción. Los resultados revelan que la actividad enzimática se ve afectada por el método utilizado, siendo la encapsulación el método óptimo (Akagi et al., 2006).

Portilla-Arias et al. (2007) han reportado el uso de los complejos que forma el PGGA con tensioactivos catiónicos de alquiltrimetilamonio, como dispositivos de liberación prolongada de fármacos. Mediante la fabricación de discos con dichos complejos con extensión de cadena de tensioactivo de 14 y 18 átomos de carbono. Estos discos erosionan en masa liberando el antibiótico eritromicina de forma controlada siguiendo una cinética sigmoideal independiente de la carga de eritromicina, y dependiente de la

hidrofobicidad del complejo, siendo un 20% más rápida para el complejo más hidrofílico, es decir el de 14 átomos de carbono.

El mismo grupo de investigación reportó la fabricación de nanoesferas con los ésteres alquílicos del PGGA mostrados en la figura 8. Mediante el uso del método de nano-precipitación, se generaron esferas biodegradables de un diámetro entre 200 y 300 nm. En estas esferas se encapsularon moléculas terapéuticas como el antibiótico eritromicina con una efectividad de hasta el 80% y proteínas como la quimotripsina que se liberó, en un medio fisiológico simulado, de forma controlada a la par de la degradación hidrolítica del polímero, reteniendo su actividad enzimática (Portilla-Arias et al., 2009).

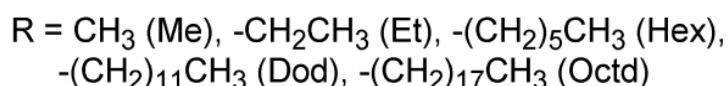
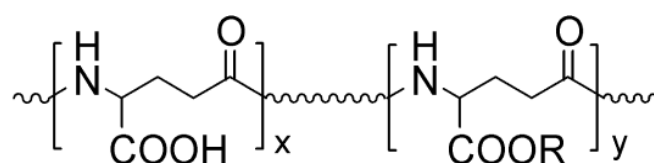


Fig. 8. Copolímeros del ácido poliglútamico con cadenas alquílicas laterales

Unos de los estudios más detallados sobre tratamiento in vivo aplicando PGGA, es el realizado por Fen et al. (2010). En este estudio se muestra la efectividad

antitumoral de un complejo formado por cisplatino y PGGA en ratones con un tumor humano de seno implantado (Fen et al., 2010).

REFERENCIAS

- Akagi T, Higashi M, Kaneko T, Kida T & Akashi M (2006) Hydrolytic and enzymatic degradation of nanoparticles based on amphiphilic poly(γ -glutamic acid)-graft-L-phenylalanine copolymers. *Biomacromolecules*. 7:297-303.
- Akagi T, Shima F & Akashi M (2001) Intracellular degradation and distribution of protein-encapsulated amphiphilic poly(amino acid) nanoparticles. *Biomaterials*. 32:4959-4967.
- Ashiuchi, M. & Misono, H. (2005) Poly- γ -glutamic acid. A. Steinbuchel, R.H. Marchessault (Eds.), *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*, Vol. 1 Wiley-VCH, Weinheim pp. 619-634
- Brian S & Zhengrong C (2006) Nasal immunization with a dual antigen anthrax vaccine induced strong mucosal and systemic immune responses against toxins and Bacilli. *Vaccine* 24: 6405-6413.
- Cao B, Yan SF, Zhang KX, Song ZJ, Chen X, Cui L & Yin J (2001) Layer-by-Layer Assembled Multilayer Films of Methoxypoly(ethylene glycol)-block-poly(α ,L-glutamic acid) and Chitosan with Reduced Cell Adhesion. *Macromol. Biosci*. 11: 1211-1217.
- Cheng C, Asada Y & Aida T (1989) Production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus licheniformis* A35 under denitrifying conditions. *Agric. Biol. Chem*. 53: 2369-2375.
- Feng Z, Yuping L, Haifeng Y, Jing H, Xu GX & Zirong W (2010) Poly (γ , L-glutamic acid)-cisplatin bioconjugate exhibits potent antitumor activity with low toxicity: A comparative study with clinically used platinum derivatives. *Cancer Sci*. 11:2476-2482.
- Garcia-Alvarez M, Alvarez JA, Alla A, Martinez de Ilarduya A, Herranz C & Muñoz-Guerra S (2005) Comb-like ionic complexes of cationic surfactants with bacterial poly(γ -glutamic acid) of racemic composition. *Macromol Biosci*. 5:30-38.
- Gardner JM & Troy FA (1979) Chemistry and biosynthesis of the poly(γ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*. Activation, racemization, and polymerization of glutamic acid by a membranous polyglutamyl synthetase complex. *J. Biol. Chem*. 254: 6262-6269.
- Hara T, Ogata S & Ueda S (1993) Plasmid doistribution in γ -polyglutamate-producing *Bacillus* strains isolated from Dan-douchi a natto-like non-salty fermented soybean food in China. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 39: 75-82.
- Hoppensack A, Oppermann-Sanio FB & Steinbuchel A (2003) Conversion of the nitrogen content in liquid manure into biomass and polyglutamic acid by a newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Micr. Lett*. 218: 39-45.
- IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry and IUB International Union of Biochemistry 1971) abbreviated

- Nomenclature of Synthetic Polypeptides (Polimerized Amino Acids) Londres: Butterworths (en línea). Disponible en: <http://stage.iupac.org/objID/Article/pac3302x0437> Consultado el 10 Agosto 2011]
- Jung DY, Jung S, Yun JS, Kim JN, Wee YJ, Jang HG & Ryu H. (2005) Influences of cultural medium component on the production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus* sp. RKY3. *Biotech. Bioprocess Eng.* 10: 289-295.
- Karmaker S, Saha KT & Sakurai H (2007) Investigation of a Cu-II-poly(γ -glutamic acid) complex in aqueous solution and its insulin-mimetic activity. *Macromol Biosci.* 7: 456-466.
- King EC, Blacker AJ & Bugg TDH (2000) Enzymatic breakdown of poly- γ -D-glutamic acid in *Bacillus licheniformis*: Identification of a polyglutamyl γ -hydrolase enzyme. *Biomacromolecules.* 1: 75-83.
- Ko YG, Yoon KH, Park C, Sung MH & Kwon OK (2007) Preparation and evaluation of poly(γ -glutamic acid)-based anti-adhesion membranes. *Key Eng. Materials.* 342-343:225-228.
- Kubota H, Nambu Y & Endo T (1993) Convenient and quantitative esterification of poly(γ -glutamic acid) produced by microorganism. *J. Polym. Sc. Part A: Polym. Chem.* 31: 2877-2878.
- Kubota H, Nambu Y & Endo T (1995) Convenient esterification of poly(γ -glutamic acid) produced by microorganism with alkyl halides and their thermal properties. *J. Polym. Sc. Part A: Polym. Chem.* 33: 85-88.
- Kubota H, Nambu Y & Endo T (1996) Alkaline hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) produced by microorganism. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 34: 1347-1351.
- Kubota H, Matsunobu T, Uotani K, Takebe H, Satoh A & Taniguchi M (1992) Large scale production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. *Sci Report Meiji Seika Kaisha.* 31:41-50.
- Liang HF, Chen CT, Chen SC, Kulkarni AR, Chiu YL, Chen MC & Sung HW (2006) Paclitaxel-loaded poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer. *Biomaterials* 27:2051-2059.
- Liang HF, Yang TF, Huang CT, Chen MC & Sung HW (2005) Preparation of nanoparticles composed of poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) block copolymers and evaluation of their uptake by HepG2 cells. *J. Control. Release.* 105: 213-25.
- Lin YH, Chung CK, Chen CT, Liang HF, Chen SC & Sung HW (2005) Preparation of nanoparticles composed of chitosan/poly- γ -glutamic acid and evaluation of their permeability through caco-2 cells. *Biomacromolecules.* 6:1104-12.
- Lin YH, Mi FL, Chen CT, Chang WC, Peng SF, Liang HF & Sung HW (2007) Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules.* 8:146-152.

- Matsuo K, Yoshikawa T, Oda A, Akagi T, Akashi M, Mukai Y, Yoshioka Y, Okada N & Nakagawa S (2007) Development of amphiphilic gamma-PGA-nanoparticle based tumor vaccine: Potential of the nanoparticulate cytosolic protein delivery carrier. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 366:408-413.
- Matsusaki M & Akashi M (2005) Novel functional biodegradable polymer IV: pH-Sensitive controlled release of fibroblast growth factor-2 from a poly(gamma-glutamic acid)-sulfonate matrix for tissue engineering. *Biomacromolecules.* 6:3351-3356.
- Matsusaki M, Serizawa T, Kishida A & Akashi M (2005) Novel functional biodegradable polymer II: Fibroblast growth factor-2 activities of poly(gamma-glutamic acid)-sulfonate. *Biomacromolecules.* 6:400-407.
- Melis J, Morillo M, Martinez de Ilarduya A & Muñoz-Guerra S (2001) Poly(α -alkyl-gamma-glutamate)s of microbial origin: I. Ester derivatization of poly (gamma-glutamic acid) and thermal degradation. *Polymer.* 42:9319-9327.
- Morillo M, Martinez de Ilarduya A & Muñoz-Guerra S (2001) Comblike alkyl esters of biosynthetic poly(g-glutamic acid). 1. Synthesis and characterization. *Macromolecules.* 34:7868-7875.
- Oppermann-Sanio FB & Steinbüchel A (2002) Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. *Naturwissenschaften.* 89: 11-22.
- Perez-Camero G, Congregado F, Bou JJ & Muñoz-Guerra S (1999) Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly(gamma-glutamic acid). *Biotech. Bioeng.* 63: 110-115.
- Perez-Camero G, Garcia-Alvarez M, Martinez de Ilarduya A, Fernandez CE, Campos L & Muñoz-Guerra S (2004) Comblike complexes bacterial poly(gamma,D-glutamic acid) and cationic surfactants. *Biomacromolecules.* 5:144-152.
- Poo H, Park C, Kwak MS, Choi DW, Hong SP, Lee IH, Lim YT, Cho YK, Bae SF, Uyama H, Kim CJ & Sung MH (2010) New biological functions and applications of high-molecular-mass poly-g-glutamic acid. *Chem. Biodiversity.* 7:1555-1562.
- Portilla-Arias JA, Camargo B, Garcia-Alvarez M, Martinez de Ilarduya A & Muñoz-Guerra S. (2009) Nanoparticles made of microbial poly(γ -glutamate)s for encapsulation and delivery of drugs and proteins. *J. Biomat. Sci.* 20:1065-1079.
- Portilla-Arias JA, Garcia-Alvarez M, Martinez de Ilarduya A & Muñoz-Guerra S (2007) Ionic complexes of biosynthetic polymalic and polyglutamic acids as prospective drug delivery systems. *Macromol Biosci.* 7:883-896.
- Sawa S, Murakawa T, Murao T & Omata S (1973) Isolation and purification of polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* (5) 47: 159-165.
- Shih IL & Van YT (2001) The production of poly-(γ -glutamic acid) from

Artículos

- microorganisms and its various applications. *Bioresour. Technol.* 79: 207–225.
- Sung M, Park C, Kim CJ, Poo H, Soda K & Ashiuchi M (2005) Natural and edible biopolymer poly-gamma-glutamic acid: Synthesis, production, and applications. *Chemical Record.* 5:352-366.
- Tajima T, Ueno S, Yabu N, Sukigara S & Ko F (2011) Fabrication and Characterization of Poly-gamma-glutamic Acid Nanofiber. *J. Appl. Pol. Sci.* 122:150-158.
- Tanimoto H, Mori M, Motoki M, Torii K, Kadowaki M & Noguchi T (2001) Natto mucilage containing poly-gamma-glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine. *Biosci. Biotech. Biochem.* 65: 516-521.
- Thorne CB, Gomez CG & Noyes HE (1954) Production of glutamyl polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriology.* 68: 307-315.
- Wang X, Uto T, Akagi T, Akashi M & Baba M (2007) Poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles as an efficient antigen delivery and adjuvant system: Potential for an AIDS vaccine. *J. Virology.* 80:11-19.
- Wu Q, Xu H, Zhang D & Ouyang P (2011) A Novel Glutamate Transport System in Poly(γ -Glutamic Acid)-Producing Strain *Bacillus subtilis* CGMCC 0833. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164:1431-1443.
- Yoon SH, Do JH, Lee SY & Chang HN (2000) Production of poly-c-glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 22:585–588.