

Design and construction of a fungal encapsulation device for the mass production of drugs for administration in sheep.

Marcelo Tosini^{1,2}  and Eduardo Charlone ¹  and Federica Sagües¹  Manuela Southwell¹ 

¹ Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires

² Universidad de la Fraternidad de Agrupaciones Santo Tomas de Aquino

Abstract. This work proposes, within the context of a larger integrated project, the design and development of a portable device for producing capsules that allow the administration of drugs to cattle via drinking water. The main objectives are: (1) to increase capsule production compared to other artisanal methods currently used in the research laboratory, (2) to develop the device using readily available or easily manufactured components from the local market, and (3) to optimize the equipment design for future commercialization. The device incorporates 3D-modeled and printed components, components readily available from local suppliers, and a simple yet robust control system that allows for almost automatic operation with minimal operator intervention. The use of readily available components aims to achieve affordable costs compared to existing equipment, which is much more expensive and inaccessible in the current market. A first version of the device is undergoing laboratory production tests with favorable results that allow the production process to be accelerated up to 10 times compared to the currently used handcrafted method and costs around 6 times cheaper than other commercially available equipment.

Keywords: alginate encapsulation, livestock medication, portable device.

Diseño y construcción de un dispositivo de encapsulación de hongos para la producción masiva de fármacos para administración en ovinos

Resumen. El trabajo propone, en el contexto de un proyecto más abarcativo, el diseño y desarrollo de un dispositivo portátil para la producción de capsulas para la administración de fármacos a ganado ovino en el agua de bebida. Los objetivos principales se relacionan con: (1) aumentar la producción de capsulas respecto de otros métodos artesanales usados en la actualidad en el laboratorio de investigación, (2) desarrollar el dispositivo a partir de componentes ampliamente accesibles o sencillos de fabricar en el mercado local, y (3) optimizar el diseño del equipo en vistas a su futura comercialización. El dispositivo posee componentes modelados e impresos en 3D, componentes de fácil adquisición en proveedores

locales y un sistema de control sencillo y robusto que permite realización del proceso de manera casi automática y con limitada intervención del operador. La construcción con componentes accesibles persigue la meta de costos viables frente a equipos existentes mucho más costosos e inaccesibles en el contexto actual. Una primera versión del dispositivo se somete a pruebas de producción en laboratorio con resultados favorables que permiten acelerar el proceso de producción hasta 10 veces respecto del método artesanal utilizado actualmente y costos del orden de 6 veces más baratos que otros equipos disponibles comercialmente.

Palabras clave: encapsulador de alginato, medicación ganado, dispositivo portátil.

1 Introducción

Las parasitosis en la producción animal se reconocen como la principal limitante productiva en categorías de animales jóvenes. Diversos productos y métodos de inoculación son aplicados cotidianamente. A pesar de la amplia oferta de productos antiparasitarios, los elevados costos, el manejo de grandes volúmenes de hacienda y la complejidad operativa de las vías de administración tradicionales dificultan un control eficiente. En este contexto, se está desarrollando un proyecto de investigación (Sagües et al., 2022) enfocado en un sistema de control biológico mediante el microencapsulamiento de hongos nematófagos en esferas de alginato. Este método busca facilitar la administración masiva a través del agua de bebida, permitiendo una integración sencilla y económica a la rutina del establecimiento sin la necesidad de intervención individual por animal.

En general, el proceso de encapsulación de fármacos u otros componentes (el proceso es usado también en el ámbito de la alimentación) es una técnica farmacéutica que protege principios activos dentro de una cubierta (polímeros, lípidos, gelatina) para mejorar su estabilidad, biodisponibilidad y eficacia, permitiendo la liberación controlada y dirigida a zonas específicas (Lupo Pasin, 2014)

En particular, en el ámbito del proyecto, se han estudiado los efectos predatorios del hongo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infecciosas de parásitos gastrointestinales en ganado ovino a partir de la administración de microesferas de alginato en el agua de bebida (Bilotto et al., 2018) (Sagües et al., 2020). Para ello, se pretende llevar adelante todo el proceso, desde la encapsulación del hongo en microesferas de alginato, hasta la distribución en bebederos automatizados con capacidad de liberación de cantidades determinadas de microesferas en el agua de bebida.

Respecto de la fabricación de capsulas, la misma consiste en el goteo continuo de alginato de sodio sobre cloruro de calcio mediante un dispositivo de diseño y fabricación propia que permite la liberación del alginato a través de un sistema multicanales con control automatizado de flujo y presión del alginato, obstrucción de canales, caudal de aire y densidad de micro esferas en suspensión, tal como se detalla en la sección siguiente.

En el mercado farmacéutico se pueden encontrar productos diseñados a tal fin, con costos elevados y requerimientos de puesta en uso a veces prohibitivos para el mercado local. Por caso, el fabricante de equipamiento de laboratorios Bucchi, produce y distribuye el Encapsulador B-390 para la producción de perlas en laboratorios de investigación o para pequeñas producciones. El equipo es de alta calidad y versatilidad, pero el costo es altamente prohibitivo en ciertos espacios (250000 INR – 28000 U\$S).

2 Técnicas de producción de partículas de gel

2.1 Mecanismos de gelificación para encapsulación

El proceso de formación de partículas de gel de alginato se basa en dos estrategias principales de gelificación iónica, cuya principal diferencia radica en la cinética del proceso (Avendaño-Romero et al., 2013).

- Gelificación Externa: Este proceso ocurre por la difusión de un catión, como el Ca^{2+} , desde una fuente externa que rodea a la solución de alginato (Avendaño-Romero et al., 2013; Lupo-Pasin et al., 2012). La formación del gel comienza en la interfaz y avanza hacia el interior, lo que resulta en geles no homogéneos con un gradiente de concentración de alginato y de catión que disminuye desde la superficie hacia el núcleo (Avendaño-Romero et al., 2013; Ching et al., 2017).
- Gelificación Interna: Este método consiste en la liberación controlada del catión desde una fuente insoluble o parcialmente soluble que se encuentra dispersa dentro de la misma solución de alginato (Avendaño-Romero et al., 2013; Lupo-Pasin et al., 2012). La liberación del ion se activa mediante la adición de un ácido que solubiliza la sal de calcio, lo que permite que la gelificación ocurra de manera simultánea en todo el volumen, dando como resultado geles homogéneos (Ching et al., 2017; Lupo-Pasin et al., 2012).

2.2 Técnicas de producción de partículas de gel

La selección de la técnica de producción depende del tamaño de partícula deseado para la aplicación final (Ching et al., 2017).

- Técnicas para Macrogeles ($>1000\ \mu\text{m}$):
 - Extrusión por Goteo Simple: Este es el método más común, que consiste en la extrusión gota a gota de una solución de alginato desde una jeringa hacia un baño de gelificación con calcio (Ching et al., 2017; Solis, 2017). Este procedimiento produce esferas con un diámetro típico en el rango de 1 a 2 mm (Ching et al., 2017).
- Técnicas para Microgeles ($0.2 - 1000\ \mu\text{m}$):
 - Extrusión Modificada: Para obtener partículas más pequeñas, se emplean técnicas avanzadas como la atomización electrostática, el uso de boquillas vibratorias y el corte por chorro (jet cutting) (Ching et al., 2017).
 - Técnica de Emulsión: En este método, la solución de alginato se dispersa en una fase oleosa para formar una emulsión de agua en aceite (W/O), seguida por la inducción de la gelificación (Lupo-Pasin et al., 2012). Se considera una técnica sencilla y adecuada para la producción a gran escala (Ching et al., 2017; Lupo-Pasin et al., 2012).
 - Secado por Atomización (Spray Drying): Este método consiste en pulverizar una emulsión o suspensión de alginato en una corriente de aire

caliente para promover la evaporación instantánea del agua (Lupo-Pasin et al., 2012). Aunque es un proceso práctico y económico, su aplicación con alginato puro se ve limitada por la alta viscosidad de la solución (Lupo-Pasin et al., 2012; Ching et al., 2017).

La micro encapsulación puede realizarse de diferentes maneras. La técnica adecuada depende fuertemente de las propiedades físico-químicas del material de soporte y la aplicación final deseada, a fin de asegurar que se mantengan las propiedades químicas del hongo. Al emplear el alginato como matriz polimérica, las técnicas de micro encapsulación en aplicaciones sanitarias se reducen a: extrusión, emulsión y secado por atomización (Ramana et al., 2019).

Para este proyecto, se optó por el método de encapsulación por extrusión ya que, la sensibilidad del principio activo (hongo *D. flagrans*) a las altas temperaturas, no permite el uso del método de secado por atomización.

3 Generador de perlas de alginato propuesto

La encapsulación por extrusión puede realizarse de diversas maneras. Las cuatro más difundidas en la literatura son: a) flujo de aire coaxial, que utiliza un flujo de aire coaxial al flujo de alginato para producir las burbujas; b) electrostática, que utiliza una diferencia de potenciales electrostático entre el flujo de alginato y el cloruro de calcio en el recipiente receptor; c) vibratoria, que fuerza la generación de gotas mediante algún mecanismo vibratorio en el difusor de alginato; y d) mediante cortadora de chorro (jetcut), que utiliza un sistema de cuchillas giratorias de alta velocidad para cortar el chorro de alginato (Lupo Pasin, 2012). En el proyecto se realizaron modelos de los métodos coaxial air-flow y vibration para poder realizar comparaciones entre ambos y determinar el de mejor rendimiento. Dispositivos utilizando cualquiera de estos métodos están ampliamente difundidos en el mercado, aunque sus costos son prohibitivos en muchos casos o los repuestos de componentes desechables difíciles de conseguir en el mercado local.

El objetivo principal de este diseño fue, desde el principio, poder desarrollar el dispositivo a un costo accesible, con componentes de fácil adquisición local y con componentes generables a partir de impresiones 3D de modelos desarrollados específicamente para el dispositivo.

3.1 Método propuesto de flujo de aire coaxial

En este método, un flujo de alginato, proveniente de una cuba es rodeado por un flujo de aire a presión, que fuerza la generación de gotas controlables en tamaño y cantidad. El método es una mejora del método de goteo por gravedad, que consiste en hacer pasar la solución de alginato por un dispositivo extrusor de tamaño y velocidad de goteo controlado (Lee et al., 2021). Las gotas se generan de manera espontánea cuando la tensión del material saliente del pico del extrusor es vencida por el propio peso del material,

resultando en la formación de una gota. En estas condiciones, el agregado de un flujo de aire coaxial permite acelerar este proceso con el consecuente aumento en la cantidad y esfericidad de las gotas formadas.

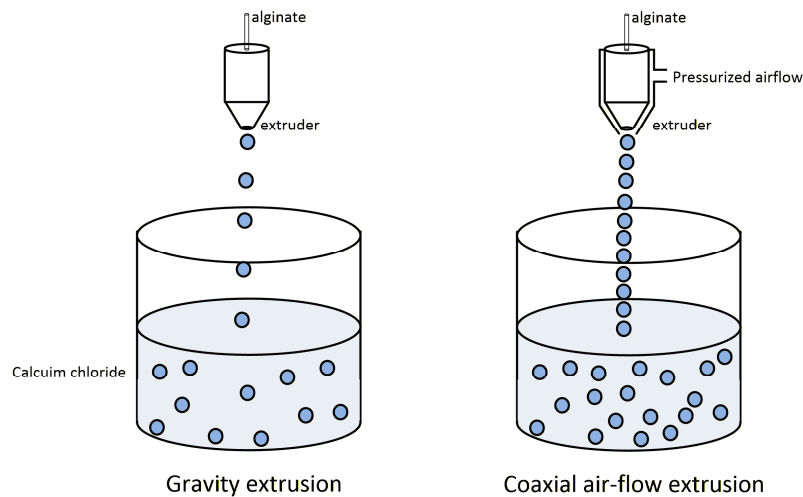


Fig 1. Método básico de extrusión por gravedad (izquierda), método mejorado de flujo coaxial de aire (derecha).

Para cumplir los objetivos propuestos, se diseñó un extrusor compuesto de dos partes principales: una aguja hipodérmica de uso genérico en medicina, a modo de dispensador del alginato, y un dosificador del flujo de aire modelado e impreso en 3D. Ambos componentes ensamblados permiten el control tanto del caudal de gotas generadas (mediante la regulación del caudal de aire y la distancia entre el pico de aire y la aguja), como el tamaño de las mismas (determinado por el tipo de aguja utilizado). En la figura 2 se pueden ver los componentes utilizados y su ensamble.

3.2 Método por vibración propuesto

En esta segunda alternativa, el flujo de alginato, proveniente de la cuba es enviado a las agujas extrusoras (4 en este diseño), que fuerzan la generación de gotas mediante un sistema vibratorio rotativo. En este caso, las gotas se generan de manera espontánea cuando la tensión del material saliente del pico de los extrusores es vencida por el propio peso del material más la acción del sistema de vibración, que refuerza el mecanismo de gravedad, resultando en la formación de gotas.



Fig 2. Componentes básicos del método de flujo coaxial de aire (izquierda), prototipo en uso (derecha).

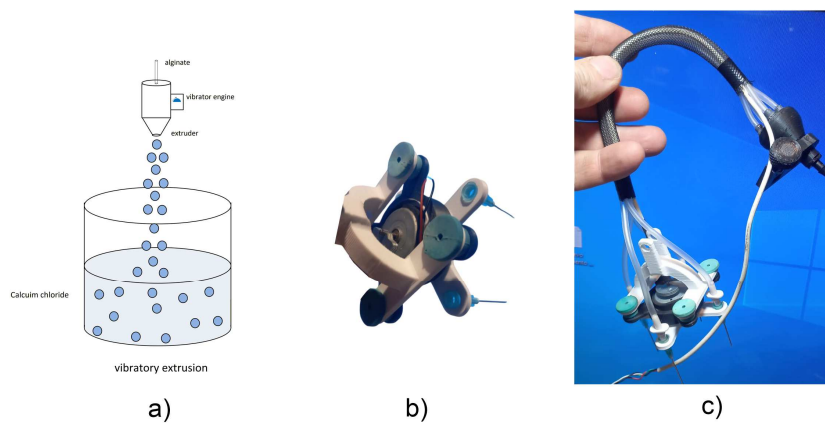


Fig 3. a) Método básico de extrusión por vibración. b) dispositivo de extrusión por vibración. c) sistema completo de extrusión múltiple

4 Sistema de control embebido del dispositivo

El Sistema de control del dispositivo está totalmente integrado en un módulo gobernado por un microcontrolador que testea el estado de magnitudes de presión de aire y presión de alginato, obstrucción de inyectores y tiempos de proceso.

El diagrama general del sistema propuesto está expuesto en la figura 4 y la funcionalidad de sus componentes principales se explica a continuación

La presión de la emulsión de alginato se mide en la entrada del derivador hacia los extrusores. La presión debe ser aproximadamente constante, por lo que cualquier aumento mayor a cierto umbral debe interpretarse como una obstrucción en uno o más extrusores y se fuerza la detención del proceso. Dada la alta densidad del alginato, las presiones necesarias alcanzan los 20 a 25 Kpa (2.9 a 3.6 psi). Esta misma magnitud se utiliza para detectar anomalías como taponamientos de extrusores, cuando la presión es mayor que un umbral configurable en la aplicación (por defecto 30 Kpa). La presión de aire ingresado a las boquillas de los extrusores permite controlar las características de tamaño y cantidad de gotas que se generan, por lo que el control de esta magnitud permite una producción más homogénea y constante. En este caso, la presión del aire es más débil que la necesaria para alimentar el extrusor de alginato, del orden de 5 a 15 Kpa (0.7 a 3.0 psi). El control de velocidad del motor del agitador también es de importancia, ya que el proceso de gelificación del alginato puede requerir variaciones de velocidad en los diferentes momentos del proceso de producción. El rango de velocidades del dispositivo es de 1 a 30 revoluciones por segundo. Por último, es posible medir la resistividad del cloruro de calcio a fin de determinar en qué momento la efectividad del mismo comienza a ser baja y se debe finalizar el proceso. El cloruro de calcio (CaCl_2) al disolverse en agua aumenta significativamente la conductividad eléctrica y reduce drásticamente la resistividad del agua. Es un compuesto altamente higroscópico y soluble que se disocia en iones (Ca^{2+} y Cl^-), lo que facilita el paso de la corriente eléctrica. Para concentraciones en agua destilada en rangos de 500 a 50000 mg/L (ppm) la resistividad va de 10.5 a 0.15 $\Omega \cdot m$ (0.95 a 66.7 mS/cm). De esta manera, un simple sensor de continuidad de líquidos permite realizar dicha medición para las concentraciones usadas en los experimentos (0.1 Molar -11,1 g/litro- y 0.5 Molar -55,5 g/litro-)

Un microcontrolador Esp32 Nodemcu es usado para la implementación del sistema de control con las interfaces usuales como botonera para las distintas configuraciones y pantalla de exposición de datos. Al mismo tiempo, este microcontrolador permite la adquisición de datos y el control del sistema a través de wifi. Los sensores de presión utilizados son del tipo Mps20N0040, de precio accesible y amplia disponibilidad en mercado. Los componentes se imprimen en impresora 3D a partir de modelos de diseño propietario y se ensamblan para obtener los extrusores y soportes necesarios para el armado de la línea de extrusión.

El alginato se puede forzar hacia los extrusores utilizando cualquier bomba peristáltica, aunque se ensayan modelos impresos en 3D para incluir en el conjunto de componentes del dispositivo. Por último, el aire a presión se puede obtener de cualquier compresor disponible.

La figura 4.b) muestra uno de los primeros prototipos desarrollado para las diversas pruebas de extrusores (en la imagen el sistema de flujo de aire coaxial) y la realización de distintos experimentos con variaciones de presiones de alginato y aire y diferentes medidas de agujas hipodérmicas (25x8 cono verde, 16x5 cono naranja). Es de notar que a las agujas hipodérmicas se les elimina la punta sesgada a fin de evitar la formación de remolinos en el flujo de alginato a la salida del extrusor.

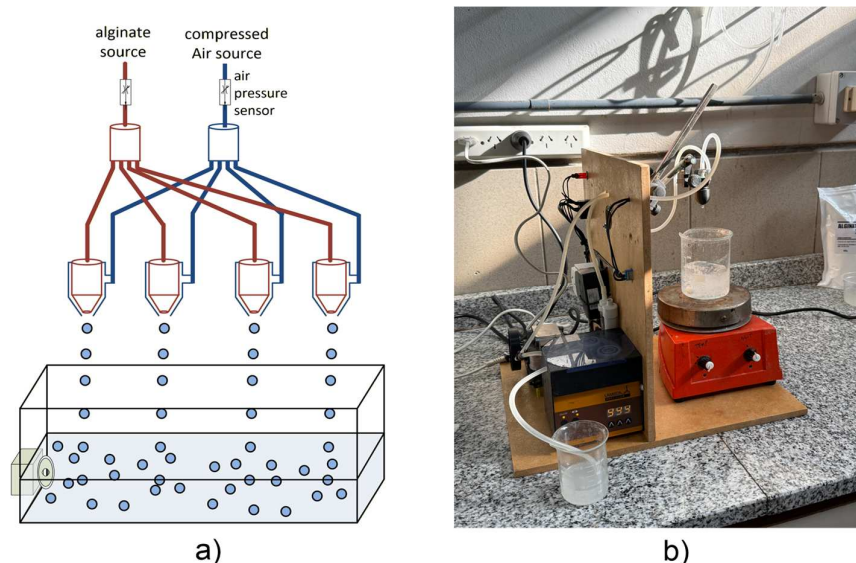


Fig 4. a) Diseño propuesto para el encapsulador por flujo coaxial de aire; b) prototipo desarrollado para mediciones experimentales

5 Resultados experimentales

A fin de poder llevar adelante la fase de experimentación objetiva, y la obtención de comparaciones se realizó la fabricación de cápsulas de manera artesanal a través del goteo continuo de alginato de sodio sobre cloruro de calcio, generando una gota única por vez. La fabricación de 125g de cápsulas conteniendo el hongo, necesarias para el tratamiento semanal de 20 ovinos, ocupó 8 horas de un operario especializado.

Parte de las pruebas obtenidas con un prototipo en fase de desarrollo se muestran en la tabla 1, a continuación. Para estas pruebas, el prototipo consistió en un extrusor con sistema de inyección de flujo de aire coaxial, forzado de alginato por bomba peristáltica y aguja de extrusión de 25x8 cono verde. En estas condiciones, el promedio de tiempos para la producción de 125g de microesferas se redujo de 8 horas a solo 45 minutos. La tabla 1 muestra algunos parámetros medidos para diferentes experimentos en laboratorio variando las concentraciones de alginato y cloruro de calcio y los tiempos de reticulación (tiempo de espera para una gelificación interna completa y estable)

Tabla 1. Experimentos de laboratorio variando la concentración de alginato y CaCl_2 , y los tiempos de reticulación.

% alginato	CaCl_2 (M)	T. reticulación (mins)	Rendimiento (%)	diámetro (mm) húmedas
1	0,1	10	55,3	2,62
1	0,1	25	48,8	2,65
1	0,5	10	45,8	2,65
1	0,5	25	52,9	2,58
1,5	0,1	10	47,1	3,26

Los tiempos de reticulación, rendimiento y diámetro obtenidos muestran que el dispositivo presenta comportamiento estable, independiente del tiempo esperado para la gelificación. Además, los tamaños con diámetros de 2,5 mm aproximadamente son los deseables para el tipo de aguja extrusora utilizada y para aplicar al agua de bebida del ganado

6 Conclusiones y trabajo futuro

Se diseñaron dos modelos diferentes según variaciones de los métodos de flujo de aire coaxial y vibratorio. Se implementaron y probaron sus capacidades de generación de gotas de alginato midiendo específicamente los tamaños de gotas generadas, la dispersión de la lluvia de gotas y la densidad de las mismas. El método de flujo coaxial de aire mostró mejor comportamiento, sobre todo en cuanto a la menor área de dispersión y tamaño de gotas más estable. Se modelaron los componentes imprimibles y se ensambló en dispositivo junto al sistema embebido de control basado en un microcontrolador Esp32 Nodemcu y sensores específicos para la medición de presión. Se logró mejoras en los tiempos de producción de hasta 8 veces más rápido con un equipo cuyo costo operativo resultó aproximadamente 6 veces más barato que un equipo de similares prestaciones de mercado.

Los planes a futuro involucran la mejora de los modelos de los componentes imprimibles en 3D, depurar el proceso de limpieza semiautomática del subsistema de alginato, que por las características propias del polímero tiende a tapar los ductos por los que circula. También se prevé una estrategia alternativa de medición de presión de alginato que no involucre el sensor de medición en el flujo del alginato, debido a los inconvenientes mencionados precedentemente. Por último, el escalado del sistema para aumentar la cantidad de producción a nivel semi industrial.

Referencias

- Sagües F., Saumell, C., Fernandez, A., Toloza, J., Vázquez, M., Bernat, G., Massa, J., Leiva, L., Tosini, M., Goñi, O. (2022). Encapsulación y administración de *Duddingtonia Flagrans* Como agente de control biológico de nematodos gastrointestinales en ovinos. Proyecto PICT-2021-I-A. UNICEN. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
- Lupo, Pasin, B.. (2014). Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales. Tesis de Doctorado en Ciencia i Tecnologia de Materials.Universitat de Barcelona.
- Sagües, M. F., Zegbi, S., Guerrero, I, Fernández, S., Iglesias, L., Junco, M., Saumell, C. (2020). Assessment of the efficacy in vitro of *Duddingtonia flagrans* isolate 03/99 in different doses of chlamydospores and faeces egg counts in faecal of sheep. BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY - ISSN 0958-3157. Reino Unido: TAYLOR & FRANCIS LTD. 2020 p1 - 1.
- Bilotto F., Fuse L., Sagues M. F., Iglesias L. E., Fernández A. S., Zegbi S., Guerrero I., Saumell C. A. (2018). Predatory effect of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of gastro-intestinal parasites under sunny and shaded conditions. EXPERIMENTAL PARASITOLOGY - ISSN 0014-4894. Estados Unidos, Amsterdam: ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE. 2018 p27 - 32.
- Avendaño - Romero, G. C., Lopez, A., & Palou, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 7(1), 87-96.
- Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2015). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(6), 1133-1152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>
- Lupo, B., Gonzalez, C., & Garriga, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 3 (1), 130-151.
- Solis, C. (2016). Comparación de dos materiales encapsulantes por el método de gelificación iónica normal e inversa. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.23113.85607>
- Ramana Reddy, K. V., Gupta, J., Izharuddin, P. (2019). Alginate Microspheres: The Innovative Approaches to Production of the Microbeads/Micro-Particles. Journal of Drug Delivery & Therapeutics. 2019; 9(4-s):774-781. <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v9i4-s.3413>
- Lupo Pasin, B., González Azón, C., Maestro Garriga, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 3 (1): 130-151. ISSN: 2218-4384.
- Lee, D., Greer, S. E., Kuss, M. A., An, Y., Dudley, A. T.. (2021). 3D printed alginate bead generator for high-throughput cell culture. Biomedical Microdevices. <https://doi.org/10.1007/s10544-021-00561-4>.