



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica
UNITEFA-CONICET

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

**DESARROLLO DE SISTEMAS DE TRANSPORTE Y LIBERACIÓN
NANOPARTICULADOS DESTINADOS A LA OPTIMIZACIÓN DE
LA ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DE FÁRMACOS**

Farm. Ivana Romina Scolari

Director de Tesis: Prof. Dra. Gladys E. Granero

- 2019 - Córdoba, Argentina

Comisión Evaluadora de Tesis:

Prof. Dr. César Gomez

Prof. Dr. Daniel García

Prof. Dr. Santiago Palma

Evaluador externo: Prof. Dr. Dario Leonardi

(Universidad Nacional de Rosario – UNR.)

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico obtenido a través de becas y subsidios otorgados por: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT), y Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC).

ÍNDICE

RESUMEN	I
----------------	----------

ABSTRACT	III
-----------------	------------

ABREVIATURAS	V
---------------------	----------

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
---	----------

1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1. NANOTECNOLOGÍA: NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	1
1.1.1.1. POLISACÁRIDOS NATURALES	3
1.1.1.1.1. QUITOSANO	3
1.1.1.1.2. ALGINATO	5
1.1.1.2. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	6
1.1.1.3. VENTAJAS DE LA UTILIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS	7
1.1.2. INFECCIONES BACTERIANAS	8
1.1.2.1. INFECCIONES POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS	10
1.1.2.2. TUBERCULOSIS	11
1.1.2.3. RIFAMPICINA	12
1.1.2.4. NANOPARTÍCULAS EN EL TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES BACTERIANAS	13
1.1.3. ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS POR VÍA PULMONAR	16
1.1.3.1. ANATOMO-FISIOLOGÍA DEL APARATO RESPIRATORIO	16
1.1.3.2. VENTAJAS DE LA VÍA DE ADMINISTRACIÓN PULMONAR	20
1.1.3.3. ANTECEDENTES DE NANOSISTEMAS DESTINADOS AL TRATAMIENTO DE INFECCIONES RESPIRATORIAS	21
1.2. OBJETIVOS	23
1.3. BIBLIOGRAFÍA	25

CAPÍTULO 2: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	33
---	-----------

2.1. INTRODUCCIÓN	33
2.1.1. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	33

2.1.2. PROCESO DE LIOFILIZACIÓN. AGENTES CRIOPROTECTORES.	35
2.1.3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	36
2.1.3.1. DISPERSIÓN DE LA LUZ DINÁMICA	36
2.1.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	37
2.1.3.3. ÁNGULO DE CONTACTO	38
2.1.3.4. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER	39
2.1.3.5. DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO (DRX)	40
2.1.3.6. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO Y CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	40
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.2.1. OBTENCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	42
2.2.1.1. ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE FASES DE RIFAMPICINA	44
2.2.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS RELACIONES DE MASA ENTRE ALGINATO Y CLORURO DE CALCIO	45
2.2.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS APLICANDO UN DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA CON EL MODELO DE BOX-BEHNKEN	45
2.2.1.4. OBTENCIÓN DEL POLVO LIOFILIZADO DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y TWEEN 80, VACÍAS Y CARGADAS CON RIFAMPICINA	47
2.2.2. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	47
2.2.2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	48
2.2.2.2. MEDICIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO	48
2.2.2.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER	48
2.2.2.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO	49
2.2.2.5. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO Y CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO	49
2.2.3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD COLOIDAL DE LAS NANOPARTÍCULAS A LARGO PLAZO	49
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
2.3.1. OBTENCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	50
2.3.1.1. ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DE FASES DE RIFAMPICINA	50
2.3.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS RELACIONES DE MASA ENTRE ALGINATO Y CLORURO DE CALCIO	53
2.3.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS APLICANDO UN DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA CON EL MODELO DE BOX-BEHNKEN	53
2.3.1.4. OBTENCIÓN DEL POLVO LIOFILIZADO DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y TWEEN 80, VACÍAS Y CARGADAS CON RIFAMPICINA	63
2.3.2. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	64
2.3.2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	64
2.3.2.2. MEDICIÓN DEL ÁNGULO DE CONTACTO	67
2.3.2.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER	68

2.3.2.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE POLVO	71
2.3.3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD COLOIDAL DE LAS NANOPARTÍCULAS A LARGO PLAZO	76
2.4. CONCLUSIONES PARCIALES	81
2.5. BIBLIOGRAFÍA	82

CAPÍTULO 3: ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE RIFAMPICINA

3.1. INTRODUCCIÓN	87
3.1.1. ENSAYO DE DIFUSIÓN EN PLACAS DE AGAR	87
3.1.2. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA	88
3.1.3. CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA	89
3.1.4. ENSAYO DE POTENCIAL DE MEMBRANA	89
3.1.5. ENSAYO DE CURVA DE MUERTE	90
3.1.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	90
3.1.7. MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA	91
3.1.8. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	91
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	92
3.2.1. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS NPs EN MEDIO DE CULTIVO	93
3.2.2. ENSAYO DE DIFUSIÓN EN PLACAS DE PETRI.	93
3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA.	94
3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA.	95
3.2.5. ENSAYO DE POTENCIAL DE MEMBRANA	96
3.2.6. ENSAYO DE CURVA DE MUERTE	97
3.2.7. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.	98
3.2.8. MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA	99
3.2.9. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	100
3.2.10. PRUEBA DE SENSIBILIDAD EN <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	101
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	102
3.3.1. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS NPs EN MEDIO DE CULTIVO.	102
3.3.2. ENSAYO DE DIFUSIÓN EN PLACAS DE PETRI.	103
3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA.	105
3.3.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA.	106
3.3.5. ENSAYO DE POTENCIAL DE MEMBRANA	107
3.3.6. ENSAYO DE CURVA DE MUERTE	110

3.3.7. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	112
3.3.8. MICROSCOPÍA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA	115
3.3.9. MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA	119
3.3.10. PRUEBA DE SENSIBILIDAD EN <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	125
3.4. CONCLUSIONES PARCIALES	127
3.5. BIBLIOGRAFÍA	129

CAPÍTULO 4: ADMINISTRACIÓN PULMONAR DE NANOPARTÍCULAS DE RIFAMPICINA:

ESTUDIOS PREMILINARES *IN VITRO* 135

4.1. INTRODUCCIÓN	133
4.1.1. MUCOADHESIÓN	133
4.1.2. REOLOGÍA	134
4.1.3. SURFACTANTE PULMONAR	135
4.1.4. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE FÁRMACOS	136
4.1.5. NANOCITOTOXICIDAD <i>IN VITRO</i>	136
4.1.6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA	137
4.1.7. INMUNOFLUORESCENCIA	139
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	140
4.2.1. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES MUCOADHESIVAS DE LAS NANOPARTÍCULAS	141
4.2.1.1. MÉTODO DE LA PARTÍCULA DE MUCINA	141
4.2.1.2. REOMETRÍA	142
4.2.1.3. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	142
4.2.1.4. ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER	143
4.2.2. ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LAS NANOPARTÍCULAS Y EL SURFACTANTE PULMONAR	143
4.2.3. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE RIFAMPICINA	143
4.2.4. ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN MEDIO DE CULTIVO	144
4.2.5. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD <i>IN VITRO</i>	145
4.2.6. ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN CELULAR DE RIFAMPICINA	147
4.2.6.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	147
4.2.6.2. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE RIFAMPICINA INTRACELULAR	149
4.2.6.3. ESTUDIO CUALITATIVO DE LA ESTABILIDAD QUÍMICA DE RIFAMPICINA	150
4.2.7. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> DE INTERNALIZACIÓN CELULAR DE LAS NANOPARTÍCULAS OBTENIDAS MEDIANTE MICROSCOPÍA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA	151
4.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	153

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	154
4.3.1. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES MUCOADHESIVAS DE LAS NANOPARTÍCULAS	154
4.3.1.1. MÉTODO DE LA PARTÍCULA DE MUCINA	154
4.3.1.2. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE LAS NPS	155
4.3.1.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	160
4.3.1.4. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER	162
4.3.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CON EL SURFACTANTE PULMONAR	165
4.3.3. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE RIFAMPICINA	170
4.3.4. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS EN MEDIO DE CULTIVO	171
4.3.5. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD <i>IN VITRO</i>	172
4.3.6. ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN CELULAR DE RIFAMPICINA	176
4.3.6.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA	176
4.3.6.2. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO INTRACELULAR DE RIFAMPICINA	179
4.3.6.3. ESTUDIO CUALITATIVO DE LA ESTABILIDAD QUÍMICA DE RIFAMPICINA	183
4.3.7. ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN CELULAR DE LAS NANOPARTÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA	185
4.4. CONCLUSIONES PARCIALES	187
4.5. BIBLIOGRAFÍA	188
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	193
5.1. CONCLUSIONES FINALES	193
5.2. PROYECCIONES	197
ANEXOS	199
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	231

RESUMEN

Este trabajo de Tesis tuvo como objetivo el desarrollo de sistemas nanotransportadores obtenidos con la combinación de alginato y quitosano para la administración pulmonar de rifampicina. Rifampicina es un fármaco de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis, sin embargo, debido a que esta enfermedad presenta una alta tasa de prevalencia y un elevado desarrollo de resistencia surge la necesidad de optimizar el tratamiento farmacoterapéutico de dicha infección. Los sistemas nanoparticulados presentan destacables ventajas tales como la capacidad de alcanzar compartimentos intracelulares y la modulación de la cinética de liberación de fármacos, que podrían resolver algunos de los problemas relacionados con el tratamiento de esta enfermedad.

Las nanopartículas se desarrollaron con el método de gelación iónica, el cual consiste en el entrecruzamiento de grupos funcionales con cargas iónicas opuestas. Para la caracterización de los sistemas obtenidos se emplearon diversas técnicas entre las que se pueden mencionar la dispersión de la luz dinámica, espectroscopia infrarroja transformada de Fourier, la difracción de rayos X de polvos, la microscopía electrónica de barrido, entre otras. Además, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* en diferentes cepas bacterianas, incluyendo aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis*. Por último, se realizaron estudios de citotoxicidad *in vitro* y de internalización en líneas celulares de pulmón de los nuevos sistemas.

Entre los resultados más destacables de este trabajo de Tesis se puede mencionar que los sistemas nanoparticulados presentaron mayor actividad antimicrobiana en algunas de las cepas bacterianas evaluadas, en comparación con rifampicina sola. Además, se observó una reducción de los efectos citotóxicos de este fármaco en líneas celulares de pulmón y riñón, como así también un aumento de la concentración intracelular del antibiótico en células pulmonares. Los hallazgos de este trabajo resaltan el potencial de los nanotransportadores desarrollados para la administración de rifampicina por vía pulmonar, lo que aumentaría la concentración local de antibiótico en los tejidos pulmonares, reduciendo

ABSTRACT

This Thesis aimed the development of new alginate and chitosan nanocarrier systems for the pulmonary administration of rifampicin. Rifampicin is a first line drug for the treatment of tuberculosis. This disease has a high prevalence rate and a high development of antimicrobial resistance, for these reasons there is a need to optimize the pharmacotherapeutic treatment of this infection. The nanoparticulate systems present remarkable advantages such as the ability to reach intracellular compartments and the modulation of drug release kinetics, which could solve some of the problems related to the treatment of this disease.

The nanoparticles were developed by the ionic gelation method, which consists of the cross-linking of functional groups with opposite ionic charges. For the characterization of the obtained systems, several techniques were used, such as dynamic light scattering, Fourier transform infrared spectroscopy, powder X-ray diffraction, scanning electron microscopy, among others. In addition, *in vitro* antimicrobial activity was evaluated in different bacterial strains, including isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Finally, *in vitro* studies were carried out on lung cell lines to evaluate the cytotoxicity and internalization of the new systems.

Among the most outstanding results of this Thesis work is the greatest antimicrobial activity demonstrated by the new nanoparticulate systems in some of the bacterial strains evaluated, in comparison with rifampicin alone. In addition, a reduction of the cytotoxic effects of this drug was observed in lung and kidney cell lines, as well as, the increase of the intracellular concentration of the antibiotic in lung cells. Findings of this work highlight the potential of the nanoparticles developed for the administration of rifampicin by the pulmonary route, which would increase the local concentration of antibiotic in the pulmonary tissue, reducing the risk of systemic toxicity and the improvement in the therapeutic efficacy.

ABREVIATURAS

2 θ : ángulo de difracción.

a: pendiente.

ALG: alginato.

AMH: agar Müller-Hinton.

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.

ANOVA: análisis de la varianza, por sus siglas en inglés de analysis of variance.

ANS: 1-anilino-8-naftaleno sulfonato.

ASC: ácido ascórbico.

ASF: análisis de solubilidad de fases.

ATCC: American Type Culture Collection.

ATP: adenosín trifosfato, por sus siglas en inglés de adenosine triphosphate.

b: ordenada al origen.

BHL: balance hidrofílico-lipofílico.

BSA: albúmina de suero bovino, por sus siglas en inglés de bovine serum albumin.

CC: capacidad de carga.

CLSI: por sus siglas en inglés, The Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMC: concentración micelar crítica.

CMH: caldo Müller-Hinton.

cP: centipoise.

CV: coeficiente de variación.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

Abreviaturas

DBB: diseño Box-Behnken.

DE: desviación estándar.

DHR: dihidrorodamina 123.

DLS: dispersión de la luz dinámica, por sus siglas en inglés, dynamic Light scattering.

DMEM: medio de cultivo para células eucariotas, por sus siglas en inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DSC: calorimetría diferencial de barrido, por sus siglas en inglés de differential scanning calorimetry.

DSR: diseño de superficie de respuesta.

dTGA: derivada primera del análisis termogravimétrico, por sus siglas en inglés derivative thermogravimetric analysis.

EI: estándar interno.

EMA: Agencia Europea de Medicamentos, por sus siglas en inglés, European Medicines Agency.

E. coli: *Escherichia coli*.

F: estadístico empleado en test ANOVA.

Fd: faloidina.

FDA: Food and Drug Administration.

FITC: fluoresceína isotiocinato.

FTIR: espectroscopia infrarroja transformada de Fourier, por sus siglas en inglés Fourier Transform Infrared Spectroscopy.

gp-P: glicoproteína-P

H₀: hipótesis nula.

HPLC: cromatografía líquida de alta precisión, por sus siglas en inglés high performance chromatography.

ICH: International Council for Harmonisation.

IFA: ingrediente farmacéutico activo.

IR: infrarrojo/o.

K. pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*.

LG: interfaz líquida/gaseosa.

MA: macrófagos alveolares.

MF: mezcla física.

MP: materia prima.

Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*.

MUC: mucina.

N.I. : no demostró inhibición.

NPs RIF: nanopartículas de rifampicina.

NPs vacías: nanopartículas vacías (sin rifampicina).

NPs: nanopartículas.

NPs-FITC: nanopartículas vacías marcadas con fluoresceína isotiocianato.

p-valor: valor de probabilidad.

PBS: solución buffer fosfato, por sus siglas en inglés phosphate buffer solution.

PFD: paraformaldehído.

pKa: constante de disociación ácida.

PM: peso molecular.

P. aureuginosa: *Pseudomonas aureuginosa*.

Abreviaturas

QUIT: quitosano.

r²: coeficiente de correlación.

Rd-Fd: faloidina conjugada con rodamina.

RIF: rifampicina.

RIM: rifamicina.

RZ: resazurina.

S. aureus MR: *Staphylococcus aureus* metilino resistente.

S. aureus MS: *Staphylococcus aureus* metilino sensible.

S. aureus: *Staphylococcus aureus*.

SCB: sistema de clasificación biofarmacéutica.

SEM: microscopía de barrido electrónico, por sus siglas en inglés scanning electron microscopy.

SG: interfaz sólida/gaseosa.

SL: interfaz sólida/líquida.

SP: surfactante pulmonar.

T80: tween 80.

TB: tuberculosis.

TEM: microscopía de transmisión electrónica, por sus siglas en inglés transmission electron microscopy.

Tg: temperatura de transición vítrea.

TGA: análisis termogravimétrico, por sus siglas en inglés thermogravimetric analysis.

TPS: tripsina.

UFC: unidades formadoras de colonias.

UV-Vis: ultravioleta-visible.

ζ : potencial z.

θ_c [**H₂O**]: ángulo de contacto con el agua.

θ_c : ángulo de contacto.

λ : longitud de onda.

τ : esfuerzo de corte.

Υ_{LG} : energía libre para la interfaz líquido/gas.

Υ_{SG} : energía libre para la para la interfaz sólido/gas.

Υ_{SL} : energía libre para la interfaz sólido/líquido.

γ : velocidad de deformación o cizallamiento.

η : viscosidad dinámica.

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

1.1.1. Nanotecnología: Nanopartículas poliméricas

Aunque el término "nanotecnología" se comenzó a utilizar en la década del ochenta, se tiene conocimiento de que algunos nanomateriales eran ya empleados hace aproximadamente 2.000 años atrás. Un ejemplo muy conocido es el de la copa de vidrio de Licurgo (Roma, siglo IV A.C.), hoy expuesta en el Museo Británico. La copa cambia de color de acuerdo con la incidencia de la luz sobre la misma; se observa verde con luz reflejada, mientras que iluminada desde su interior, la luz transmitida a través del vidrio hace que se vea roja (*Figura 1.1.*). El análisis del vidrio permitió revelar que la copa contenía nanopartículas de plata y oro con un tamaño aproximado de 70 nm, y con una proporción molar de 14:1, respectivamente. La combinación de esta composición química y el tamaño de partículas de esta dispersión resultó ser el factor responsable que le confiere al vidrio la propiedad de generar diferentes colores a partir de la interacción con la radiación electromagnética. Además de este ejemplo, se pueden mencionar otros obtenidos en forma intencional, tales como, la fabricación de partículas de negro de humo y la obtención de dióxido de silicio "fumé", en los años cuarenta. Aquella época determinó el inicio del desarrollo de la nanotecnología de manera sistemática, la cual ha venido creciendo hasta la fecha de manera exponencial¹.



Figura 1.1. Copa de Licurgo

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

Desde entonces el término "nanotecnología" ha ido evolucionando, alcanzando en nuestros días definiciones bien establecidas. La "*National Nanotechnology Initiative Strategic Plan*" de los Estados Unidos de Norteamérica, define a la nanotecnología como "el entendimiento y el control de la materia en dimensiones, comprendidas entre 1 a 100 nanómetros, donde fenómenos únicos permiten nuevas aplicaciones"². La nanotecnología se está imponiendo en diversas áreas de estudio debido a las interesantes posibilidades para innovar en el desarrollo de nuevos sistemas como lo es la obtención de materiales fuertes y ligeros, lo cual repercute en un menor consumo de combustible. Otros ejemplos, son el desarrollo de computadoras ultrarrápidas con gran capacidad de almacenamiento, ventanas inteligentes que se iluminan u oscurecen para conservar la energía, la administración dirigida de fármacosⁱ para tratamientos más seguros y efectivos, entre otras aplicaciones³.

En este sentido, en las últimas décadas, ha habido un creciente interés por el desarrollo de sistemas nanoparticulados de liberación de fármacos, obtenidos a partir de polímeros. Las **nanopartículas (NPs) poliméricas** son partículas coloidales sólidas, con un diámetro que varía en el rango de 1 a 1.000 nm^{4,5}.

Dependiendo de la composición, se pueden obtener principalmente dos tipos de NPs poliméricas: nanoesferas y nanocápsulas. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares, en los cuales el fármaco está confinado en una cavidad que consiste en un núcleo líquido interno (acuoso u oleoso) rodeado por una membrana polimérica. El fármaco generalmente se encuentra disuelto en el núcleo interno, pero también puede estar adsorbido a la superficie de la nanocápsula. Por otro lado, las nanoesferas tienen una estructura (matriz) de tipo monolítica, en donde los ingredientes farmacéuticos activos (IFAs) se dispersan o adsorben sobre sus superficies o se encapsulan dentro de las NPs (*Figura 1.2.*)⁴.

ⁱ Según la Farmacopea Argentina (FA) un **fármaco, principio activo (PA) o ingrediente farmacéutico activo (IFA)** es toda sustancia química o mezcla de sustancias relacionadas, de origen natural o sintético, que poseyendo un efecto farmacológico específico se emplea en medicina humana⁸².

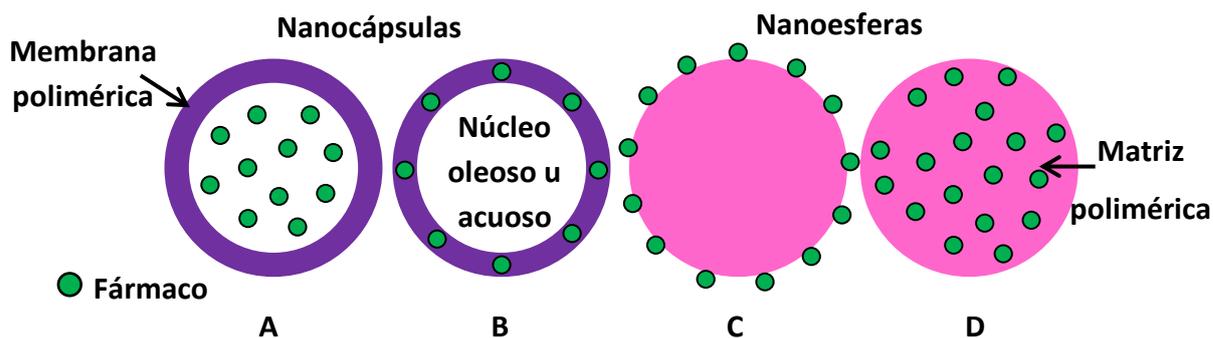


Figura 1.2. Representación gráfica de nanocápsulas y nanoesferas poliméricas: A- fármaco disuelto en el núcleo de las nanocápsulas; B- fármaco adsorbido en la pared polimérica de la nanocápsula; C- fármaco adsorbido en la superficie de la matriz polimérica de la nanoesfera y D- fármaco disperso en la matriz polimérica de la nanoesfera.

Dentro de los polímeros utilizados para la preparación de NPs se encuentran los polímeros hidrofílicos de origen natural o los polímeros hidrofóbicos de origen sintético. Los polímeros hidrofílicos naturales son ampliamente utilizados, tales como las proteínas (gelatina, albúmina, entre otros) y los polisacáridos (alginato, quitosano, dextrano, entre otros)⁶. Los criterios ideales para la selección de los mismos se basan en la fácil obtención y caracterización, bajo costo, biocompatibilidad, biodegradabilidad, hidrofiliidad, así como, atoxicidad y baja inmunogenicidad⁷.

Para este trabajo de Tesis se seleccionaron dos polisacáridos naturales de carga iónica opuesta, alginato y quitosano, los cuales serán descriptos a continuación.

1.1.1.1. Polisacáridos naturales

1.1.1.1.1. Quitosano

El polisacárido quitosano, QUIT, fue descubierto por Rouget en 1859, quien reportó que al tratar quitina (carbohidrato que forma parte del exoesqueleto de los artrópodos, como arácnidos, crustáceos e insectos) con una solución caliente de hidróxido de potasio, se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta “quitina modificada”, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras que, la

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

quitina natural era de color verde⁸. En 1894, Hoppe-Seyler la denominó “quitosano”⁹. Su principal fuente de producción, como se mencionó anteriormente, es la hidrólisis de quitina en medio alcalino, usando solución acuosa concentrada de hidróxido de sodio o potasio, a altas temperaturas. Dependiendo del procedimiento de preparación y su origen, su peso molecular (PM) puede variar desde 300 a más de 1000 kDa, con un grado de desacetilación de 30% a 95%, mientras que, si la desacetilación es total se obtiene otro compuesto denominado “quitano”¹⁰.

Estructuralmente, QUIT, es un polisacárido catiónico lineal, con un valor de constante de disociación ácida (pKa) de 6,5. Está compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de 2-acetamida-2-desoxi- β -D-glucosa (unidades N-acetyl-D-glucosamina, acetiladas) y 2-amino-2-desoxi- β -D-glucosa (unidades D-glucosamina, desacetiladas), unidas por enlaces β -(1-4)¹¹. Su estructura química se muestra en la *Figura 1.3*.

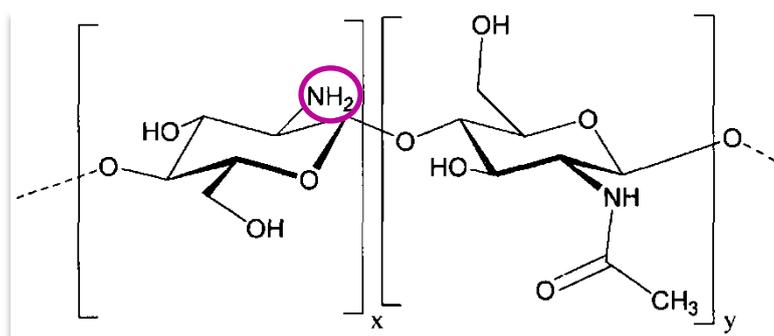


Figura 1.3. Estructura química del quitosano. Unidades x: D-glucosamina; y: N-acetil-D-glucosamina.

QUIT presenta propiedades biofarmacéuticas favorables, tales como su biocompatibilidad, excelente biodegradabilidad, propiedades bioadhesivas y atoxicidad, y además, sus aplicaciones son muy variadas. Se utiliza en la industria alimenticia, principalmente en el recubrimiento de frutas, semillas, en la protección de plantas (antifúngico), la clarificación de jugos de frutas, vinos, cervezas, también, es fuente de fibra alimentaria, posee propiedades como hipocolesterolémico, entre otras. Por su parte, en el área de la biomedicina, QUIT ha adquirido un papel protagónico en la ingeniería de tejidos y el desarrollo de sistemas portadores de fármacos novedosos (hidrogeles, membranas, films, perlas, vendajes, nanofibras, micro y nanogeles, micro y nanopartículas, entre otros)¹².

1.1.1.1.2. Alginato

Alginato de sodio, ALG, es un polisacárido aniónico, que se extrae de las paredes celulares de algas pardas marinas a través de un tratamiento en medio alcalino a alta temperatura, aproximadamente 80°C, y luego se procede a su purificación.

La estructura de ALG consiste en residuos de ácidos β -D-manurónico y α -L-gulurónico, que se encuentran unidos linealmente por enlaces 1,4-glucosídicos (Figura 1.4.). La composición y secuencia de sus unidades monoméricas dependen de la fuente de las algas usadas, y esto repercute sobre las propiedades del ALG obtenido¹³. Las unidades repetitivas de ácido manurónico poseen un pKa de 3,38 y las de ácido gulurónico 3,65¹⁴.

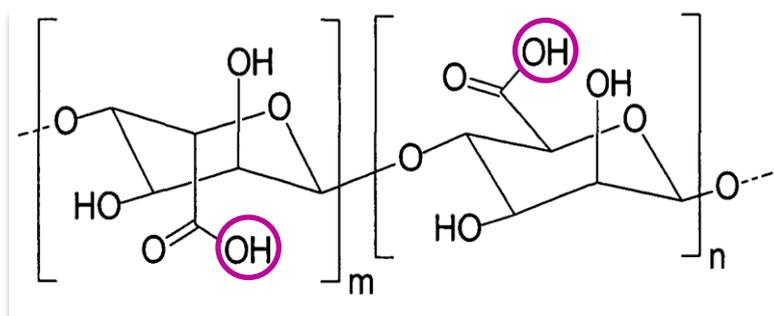


Figura 1.4. Estructura química de las unidades repetitivas de alginato, *m*: β -D-manurónico; *n*: α -L-gulurónico.

Este polisacárido no es tóxico, es biodegradable, biocompatible, de bajo costo, y fácilmente disponible, además, presenta propiedades mucoadhesivas. Ha sido ampliamente estudiado con respecto a sus propiedades físicas y químicas, y es utilizado en la industria alimenticia como estabilizante, espesante en jugos, salsas, cervezas, así como gelificante en relleno de aceitunas, fabricación de gelatinas, entre otros usos.

En 1980 se desarrollaron las primeras partículas de ALG con fines de encapsulación¹⁵. Desde entonces, se han realizado muchas investigaciones sobre el desarrollo y la aplicación de las partículas de ALG, lo que hace que el mismo sea uno de los materiales más comúnmente utilizados para la formación de micro y nanopartículas en la actualidad¹³.

1.1.1.2. Métodos de preparación de nanopartículas

Los principales métodos para obtener NPs se conocen como “De abajo hacia arriba” (“Bottom up”) y “De arriba hacia abajo” (“Top down”). La técnica “De abajo hacia arriba” consiste en la construcción de NPs a partir del autoensamblaje de átomos o moléculas, mientras que la técnica “De arriba hacia abajo” involucra un proceso de ruptura o molienda de grandes partículas mediante un estrés físico o químico externo hasta producir la reducción de tamaño de la partícula (Figura 1.5.)¹⁶.

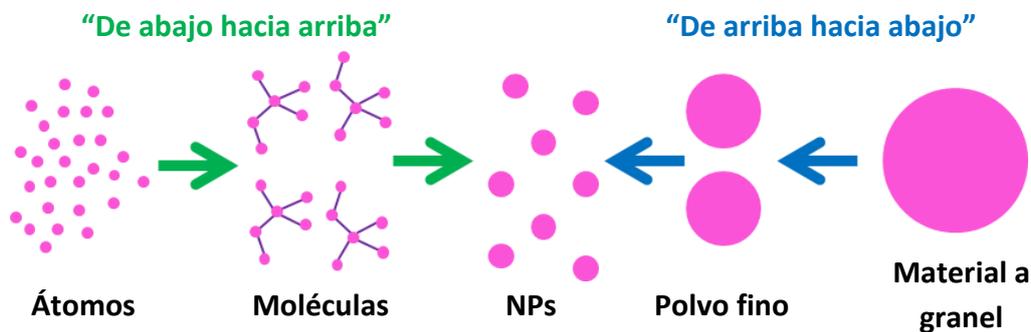


Figura 1.5. Representación gráfica de los métodos de obtención de nanopartículas: “De abajo hacia arriba” y “De arriba hacia abajo”.

Actualmente, el método más utilizado para sintetizar NPs de ALG y QUIT es un método “De abajo hacia arriba” llamado **gelación iónica**¹⁷. Este procedimiento consiste en una reacción espontánea, en la cual se mezclan dos dispersiones de polielectrolitos de carga opuesta (policación y polianión)¹⁸.

Algunas consideraciones a tener en cuenta en la gelación iónica son:

- El pH: los polímeros deben encontrarse al valor de pH adecuado para estar completamente ionizados y aumentar así la eficiencia de la interacción.
- La fuerza iónica: se debe trabajar con una mínima fuerza iónica, ya que la misma influye en el tamaño de partículas obtenidas. A menores valores de fuerza iónica menor es la tendencia de aglomeración de las NPs.
- La velocidad de agitación.
- La concentración y relación de los componentes del sistema.

- El grado de polimerización (esto va a influenciar en sus propiedades tales como viscosidad).

Una vez obtenidos los sistemas nanoparticulados, se deben separar del resto que no reaccionó, para lo cual se pueden utilizar diversas técnicas, las más utilizadas son la ultracentrifugación y la diálisis.

Además, este método de síntesis presenta algunas ventajas como lo son el hecho de que no se utilizan solventes orgánicos ("green chemistry"), o no es necesario trabajar en condiciones drásticas como temperaturas elevadas, ultrasonido, entre otras, las cuales son ventajas frente a otros métodos de síntesis tales como la emulsificación por cambio de solvente¹⁹.

1.1.1.3. Ventajas de la utilización de las nanopartículas

Los materiales nanoparticulados tienen propiedades fisicoquímicas únicas debido a su pequeño tamaño; como su gran área superficial, alta reactividad y superficie funcionalizable que permite aumentar su especificidad.

Entre las ventajas que aportan las NPs como plataformas para la liberación controlada de fármacos se pueden citar²⁰:

- La capacidad para proteger a las moléculas encapsuladas frente a su eventual degradación, desde el momento de la administración en el paciente hasta que alcanza su lugar de acción o absorción.
- La habilidad para atravesar las barreras biológicas como la piel, las mucosas gastrointestinales o respiratorias, como así también, la barrera hematoencefálica.
- La capacidad para alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana donde la molécula debe ejercer su acción.
- La capacidad para alcanzar compartimentos intracelulares.
- La capacidad para ejercer una liberación controlada y sostenida del IFA en su lugar de acción o absorción, lo que podría conducir a disminuir la frecuencia de administración.
- La disminución de la toxicidad y la aparición de reacciones adversas propias de la molécula vehiculizada.

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

- Se pueden usar para varias vías de administración, incluyendo oral, nasal, parenteral, intraocular, entre otras.

- Permite prolongar la vida media en la circulación sistémica de los fármacos.

A pesar de estas ventajas, una de las grandes limitaciones de las NPs obtenidas a partir de polímeros naturales es la baja reproducibilidad en sus características, debida principalmente a modificaciones en el PM de la materia prima y la dificultad para escalar el procedimiento de obtención.

1.1.2. Infecciones bacterianas

Las infecciones son el resultado de la invasión y la proliferación de agentes infecciosos en el organismo. Existen diferentes tipos de agentes infecciosos, entre los cuales, se pueden mencionar principalmente los microorganismos (virus, hongos y bacterias) y los parásitos.

Las infecciones bacterianas se encuentran entre los mayores problemas de salud a nivel mundial, no solo debido a que están asociadas con morbilidad y mortalidad, sino también, por la frecuente aparición de resistencia bacteriana a los tratamientos, lo que lleva a una necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias que combatan eficazmente estas infecciones²¹.

Las bacterias son organismos procariotas, unicelulares que presentan un tamaño y forma que depende de la especie a la cual pertenezcan. Comúnmente su tamaño es de alrededor de unos pocos micrómetros (entre 0,5 y 5 μm) y, de acuerdo a su morfología, se pueden mencionar principalmente: esferas (**cocos**), bastones (**bacilos**), filamentos, sacacorchos (**vibrios**) y hélices (**espirilos**)²². En la *Figura 1.6.* se representan gráficamente algunas de las morfologías de las células bacterianas.

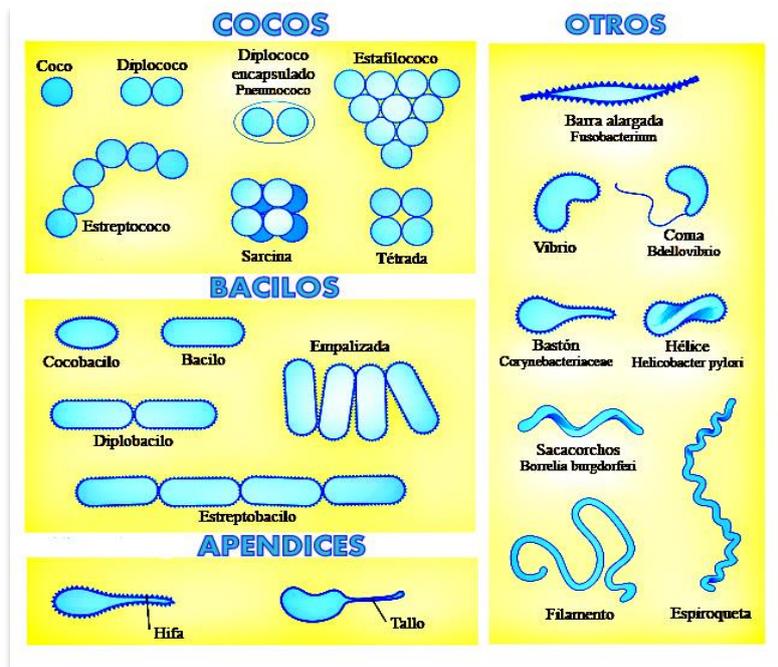


Figura 1.6. Clasificación de las células bacterianas de acuerdo a su morfología.

En 1884, el bacteriólogo Christian Gram desarrolló la técnica llamada **tinción de Gram**, la cual se utiliza, tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias Gram positivas, a las que se visualizan de color azul oscuro o morado, y bacterias Gram negativas, a las que se visualizan de color rosa o rojo²³. En la Figura 1.7. se exhiben las principales diferencias entre las bacterias Gram positivas y negativas. Las bacterias Gram negativas presentan dos membranas lipídicas, entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano (o peptidoglucano) (razón por la cual no se retiene el colorante durante la tinción de Gram), mientras que las bacterias Gram positivas presentan solo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa²⁴.

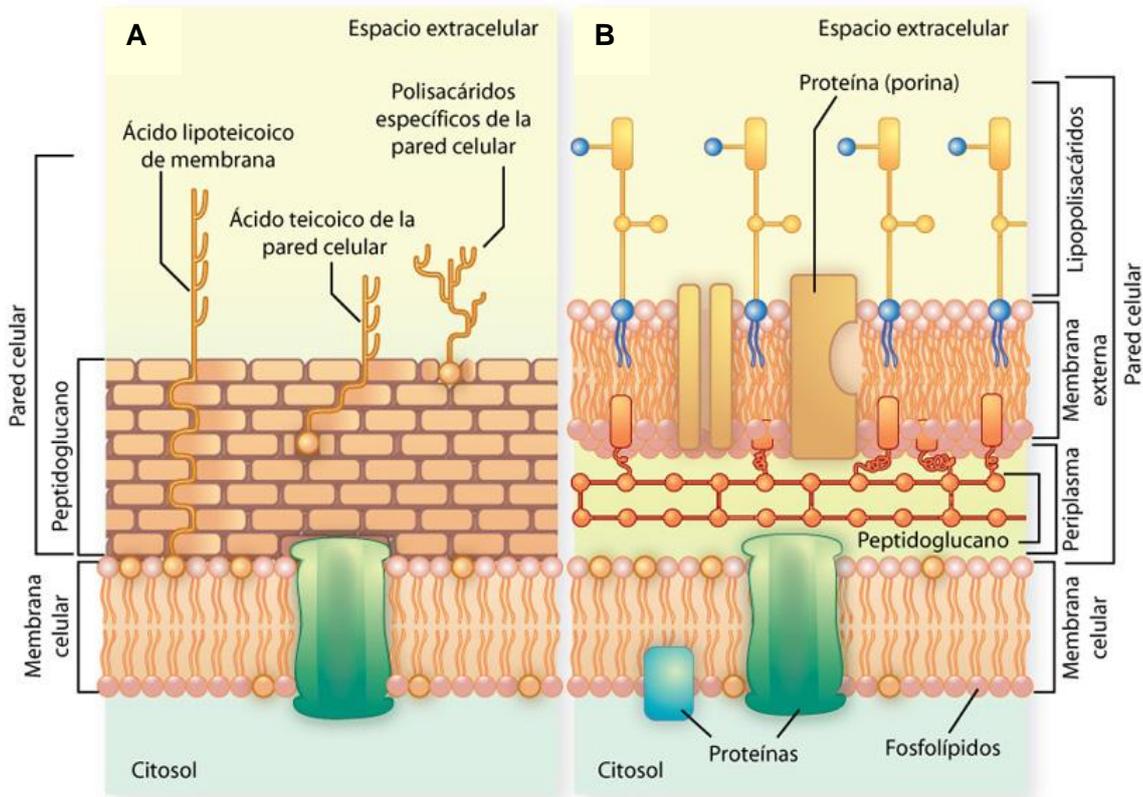


Figura 1.7. Representación gráfica de la estructura de bacterias: A- Gram positivas y B- Gram negativas.

1.1.2.1. Infecciones por *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm , comúnmente se encuentran agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas²⁵. Este microorganismo es el agente causal de una amplia variedad de infecciones que van desde infecciones de la piel hasta infecciones que amenazan la vida, como la meningitis, la neumonía, la osteomielitis, la sepsis, entre otras²⁶. Esta bacteria desarrolla una amplia resistencia a los antibióticos, incluidos meticilina y vancomicina, lo que condujo a la aparición de la cepa *S. aureus* resistente a antibióticos betalactámicos, conocido como *S. aureus* resistente a meticilina (*S. aureus MR*), lo que lleva a una amenaza para la salud pública²⁷. Además, la cepa *S. aureus MR* también está asociado a la fibrosis quística²⁸.

1.1.2.2. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*. Comúnmente afecta a los pulmones (TB pulmonar), pero también, puede afectar otros sitios (TB extrapulmonar). La misma se disemina a través del aire, cuando una persona con TB pulmonar tose, estornuda o habla²⁹.

Alrededor de la década de 1950-1960, se desarrollaron fármacos para tratar la TB, pero recién en 1966, surgió la llamada “Revolución terapéutica”, en la cual el italiano Piero Sensi aisló rifampicina, un derivado semisintético de rifamicina S, obtenida de hongos del género *Streptomyces mediterranii*, y, de esta manera, el tratamiento de la TB se logró acortar a 6 meses³⁰. Actualmente, el tratamiento de primera línea para la TB recomendado por la Organización mundial de la salud (OMS) continúa siendo los fármacos descubiertos hace más de 50 años: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida. Sin embargo, las bacterias han desarrollado resistencia a estos fármacos, y por consiguiente, hay una gran necesidad de una nueva generación de IFAs antituberculosos³¹.

Según el informe de la OMS sobre la TB en 2018, la TB es una de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo. En 2017, la TB causó aproximadamente 1.300.000 muertes de personas VIH negativas y 300.000 muertes adicionales en personas VIH positivas. A nivel mundial, se estima que 10 millones de personas desarrollaron la enfermedad de TB en 2017³². La TB resistente a los medicamentos sigue siendo una crisis de salud pública. A nivel mundial, en 2017, se estimó que 558.000 personas desarrollaron TB resistente a rifampicina (RIF), el medicamento de primera línea más efectivo; y de estos, el 82% tenía TB resistente a múltiples fármacos³². Alrededor de 1.700 millones de personas, el 23% de la población mundial, se estima que tienen una infección de TB latente, y por lo tanto, el riesgo de desarrollar la enfermedad activa de TB durante toda su vida^{32,33}.

La TB persiste como un desafío social importante debido a la facilidad de transmisión de la bacteria, el incumplimiento del paciente a la farmacoterapia que requiere la adherencia a la dosificación frecuente durante un período de 6 meses, y los altos costos de supervisión del tratamiento³⁴. La eficacia de los medicamentos en la lucha contra la TB puede verse obstaculizada por algunos factores relacionados a las propiedades biofarmacéuticas desfavorables de los agentes terapéuticos tales como la baja permeabilidad de los fármacos,

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

la baja solubilidad, la biodegradación; además es importante tener en cuenta los efectos secundarios indeseados causados por la distribución sistémica de los IFAs³⁵. La terapia fallida de la TB, ha dado lugar a la aparición de cepas multirresistentes, que se han convertido en un problema de salud mundial. Estas cepas son menos receptivas a la terapia tradicional, y requieren una terapia de segunda línea, con un aumento en la duración del tratamiento, y por lo tanto, un incremento de la toxicidad. Por otra parte, la tasa de recuperación no supera el 60 %, y en la actualidad se presenta una creciente prevalencia a la resistencia a los fármacos³⁶.

1.1.2.3. Rifampicina

RIF es un antibiótico semisintético, como se mencionó anteriormente, descubierto en 1966 el cual posee un amplio espectro antibacteriano³⁷. RIF es un fármaco zwitteriónico, posee dos valores de pKa, uno correspondiente al grupo 4-hidroxi pKa₁: 1,7 y el otro correspondiente al nitrógeno del anillo 3-piperazina pKa₂: 7,9, respectivamente³⁸. Su estructura química se representa en la *Figura 1.8*.

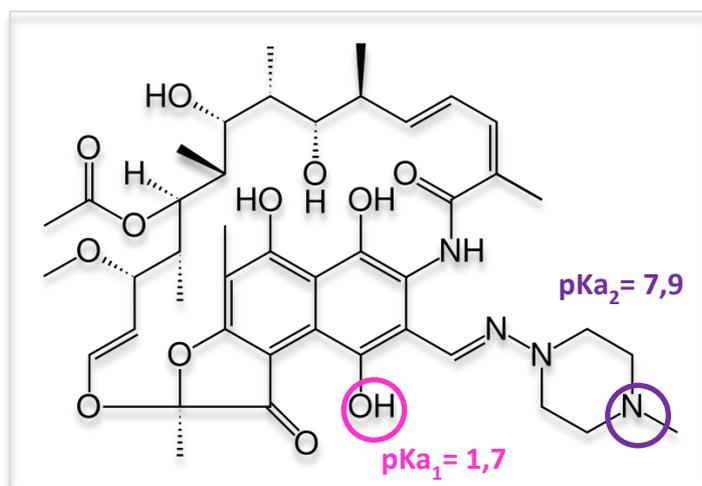


Figura 1.8. Estructura química de rifampicina.

RIF es uno de los fármacos de primera línea según la OMS para el tratamiento de TB y lepra. También presenta actividad antibiótica en infecciones causadas por estafilococos (*S. aureus*, *S. epidermidis*) y enterococos (*E. faecalis*, *E. faecium*), siendo a su vez utilizada para prevención de meningitis meningocócica (*Neisseria meningitidis*)³⁹. Recientes estudios

clínicos están evaluando el uso de combinaciones de RIF con otros antibióticos, para el tratamiento de cuatro enfermedades no micobacterianas: la meningitis bacteriana aguda, la endocarditis infecciosa y bacteriemia, la neumonía y la infección relacionada con biofilms⁴⁰.

Este fármaco posee una baja solubilidad acuosa y además presenta varios problemas de estabilidad en solución, se hidroliza a valores de pH ácidos, menores a 4,5; es fotosensible; se oxida a valores de pH básicos, superiores a 7,5. Por otro lado, presenta una alta unión a proteínas plasmáticas (principalmente albúmina sérica)⁴¹, aproximadamente 89 % y es sustrato de la glicoproteína-P (gp-P). La gp-P es un transportador de eflujo dependiente de adenosín trifosfato (ATP), responsable de la eliminación de los fármacos desde el interior de la célula hacia el medio externo. RIF se utiliza generalmente combinada con otros antibióticos debido a un alto desarrollo de resistencia antimicrobiana⁴².

Una búsqueda de patentes de RIF en el “Free patent searching database” arroja más de 13.000 resultados. Luego del descubrimiento de este antibiótico se han patentado nuevas invenciones tales como: derivados más solubles, diferentes métodos de obtención con una alta pureza, utilización de RIF para recubrimiento de dispositivos médicos, nuevas indicaciones, por ejemplo, como inhibidor de la angiogénesis, entre otros⁴³. Esto demuestra que existe un gran interés en la investigación para mejorar las propiedades biofarmacéuticas de este fármaco, así como, explotar sus potenciales aplicaciones al máximo.

Entre las especialidades medicinales conteniendo RIF, aprobadas en Argentina por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), se presentan las formas farmacéuticas para la vía de administración oral: comprimidos, cápsulas, jarabes y suspensiones; y para la vía de administración parenteral: solución para uso endovenoso⁴⁴.

1.1.2.4. Nanopartículas en el tratamiento de las infecciones bacterianas

La nanotecnología ha demostrado grandes avances en el campo del tratamiento de las infecciones⁴⁵. Particularmente, las estrategias de administración basadas en NPs han logrado mejoras significativas en el área de la administración de fármacos antimicrobianos. Especialmente, las NPs basadas en polímeros naturales representan un enfoque prometedor para encapsular antibióticos debido a sus ventajosas capacidades de dirigir la administración

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

a los sitios específicos de la enfermedad, controlar las características de liberación del principio activo (PA) para mejorar la farmacocinética o el índice terapéutico y mitigar o eliminar el fenómeno de resistencia a los antimicrobianos al modular las interacciones antibiótico-patógeno; todas estas razones llevaron a un tratamiento más eficaz de las infecciones^{46,47}.

En particular, ALG y QUIT tienen propiedades muy prometedoras para ser utilizados como sistemas de administración de antibióticos, debido a que son biodegradables y biocompatibles, sus productos de degradación, generados por procesos metabólicos en el organismo, se eliminan fácilmente a través de las vías excretoras. Además, sus características de mucoadhesión permitirían aumentar su tiempo de residencia en los sitios diana, aumentando la absorción de los antibióticos y disminuyendo la frecuencia de administración de la dosis^{48,49}. Además, se ha demostrado que las NPs que combinan estos dos polímeros naturales son más eficientes que las preparadas con estos polielectrolitos individuales⁵⁰.

En los últimos años, muchos esfuerzos se han dirigido a la encapsulación de medicamentos antituberculosos en NPs. En primer lugar, la administración oral de RIF dentro de NPs lipídicas sólidas fue estudiada por D. Pooja y colaboradores. Estos sistemas, decorados en la superficie con germen de trigo, exhibieron alta eficacia *in vitro* de unión a las glicoproteínas mucosas del intestino, y una liberación sostenida de RIF⁵¹.

Otras investigaciones se centraron en la prevención de la degradación de RIF en medio ácido (pH= 1,2) del estómago para una administración oral. Además, algunos autores evaluaron la estabilidad química del fármaco en presencia de isoniazida, teniendo en cuenta el régimen de terapia combinada para la TB. Los estudios *in vitro* demostraron una disminución significativa de la degradación de RIF en presencia de isoniazida al ser vehiculizada en los nuevos sistemas⁵².

Por otro lado, con respecto a la farmacocinética de RIF, Singh y colaboradores desarrollaron NPs lipídicas sólidas de RIF con Tween 80 (T80), lecitina de soja y Compritol® 888 ATO, para mejorar la biodisponibilidad oral errática del PA⁵³. Además de los lípidos, se han usado polímeros como QUIT, Vieira y colaboradores desarrollaron NPs lipídicas sólidas recubiertas con QUIT cargadas con RIF. Los resultados *in vitro* mostraron propiedades

mucoadhesivas con mayor permeabilidad de RIF en células epiteliales alveolares, en comparación con las NPs no recubiertas, lo cual indicó que el desarrollo de este sistema podría ser una estrategia prometedora para mejorar la terapia de TB respiratoria⁵⁴. Una táctica similar fue seguida por Banik y colaboradores para mejorar las propiedades de mucoadhesión de sistemas conteniendo QUIT cargados con isoniazida⁵⁵.

Las NPs se han explorado principalmente para la vía de administración oral, como un intento de mejorar la terapia convencional de la TB. Resultaría interesante enfocar la investigación en el desarrollo de NPs para otras vías administración, como por ejemplo, la vía pulmonar.

La especificidad de los sistemas de liberación nanoparticulados implica la interacción de un ligando específico con determinado receptor. Generalmente, los ligandos (por ejemplo, monosacáridos, anticuerpos y/o proteínas) se encuentran conjugados en la superficie del nanosistema, permitiendo la unión con receptores de las células o tejidos diana⁵⁶. En consecuencia, el desarrollo de NPs dirigidas específicamente a los macrófagos alveolares (MAs) resulta de gran importancia, ya que los mismos constituyen un reservorio celular de *Mtb* latente. En este contexto, la entrega permanente de PA en la vía pulmonar es de relevancia clínica para minimizar el riesgo sistémico, los efectos secundarios y mejorar la biodisponibilidad de los medicamentos antituberculosos en los pulmones⁵⁷. Con dicha estrategia se podría lograr reducir la dosis y la frecuencia de la misma. Considerando que una de las principales causas de fracaso del tratamiento de TB es la baja adherencia por parte del paciente, el hecho de reducir tanto la cantidad como la frecuencias de las dosis, ayudaría a mejorar el cumplimiento del paciente con la terapia⁵⁸. Además, el desarrollo de una nanoformulación conteniendo un fármaco antituberculoso convencional sería menos costoso y más accesible para los pacientes de bajos y medianos ingresos, que el largo y elevado costo del proceso de descubrimiento y desarrollo de una nueva entidad química para ser estudiada clínicamente. Finalmente, la nanotecnología también ofrece la posibilidad de superar o minimizar la resistencia a los antibióticos. La encapsulación dentro de un portador de tamaño nanométrico podría disminuir la eliminación de los PAs del medio intracelular mediado por bombas de eflujo, un mecanismo común que genera resistencia⁵⁹. Además, como *Mtb* es un patógeno intracelular, la posibilidad de mejorar las

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

concentraciones de los fármacos antituberculosos en el interior celular permitiría maximizar la eficacia de los fármacos y minimizar el desarrollo de cepas resistentes.

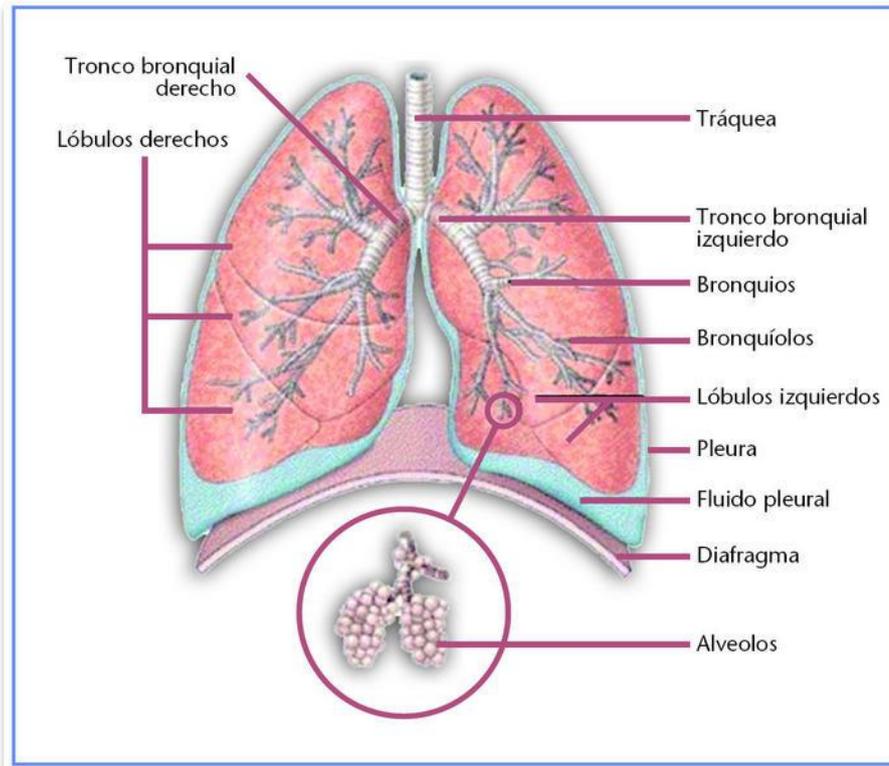
1.1.3. Administración de fármacos por vía pulmonar

1.1.3.1. Anátomo-fisiología del aparato respiratorio

El desarrollo de sistemas de liberación de fármacos para la administración pulmonar requiere un conocimiento detallado del pulmón en su estado sano, así como en varios estadios de desarrollo de procesos de enfermedad.

El pulmón está compuesto por más de 40 tipos de células diferentes. El sistema respiratorio humano es un conjunto de órganos complejo que tiene una estrecha relación estructura-función. El mismo comprende principalmente dos regiones vitales: las vías respiratorias conductoras y la región respiratoria⁶⁰. La vía aérea se divide en una parte superior formada por la cavidad nasal y los senos paranasales asociados; y una parte inferior, compuesta por la nasofaringe, la orofaringe, la laringe, la tráquea, los bronquios y los bronquiolos. La región respiratoria consiste en bronquiolos respiratorios, conductos alveolares y sacos alveolares⁶¹. En la *Figura 1.9.* se exhibe una imagen esquemática del pulmón con sus principales partes señalizadas.

A



B

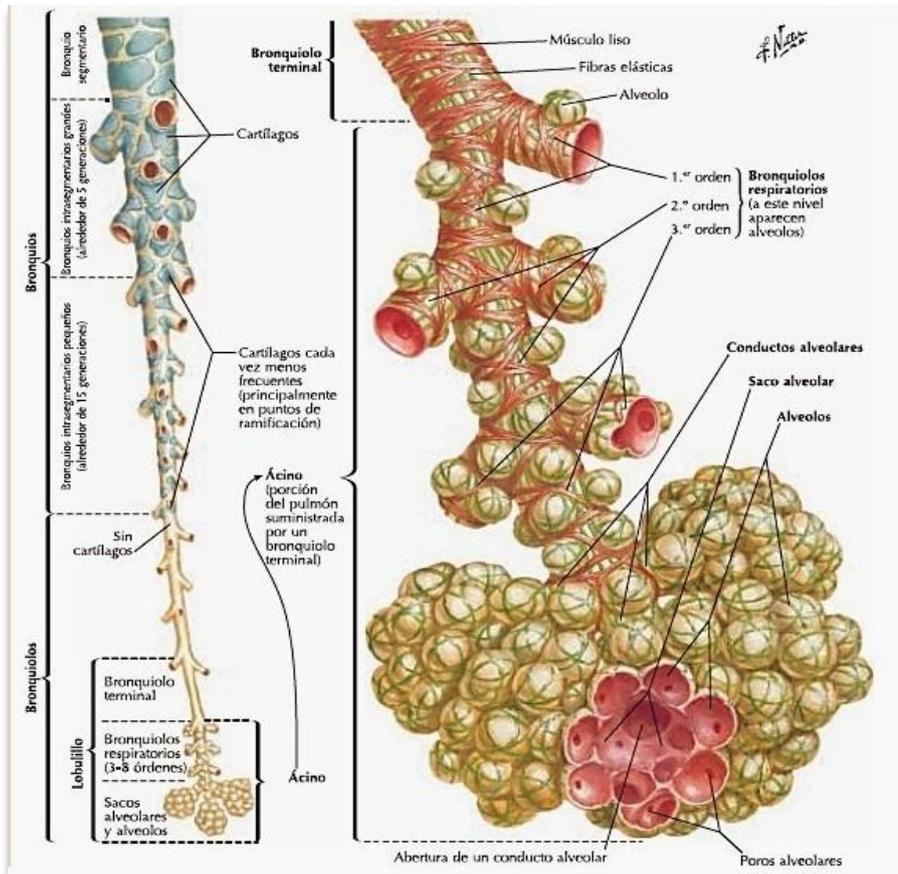


Figura 1.9. Esquema representativo de: A- Anatomía del pulmón indicando sus partes centrales; B- Árbol bronquial.

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

El epitelio respiratorio se encuentra revestido por una capa protectora de gel llamado moco o “mucus”. El “mucus” está compuesto por aproximadamente un 95 % de agua y un 5 % de sales inorgánicas, lípidos y glicoproteínas. Las glicoproteínas presentes en el “mucus” son llamadas mucinas (MUCs), y las mismas son un conjunto de macromoléculas de estructura compleja, con varios grupos funcionales con los cuales pueden interactuar diversas moléculas⁶². En la *Figura 1.10*. se exhibe un esquema de la estructura de la MUC.

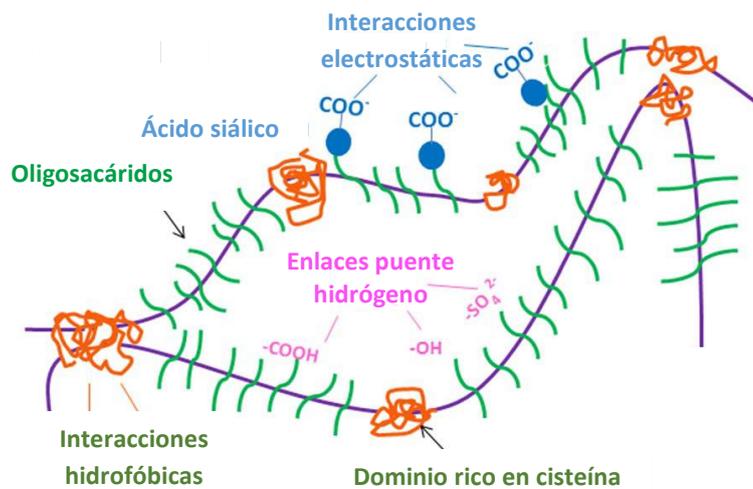


Figura 1.10. Estructura esquemática de mucina y sus elementos potencialmente mucoadhesivos.

El “mucus” es producido por un tipo especializado de células glandulares, denominadas células caliciformes. En las vías respiratorias hay tres clases de MUCs, las que se secretan pero no polimerizan, las que se secretan y polimerizan para formar geles y aquellas que tienen dominios transmembrana y están asociadas a la superficie celular⁶³. El “mucus” posee un rol vital en el mantenimiento de la salud y función de los pulmones. El mismo actúa como una barrera que previene la pérdida de agua y contribuye a la remoción de las partículas extrañas inhaladas, así como microorganismos, mediante el movimiento rítmicamente sincronizado de las ciliadas, denominado **aclaramiento mucociliar**⁶⁴. La película mucosa normal tiene dos capas: la capa de gel y la capa sol (fluido periciliar) (*Figura 1.11.*). La capa de gel superficial, producida por las células caliciformes, es una sustancia mucoide pegajosa que

contiene anticuerpos y células inmunes que ayudan a combatir bacterias y virus. Esto promueve la protección de las células subyacentes y además, la naturaleza viscoelástica de esta capa ayuda a capturar y eliminar las partículas extrañas inhaladas⁶⁵. Por su parte, el epitelio de la pared bronquial está revestido por estructuras microscópicas (alrededor de 2 a 7 μm de longitud), llamadas cilios, que están rodeadas por una fina película de líquido, llamada capa sol. Los cilios son los responsables del aclaramiento mucociliar, donde se arrastran las secreciones desde las vías respiratorias periféricas a las vías centrales a través de la tráquea, hasta la garganta donde son ingeridas o expulsadas⁶⁶.

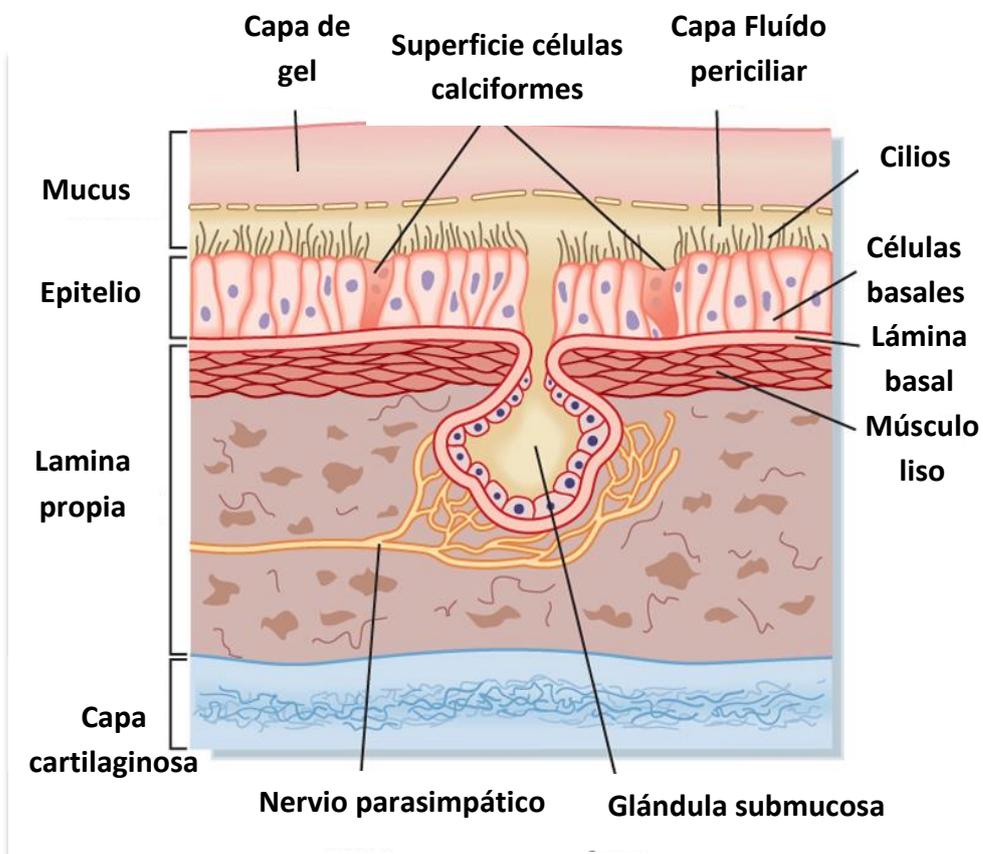


Figura 1.11. Esquema del revestimiento de las vías respiratorias.

Otro elemento clave a tener en cuenta para el correcto funcionamiento del pulmón es el sistema **Surfactante Pulmonar (SP)**. El SP es un complejo sintetizado y secretado por los neumocitos tipo II, y contiene aproximadamente 90 % de lípidos, generalmente fosfolípidos (80-90 %) y lípidos neutros (20-10 %), y el restante 10 % pertenece a cuatro proteínas

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

específicas (SP-A, SP-B, SP-C y SP-D). El SP tapiza la interfase aire-líquido del alvéolo, proporcionando una función antiadherente que disminuye la tensión superficial del mismo⁶⁷.

El SP cumple un rol vital en la fisiología pulmonar. Sus funciones principales son:

- Biofísicas: Evita el colapso alveolar y la obstrucción bronquial durante la respiración normal o forzada.
- Inmunológicas: Protege a los pulmones contra injurias e infecciones causadas por la inhalación de partículas y microorganismos.

Por su parte, los MAs también forman parte de los mecanismos de defensa del pulmón contra agentes extraños. Los mismos actúan facilitando la activación de la respuesta inmune. Estas células se encuentran principalmente en la luz alveolar y tienen la habilidad de fagocitar diferentes partículas contaminantes o microorganismos que han alcanzado los alveolos. Los MAs inhiben la unión de las partículas con el epitelio alveolar y su subsecuente penetración al espacio intersticial. Sin embargo, el *Mtb* tiene la capacidad de evadir este mecanismo de defensa y no puede ser eliminado por los MAs; por el contrario, se aloja y reproduce en los mismos. La compleja superficie de la micobacteria le permite interactuar con diversos receptores de los macrófagos, lo que le confiere a la bacteria gran capacidad de adaptación a la vida intracelular, por lo que la interacción entre ambos se lleva a cabo de múltiples formas, y esto es decisivo durante el curso de la infección. La envoltura de la bacteria consta de tres principales componentes: una membrana plasmática unida covalentemente con ácidos micólicos, un complejo de peptidoglicanos, que son moléculas unidas covalentemente a cadenas de arabinogalactana y una cápsula rica en polisacáridos. Debido a esto, hay un creciente interés por dilucidar las bases moleculares de la interacción de la *Mtb* con los MAs^{68,69,70}.

1.1.3.2. Ventajas de la vía de administración pulmonar

En los últimos años, la administración pulmonar de fármacos ha ganado gran atención, debido a sus beneficios, ya que es una ruta no invasiva, se encuentra favorecido el proceso de absorción debido a la gran superficie del pulmón (70-140 m² en adultos), el delgado epitelio alveolar (0,1-0,2 µm de grosor) y la gran irrigación de la zona. Además, esta vía de administración presenta la posibilidad de minimizar los efectos adversos sistémicos y el

metabolismo de primer paso hepático, así como una actividad enzimática comparativamente menor con respecto a la de la vía oral⁷¹. Un claro ejemplo está representado por las diferentes especialidades medicinales disponibles comercialmente para la terapia respiratoria de fibrosis quística. Diferentes antibióticos, como tobramicina TOBI® (solución de inhalación) y TOBI® Podhaler™ (polvo para inhalación), levofloxacina QUINSAIR® (solución para nebulización), Colistemato de sodio Promixin® (solución de inhalación) y aztreonam Cayston® (solución de inhalación) han sido aprobados por las agencias reguladoras *European Medicines Agency (EMA)* y *Food and Drug Administration (FDA)* como formulaciones inhalatorias⁷².

1.1.3.3. Antecedentes de nanosistemas destinados al tratamiento de infecciones respiratorias

La vía pulmonar de administración de fármacos adquiere mucha importancia en el campo de la investigación actual, ya que permite dirigir la liberación de los fármacos directamente al pulmón, tanto para el tratamiento local como sistémico⁷³. Como se mencionó anteriormente, el pulmón posee mecanismos de defensa que pueden funcionar como una barrera que impide que las NPs accedan al sitio de acción. Por lo tanto, diseñar NPs para ser administradas por vía pulmonar es un gran desafío. El sitio de deposición de los nanosistemas en los pulmones depende del tamaño y las propiedades aerodinámicas y fisicoquímicas de las partículas. Esto puede controlar el destino de deposición de las NPs en los pulmones mediante la modulación de la exposición del nanosistema a diferentes barreras pulmonares y mecanismos de aclaramiento⁷⁴. En general, las partículas aerosolizadas grandes (> 5 µm) se depositan en gran parte en las vías respiratorias superiores. Las partículas intermedias (1-5 µm) se depositan en las vías respiratorias inferiores y bronquiolos, mientras que las partículas más pequeñas (<1 µm) llegan de manera más efectiva a los bronquiolos terminales y regiones alveolares⁷⁵. Una vez depositados en los pulmones, los nanosistemas pueden eliminarse a través de los siguientes mecanismos que dependen del sitio de deposición y de las propiedades fisicoquímicas de las partículas. Los principales procesos involucrados son: el aclaramiento mucociliar, la captación fagocítica por MAs seguido del aclaramiento mucociliar, la absorción sistémica a través de los vasos linfáticos o la vasculatura pulmonar, la absorción por los macrófagos y las células dendríticas,

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

seguidas por la translocación a los ganglios linfáticos y por último la biodegradación y posterior absorción y excreción de los fragmentos de menor PM⁷⁶.

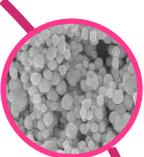
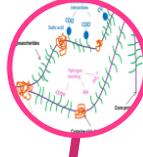
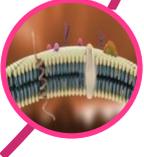
Los liposomas son el único tipo de nanomedicinas para vía pulmonar evaluados en ensayos clínicos⁷⁷. Sin embargo, las NPs basadas en polímeros son sistemas muy promisorios para administrarse a través de los pulmones ya que demuestran propiedades químicas y de superficie más específicas y velocidades de biodegradación *in vivo* haciéndolos potencialmente más adecuados como sistemas de administración de fármacos que las NPs de lípidos^{78,79}. Por esta razón, ha habido un interés creciente en el desarrollo de NPs poliméricas biodegradables como portadores de fármacos por vía pulmonar. Los polímeros biodegradables más comúnmente explorados para el suministro pulmonar de fármacos incluyen ácido poliláctico, ácido poli(láctico-co-glicólico), QUIT, ALG y albúmina^{80,81}. Estas estructuras generalmente muestran una retención prolongada en los pulmones y una gran estabilidad tras la nebulización, lo que los convierte en una primera elección como sistemas de administración de fármacos por esta vía⁷¹.

En base al marco teórico planteado se postula como hipótesis de este trabajo de Tesis: El desarrollo de nuevos sistemas nanoparticulados de QUIT y ALG para vehicular RIF permitirán su administración local por la vía pulmonar, con el fin de obtener una cinética de liberación controlada a partir de la biodegradación de las NPs al entrar en contacto con la bacteria, logrando una menor frecuencia de administración y una disminución de los efectos adversos a nivel sistémico.

1.2. Objetivos

En base al marco teórico presentado, se planteó como objetivo principal de este trabajo de Tesis el diseño, desarrollo y evaluación de nuevos sistemas nanoparticulados de fármacos antimicrobianos, promoviendo el transporte y la liberación controlada en los sitios de infección específicos, superando así los problemas de baja biodisponibilidad asociados a una limitada solubilidad y/o permeación a través de las membranas biológicas.

Del objetivo general se desprenden los siguientes objetivos específicos:

-  1. Desarrollo y caracterización de sistemas de liberación de fármacos nanoparticulados, combinando quitosano y alginato.
-  2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sistemas obtenidos.
-  3. Estudio de las propiedades mucoadhesivas de los nuevos sistemas.
-  4. Caracterización de los perfiles de liberación de los fármacos en los sistemas obtenidos.
-  5. Estudio de la eficacia de los sistemas en el pasaje de los fármacos a través de las membranas biológicas de interés y sus potenciales efectos tóxicos.

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

El trabajo de Tesis se organizó en diferentes capítulos para facilitar la comprensión y discusión del contenido. El primer objetivo específico fue abordado en el Capítulo 2, el segundo objetivo en el Capítulo 3 y los objetivos 3, 4 y 5 en el Capítulo 4. Los capítulos 2, 3 y 4 contienen los materiales y métodos empleados para abordar cada objetivo correspondiente como así también los resultados y conclusiones parciales obtenidos. Finalmente, en el Capítulo 5 se exhiben las conclusiones finales y proyecciones de este trabajo de Tesis.

1.3. Bibliografía

1. Liz-marz, L. M. Nanometals : 26–31 (2004).
2. Ramsden, J. *Nanotechnology. An Introduction.* (2016). doi:10.1016/B978-0-323-39311-9.00007-8
3. Science, N. & Council, T. National nanotechnology initiative strategic plan National Science and Technology Council Subcommittee on Nanoscale Science , Engineering , and Technology Committee on Technology.
4. Jawahar, N. & Sn, M. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting : A comprehensive review. **1**, (2012).
5. Rani, S., Sharma, A. K., Khan, I. & Gothwal, A. *Polymeric Nanoparticles in Targeting and Delivery of Drugs. Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and delivery of Drugs and Genes* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-12-809717-5.00008-7
6. Bennet, D. & Kim, S. Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery. *Appl. Nanotechnol. Drug Deliv.* (2014). doi:10.5772/58422
7. Girija, A. R. *Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles.* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/B978-0-12-814064-2.00012-3
8. Ahmad, M., Manzoor, K., Singh, S. & Ikram, S. Chitosan centered bionanocomposites for medical specialty and curative applications: A review. *Int. J. Pharm.* **529**, 200–217 (2017).
9. Raafat, D. & Sahl, H. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. *Microb. Biotechnol.* **2**, 186–201 (2009).
10. Ali, A. & Ahmed, S. International Journal of Biological Macromolecules A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **109**, 273–286 (2018).

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

11. Ce, M., Santini, A. & Souto, E. B. Delivery of Antimicrobials by Chitosan-Composed Therapeutic Nanostructures. in *Nanostructures for Antimicrobial Therapy acquire* (ed. Elsevier Inc.) 203–222 (2017). doi:10.1016/B978-0-323-46152-8.00008-1
12. Vunain, E., Mishra, A. K. & Mamba, B. B. *1 – Fundamentals of chitosan for biomedical applications. Chitosan Based Biomaterials: Volume 1: Fundamentals 1*, (Elsevier, 2017).
13. Paques, J. P., Van Der Linden, E., Van Rijn, C. J. M. & Sagis, L. M. C. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **209**, 163–171 (2014).
14. Zazzali, I. *et al.* Effects of pH , extrusion tip size and storage protocol on the structural properties of Ca(II)-alginate beads. *Carbohydr. Polym.* **206**, 749–756 (2019).
15. Zimmerberg, J., Cohen, F. S. & Finkelstein, A. Microencapsulated Islets as Bioartificial Endocrine Pancreas. 3–5 (1980).
16. Joseph, D. *et al.* Food Hydrocolloids Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. *Synth. monodisperse chitosan nanoparticles* **83**, 355–364 (2018).
17. Niyamissara, F. & Muangnoi, C. Materials Science & Engineering C Chitosan / alginate nanoparticles as a promising approach for oral delivery of curcumin diglutaric acid for cancer treatment. *Mater. Sci. Eng. C* **93**, 178–190 (2018).
18. Katuwavila, N. P. *et al.* Chitosan-Alginate Nanoparticle System Efficiently Delivers Doxorubicin to MCF-7 Cells. **2016**, (2016).
19. Pant, A. & Negi, J. S. Novel controlled ionic gelation strategy for chitosan nanoparticles preparation using TPP- β -CD inclusion complex. *Eur. J. Pharm. Sci.* **112**, 180–185 (2018).
20. Singh, S., Pandey, V. K., Tewari, R. P. & Agarwal, V. Nanoparticle based drug delivery system : Advantages and applications. **4**, 177–180 (2011).
21. Roca, I. *et al.* The global threat of antimicrobial resistance : science for intervention. *New Microbes New Infect.* **6**, 22–29

22. Hobot, J. A. *Bacterial Ultrastructure. Molecular Medical Microbiology, Three-Volume Set* (Elsevier Ltd, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00002-0
23. Bisen, P. S. Microbial staining. (2015).
24. Vollmer, W. *Peptidoglycan Molecular Medical Microbiology. Three-Volume Set* (Elsevier Ltd, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00006-8
25. Cervantes-García, E., García-González, R. & Salazar-Schettino, P. M. Características generales del Staphylococcus aureus. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* **61**, 28–40 (2014).
26. Gillapsy, A. F. & Iandolo, J. J. Staphylococcus. *Bacteria* 293–303 (2009).
27. Assis, L. M. & Nedeljkovic, M. New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant Staphylococcus aureus New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant Staphylococcus aureus. (2018). doi:10.1016/j.drup.2017.03.001
28. Dezube, R. *et al.* Eradication of persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* (2018). doi:10.1016/j.jcf.2018.07.005
29. Gupta, S. & Kakkar, V. Recent technological advancements in tuberculosis diagnostics – A review. *Biosens. Bioelectron.* **115**, 14–29 (2018).
30. Sensi, P. History of the development of rifampin. *Rev. Infect. Dis.* **66**, 57–58 (1987).
31. Pascual-Pareja, J. F., Carrillo-Gómez, R., Hontañón-Antoñana, V. & Martínez-Prieto, M. Treatment of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.)* **36**, 507–516 (2018).
32. Organization, W. H. *Global tuberculosis report.* (2018).
33. Velayati, A. A. & Farnia, P. Latency in Mycobacterium tuberculosis. *Atlas Mycobacterium Tuberc.* 171–192 (2017). doi:10.1016/B978-0-12-803808-6.00006-2
34. Koch, A., Cox, H. & Mizrahi, V. Drug-resistant tuberculosis: challenges and opportunities for diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Pharmacol.* **42**, 7–15 (2018).

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

35. Perdigão, J. & Portugal, I. Genetics and roadblocks of drug resistant tuberculosis. *Infect. Genet. Evol.* #pagerange# (2018). doi:10.1016/J.MEEGID.2018.09.023
36. Caminero, J. A. *et al.* Diagnosis and Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. *Arch. Bronconeumol. (English Ed.* **53**, 501–509 (2017).
37. Gilman, L. de A. & Goodman, L. S. *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* (2006).
38. Alliance, T. Rifampin. *Tuberculosis (Edinb).* **88**, 151–154 (2008).
39. Godel, A. & Marchou, B. Rifampicina. *EMC - Tratado Med.* **11**, 1–4 (2007).
40. Lee, C., Huang, C. & Lu, P. Role of rifampin for the treatment of bacterial infections other than mycobacteriosis. *J. Infect.* **75**, 395–408 (2017).
41. Boman, G. & Ringberger, V. Binding of Rifampicin by Human Plasma Proteins Binding of Various Concentrations of [RMP Radioassay Calculation of [Binding Binding of [RMP in Healthy Subjects Accuracy and Reproducibility of [the Method. **373**, 369–370 (1974).
42. Zaw, M. T., Emran, N. A. & Lin, Z. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J. Infect. Public Health* (2018). doi:10.1016/j.jiph.2018.04.005
43. Free Patents Online. Available at: http://www.freepatentsonline.com/result.html?sort=relevance&srch=top&query_txt=rifampicin&submit=&patents_us=on.
44. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Available at: <https://servicios.pami.org.ar/vademecum/views/consultaPublica/listado.zul>.
45. Gao, W., Chen, Y., Zhang, Y., Zhang, Q. & Zhang, L. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery ☆. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **127**, 46–57 (2018).
46. Lam, S. J., Wong, E. H. H., Boyer, C. & Qiao, G. G. Antimicrobial polymeric nanoparticles. *Prog. Polym. Sci.* **76**, 40–64 (2018).

47. Haponiuk, T., Thomas, S., Gopi, S. & Jacob, J. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems : A review. **9**, (2018).
48. Costa, E. M. *et al.* Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents : Bactericidal , antibio fi lm and antiadhesive effects. *Mater. Sci. Eng. C* **79**, 221–226 (2017).
49. Sarkar, N., Sahoo, G., Das, R., Prusty, G. & Swain, S. K. European Journal of Pharmaceutical Sciences Carbon quantum dot tailored calcium alginate hydrogel for pH responsive controlled delivery of vancomycin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **109**, 359–371 (2017).
50. Di, A., Trusova, M. E., Postnikov, P. S. & Sedlarik, V. Journal of Drug Delivery Science and Technology Folic acid-chitosan-alginate nanocomplexes for multiple delivery of chemotherapeutic agents. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **47**, 67–76 (2018).
51. Pooja, D., Tunki, L., Kulhari, H. & Reddy, B. B. Characterization , biorecognitive activity and stability of WGA grafted lipid nanostructures for the controlled delivery of Rifampicin. *Chem. Phys. Lipids* **193**, 11–17 (2015).
52. Singh, H., Bhandari, R. & Kaur, I. P. Encapsulation of Rifampicin in a solid lipid nanoparticulate system to limit its degradation and interaction with Isoniazid at acidic pH. *Int. J. Pharm.* **446**, 106–111 (2013).
53. Singh, H., Jindal, S., Singh, M., Sharma, G. & Kaur, I. P. Nano-formulation of rifampicin with enhanced bioavailability : Development , characterization and in-vivo safety. *Int. J. Pharm.* **485**, 138–151 (2015).
54. Vieira, A. C. C., Chaves, L. L., Pinheiro, S., Pinto, S. & Pinheiro, M. Mucoadhesive chitosan-coated solid lipid nanoparticles for better management of tuberculosis. **536**, 478–485 (2018).
55. Esmaeili, F. *et al.* Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **3**, 161–167 (2007).

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

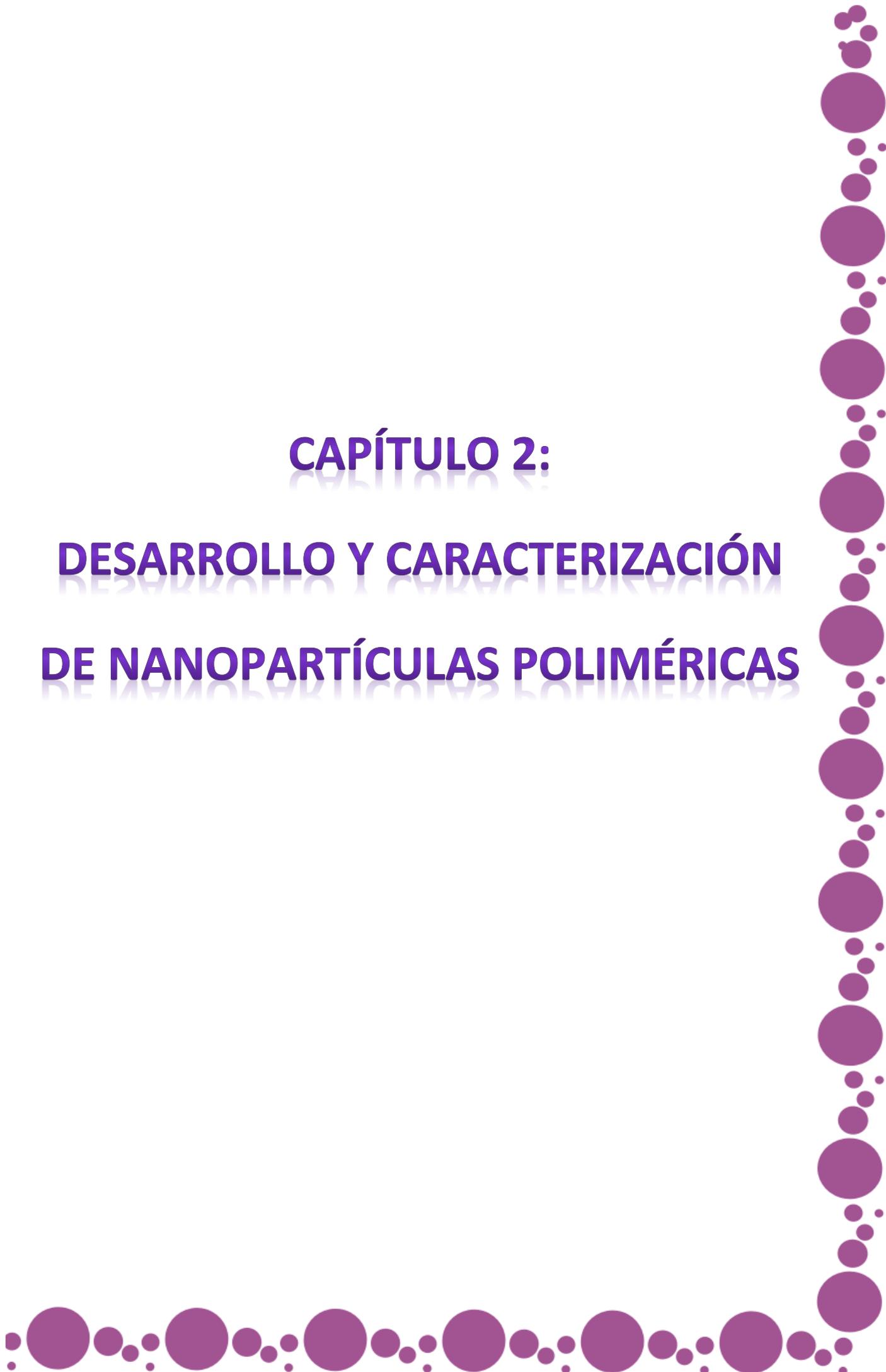
56. Grotz, E. *et al.* Nanotechnology in Tuberculosis: State of the Art and the Challenges Ahead. (2018).
57. Traini, D. & Young, P. M. Drug delivery for tuberculosis : is inhaled therapy the key to success ? **1**, 819–821 (2017).
58. Patil, K., Bagade, S., Bonde, S., Sharma, S. & Saraogi, G. Biomedicine & Pharmacotherapy Recent therapeutic approaches for the management of tuberculosis : Challenges and opportunities. *Biomed. Pharmacother.* **99**, 735–745 (2018).
59. Shair, I., He, W. & Yin, L. Biomedicine & Pharmacotherapy Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR. *Biomed. Pharmacother.* **100**, 335–348 (2018).
60. Forbes, B. & Ehrhardt, C. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications *. **60**, 193–205 (2005).
61. Welsch, U. *Histología*. (2010).
62. Yang, X. *et al.* Immobilization of Pseudorabies Virus in Porcine Tracheal Respiratory Mucus Revealed by Single Particle Tracking. *PLoS One* **7**, (2012).
63. Bansil, R. & Turner, B. S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **124**, 3–15 (2017).
64. Leal, J., Smyth, H. D. C. & Ghosh, D. Physicochemical properties of mucus and their impact on transmucosal drug delivery. *Int. J. Pharm.* **532**, 555–572 (2017).
65. Ma, J., Rubin, B. K. & Voynow, J. A. Mucins , Mucus , and Goblet Cells. *Chest* 1–8 (2017). doi:10.1016/j.chest.2017.11.008
66. R, A. L. Dinámica y patología del barrido mucociliar como mecanismo defensivo del pulmón y alternativas farmacológicas de tratamiento. 606–615 (2014).
67. Koeppen, B. M. & Stanton, B. A. *Berne and Levy Physiology*. (2018).

68. Hestvik, A. L. K., Hmama, Z. & Av-gay, Y. Mycobacterial manipulation of the host cell. **29**, 1041–1050 (2005).
69. Brennan, P. J. & Collins, F. Tuberculosis : Molecular Basis of Pathogenesis. 333–339 (2009).
70. Hugo Trejo Márquez, Patricia Gorocica, Flor Porras, Raúl Chávez, Ricardo Lascurain, E. Z. Bases moleculares de la interacción Mycobacterium tuberculosis con los macrófagos. **16**, (2003).
71. Haque, S., Whittaker, M. R., Mcintosh, M. P., Pouton, C. W. & Kaminskas, L. M. Disposition and safety of inhaled biodegradable nanomedicines : Opportunities and challenges. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**, 1703–1724 (2016).
72. Hamed, K. & Debonnett, L. Tobramycin inhalation powder for the treatment of pulmonary Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis : a review based on clinical evidence. 193–209 (2017). doi:10.1177/1753465817691239
73. Sibus, I., Hagedoorn, P., Boer, A. H. De, Frijlink, H. W. & Grasmeyer, F. Challenges for pulmonary delivery of high powder doses. *Int. J. Pharm.* **548**, 325–336 (2018).
74. Yang, M. Y., Chan, J. G. Y. & Chan, H. K. Pulmonary drug delivery by powder aerosols. *J. Control. Release* **193**, 228–240 (2014).
75. Yang, W., Peters, J. I. & Williams, R. O. Inhaled nanoparticles-A current review. *Int. J. Pharm.* **356**, 239–247 (2008).
76. Courrier, H. M., Butz, N. & Vandamme, T. F. Pulmonary Drug Delivery Systems: Recent Developments and Prospects; *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **19**, 425–498 (2002).
77. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=liposomes+inhalation&Search=Search>.
78. Ulery, B. D., Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **49**, 832–864 (2011).

Capítulo 1: Introducción y Objetivos

79. Beck-Broichsitter, M., Merkel, O. M. & Kissel, T. Controlled pulmonary drug and gene delivery using polymeric nano-carriers. *J. Control. Release* **161**, 214–224 (2012).
80. Ungaro, F. *et al.* Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: Modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers. *J. Control. Release* **157**, 149–159 (2012).
81. Woods, A. *et al.* In vivo biocompatibility, clearance, and biodistribution of albumin vehicles for pulmonary drug delivery. *J. Control. Release* **210**, 1–9 (2015).
82. Ministerio de Salud de la Nación. *Farmacopea Argentina*. (2013).
doi:10.1177/0897190017699760

CAPÍTULO 2:
DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN
DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS



CAPÍTULO 2: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

2.1. Introducción

En las últimas décadas, los sistemas nanotransportadores de fármacos han adquirido un especial interés en el área de las Ciencias Farmacéuticas debido a sus ventajas notables tales como, la minimización de la degradación de los IFAs, la reducción de las dosis de los mismos al acceder de manera controlada al sitio de acción, la disminución de los riesgos de la toxicidad, entre otros¹. Además, el uso de los polímeros naturales, especialmente los polisacáridos, en los sistemas transportadores de fármacos ha atraído un interés particular debido a sus deseables propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, hidrofiliidad y baja toxicidad².

2.1.1. Nanopartículas poliméricas

Para la obtención de NPs poliméricas de ALG y QUIT se seleccionó el método de gelación iónica. Este procedimiento se basa en la interacción electrostática entre sustancias con cargas opuestas. El método para obtener las NPs consistió en la obtención de un pre-gel entre los grupos cargados negativamente de los residuos de ácido gulurónico de ALG e iones Ca^{2+} , estructura conocida como “caja de huevo”³ (*Figura 2.1*). Posteriormente, las NPs obtenidas con ALG se recubrieron con QUIT a través de la reacción iónica entre los grupos aminos cargados positivamente de QUIT con los grupos de ácido carboxílico de los residuos de ácido gulurónico y/o manurónico cargados negativamente de ALG (*Figura 2.2*)^{4,5}.

Las condiciones metodológicas empleadas para la preparación de las NPs en este trabajo de Tesis se describirán en la sección 2.2.1.

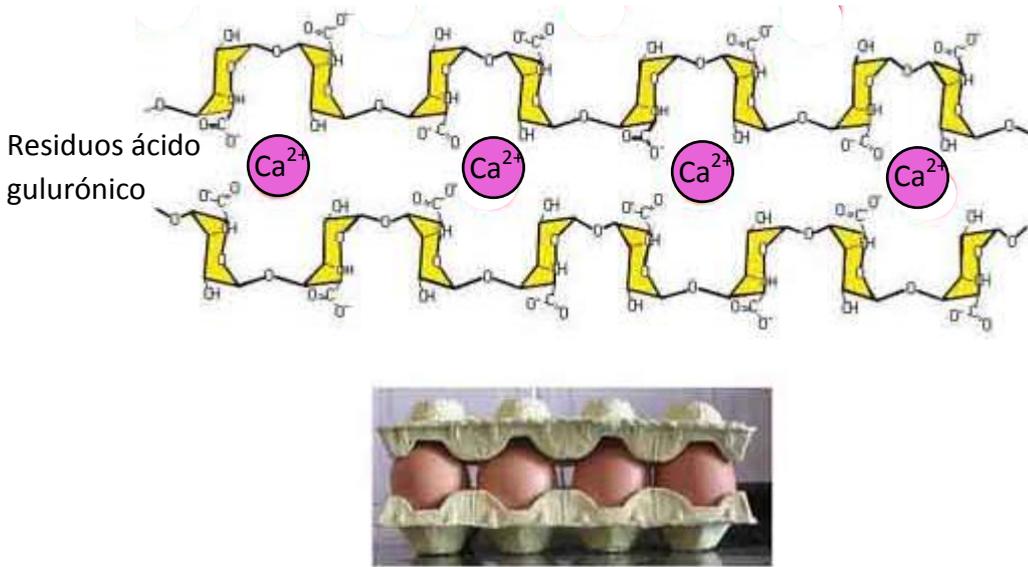


Figura 2.1. Diagrama esquemático de la formación de la estructura “caja de huevo” de alginato de sodio en presencia de iones calcio divalentes.

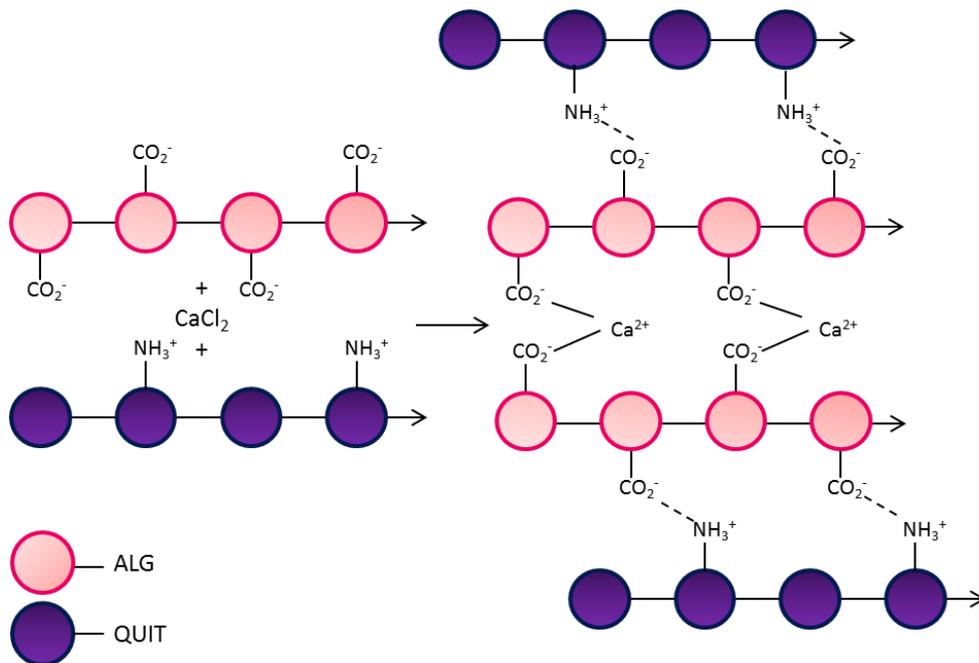


Figura 2.2. Diagrama esquemático de las interacciones entre alginato, iones de calcio divalentes y quitosano en el proceso de gelación iónica.

Para optimizar los parámetros de síntesis es muy útil el empleo de diseños de superficie de respuesta (DSR). Los DSR son un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos que conducen a la optimización de un proceso. Existen de diversos tipos según las necesidades y el análisis que se quiera llevar a cabo; los diseños de Box-Behnken (DBB)

son un tipo de DSR que permiten optimizar parámetros de procesos utilizando como mínimo tres factores y tres niveles (alto, medio y bajo) los cuales ajustaran las respuestas obtenidas a modelos matemáticos lineales, cuadráticos y de dos factores. Mediante la aplicación del test estadístico análisis de la varianza (ANOVA) para cada respuesta, con un intervalo de confianza del 95%, se pueden determinar los coeficientes significativos en cada ecuación polinómica y se denota por signos negativos o positivos de acuerdo con un efecto antagónico o sinérgico, respectivamente así como también se permite los eliminar los factores no significativos, es decir, los parámetros que no son críticos en el proceso⁶. El test estadístico ANOVA sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa, el mismo será explicado en mayor detalle en el *Capítulo 4* de este trabajo de Tesis.

2.1.2. Proceso de liofilización. Agentes crioprotectores.

La **liofilización** es la eliminación del agua por sublimación de la muestra en el estado sólido. En este proceso, primero se congela la muestra y luego la misma se somete a alto vacío, por lo que el hielo del agua se sublima, es decir, se evapora directamente, sin fundirse. El vapor de agua liberado, generalmente, se captura en la superficie de un condensador a muy baja temperatura⁷. La liofilización es un procedimiento muy utilizado para mejorar la estabilidad a largo plazo de las NPs poliméricas destinadas a la administración de fármacos, evitando de esta manera su inestabilidad en suspensión. Un buen liofilizado debería cumplir las siguientes características importantes: mantener las propiedades físicas y químicas del producto original (no presentar ninguna modificación del tamaño y distribución de las partículas), ser un polvo con buen aspecto, con bajo contenido de humedad y que permita una fácil y rápida reconstitución en sistemas acuosos. Además, después de la liofilización, las NPs deben ser capaces de preservar la actividad terapéutica del fármaco encapsulado⁸.

Durante el proceso de congelación, ocurre una separación de dos fases, hielo y suspensión concentrada. La fase concentrada está constituida por las NPs y otros excipientes como los crioprotectores, las soluciones tamponadas (buffers), los surfactantes, entre otros. Se debe tener en cuenta que una concentración alta de las NPs en esta fase puede causar su agregación. Además, la cristalización del hielo puede inducir el estrés mecánico de las NPs, lo cual conduce a su desestabilización. Para evitar estos problemas, se estila agregar crioprotectores a la suspensión de NPs antes de la congelación. En general, los crioprotectores pueden formar una matriz vidriosa, en la que las NPs se inmovilizan evitando

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

su agregación y, de esta manera, protegen a las mismas de las tensiones mecánicas de los cristales de hielo. Los crioprotectores que más comúnmente se utilizan son los azúcares, como trehalosa, glucosa, sacarosa y manitol⁹.

2.1.3. Técnicas de caracterización

En esta sección se describirán los fundamentos de las metodologías empleadas para la caracterización de las NPs desarrolladas en este trabajo de Tesis.

2.1.3.1. Dispersión de la luz dinámica

La dispersión de la luz dinámica, (DLS, por sus siglas en inglés de Dynamic Light Scattering), es una técnica no destructiva y bien establecida para medir el tamaño y la distribución del tamaño de las moléculas y las partículas. Esta técnica se basa en el hecho de que la intensidad de la radiación dispersada sobre las partículas de la muestra, que se encuentran en movimiento brownianoⁱⁱ, al incidir un haz de láser, varía en el tiempo, debido a que la posición de las partículas en la muestra, que cambia constantemente, determina la magnitud y el carácter constructivo o destructivo de la interferencia de la luz dispersada por las partículas, en un punto del espacio, lo que se relaciona con la velocidad del movimiento de las mismas, y por lo tanto, con su tamaño. De esta manera, detectando y correlacionando las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada, es posible determinar los tamaños de las partículas midiendo el coeficiente de difusión de la luz en la muestra mediante la función de autocorrelación. Esta función tiene un ajuste exponencial, o alguna combinación o modificación de la misma, con la constante de desintegración correspondiente, que son parámetros relacionados con el coeficiente de difusión. Asumiendo que las partículas tienen forma esférica, baja concentración y se conoce la viscosidad del medio en el que están suspendidas, el diámetro hidrodinámicoⁱⁱⁱ de la partícula se calcula con el coeficiente de difusión obtenido de la partícula, y a partir de dicho valor, se puede aproximar un diámetro promedio, que debe corroborarse con técnicas microscópicas de alta resolución, como la

ⁱⁱ El movimiento browniano es el movimiento aleatorio que se observa en las partículas que se hallan en un medio fluido (líquido o gas), como resultado de las colisiones contra las moléculas de dicho fluido.

ⁱⁱⁱ Cuando un medio líquido mueve una partícula dispersa, la mayoría de las veces se adhiere una capa eléctrica dipolar a su superficie. Debido a que esta capa influye en el movimiento de la partícula, en la DLS el diámetro medido de la partícula, que se conoce como hidrodinámico, la mayoría de veces es superior al diámetro que se mide con un microscopio electrónico. El grosor de la capa depende de distintos factores, entre los cuales está la conductividad eléctrica del líquido.

microscopía electrónica de barrido, para determinar el diámetro geométrico de las partículas, y de esta forma poder inferir el tamaño de las partículas dispersas¹⁰.

Otro parámetro importante es el índice de polidispersidad (IPD) que se obtiene de manera simultánea con el diámetro hidrodinámico de la partícula. Este índice refleja la distribución de tamaños presentes en la muestra, valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa, y valores mayores a 0,5 indican que la muestra presenta una amplia distribución de tamaños^{11,12}.

Otra propiedad que se puede medir mediante la técnica de DLS es el potencial z (ζ , unidad: mV). Este parámetro también llamado potencial electrocinético, da una aproximación del valor de las cargas superficiales de las partículas, las cuales no pueden medirse directamente. El valor de ζ determinará el comportamiento físico de las partículas en la suspensión, estableciendo principalmente su estabilidad; si este valor es mayor a |30| mV, significa que las partículas que conforman el sistema poseen cargas superficiales lo suficientemente grandes, favoreciendo las fuerzas repulsivas sobre las atractivas, lo cual evita que el sistema sufra fenómenos de inestabilidad tales como coagulación irreversible¹³.

2.1.3.2. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés de scanning electron microscopy) es una técnica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. El funcionamiento de este tipo de microscopía consiste en hacer incidir un barrido de haz de electrones sobre la muestra. Dentro de las ventajas de SEM, se puede mencionar que se requiere una mínima preparación previa de la muestra, sólo es necesario asegurar que las mismas estén limpias, secas, con una superficie conductora de electricidad y que resistan la incidencia del haz de electrones de alta energía.

Cuando se debe caracterizar un material no conductor, las muestras se deben recubrir con una capa metálica delgada de compuestos puros o una mezcla de los mismos, frecuentemente se utilizan oro, cromo y paladio. La SEM permite la observación y caracterización superficial de los materiales inorgánicos y orgánicos, así como, de muestras biológicas, proporcionando información morfológica del material analizado¹⁴.

2.1.3.3. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto (θ_c) es el ángulo que forma un líquido, comúnmente agua (θ_c [H₂O]), al depositarse sobre una superficie perfectamente plana de un sólido. El θ_c permite cuantificar la humectabilidad de un sólido al tomar contacto con un líquido a través de la ecuación de Young (Ecuación 2.1). Esta ecuación toma en cuenta las energías superficiales de las interfaces involucradas (sólida/gaseosa (SG), líquida/gaseosa (LG) y sólida/líquida (SL))¹⁵ (Figura 2.3).

$$\gamma_{SG} = \gamma_{SL} + \gamma_{LG} \times \cos \theta$$

Ecuación 2.1. Ecuación de Young.

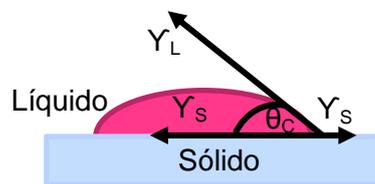


Figura 2.3. Representación gráfica del ángulo de contacto y sus componentes.

donde, γ_{SL} es la energía libre de interfaz para la interfaz SL, γ_{SG} para la interfaz SG, γ_{LG} para la interfaz LG y θ_c es el ángulo de contacto.

Existen diversos métodos para medir el θ_c ^{16,17,18}, entre los cuales se pueden mencionar:

- Método directo.
- Método de la placa inclinada, Adam y Jessop.
- Método de Ablett.
- Método de la burbuja – Taggart.
- Técnica de mojabilidad de capas delgadas.

Frecuentemente, el método más utilizado para determinar el θ_c es el método directo. En este procedimiento, conocido como técnica goniométrica, se deposita una gota de líquido sobre la superficie del sólido a estudiar y se mide el θ_c haciendo una captura digital de la imagen de esa gota en función del tiempo y utilizando programas informáticos específicos. Con esta técnica se pueden realizar mediciones estáticas y dinámicas de los θ_c . Para este trabajo de Tesis se realizó una determinación estática (θ_c estático), es decir, cuando la gota

deja de oscilar después de ser depositada en la superficie del sólido, se adquieren varias fotos donde el θ_c se mantiene constante durante décimas de segundo. El valor de este parámetro depende principalmente de la relación que existe entre las fuerzas adhesivas, entre las moléculas del líquido y del sólido, y las fuerzas cohesivas entre las moléculas del líquido. Cuando predominan las fuerzas adhesivas sobre las cohesivas, el θ_c es menor de 90° , y por lo tanto, el líquido “moja” la superficie. Por el contrario, cuando predominan las fuerzas cohesivas sobre las adhesivas, el θ_c es mayor de 90° , y el líquido “no moja” la superficie del sólido¹⁹. La *Tabla 2.1.* describe la clasificación de los sólidos con respecto a su humectabilidad según su θ_c [H₂O].

Tabla 2.1. Clasificación de los sólidos según θ_c [H₂O].

Super-hidrofílico	θ_c [H ₂ O] < 10°	
Hidrofílico	$10^\circ < \theta_c$ [H ₂ O] < 90°	
Hidrofóbico	$90^\circ < \theta_c$ [H ₂ O] < 120°	
Super-hidrofóbico	θ_c [H ₂ O] > 120°	

2.1.3.4. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

La espectroscopia infrarroja (IR), es una técnica muy útil para la caracterización de IFAs en el estado sólido, especialmente cuando la medición se realiza mediante el método de la transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés de Fourier Transform Infrared Spectroscopy). La FTIR es un método de caracterización de materiales basado en la absorción de energía a partir de la transición de modos vibracionales y rotacionales de las moléculas en la región IR del espectro electromagnético. Esta región se encuentra en el rango de 800 a 1.000.000 nm. Los espectros se registran comúnmente usando una escala lineal que es la inversa a la longitud de onda, conocida como número de onda ($\tilde{\nu}$)^{iv} (unidad cm^{-1}). La región IR se puede subdividir en tres: IR cercano, 12.500 a 4.000 cm^{-1} ; IR medio 4.000 a 400 cm^{-1} y de 400 a 10 cm^{-1} , que se conoce como región de IR lejano²⁰.

^{iv} El número de onda es una magnitud de frecuencia que indica el número de veces que vibra una onda en una unidad de distancia.

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

En el análisis cualitativo de las moléculas de interés farmacéutico, el rango de frecuencias más utilizado es el correspondiente al IR medio. Esta técnica se emplea ampliamente en la investigación en el campo farmacéutico para identificar sustancias, obtener información estructural de nuevas moléculas químicas, así como, dilucidar las interacciones entre uno o más grupos funcionales presentes en una formulación²¹.

2.1.3.5. Difracción de rayos x de polvo (DRX)

La espectroscopia de difracción de rayos X (DRX) es una técnica no destructiva que proporciona información detallada de la composición química y estructural de los materiales estudiados. El patrón de DRX de un sólido resulta de la satisfacción de la condición de Bragg ($n\lambda = 2d \times \sin\theta$), donde λ es la longitud de onda de la radiación de rayos X, y d es la separación particular entre planos individuales paralelos. La condición se puede satisfacer cuando el ángulo θ entre la radiación incidente y ese conjunto de planos resulta en una interferencia constructiva. El patrón de DRX de un sólido es un gráfico de la intensidad de la difracción en función de los valores de ángulo de difracción (2θ) o, equivalentemente, espaciamentos d , y puede considerarse una huella dactilar de ese sólido. Los valores de los espacios d reflejan las dimensiones de la celda unitaria, mientras que las intensidades son debidas al contenido de la misma y la forma en que se disponen los átomos y las moléculas en esta²².

Las aplicaciones típicas de esta metodología incluyen la determinación de las estructuras cristalinas, la evaluación de las estructuras de polimorfos y solvatos, la evaluación del grado de cristalinidad y el estudio de transiciones de fase²³.

2.1.3.6. Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido

El análisis térmico es un conjunto de métodos ampliamente utilizados en la ciencia de los materiales en el que se estudian los cambios de las propiedades físicas y químicas de los mismos con la temperatura.

El estudio del efecto de la temperatura sobre los sólidos resulta más ventajoso cuando se lleva a cabo a partir de la combinación de técnicas. Las técnicas más utilizadas, en el área farmacéutica, son la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés differential scanning calorimetry) y el análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en

inglés thermogravimetric analysis). En el TGA se registra la pérdida de peso de una muestra con el aumento de la temperatura, bajo condiciones controladas de velocidad de calentamiento y atmósfera de reacción. A partir de este análisis se obtienen curvas denominadas termogramas y curvas de análisis termogravimétrico diferencial (dTGA, por sus siglas en inglés differential thermogravimetric analysis). Por su parte, DSC es una técnica termoanalítica en la que la diferencia de calor entre la muestra de interés contenida en un recipiente portamuestra adecuado para DSC (“DSC sample pan”) y una referencia (usualmente, un recipiente portamuestra para DSC vacío) es medida como una función de la temperatura. Es la técnica de medición más utilizada para detectar transiciones de fases que pueden ser endotérmicas o exotérmicas, y están relacionadas mayormente a la entalpia de fusión o cristalización. También es posible determinar la transición del estado vítreo al estado gomoso del material, conocida como temperatura de transición vítrea del material (T_g)²⁴.

2.2. Materiales y métodos

Materiales utilizados:

- El IFA empleado para este trabajo de Tesis fue RIF de la marca Parafarm®, adquirida en Todo Droga, Córdoba, Argentina.
- QUIT de bajo PM (Sigma-Aldrich®, EE.UU.) se adquirió en Merck, Buenos Aires, Argentina. Su PM se encuentra comprendido entre 50.000-190.000 Da y posee un 85% de grado de desacetilación.
- ALG (Sigma-Aldrich®, EE.UU.) fue adquirido en Merck, Buenos Aires, Argentina. Su PM ronda alrededor de 70.000-100.000 Da, la valor de viscosidad es de aproximadamente 8 cP (centipoise) y posee un 39% de contenido ácido de α -L-gulurónico y un % 61 de ácido β -D-manurónico.
- CaCl_2 (Cicarelli®) y ASC (Anedra®) se adquirieron de Todo Droga, Córdoba, Argentina.
- T80 (Sigma-Aldrich®, EE.UU.) se adquirió en Merck, Buenos Aires, Argentina.
- Los reactivos químicos fueron de grado analítico o superior y se utilizaron sin una purificación adicional.

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

- El agua utilizada en todos los estudios fue producida con un sistema de purificación Milli-Q (Millipore®, Bedford, MA).

Equipamiento utilizado:

- Todos los reactivos se pesaron en una balanza analítica Voyager Ohaus® modelo Explorer E01140.
- Para disolver algunos compuestos se utilizó un ultrasonicador Elma S 40 Elmasonic®, Alemania.
- El pH de las muestras se determinó utilizando un pH-metro Hanna instrument HI 255 combined meter®, Buenos Aires, Argentina.
- Para incubar las muestras a temperatura constante se utilizó un agitador orbital Ferca®, Buenos Aires, Argentina.
- Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis®, EE.UU. Se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico Hëllma Analytics®, EE.UU.
- Para centrifugar las NPs se utilizaron tubos de centrifuga (Oak Ridge Centrifuge Tube®, Thermo scientific, EE. UU.) y una ultracentrífuga HERMLE Labortechnik Z36HK®, Alemania.
- El tamaño de partícula, IPD y ζ se determinaron utilizando un equipo DLS, Malvern Panalytical®, Reino Unido.

2.2.1. Obtención de las nanopartículas poliméricas

Las NPs se obtuvieron mediante el procedimiento de gelación iónica. Las soluciones madre de los polímeros se prepararon de la siguiente manera: la solución de QUIT se preparó en ácido acético 1 % v/v a un valor de pH de 4,5 que se ajustó previamente con una solución de NaOH 1 M para favorecer la protonación de los grupos amino de QUIT. La concentración final de la solución de QUIT fue de 0,05 % p/v. Por otro lado, se preparó la solución de ALG en agua Milli-Q con un valor de pH previamente ajustado a 5,5 con una solución de HCl 1 M, para favorecer la ionización de los grupos carboxilatos de ALG. La concentración final de la solución de ALG fue de 0,06 % p/v. Ambas dispersiones se agitaron durante toda la noche a 300 rpm y a temperatura ambiente para favorecer la disolución de

los polisacáridos. Posteriormente, las soluciones fueron filtradas al vacío utilizando una membrana con tamaño de poro de 0,45 μm (Millipore®, EE. UU.) para remover los residuos de las partículas insolubles.

El método de obtención de las NPs constó de dos pasos; como primer paso (**Paso 1**), se adicionaron gota a gota 0,96 mL de una solución acuosa de CaCl_2 0,05 % p/v a un vaso de precipitado conteniendo 20 mL de la solución de ALG previamente preparada, con agitación constante de 300 rpm durante 60 min. Luego, en un segundo paso (**Paso 2**), 1,96 mL de la solución de QUIT previamente preparada se adicionaron gota a gota sobre la preparación anterior, manteniéndose durante 120 min con agitación a 300 rpm, alcanzando la mezcla resultante un pH de 4,7. Luego, las NPs se colocaron en tubos de centrifuga para separarlas de los componentes que no reaccionaron mediante ultracentrifugación, a una velocidad de 19.000 rpm, con ciclos de 15 min y a una temperatura de 4 °C. Se realizaron dos ciclos de lavado para asegurar que la separación de los componentes que no reaccionaron sea completa, para esto, se resuspendieron los “pellets” obtenidos con un volumen adecuado de agua Milli-Q y las muestras se centrifugaron a las mismas condiciones descriptas anteriormente²⁵. En la *Figura 2.4*. se presenta un esquema del método de obtención de las NPs.

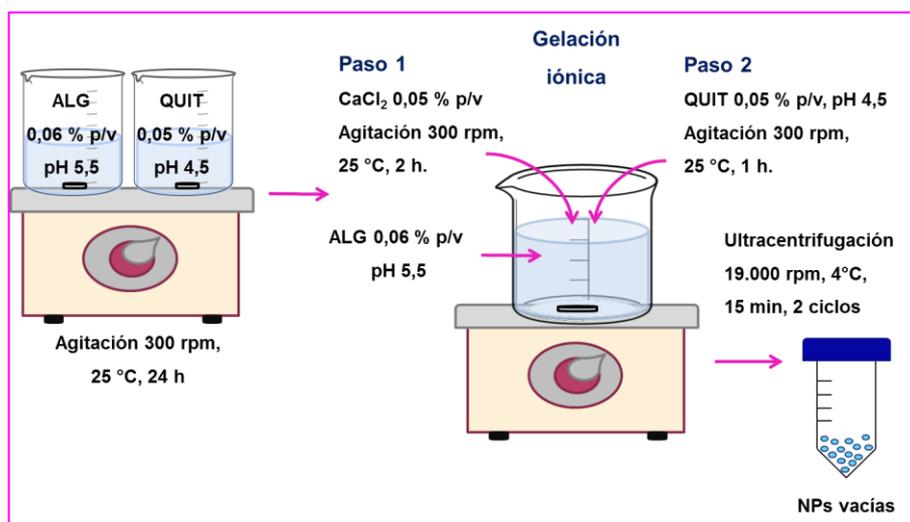


Figura 2.4. Esquema de obtención por el método de gelación iónica de las NPs vacías.

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

2.2.1.1. Análisis de solubilidad de fases de rifampicina

Debido a que se desconoce la solubilidad máxima de RIF en los polímeros utilizados en este trabajo de Tesis para la obtención de los sistemas transportadores, se realizó el análisis de solubilidad de fases (ASF) para conocer la solubilidad máxima de RIF en los polímeros empleados. Para realizar el ASF se prepararon muestras en tubos con tapa a rosca conteniendo un exceso de RIF en estado sólido (aproximadamente 5 mg), a los cuales se les adicionaron soluciones acuosas de ALG en el rango de concentraciones de 0,030 a 0,120 % p/v, con un valor de pH de 5,5. Por otro lado, se procedió de la misma manera que la descrita en el párrafo anterior, para realizar el ASF con las soluciones acuosas de QUIT a pH 4,5 utilizando un rango de concentraciones comprendido entre 0,025 a 0,100 % p/v. El volumen final en cada tubo fue de 5 mL y se utilizó agua Milli-Q como control de la solubilidad intrínseca de RIF. Los tubos se colocaron en un agitador orbital a 200 rpm y 25°C durante 48 h. Pasadas las 48 h, las muestras fueron filtradas con membranas Millipore® de 0,45 μm y se midió el IFA disuelto con un espectrofotómetro UV-vis, a una $\lambda = 334 \text{ nm}$. El ensayo se realizó por triplicado y las muestras se mantuvieron al resguardo de la luz. Se estudió si el IFA de interés (RIF) se incorpora en el sistema nanotransportador. Una vez seleccionado el polímero en el cual se disolverá RIF, así como la concentración de la misma con la cual se trabajará, se procedió a obtener las NPs RIF, para esto se realizó la síntesis de las NPs siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en 2.2.1. pero incorporando la solución de RIF disuelta en el polímero adecuado respondiendo al esquema de la *Figura 2.4*.

Debido a que RIF es susceptible a sufrir degradación oxidativa, es frecuente el agregado de agentes antioxidantes, tales como ácido ascórbico (ASC)²⁶ en sus formulaciones farmacéuticas. Por este motivo, se agregó a una solución de RIF una cantidad de ASC equivalente a una concentración final de 1 % p/v, con un valor de pH de 4,5 ajustado con una solución NaOH 1 M, para evitar la hidrólisis ácida de RIF. Por otro lado, para mejorar la estabilidad coloidal de las NPs se propuso agregar al sistema un surfactante no iónico, tween 80 (T80). Para conocer la solubilidad de RIF en T80 se realizó un ASF. Se prepararon soluciones de T80 a diferentes concentraciones: 0,5; 1,0 y 2,5 % p/v. Se realizó un ASF de RIF en T80 y se seleccionó el medio y la concentración adecuados para favorecer la disolución de RIF y luego se procedió a obtener las NPs incorporando la solución de T80 y ASC previamente al Paso 1 del esquema de la síntesis (*Figura 2.4*). Para obtener las NPs vacías con ASC y T80 se realizó el mismo procedimiento, sin el agregado de RIF.

2.2.1.2. Optimización de las relaciones de masa entre alginato y cloruro de calcio

Se determinaron las condiciones óptimas para la obtención de las NPs con un tamaño menor a 500 nm y un IPD cercano a 0,2. Las NPs se prepararon según el procedimiento previamente descrito en la sección 2.2.1. variando la relación de masa (RM) de los componentes de las mismas (ALG, CaCl₂ y QUIT).

En primer lugar, se seleccionaron las RM óptimas de los componentes de las NPs. Para este propósito se probaron diferentes RM de ALG y CaCl₂, manteniendo constante la RM de QUIT:ALG en 0,1. Se midió el diámetro hidrodinámico y el IPD mediante DLS. Luego, se procedió a seleccionar la RM entre QUIT y ALG más adecuada, manteniendo constante la RM de CaCl₂ y ALG seleccionada anteriormente, variando la RM entre QUIT y ALG y de igual manera se realizaron las determinaciones mediante DLS.

2.2.1.3. Optimización de las condiciones de síntesis de las nanopartículas aplicando un diseño de superficie de respuesta con el modelo de Box-Behnken

Las matrices de diseño experimental y el análisis de resultados se realizaron con el diseño de superficie de respuesta (DSR) siguiendo un diseño estadístico de Box-Behnken (DBB) utilizando el software Minitab® 18 (Minitab Inc., EE. UU.). Se realizaron dos DBB independientes (DBB₁ y DBB₂) para evaluar la influencia de diferentes parámetros de síntesis en las características de las NPs obtenidas. Se utilizaron dos DBB de 3 factores y 3 niveles (bajo (-1), medio (0) y alto (+1)) para determinar los efectos de diferentes factores (X, variables independientes):

- DBB₁: RM QUIT/ALG (X₁), cantidad de RIF (X₂) y velocidad de agitación para la preparación de las NPs (X₃).
- DBB₂: cantidad de RIF (X₁), concentración de T80 (X₂) y tiempo de agitación total de la síntesis de NPs (X₃).

Las respuestas analizadas (Y, variables dependientes) fueron: diámetro hidrodinámico (tamaño de partícula) (Y₁), IPD (Y₂), ζ (Y₃) y eficiencia de encapsulación (EE) de RIF (Y₄).

Los factores de nivel (-1, 0 y +1) se seleccionaron sobre la base de los resultados de experimentos preliminares (resultados no mostrados en el trabajo de Tesis). Las *Tablas 2.2. y 2.3.* respectivamente, muestran cada matriz de diseño experimental para un total de 15 ejecuciones experimentales con tres repeticiones en el punto central. Las correlaciones

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

entre los factores en las respuestas se investigaron mediante ecuaciones matemáticas, diagramas de Pareto, gráficos de contorno y de superficie, así como gráficas de efectos principales. Se usó la prueba ANOVA para evaluar estadísticamente los resultados, y las ecuaciones finales se acortaron para incluir solo los parámetros significativos (p -valor < 0,05).

Tabla 2.2. Condiciones experimentales DBB_1 para la preparación de las NPs vacías y RIF sin T80 ni ASC.

Variables independientes	Niveles		
	-1	0	+1
X_1 (RM QUIT/ALG, mg/mg)	0	0,067	0,134
X_2 (cantidad de RIF, mg)	0	12,5	25,0
X_3 (velocidad de agitación, rpm)	300	600	900

Tabla 2.3. Condiciones experimentales DBB_2 para la preparación de las NPs vacías y RIF con T80 y ASC.

Variables independientes	Niveles		
	-1	0	+1
X_1 (cantidad de RIF, mg)	0	12,5	25,0
X_2 (concentración de T80, % p/v)	0	0,25	0,50
X_3 (tiempo total de síntesis, min)	15	97,5	180

Las respuestas Y_1 , Y_2 e Y_3 se determinaron mediante mediciones con DLS, mientras que la respuesta Y_4 se estimó por un método indirecto. Para calcular la EE de RIF en las NPs se restó la cantidad de RIF libre presente en el sobrenadante (RIF en sobrenadante) después de que las NPs RIF se separaron de RIF libre mediante ultracentrifugación a 19.000 rpm durante 15

min y a 4 ° C de la cantidad inicial agregada previo al Paso 1 (*Figura 2.4*) para preparar las NPs RIF (RIF total). La RIF libre en el sobrenadante se cuantificó mediante espectrometría UV-Vis ($\lambda = 334 \text{ nm}$). La EE se calculó utilizando la siguiente *Ecuación 2.2*.

$$EE (\%) = \frac{RIF \text{ total (mg)} - RIF \text{ en sobrenadante (mg)}}{RIF \text{ total (mg)}} \times 100$$

Ecuación 2.2.

2.2.1.4. Obtención del polvo liofilizado de las nanopartículas poliméricas con ácido ascórbico y tween 80, vacías y cargadas con rifampicina

Se evaluó el efecto del agregado de 2 agentes crioprotectores, manitol y sucrosa, en un rango de concentraciones entre 1 a 5 % p/v, sobre los efectos del proceso de liofilización en las características de estabilidad de las NPs obtenidas y resuspendidas en agua Milli-Q, tanto vacías como cargadas con RIF. Luego del agregado de los crioprotectores a las suspensiones acuosas de la NPs, las muestras se congelaron a - 4 °C y se sometieron a un proceso de liofilización durante 48 h, usando un sistema liofilizador Labconco Freezone 6. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron mediante la adición de agua Milli-Q hasta obtener una concentración adecuada para realizar las mediciones de tamaño de partícula, IPD y ζ mediante DLS. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

A partir del polvo liofilizado se determinó la capacidad de carga (CC) de las NPs de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CC (\%) = \frac{Cantidad \text{ de RIF enapsulada (mg)}}{Peso \text{ final de las nanopartículas (mg)}} \times 100$$

Ecuación 2.3.

2.2.2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas poliméricas

Se emplearon diferentes técnicas para caracterizar las NPs obtenidas, las cuales se detallan a continuación.

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

2.2.2.1. Microscopía electrónica de barrido

El tamaño y la morfología de la superficie de las NPs con y sin ASC/T80, vacías y cargadas con RIF, así como las NPs con y sin liofilizar, se determinó mediante SEM. Aproximadamente 10 μL de una suspensión de las NPs se fijaron en un soporte adecuado para SEM (SEM Specimen Stub), utilizando una cinta adhesiva de doble faz. Las muestras se secaron en una cámara de vacío hasta corroborar la ausencia de agua, luego fueron recubiertas con oro empleando un recubridor por pulverización PELCO Modelo 3 y se analizaron empleando un microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss Sigma a una intensidad de 4 kV.

2.2.2.2. Medición del ángulo de contacto

El comportamiento de mojabilidad de las muestras (materias primas (MPs), mezclas físicas (MFs) y NPs) se investigó mediante mediciones del θ_c por el método de gota sésil con un goniómetro de θ_c casero, a temperatura ambiente. Para llevar a cabo este ensayo se añadió una gota de agua Milli-Q en las diferentes muestras de polvo, adheridas en una cinta doble faz. La imagen de la gota sobre cada muestra se adquirió con una cámara integrada. Todos los ensayos se llevaron a cabo con gotas de agua con un volumen de $4,00 \pm 0,04 \text{ mm}^3$, que se midió con la pipeta automática del goniómetro de θ_c . La gota de agua se dejó caer desde una distancia de $2,00 \pm 0,01 \text{ mm}$ a la superficie plana de la muestra. Antes y después que la gota toque la superficie, se grabó un video usando una cámara CMOS a 15 fotogramas^v por segundo. Cada video se procesó con el software Spanish-Dub y se seleccionaron diferentes fotogramas a 0 y 15 s en formato bmp. Finalmente, las imágenes de bmp se convirtieron en escala de grises de 8 bits con el software ImageJ 1.4 g. El θ_c se midió procesando las imágenes con un complemento de análisis de gota (LB-ADSA (Low Axisymmetric Drop Shape Analysis de Aurélien Stalder)). Los resultados obtenidos corresponden al θ_c obtenido por el método de subpíxeles²⁷. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

2.2.2.3. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

Los espectros FTIR se obtuvieron con un espectrofotómetro Nicolet Avatar 380. Los espectros se registraron en modo de transmitancia y la exploración espectral se realizó en el

^v Un fotograma o frame (en inglés) es cada una de las imágenes que forman un video.

rango de 400 a 4.000 cm^{-1} , donde la señal promedio es resultado de la adquisición de 32 veces la curva espectral con una resolución de 4 cm^{-1} .

Las MPs, MFs y NPs vacías y cargadas con RIF liofilizadas (sin crioprotector) se mezclaron con bromuro de potasio previamente deshidratado, utilizando un mortero de agata para obtener pastillas de un peso total de 100 mg, correspondientes a KBr y una concentración de 1 % p/p de cada formulación a analizar y sus correspondientes MFs y MPs. Las pastillas se prepararon utilizando un pastillero para tal fin, aplicando una presión de 3 Tohr en una prensa de compresión manual, por duplicado. Los espectros fueron analizados utilizando el software OMNIC E.S.P. 5.1.

2.2.2.4. Difracción de rayos X de polvo

Se llevaron a cabo mediciones de DRX en el rango de 5 a 40 °, utilizando un difractómetro Philips PW1800/10, con radiación $\text{CuK}\alpha$, que funciona a 40 kW y 30 mA, con una velocidad de exploración de 0,02 $^\circ\text{s}^{-1}$. Se analizaron las siguientes formulaciones: las MPs, MFs y NPs vacías y cargadas con RIF liofilizadas (sin crioprotector). Los difractogramas fueron posteriormente procesados para su análisis con el software X'Pert HighScore.

2.2.2.5. Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido

Las NPs vacías y cargadas con RIF liofilizadas (sin crioprotector), MPs y MFs de los componentes utilizados para obtener las NPs se caracterizaron con un analizador térmico TGA-DSC Instrument, serie Discovery.

Para el análisis de DSC, las muestras se colocaron en recipientes herméticos de aluminio y las mediciones abarcaron un rango de temperatura de 25 a 220 $^\circ\text{C}$, con una velocidad de calentamiento de 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$ y bajo un flujo de nitrógeno de 50 mL min^{-1} . Para el TGA, las muestras se colocaron en bandejas de platino y se calentaron de 25 a 400 $^\circ\text{C}$, a una velocidad de calentamiento de 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$ y bajo un flujo de nitrógeno de 50 mL min^{-1} . Los termogramas fueron posteriormente procesados utilizando el software TA Instruments TRIOS.

2.2.3. Evaluación de la estabilidad coloidal de las nanopartículas a largo plazo

Las NPs liofilizadas (con crioprotector) vacías y cargadas con RIF se resuspendieron en las siguientes soluciones tamponadas preparadas según USP: HCl 100 mM, pH 1,2; acetato de

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

sodio 50 mM, pH 5,5; fosfato de sodio monobásico 50 mM, pH 6,8 y 7,4. Las dispersiones de las NPs obtenidas se almacenaron, a temperatura ambiente y en heladera (4°C), durante 3 meses y en este período de tiempo se evaluaron sus diámetros hidrodinámicos, IPDs y ζ mediante DLS.

Por otro lado, se evaluó la estabilidad del polvo liofilizado de NPs conservado en un envase hermético a temperatura ambiente durante un periodo de 6 meses. Finalizado el periodo de almacenamiento las NPs fueron resuspendidas en agua Milli-Q y se midió el diámetro hidrodinámico, IPD y ζ mediante DLS, además, se midió mediante espectroscopia UV-Vis el sobrenadante de las NPs RIF para determinar si el IFA se mantiene encapsulado durante este periodo de almacenamiento.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Obtención de las nanopartículas poliméricas

2.3.1.1. Análisis de solubilidad de fases de rifampicina

En la *Figura 2.5. A y B* se muestran los datos del ASF de RIF en función de la concentración de ALG y QUIT, respectivamente.

La solubilidad intrínseca de RIF en agua es aproximadamente $(0,41 \pm 0,02)$ mg/mL. La solubilidad de RIF no se modificó significativamente en función del aumento de la concentración de ambos polisacáridos, sin embargo, la solubilidad en ALG a una concentración de 0,06 % p/v, fue al menos 10 μ g/mL mayor que en QUIT 0,05 % p/v, a su vez, la concentración de ALG para sintetizarlas NPs es mayor que la de QUIT, por lo tanto, se consideró que la solución de ALG es el medio más adecuado para disolver a la RIF.

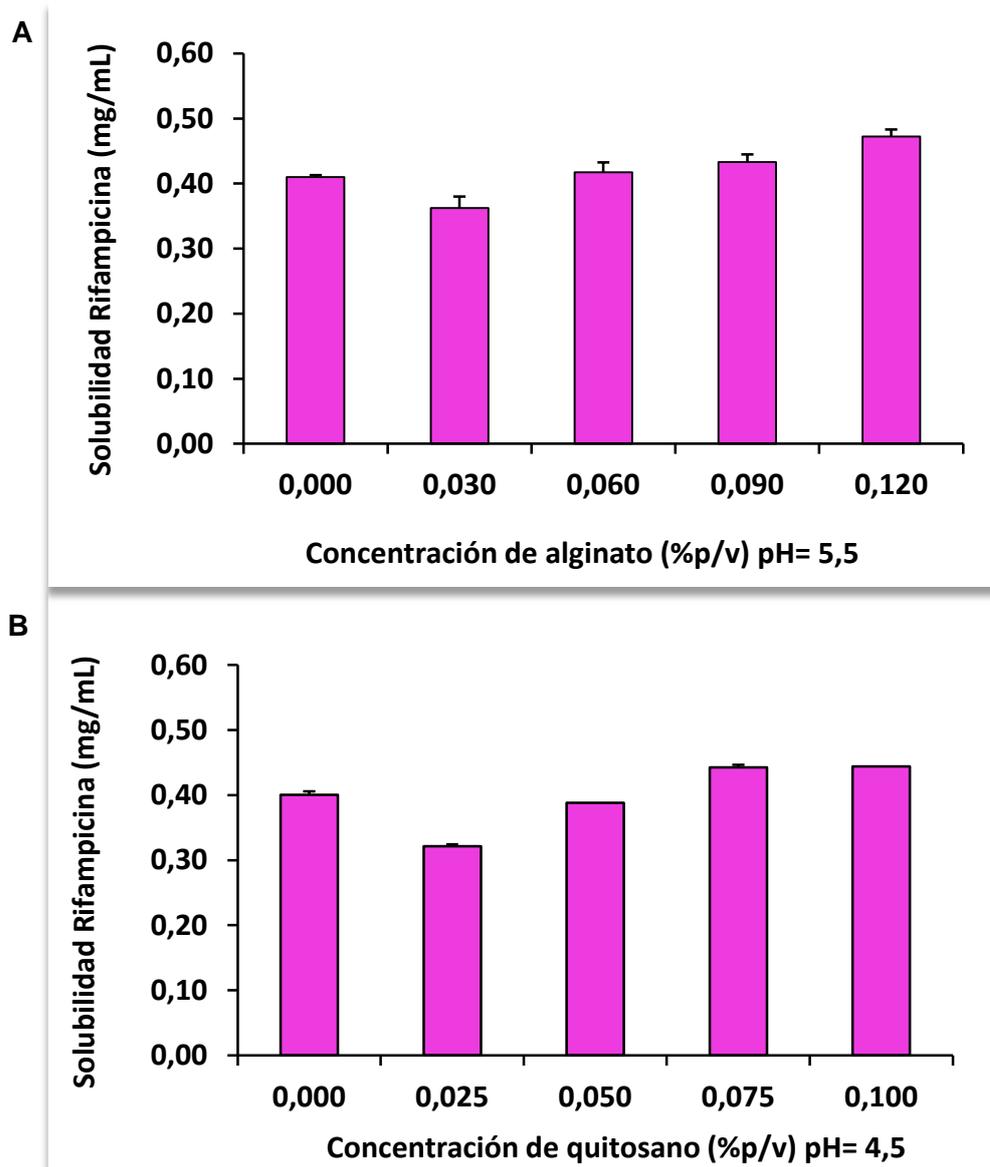


Figura 2.5. Solubilidad de rifampicina (mg/mL) en función de la concentración (% p/v) de: A- alginato; B- quitosano (promedio \pm DE, n=3).

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

Por otro lado, se realizó un ASF de RIF en T80 con el fin de evaluar si provocaba alguna modificación en la solubilidad del IFA. En la *Figura 2.6.* se muestran los resultados de este estudio.

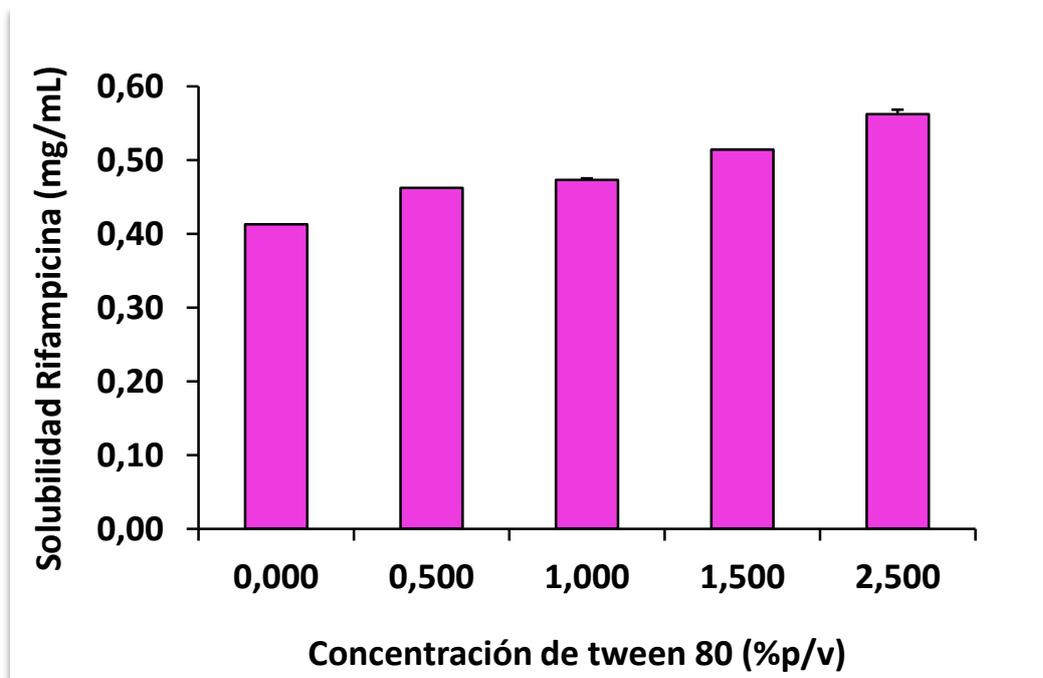


Figura 2.6. Solubilidad de rifampicina (mg/mL) en función de la concentración (% p/v) de tween 80 (promedio \pm DE, n=3).

Como se observa en la *Figura 2.6.*, la variación de la solubilidad de RIF con respecto al aumento de concentración del surfactante no tuvo un efecto significativo, sin embargo, se decidió disolver la RIF en T80 1 % p/v conteniendo un 1 % p/v de ASC para prevenir la oxidación del fármaco. La concentración de T80 se seleccionó teniendo en cuenta no superar el valor de la concentración micelar crítica (CMC)^{vi 28}.

^{vi} CMC: es la mínima concentración de surfactante a partir de la cual se forman micelas espontáneamente en una disolución.

2.3.1.2. Optimización de las relaciones de masa entre alginato y cloruro de calcio

Debido a la gran cantidad de antecedentes existentes referidos a la formación del complejo entre ALG y Ca^{2+} se procedió a realizar un breve análisis de la RM óptima para formular las NPs, manteniendo constante la RM QUIT/ALG en 0,1. En la *Figura 2.7.* se exhibe el gráfico de barras correspondiente al tamaño e IPD obtenido variando las RM CaCl_2/ALG entre 0 y 0,33. Se decidió trabajar con una RM CaCl_2/ALG de 0,04 debido a que el tamaño e IPD obtenidos para esta relación fue el menor, lo cual coincide con lo reportado por otros autores²⁹.

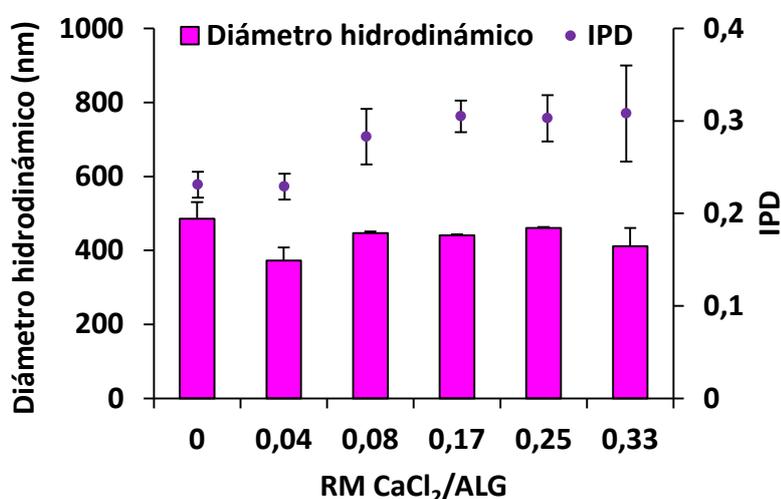


Figura 2.7. Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad de las nanopartículas en función de la relación de masa CaCl_2/ALG (promedio \pm DE, $n=3$).

Una vez seleccionada la RM entre ALG y CaCl_2 para formar el pre-gel, se procedió a realizar un DSR utilizando un DBB.

2.3.1.3. Optimización de las condiciones de síntesis de las nanopartículas aplicando un diseño de superficie de respuesta con el modelo de Box-Behnken

En esta sección se discuten los resultados obtenidos para cada uno de los DBB empleados. Los gráficos correspondientes a los estudios de DSR se encuentran en la sección Anexos de este trabajo de Tesis.

DBB₁

Evaluación de los efectos de los factores sobre el tamaño de las NPs.

El análisis estadístico de los datos experimentales considerando el tamaño de partícula como respuesta (Y_1) mostró que los modelos que mejor ajustaron para predecir el tamaño de partícula fueron el lineal (p-valor= 0,001) y el cuadrático (p-valor= 0,0001), mientras que el modelo de coeficientes de interacción no fue estadísticamente significativo (p-valor = 0,656).

La ecuación polinómica correspondiente al tamaño de partícula se presenta en la *Ecuación 2.4*.

Tamaño de partícula =

$$474 - 3278 \text{ RM QUIT/ALG} + 21471 \text{ RM QUIT/ALG} * \text{ RM QUIT/ALG}$$

Ecuación 2.4.

El valor de r^2 correspondiente a la regresión de cuadrados mínimos de la ecuación fue 98,85 % y 96,78 % para el r^2 ajustado. La cercanía entre ellos sugiere la validez estadística y significación de la ecuación de regresión.

La *Ecuación 2.4.* reveló que la RM QUIT/ALG fue el factor que afectó de manera estadísticamente significativa el tamaño de partícula de las NPs obtenidas bajo el DBB₁ aplicado. El efecto fue antagonista, debido al signo negativo del coeficiente de regresión. Por lo tanto, el aumento en la RM QUIT/ALG disminuye el tamaño de las NPs. Mientras que el signo positivo del coeficiente de regresión para el término de orden superior en la *Ecuación 2.4.* indicó una relación no lineal entre este factor y la respuesta, lo que significa que es posible obtener respuestas diferentes de aquellas predichas por la ecuación de regresión cuando los factores de orden superior varían en diferentes niveles o más de un factor varía simultáneamente.

El diagrama de Pareto estandarizado permite conocer cual o cuales de los factores estudiados influyen significativamente en la respuesta, al trazar los efectos cuantitativos estandarizados de los factores en la respuesta a través de barras cuya longitud es proporcional al valor absoluto del efecto estimado dividido por el error estándar. La línea vertical en la gráfica denota los efectos estadísticamente significativos con un 95% de nivel

de confianza, por lo cual las barras que superan esta línea representan los efectos que son estadísticamente significativos. La *Figura 1.1 (Anexo I)* muestra que la RM QUIT/ALG fue el factor más significativo que influyó en el tamaño de partícula.

Se realizaron análisis de superficie de respuesta para estudiar las interacciones entre 2 factores (variables independientes) en la respuesta (variable dependiente), manteniendo constante el tercer factor y se obtuvieron gráficos de superficie 3D y de contorno 2D (*Figuras 1.3 y 1.4, Anexo I*). La *Figura 1.3* muestra que la RM QUIT/ALG tuvo una relación no lineal con el tamaño de partícula a un nivel constante de RIF. El diámetro hidrodinámico de las NPs disminuyó hasta una cierta proporción de masa entre QUIT y ALG, después de eso comenzó a aumentar. Estos hallazgos podrían explicarse porque en las RMs QUIT/ALG más bajas, las interacciones iónicas entre estos polímeros son favorecidas conduciendo a NPs con un tamaño más pequeño, mientras que en las RMs QUIT/ALG mayores hay pocos grupos COO⁻ de ALG restantes, por lo que las NPs comienzan a formar agregados³⁰. Por otro lado, la cantidad de RIF y la velocidad de agitación no afectaron el tamaño de partícula. Las gráficas de contorno (*Figura 1.4, Anexo I*) revelaron que las NPs tuvieron un tamaño promedio menor a 330 nm en el rango comprendido entre 0,06 y 0,09 de la RM QUIT/ALG, mientras que la cantidad de RIF y la velocidad de agitación no influyeron significativamente en el tamaño de las partículas. Por último, en la gráfica de los efectos principales (*Figura 1.2, Anexo I*) reveló que se alcanzó el menor tamaño de partícula cuando la RM QUIT/ALG fue aproximadamente 0,07, mientras que los otros factores no tuvieron un efecto significativo sobre el tamaño de partícula.

Evaluación de los efectos de los factores en el IPD

El análisis estadístico de los datos de los factores de respuesta determinó que los modelos lineal y cuadrático fueron estadísticamente significativos. La *Ecuación 2.5.* es la ecuación polinómica derivada del modelo:

$$IPD = 0,2688 - 1,720 RM\ QUIT/ALG + 10,999 RM\ QUIT/ALG * RM\ QUIT/ALG$$

Ecuación 2.5.

r² y r² ajustado fueron 96,69% y 90,73%, respectivamente.

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

De acuerdo con la Ecuación 2.5. los valores de IPD solo se vieron afectados por la RM QUIT/ALG y los términos de RM QUIT/ALG de segundo orden, donde la respuesta tuvo una relación lineal e inversa (signo de coeficiente negativo) con la RM entre QUIT y ALG, mientras que el término cuadrático QUIT/ALG produjo un efecto no lineal y sinérgico (signo positivo) en la respuesta. La gráfica de Pareto (Figura II.1, Anexo II) confirma estos resultados, mostrando que la RM QUIT/ALG fue el único factor que produjo un efecto estadísticamente significativo en el IPD. Los gráficos de superficie de respuesta 3D (Figura II.3, Anexo II) mostraron que el IPD tuvo una relación curvilínea con el factor RM QUIT/ALG, se observó una disminución hasta una cierta proporción de masa en el rango comprendido entre 0,06 y 0,09 y luego de esto comenzó a aumentar, mientras que no se obtuvieron efectos estadísticamente significativos con la cantidad de RIF ni con la velocidad de agitación. Se obtuvieron hallazgos similares con los gráficos de contorno (Figura II.4, Anexo II) y el gráfico de efectos principales (Figura II.2, Anexo II), revelando este último, que el IPD mínimo se encontró a un valor de RM QUIT/ALG de aproximadamente 0,07. Esta asociación de efectos es similar a lo observado con la variable respuesta tamaño.

Evaluación de los efectos de los factores sobre el potencial zeta

La prueba ANOVA para los modelos predichos realizados con el software mostró que todos los modelos ajustados tenían un valor de p inferior a 0,05 y, por lo tanto, eran estadísticamente significativos. La ecuación de regresión polinómica que involucra los principales efectos y factores de interacción, considerando solo los términos estadísticamente significativos fue la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Potencial } z = & \\ & -37,6 + 59,2 \text{ RM QUIT/ALG} + 458,5 \text{ RM QUIT/ALG} * \text{RM QUIT/ALG} - \\ & 1,463 \text{ RM QUIT/ALG} * \text{RIF} \end{aligned}$$

Ecuación 2.6.

El valor de r^2 fue 99,59 % y r^2 ajustado 98,85 %, los cuales indicaron que el modelo de regresión cuadrática fue adecuado para predecir esta respuesta.

De acuerdo con el diagrama de Pareto (Figura III.1, Anexo III), la Ecuación de regresión 2.6. muestra que el término lineal RM QUIT/ALG, el término cuadrático RM QUIT/ALG * RM QUIT/ALG y los términos de interacciones RM QUIT/ALG * RIF tuvieron efectos

estadísticamente significativos en la respuesta. Los gráficos de respuesta de superficie 3D (*Figura III.3, Anexo III*) muestran que el ζ se modificó con el aumento del factor RM QUIT/ALG hacia valores menos negativos. Esta tendencia podría atribuirse a la neutralización de la carga negativa en la superficie de las NPs por parte del aumento de la cantidad de QUIT, resultando en todos los casos un valor negativo debido a la preponderancia de ALG. Por otro lado, el aumento de la velocidad de agitación y la cantidad de RIF no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el ζ . Esto sugirió que la carga superficial de las NPs dependió de interacciones electrostáticas entre los grupos negativos de ALG y los grupos positivos de QUIT. Por lo tanto, las combinaciones de ambos componentes de las NPs tuvieron influencia en el ζ , lo cual también se evidenció a partir del gráfico de contorno 2D (*Figura III.4, Anexo III*) y los gráficos de efectos principales (*Figura III.2, Anexo III*).

Evaluación de los efectos de los factores sobre la eficiencia de la encapsulación

El análisis de ANOVA del efecto de los factores estudiados sobre la EE de RIF mostró que los modelos que mejor ajustaron para la variable dependiente (respuesta) fueron el lineal (p-valor = 0,0001) y el cuadrático (p-valor = 0,046). El r^2 y el r^2 ajustado de los coeficientes de regresión fueron 97,30% y 92,43%, respectivamente. La ecuación de regresión se presenta a continuación, considerando solo los términos estadísticamente significativos:

$$EE (\%) = -737 + 160,4 RM \text{ QUIT/ALG} + 1,710 RIF - 0.03520 RIF * RIF$$

Ecuación 2.7.

Al analizar los coeficientes de regresión de la *Ecuación 2.7.* es evidente que los términos lineales RM QUIT/ALG y cantidad de RIF demuestran efectos sinérgicos en la respuesta por sus signos positivos correspondientes. Por lo tanto, un aumento en la RM QUIT/ALG o en la cantidad de RIF resultará en un aumento en la EE. El diagrama de Pareto (*Figura IV.1, Anexo IV*) muestra que la cantidad de RIF y la RM QUIT/ALG fueron los factores que tuvieron un efecto estadísticamente significativo en la variable EE, siendo la cantidad RIF la variable independiente más influyente en la respuesta. Las gráficas de superficie de respuesta 3D se muestran en la *Figura IV.3, Anexo IV* y revelaron que los efectos de interacción de RIF fueron lineales, mientras que la relación entre el factor RM QUIT/ALG y la respuesta estudiada fue curvilínea, mostrando un efecto máximo sobre la respuesta en la RM QUIT/ALG cercana a 0,07. La cantidad de RIF influyó principalmente en los valores de EE, en los que esta

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

respuesta aumenta con el incremento de la cantidad de RIF y en menor proporción con el aumento de la cantidad de QUIT en la formulación. RIF a valores de pH mayores a 3 se encuentra predominantemente con cargas negativas, por esta razón es probable que los grupos amino cargados positivamente de QUIT interactúen con las cargas negativas del fármaco, favoreciendo su encapsulación en las NPs. Estos hallazgos también se muestran en las gráficas de contorno 2D (*Figura IV.4, Anexo IV*) y en el gráfico de efectos principales (*Figura IV.2, Anexo IV*). Por otro lado, la velocidad de agitación no mostró efectos estadísticamente significativos en la modificación de la EE.

Selección de los parámetros de obtención de las nanopartículas óptimos

La administración pulmonar de RIF podría proporcionar una estrategia prometedora para el tratamiento local de la TB, accediendo a los MAs, donde *Mtb* reside y completa su ciclo de vida, para aumentar la eficacia del fármaco y reducir los efectos adversos asociados con otras vías de administración. En base a este propósito, las NPs RIF optimizadas deben tener un tamaño promedio dentro del rango de 300 a 500 nm, debido a que este rango es óptimo para que las NPs se acumulen preferentemente en los pulmones y puedan permanecer en ellos por períodos prolongados de tiempo después de su administración, partículas de menor tamaño son fácilmente exhaladas mientras que las de mayor tamaño no pueden ser fagocitadas por las células³¹. Por otro lado el IPD debe ser lo más pequeño posible debido a que esto se correlaciona con una menor distribución del tamaño de partícula. En cuanto al ζ el mismo debe poseer un valor suficiente para evitar la aglomeración de las NPs, y en lo posible debe ser cercano a $|30|$ mV³². Para la vía de administración pulmonar, en particular se ha reportado que reportado que las NPs con carga superficial negativa son más adecuadas debido a que evitan algunos procesos indeseados tales como adhesión a las fibras de MUC o interferir con las propiedades biofísicas del SP. La EE debe ser la mayor posible para tener una buena proporción entre la cantidad del fármaco y el resto de los componentes de los nanosistemas. En este sentido, los parámetros que se encontraron como óptimos fueron: RM QUIT/ALG: 0,067, cantidad de RIF: 25 mg y velocidad de agitación 300 rpm, está última debido a que no fue un parámetro crítico en el proceso de producción por lo tanto se decidió utilizar la velocidad más baja para otorgar menos energía al sistema y trabajar en condiciones suaves.

DBB₂

El segundo DBB se realizó con los valores de los parámetros RM QUIT/ALG y velocidad de agitación optimizados en el DBB₁ y se evaluaron los efectos e interacciones de tres factores: la cantidad de RIF (X_1), la concentración de T80 (X_2) y tiempo de agitación (X_3) en el tamaño de partícula (Y_1), el IPD (Y_2), el ζ (Y_3) y la EE (Y_4) de las NPs vacías o cargadas con RIF.

Evaluación de los efectos de los factores sobre el tamaño de las NPs

El análisis estadístico de los datos experimentales considerando el tamaño como respuesta (Y_1) mostró que los modelos que mejor ajustaron fueron el lineal (p-valor= 0,000004) y el cuadrático (p-valor= 0,000005), mientras que el modelo de coeficientes de interacción no fue estadísticamente significativo (p-valor = 0,444624).

El valor de tamaño de partícula se expresó mediante la siguiente ecuación generada considerando solo los términos de significación estadística (p-valor < 0,05):

$$\text{Tamaño de partícula} = 483,5 - 2301 T80 + 6825 T80 * T80$$

Ecuación 2.7.

Donde r^2 y r^2 ajustado fueron 99,72% y 99,23%, respectivamente.

La *Ecuación 2.7.* permite inferir que el diámetro hidrodinámico de las NPs vacías y cargadas con RIF se vio afectado principalmente por la proporción de T80 en la formulación. El signo negativo en la ecuación para el coeficiente de regresión de T80 señala que el tamaño de partícula de las NPs disminuye con un aumento en la concentración de T80.

A partir de los resultados del ANOVA y la *Figura V.1, Anexo V* donde se exhibe el diagrama de Pareto de los efectos estandarizados se observa que el factor crítico que influye significativamente en la respuesta tamaño de partícula fue T80 (p-valor < 0,0001). Los gráficos de superficie de respuesta tridimensional (*Figura V.3, Anexo V*) mostraron que la cantidad de RIF y el tiempo total de agitación para el proceso de preparación de las NPs no modificaron el tamaño de manera estadísticamente significativa. Por otro lado, el aumento en la concentración de T80 a valores menores de aproximadamente 0,25 % p/v generó los menores tamaños de las NPs, pero a concentraciones superiores, el tamaño de las NPs RIF comenzó a aumentar. Los gráficos de contorno (*Figura V.4, Anexo V*) y los de las

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

interacciones entre factores (*Figura V.2, Anexo V*), también revelaron que el único factor que influye en el tamaño de partícula de las NPs fue la concentración de T80.

En resumen, se encontró que entre todos los factores estudiados, la concentración del surfactante fue el factor más influyente en el control del diámetro hidrodinámico de las NPs. Los resultados revelaron que la concentración óptima de T80 fue de 0,16 % p/v. El aumento de la concentración de T80, hasta un cierto valor, produjo una disminución en el tamaño de partícula. Este efecto podría atribuirse a un fenómeno de estabilidad coloidal asistido por el surfactante, debido a que T80 es una sustancia tensioactiva capaz de inhibir la agregación de partículas. Los efectos decrecientes y estabilizadores de T80 sobre el tamaño de partícula podrían deberse a su valor de balance hidrofílico-lipofílico (BHL) que permitiría que el mismo se pueda ubicar cerca de la superficie de las NPs y formar una capa protectora alrededor de ellas, lo que lograría que las NPs permanezcan bien dispersas debido a un efecto de estabilización estérico³³. Sin embargo, después de esa concentración óptima de T80, el tamaño de las partículas aumenta, probablemente debido a que las moléculas libres de T80 se fusionen en la superficie de las NPs causando su adherencia y un aumento del tamaño promedio de partícula³⁴.

Evaluación de los efectos de los factores sobre el índice de polidispersidad

El análisis estadístico de los datos experimentales considerando el IPD como respuesta (Y_2) mostró que los modelos que mejor ajustaron para predecir el IPD fueron el lineal (p-valor= 0,0006) y el cuadrático (p-valor= 0,0001), mientras que el modelo de coeficientes de interacción no fue estadísticamente significativo (p-valor = 0,2262).

Los valores de IPD predichos fueron expresados según la siguiente ecuación polinómica, considerando solo los términos con significación estadística (p-valor < 0,05):

$$IPD = 0,2992 - 0,6307 T80 + 1,571 T80 * T80$$

Ecuación 2.8.

Donde r^2 y r^2 ajustado fueron 98,58% y 96,02%, respectivamente. Estos valores indicaron un buen ajuste entre los valores predichos y los valores experimentales.

De acuerdo a la *Ecuación 2.8.* se encontró que el IPD estaba principalmente influenciado por la concentración de T80. El signo negativo del coeficiente de regresión lineal denota la

relación inversa entre la concentración de T80 y el IPD. También este resultado se observa en el diagrama de Pareto (*Figura VI.1, Anexo VI*). En los gráficos de superficie de respuesta 3D y de contorno 2D (*Figura VI.3 y VI.4, Anexo VI*) se puede apreciar que en el rango comprendido entre 0,1 y 0,3 % p/v de T80 se encuentran los menores valores de IPD, los cuales luego aumentan a medida que aumenta la concentración de T80. En el gráfico de efectos principales (*Figura VI.2, Anexo VI*) se determinó que con un valor de concentración de T80 cercano a 0,16 % p/v se obtuvo el menor IPD. Estos resultados están relacionados con los obtenidos para el tamaño de partícula, donde se observó que cuando la concentración de T80 se aproxima a 0,5% p/v el tamaño de partícula fue superior a 1.000 nm mientras que los valores de IPD fueron superiores a 0,3; estos hallazgos podrían estar asociados con la agregación de partículas promovidas por un aumento de la concentración de moléculas libres de T80.

Evaluación de los efectos de los factores sobre el potencial zeta

El análisis estadístico aplicado, ANOVA, mostró una falta de ajuste para cada factor estudiado con respecto a la variable de respuesta, lo que indicó la insuficiencia de todos modelos matemáticos para predecir los datos de la variable de respuesta correspondiente. Los valores de r^2 (71,21%) y r^2 ajustado (19,38%) apoyaron la insuficiencia de los tres modelos estadísticos. Esto podría estar asociado a pequeños cambios de respuesta inducidos por los factores estudiados. Además, el gráfico de Pareto, no mostró asociación entre los factores y la respuesta (*Figura VII.1, Anexo VII*). Las interacciones e influencia de cada factor estudiado en la variable de respuesta son mostradas en las gráficas 3D (respuesta de superficie) y 2D (contorno) en las *Figura VII.3 y VII.4, Anexo VII*, y refuerzan los efectos despreciables de los factores estudiados en esta respuesta. Sin embargo, aunque los efectos de los factores no fueron estadísticamente significativos, la concentración de RIF mostró la mayor influencia en el ζ , como se muestra en el gráfico de efectos principales (*Figura VII.2, Anexo VII*). De todos modos, estos resultados demostraron que el ζ no dependía fuertemente de la concentración de RIF, probablemente debido a que las moléculas del fármaco quedaron atrapadas en el núcleo de las NPs y tuvieron muy poco efecto sobre el ζ .

Evaluación de los efectos de los factores sobre la eficiencia de encapsulación

Los valores predichos de EE se expresaron mediante la siguiente ecuación, considerando solo los términos con significancia estadística para una confiabilidad de 95% (p-valor < 0,05):

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

$$EE (\%) = -9,3 + 3,58 RIF$$

Ecuación 2.9.

El análisis ANOVA mostró un efecto significativo de la concentración de RIF en la variable EE (p-valor= 0,032) para el ajuste lineal. Según la *Ecuación 2.9.* el coeficiente de regresión positivo en el término RIF indica que el factor contribuye a la respuesta con un efecto sinérgico, por lo tanto, la EE aumenta con la concentración del RIF. Además, el diagrama de Pareto (*Figura VIII.1, Anexo VIII*) muestra que la variable concentración de RIF fue el único factor significativo que afectó la respuesta de EE. Sin embargo, aunque la concentración de T80 demostró ser un parámetro no significativo, de la gráfica de efectos principales (*Figura VIII.2, Anexo VIII*) es posible observar que la concentración de T80 llevó a una mejora en la EE hasta una concentración óptima de T80 de 0,16 % p/v, lo que sugiere que el surfactante podría facilitar la incorporación de RIF. Las gráficas de respuestas 3D (*Figura VIII.3, Anexo VIII*) y de contorno 2D (*Figura VIII.4, Anexo VIII*) para la EE mostraron que cuando aumenta la concentración de RIF, también aumenta la EE.

Selección de las condiciones óptimas para formular NPs con el agregado de tween 80 y ácido ascórbico

Dados los resultados obtenidos y discutidos anteriormente se seleccionaron como condiciones óptimas para formular las NPs vacías para este trabajo de Tesis, una RM CaCl₂/ALG de 0,04 mg/mg, una RM QUIT/ALG 0,067 mg/mg, concentración de T80 0,16 % p/v, ASC 1 % p/v, velocidad de agitación 300 rpm y un tiempo de síntesis de 15 minutos. En el caso de las NPs RIF las condiciones son las mismas con la diferencia de que se añade RIF en su máxima solubilidad a una concentración de 0,5 mg/mL. Las NPs obtenidas bajo estas condiciones son las ideales debido a que se encuentran en un rango de tamaño comprendido entre 300 y 400 nm, su IPD es cercano a 0,2 el cual es inferior a los reportados por otros autores para sistemas similares en bibliografía^{35,36,37}, su ζ confiere una gran estabilidad y al ser negativo evita reacciones indeseadas tales como interacción con MUC o fosfolípidos del SP que pueden favorecer su rápida eliminación del sistema respiratorio y por último, la EE obtenida fue la más alta al compararse con el resto de las formulaciones pertenecientes a la matriz del DBB₂. Estos resultados evidenciaron que la incorporación del surfactante a la formulación permitió aumentar la carga de RIF dentro de las NPs debido a su

potencial de solubilización, en comparación con las NPs basadas en los polisacáridos sin el agregado de agente tensioactivo.

2.3.1.4. Obtención del polvo liofilizado de las nanopartículas poliméricas con ácido ascórbico y tween 80, vacías y cargadas con rifampicina

Para finalizar el proceso de producción y preservar las muestras durante períodos de tiempo prolongados se decidió secar las muestras para obtener un polvo finamente dividido como producto final. Para obtener las NPs en estado sólido se realizó el procedimiento de liofilización y para esto fue necesaria la incorporación de crioprotectores.

La *Figura 2.8.* muestra que tanto manitol como sucrosa demostraron un efecto protector preservando el tamaño e IPD de las NPs. La concentración de crioprotector óptima resultó sucrosa al 1 % p/v, ya que ambas NPs, vacías y cargadas con RIF, mostraron buena redispersabilidad después del proceso de liofilización y su tamaño se conservó en comparación con las NPs sin ser sometidas al proceso de liofilización. Las NPs liofilizadas sin crioprotector tuvieron el mayor tamaño de partícula, lo que confirma las funciones antiagregantes de los crioprotectores empleados durante la liofilización formando una capa que rodea la superficie de las NPs que impide la coalescencia de las mismas y de este modo, favorece la redispersabilidad de los agregados al inhibir las interacciones entre las NPs durante el proceso de liofilización³⁸. La CC de las NPs Rif liofilizadas fue de (24 ± 1) %.

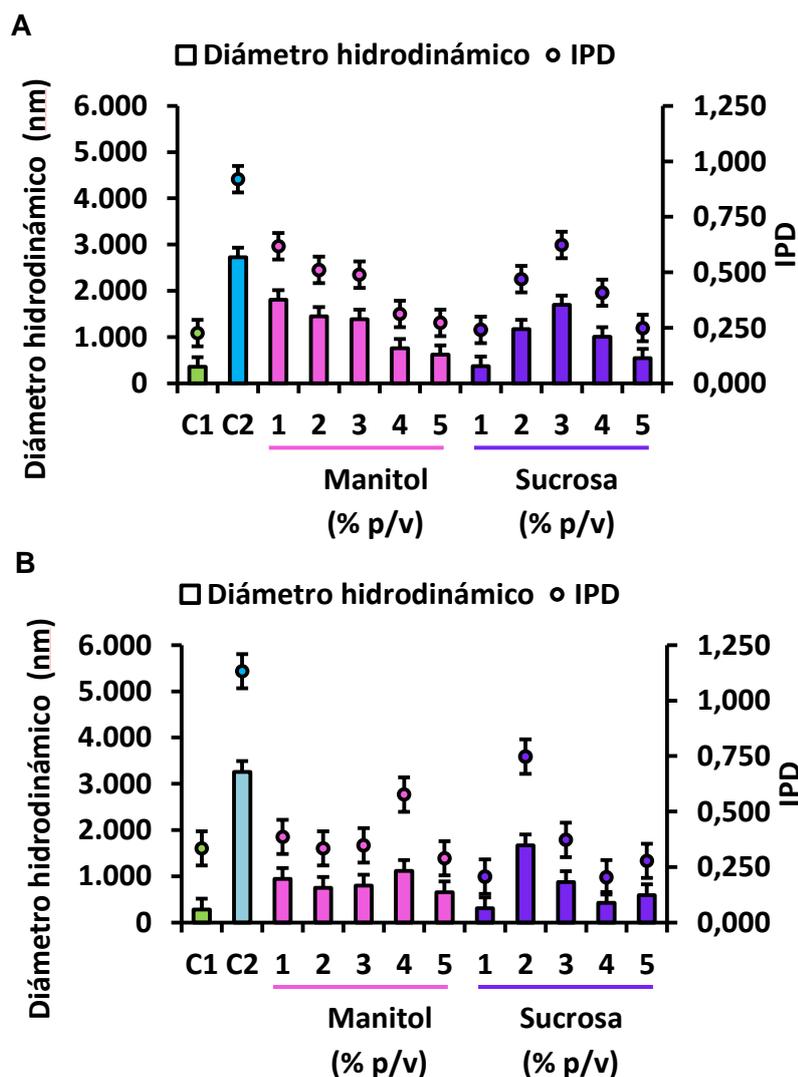


Figura 2.8. A- NPs vacías; B- NPs RIF. C1: NPs sin liofilizar; C2: NPs liofilizadas sin crioprotector. $n=3 \pm DE$.

2.3.2. Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas poliméricas

2.3.2.1. Microscopía electrónica de barrido

En la Figura 2.9. se exhiben las imágenes de SEM de las NPs RIF, con y sin ASC y T80, resuspendidas en agua Milli-Q sin liofilizar. El tamaño promedio de partícula para ambas NPs fue más pequeño que el medido por DLS, probablemente debido a que ALG y QUIT interactúan fuertemente con el agua y aumentan significativamente su volumen cuando se colocan en ambientes acuosos. Por otro lado, las superficies de las NPs fueron diferentes. En el caso de las NPs sin la adición de ASC ni T80 se observó una mayor cantidad de aglomerados, una morfología variable, heterogeneidad en el tamaño de partículas. Sin embargo, cuando se agregó ASC y el surfactante, las NPs presentaron una apariencia más esférica y más dispersa, es decir, se apreció una menor cantidad de aglomerados, la

superficie fue bastante definida en comparación con las otras NPs que presentaban bordes irregulares y restos de material adherido a su superficie.

Finalmente, se obtuvieron imágenes mediante SEM de las NPs RIF con ASC y T80 resuspendidas en agua Milli-Q, sin liofilizar y liofilizadas con el crioprotector seleccionado (*Figura 2.10*). A partir del análisis de las imágenes obtenidas se observó que las NPs liofilizadas con sucrosa 1 % p/v, resuspendidas en agua Milli-Q (*Figura 2.10.B*) exhibieron mayor rugosidad en comparación con las NPs sin liofilizar (*Figura 2.10.A*). Esto se debe a que la sublimación de agua a partir del cristal de hielo en las NPs congeladas se produce intersticialmente, lo que da como resultado la formación de partículas porosas. Por otro lado, se observó que el proceso de liofilización acompañado de un crioprotector adecuado no afectó la morfología ni el tamaño de las NPs, y por lo tanto, resulta un método adecuado para obtener las NPs en estado sólido.

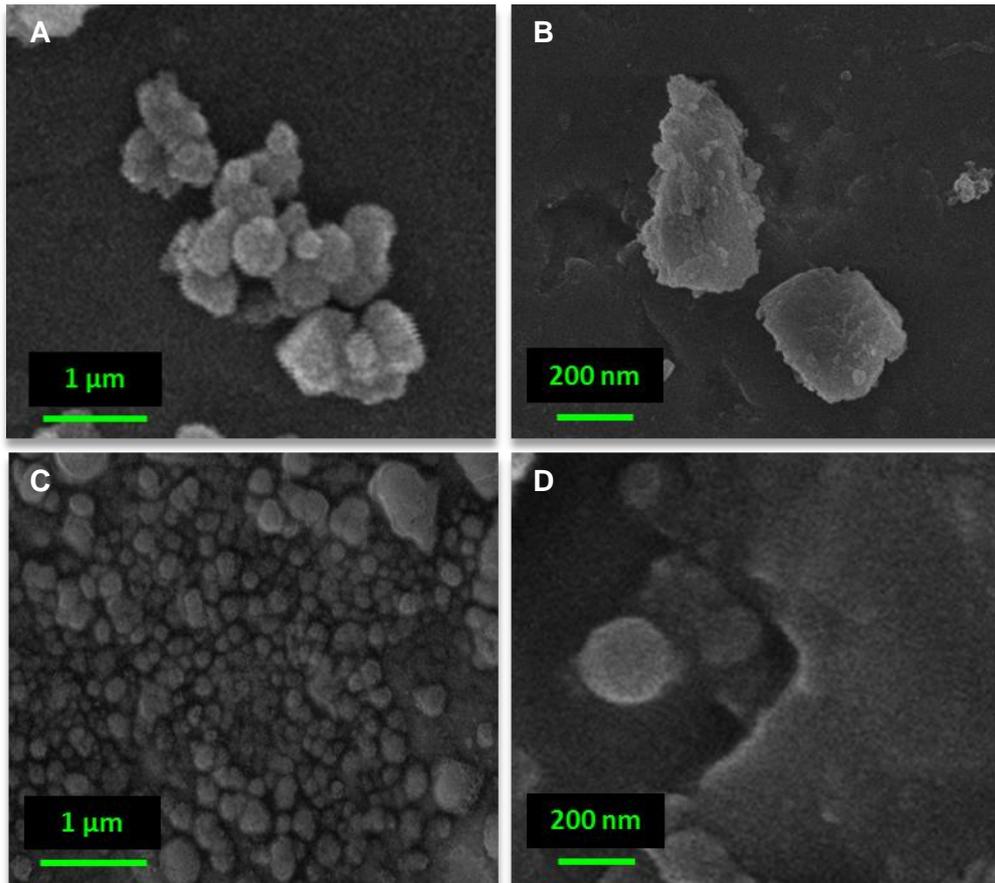


Figura 2.9. Microfotografías de SEM de: Nanopartículas de Rifampicina sin T80 y ácido ascórbico, escala: (A)- 1 μm (B)- 200 nm; Nanopartículas de Rifampicina con T80 y ácido ascórbico, escala: (C)- 1 μm (D)- 200 nm.

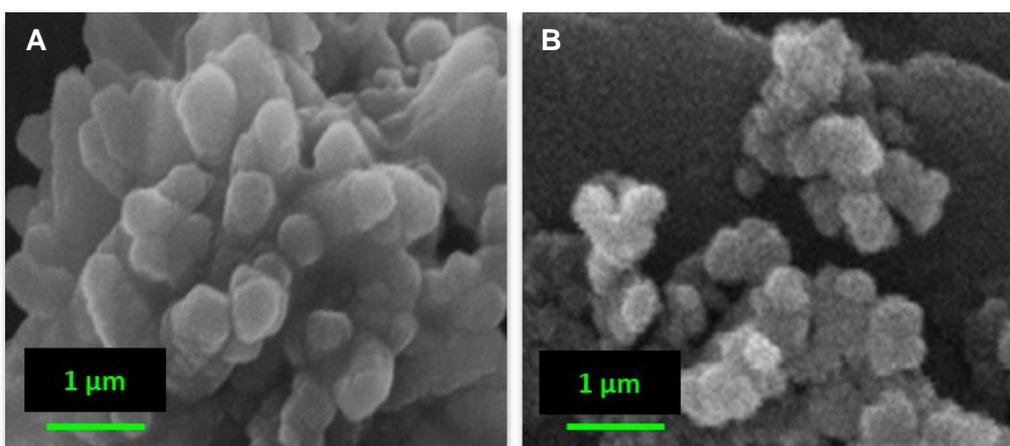


Figura 2.10. Imágenes obtenidas por SEM de: A- NPs RIF sin liofilizar; B- NPs RIF liofilizadas con sucrosa 1% p/v.

2.3.2.2. Medición del ángulo de contacto

La determinación del θ_c de los sistemas obtenidos se llevó a cabo para evaluar sus propiedades de humectabilidad, así como para determinar el efecto del tensioactivo T80 en las propiedades superficiales de las NPs. Los surfactantes son agentes tensioactivos, por lo que pueden alterar significativamente la humectabilidad de las dispersiones nanocoloidales con una superficie particular³⁹.

La *Figura 2.11.* muestra imágenes obtenidas 15 s después de depositar una gota de agua sobre la superficie de las diferentes formulaciones, momento en el cual la misma alcanza una forma de cuasi equilibrio, donde la línea de contacto ya no cambió con tiempo. La *Figura 2.11.A.* muestra un alto valor de θ_c [H₂O]= (111,889 ± 5,860) ° para el polvo de RIF, lo que indica su baja humectabilidad en agua, y por lo tanto, se puede clasificar a este IFA como altamente hidrofóbico. Por otro lado, tanto las MFs como los polvos de NPs sin T80 ni ASC, sin y con RIF presentaron valores de θ_c [H₂O] alrededor de 20 ° y 50 ° (*Figura 2.11.B, C, E y F*), lo que indicó que las superficies de estas fueron hidrofílicas. Sin embargo, se observaron comportamientos particulares con aquellas NPs, vacías o cargadas con RIF, conteniendo además T80 y ASC en su composición (*Figura 2.11. D y G*, respectivamente), cuyos valores de θ_c [H₂O] eran cercanos a 0 °. Al parecer, la presencia de T80 altera el comportamiento de mojado de las NPs, donde se postula como hipótesis que el bloque lipofílico de T80 interacciona de manera no covalente con los polisacáridos, mientras que su parte hidrofílica se ubica en la superficie de las NPs favoreciendo la interacción con las moléculas de agua, promoviendo así un aumento de la humectabilidad. T80 (*Figura 2.12*) es un tensioactivo no iónico con cuatro grupos hidrofílicos en la cabeza de su estructura canónica y 1-3 ácidos grasos unidos a sorbitan polietoxilado⁴⁰. Las cadenas de hidrocarburos de T80 proporcionan su naturaleza hidrofóbica, mientras que sus subunidades de óxido de etileno proporcionan su naturaleza hidrofílica⁴¹. Por lo tanto, la adición de T80 generaría una superficie más hidrofílica. Estos resultados demuestran que solo se necesita una pequeña cantidad de T80 para obtener una superficie con alta hidrofiliidad.

Estos hallazgos son de gran importancia debido a que las NPs hidrofílicas son más compatibles con los fluidos biológicos que las de superficie hidrofóbica, en el caso particular de la vía de administración pulmonar se ha reportado que difunden mejor por la película de SP, mientras que las NPs hidrofóbicas quedan principalmente retenidas en la misma⁴².

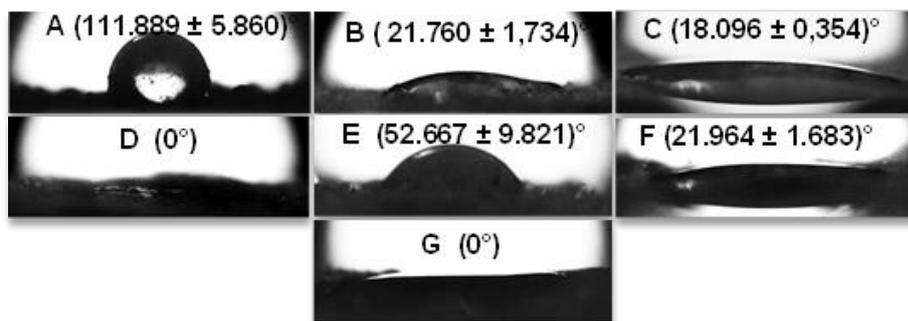


Figura 2.11. Imágenes de las mediciones del ángulo de contacto de: A: RIF, B: mezcla física de los componentes de NPs vacías sin ASC ni T80, C: NPs vacías sin T80 ni ASC, D: NPs vacías con T80 y ASC, E: mezcla física de los componentes de NPs RIF sin ASC ni T80, F: NPs RIF sin T80 ni ASC y G: NPs RIF con T80 y ASC.

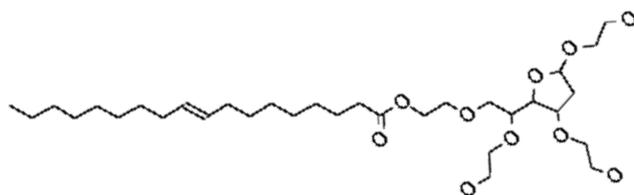


Figura 2.12. Estructura química de tween 80.

2.3.2.3. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

Se estudiaron las interacciones involucradas entre los componentes de las NPs mediante FTIR. Los espectros FTIR de ALG, QUIT, RIF, T80, ASC, NPs vacías y NPs cargadas con RIF, con y sin ASC y T80 se muestran en la *Figura 2.13*.

Las señales principales correspondientes a los grupos funcionales de ALG son las atribuidas a la banda ancha de vibración de OH situada a 3.421 cm^{-1} y a las bandas de estiramiento C=O de los iones carboxilato (COO^-) a 1.594 cm^{-1} (asimétrico) y a 1.398 cm^{-1} (simétrico)⁴³. Por otro lado, las bandas de absorción características de los grupos funcionales de QUIT se localizaron a 3.373 cm^{-1} (estiramiento OH y superposición de estiramiento NH), 1.652 cm^{-1} (C=O se extiende desde amida I), 1.592 cm^{-1} (flexión NH y CN que se extiende desde la amida II) y 1.423 , 1.380 y 1.085 cm^{-1} correspondientes a la flexión CH_2 , la deformación simétrica CH_3 y la vibración del estiramiento del CO, respectivamente⁴⁴. En el espectro de RIF se observaron las señales características de los grupos funcionales que conforman dicha molécula, a una longitud de onda de 3.482 cm^{-1} se observó una banda

correspondiente al estiramiento al grupo OH, tres bandas fueron asignadas a las vibraciones de estiramiento de los grupos CH, cuyos valores fueron: 2.972, 2.932 y 2.878 cm^{-1} . A 1.727 cm^{-1} se observó una señal correspondiente al grupo C=O del compuesto heterocíclico furanona, 1.643 cm^{-1} (estiramiento C=O de la amida), 1.562 cm^{-1} atribuida a los dobles enlaces C=C, 1.522 cm^{-1} señal de estiramiento C-C cercano a grupo amida y una banda a 1.245 cm^{-1} correspondiente al grupo C-O-C del acetilo⁴⁵.

En los espectros representados en la *Figura 2.13*. se observaron varios cambios en los modos de vibración de los grupos funcionales de ALG, así como de QUIT de las NPs vacías de la siguiente manera: la banda atribuida a los grupos hidroxilo de ALG (3.421 cm^{-1}) se desplazó a un número de onda más alto (3.452 cm^{-1}), posiblemente debido a sus interacciones con los iones de calcio divalentes utilizados como agente entrecruzante. Además, los picos de vibración de estiramiento de estos grupos hidroxilo fueron más anchos, probablemente por los enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares entre ALG y QUIT. Por otro lado, la banda atribuida al estiramiento C=O asimétrico de los grupos carboxilato de ALG, a 1.594 cm^{-1} y simétrico a 1.398 cm^{-1} , se desplazaron a números de onda superiores (1.604 y 1.410 cm^{-1} , respectivamente), probablemente debido a la formación de complejos entre ALG y los iones de calcio divalentes. Además, las bandas de ALG mencionadas anteriormente se desplazaron a longitudes de onda mayores y se hicieron más anchas debido a la unión de los iones carboxilato de ALG con los grupos de amino de QUIT cargados positivamente a través de interacciones electrostáticas para formar una red entrecruzada. Del mismo modo, las bandas correspondientes a 1.625 cm^{-1} (C=O que se extiende desde la amida I) y a 1.592 cm^{-1} (flexión N-H y estiramiento C-N a partir de amida II), respectivamente, de QUIT se desplazaron a valores de longitudes de onda superiores.

El espectro de T80 muestra las siguientes bandas características de estiramiento: OH (3.470 cm^{-1}), CH₂ (2.923 cm^{-1} , asimétrico), CH₂ (2.862 cm^{-1} , simétrico), C=O (1.735 cm^{-1}) y HOH (1.649 cm^{-1})⁴⁶. En el espectro de las NPs vacías con adición de T80, tanto el número de onda de las bandas de estiramiento OH, como de flexión HOH, se desplazaron a frecuencias más altas (1.738 y 1.669 cm^{-1} , respetivamente), junto con una disminución en su intensidad. Además, en este espectro apareció la banda en 2.862 cm^{-1} atribuída anteriormente al estiramiento simétrico del grupo CH₂ de T80, lo que sugiere que el surfactante se adsorbió con éxito en la superficie de las NPs y estas variaciones, probablemente, se debieron a las

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

uniones de las cadenas de alquilo del surfactante con los segmentos hidrofóbicos de las NPs, lo cual estuvo de acuerdo con los resultados obtenidos con las mediciones del θ_c [H₂O]⁴⁷.

También se observaron cambios similares en las señales de T80 en el espectro FTIR de las NPs cargadas con RIF con la adición del tensioactivo. En este espectro, aunque muchas de las bandas de RIF fueron enmascaradas por las bandas de otros componentes de las NPs, es notable que las bandas en el espectro fueron más anchas que las observados para las NPs cargadas con RIF sin T80, y los picos correspondientes al C=O del grupo acetilo y C=O del grupo furanona de RIF se desplazaron a números de onda superiores desde 1.727 a 1.730 cm⁻¹, respectivamente. Estos resultados indican que la RIF forma enlaces de hidrógeno con los componentes de las NPs⁴⁵.

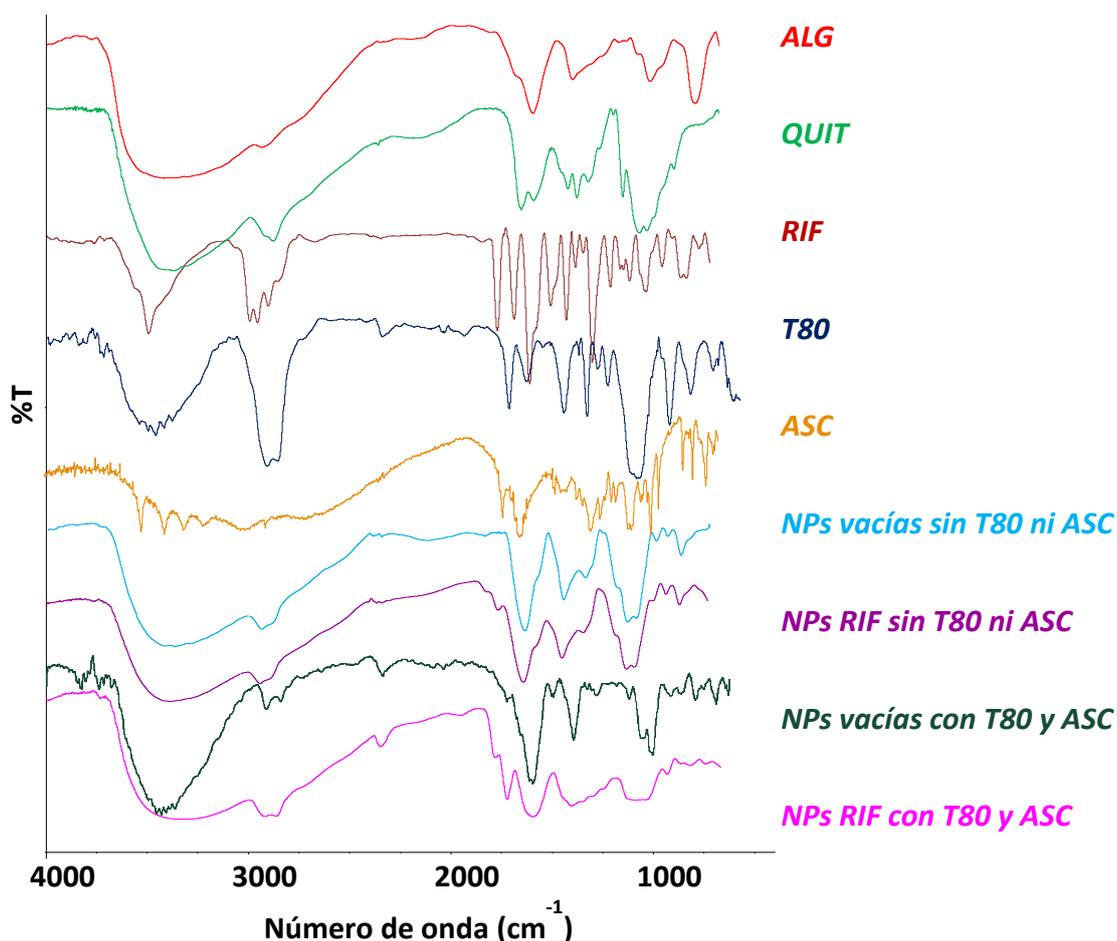


Figura 2.13. Espectros de infrarrojo de las diferentes materias primas y nanopartículas.

2.3.2.4. Difracción de rayos X de polvo

Las curvas de DRX de las diferentes formulaciones se muestran en la *Figura 2.14*.

RIF posee dos formas polimórficas, I y II, las cuales se diferencian en sus espectros de DRX debido a que los polimorfos comprenden diferentes celdas unitarias, así como también, diferentes arreglos de las moléculas dentro de la celda unitaria, lo que produce diferentes huellas dactilares, tan diferentes como los patrones de polvo de rayos X de dos compuestos distintos. La forma I de RIF tiene picos característicos a 13,6 ° y 14,4 ° de 2 θ , mientras que para la forma II, los picos característicos están ubicados a 9,9 ° y 11,1 ° de 2 θ ⁴⁸.

Las NPs cargadas con RIF se prepararon utilizando la forma I de RIF, ya que en el difractograma de RIF se observaron los picos característicos que se ubicaron a 13,66 ° y 14,40 °. Además, mostró la presencia de numerosos picos de alta intensidad y bien definidos, por lo cual, RIF evidenció un alto grado de cristalinidad.

Los difractogramas de ALG y QUIT mostraron cada uno dos picos principales de amplia reflexión y de baja intensidad a 13,64 ° (2 θ) y 22,53 ° (2 θ), y a 9,98 ° (2 θ) y 19,64 ° (2 θ), respectivamente, lo que indicó su naturaleza de baja cristalinidad, con una estructura poco organizada, según lo sugerido por estas amplias reflexiones^{49,50}.

Se observó en el difractograma de las NPs cargadas con RIF, sin ASC ni T80, la desaparición de los picos característicos de RIF (amorfización del sistema), mientras que el patrón de DRX de la MF de los componentes de estas NPs correspondió a la superposición de los difractogramas de cada componente individual. Esta pérdida del hábito cristalino de RIF puede atribuirse a fuertes interacciones entre la misma y los polisacáridos ALG y QUIT, conduciendo a la ruptura de la estructura cristalina de las partículas del fármaco, dando como resultado una dispersión de las moléculas del IFA en la matriz polimérica.

Por otro lado, se observó que el patrón de DRX de las NPs cargadas con RIF, preparadas con ASC y T80, mostraron varios picos distintivos, que fueron relativamente agudos e intensos, sugiriendo cambios estructurales probablemente debidos a las interacciones de las cadenas poliméricas con RIF, T80 y ASC, posiblemente causados por fuertes enlaces de hidrógeno formando redes entrelazadas y conduciendo a un material más cristalino, aunque los picos de difracción anchos sugirieron la formación de cristales defectuosos y de baja cristalinidad. Además, aunque en menor número e intensidad, se observaron picos de

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

reflexión en el difractograma de las NPs vacías, con ASC y T80, diferente a lo observado en sus componentes por separado.

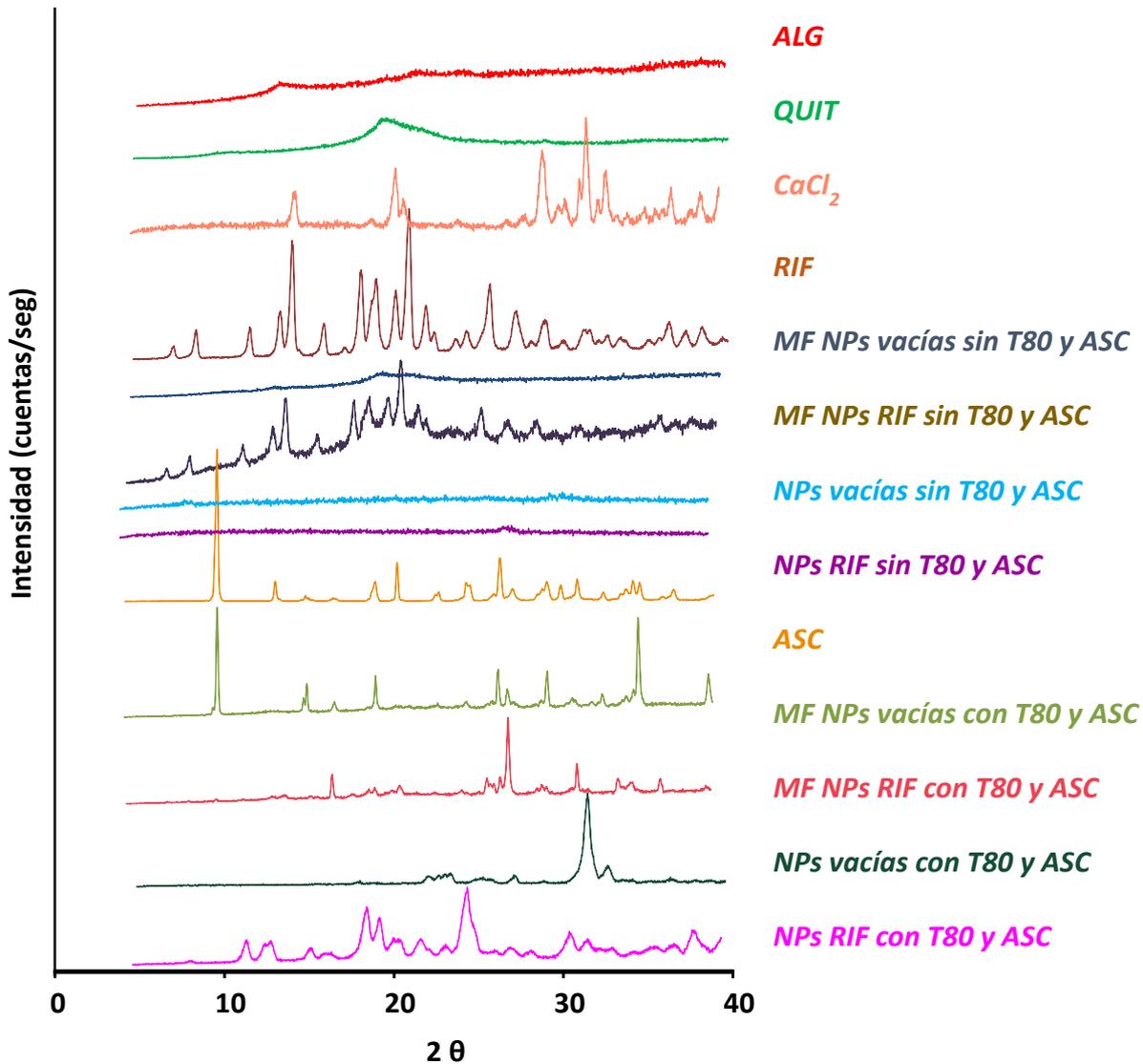


Figura 2.14. Difractogramas de las materias primas, las nanopartículas vacías y cargadas con RIF y sus correspondientes mezclas físicas.

2.3.2.5. Análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido

En la *Figura 2.15.* se exhiben los perfiles de las curvas de TGA, DSC y de la derivada primera de TGA (dTGA) de las MPs, las NPs vacías y cargadas con RIF liofilizadas (sin crioprotector) y sus correspondientes MFs.

El polimorfo I de RIF es la forma térmicamente más estable de este compuesto, según reportes bibliográficos⁵¹. La forma I solo presenta descomposición a una temperatura aproximada de 260 °C, mientras que la forma II muestra una endoterma de fusión a 189 °C, seguida de una exoterma de recristalización a la forma I a 204°C, que finalmente se descompone a 258 °C⁵². La curva DSC de RIF (*Figura 2.15.C-v*) no mostró la fusión de este compuesto, el cual comenzó su proceso de descomposición térmica alrededor de 245 °C determinado mediante TGA (*Figura 2.15.A-v y B-v*). Resultados similares fueron encontrados por otros autores^{53,54,55}. Este resultado, junto con los obtenidos por DRX, confirma que el polimorfo de RIF con el cual se trabajó es la forma I. Además, a partir de la curva DSC de RIF se descartó la presencia de agua de cristalización.

La *Figura 2.15.C.iii y iv* muestra las curvas de DSC de los polvos de QUIT y ALG, respectivamente, exhibiendo cada uno un pico endotérmico amplio a aproximadamente 67 °C y 86 °C, respectivamente, correspondientes a la evaporación de la humedad presente en los polvos originales de los polímeros. Las temperaturas de fusión de QUIT y ALG son más altas que sus temperaturas de degradación, por lo cual, sus curvas de DSC no mostraron ninguna temperatura de Tg^{vii}. Estos resultados concuerdan con los encontrados en el análisis TGA/dTGA, ya que las curvas termogravimétricas de los polvos de QUIT y ALG mostraron cada una dos regiones, la primera correspondió al rango de temperatura de 25 °C a 100 °C, atribuido a la eliminación de agua libre, y el segundo, a temperaturas superiores a 200 °C, atribuido a la degradación térmica de los polímeros. QUIT comenzó su descomposición a 258 °C, con una tasa máxima de descomposición térmica a 295 °C. Para ALG, la descomposición térmica comenzó a 198 °C, con una descomposición térmica máxima a 238 °C, en esta región su curva dTGA mostró un pico agudo y un hombro alto, posiblemente debido a la superposición de diferentes procesos de degradación⁵⁶.

Las curvas TGA/dTGA de las MFs obtenidas conteniendo ALG, QUIT y CaCl₂ o ALG, QUIT, CaCl₂ y RIF exhibieron la superposición de los procesos de descomposición térmica de cada uno de los componentes de la mezcla. Sin embargo, se observó que los procesos de degradación de los componentes de estas MFs, que contenían T80 y ASC, ocurrieron a temperaturas más bajas que para aquellas MFs que no tenían T80 y ASC en su composición.

^{vii} Es la temperatura a la cual las propiedades mecánicas de un material cambian radicalmente debido a los movimientos internos de las cadenas poliméricas que lo componen.

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

Este comportamiento térmico puede atribuirse a las interacciones entre las cadenas poliméricas y T80, que debilita la estructura del polímero por un efecto plastificante⁵⁷.

Por otro lado, se observó en la curva DSC de las NPs que contenían T80 y ASC cargadas con RIF, un pico endotérmico a aproximadamente 180 °C, sin pérdida de masa, como se ve en su curva TGA/dTGA (*Figura 2.15.A. y B. xii y xiii*). Este fenómeno podría atribuirse a la fusión de las NPs RIF⁵⁸. Como se observó en el ensayo de DRX, las NPs RIF poseen un nuevo patrón característico de cristalinidad; debido a que están formadas por una gran cantidad de componentes el intervalo de temperatura de fusión es amplio y ocurre a temperaturas menores que su material de partida.

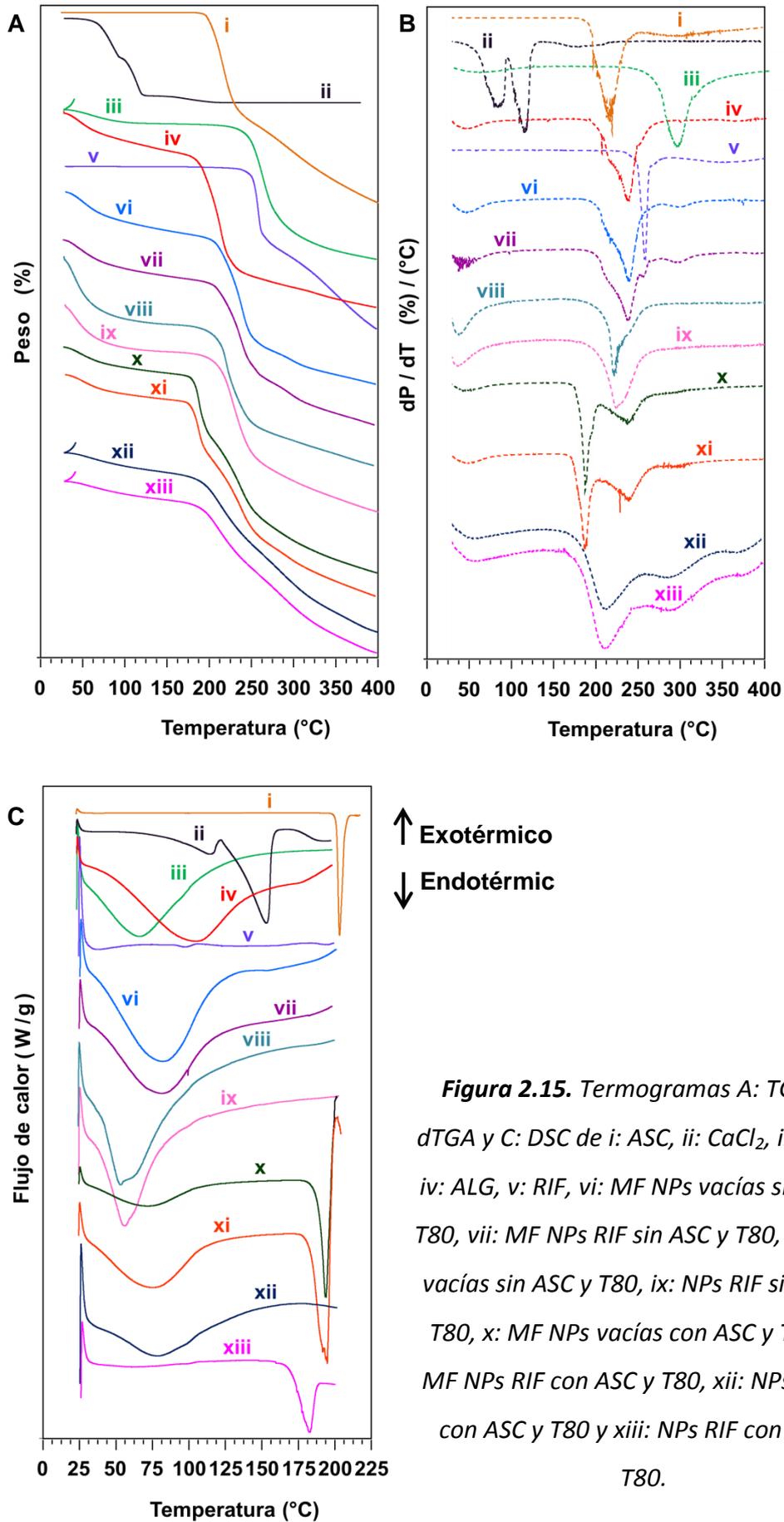


Figura 2.15. Termogramas A: TGA, B: dTGA y C: DSC de i: ASC, ii: CaCl₂, iii: QUIT, iv: ALG, v: RIF, vi: MF NPs vacías sin ASC y T80, vii: MF NPs RIF sin ASC y T80, viii: NPs vacías sin ASC y T80, ix: NPs RIF sin ASC y T80, x: MF NPs vacías con ASC y T80, xi: MF NPs RIF con ASC y T80, xii: NPs vacías con ASC y T80 y xiii: NPs RIF con ASC y T80.

2.3.3. Evaluación de la estabilidad coloidal de las nanopartículas a largo plazo

Con frecuencia, las NPs poliméricas requieren el agregado de un estabilizador anfifílico, debido a que tienden a ser físicamente inestables con el tiempo⁵⁹. Por este motivo, se investigó la estabilidad física de las NPs RIF, con o sin el agregado de T80. El surfactante T80 es frecuentemente utilizado debido a su capacidad de prevenir la agregación de las NPs en medios acuosos⁶⁰.

El propósito de este ensayo fue evaluar el uso de T80 como un estabilizador anfifílico en la preparación de las NPs. La estabilidad se evaluó en soluciones acuosas de diferentes valores de pH (1,2; 5,5; 6,8 y 7,4), y a largo plazo (tres meses) en agua, monitoreando cambios en el diámetro hidrodinámico, IPD y ζ . En la *Figura 2.16.A.* se puede observar que se formó un precipitado y se depositó en el fondo de los tubos falcon cuando se prepararon las NPs sin el agregado de T80 al resuspenderlas en las soluciones acuosas tamponadas a los diferentes valores de pH. Por el contrario, las NPs con la adición de T80 no mostraron la formación de precipitados y se observaron bien dispersas (*Figura 2.16.B.*), lo cual demostró claramente la contribución de este agente a la estabilización de las mismas.

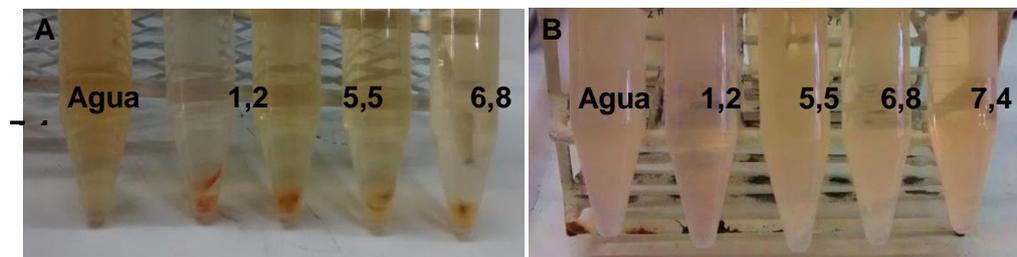


Figura 2.16. Fotografías de: A- NPs RIF sin ASC/T80 y B- NPs RIF con ASC/T80 a diferentes valores de pH.

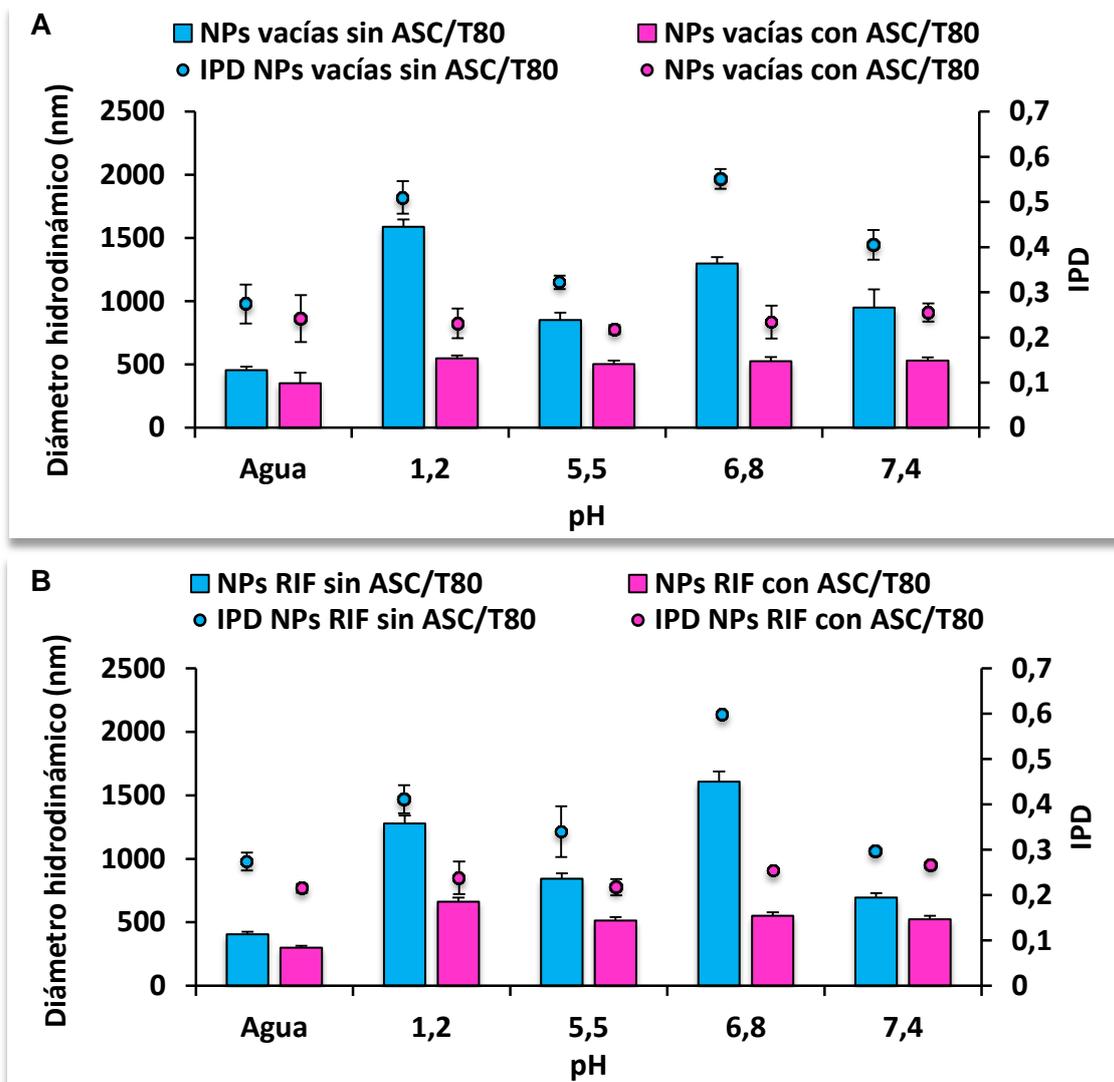


Figura 2.17. Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad de: A- NPs vacías con y sin ASC/T80 y B- NPs RIF con y sin ASC/T80 a diferentes valores de pH, (promedio \pm DE, n=3).

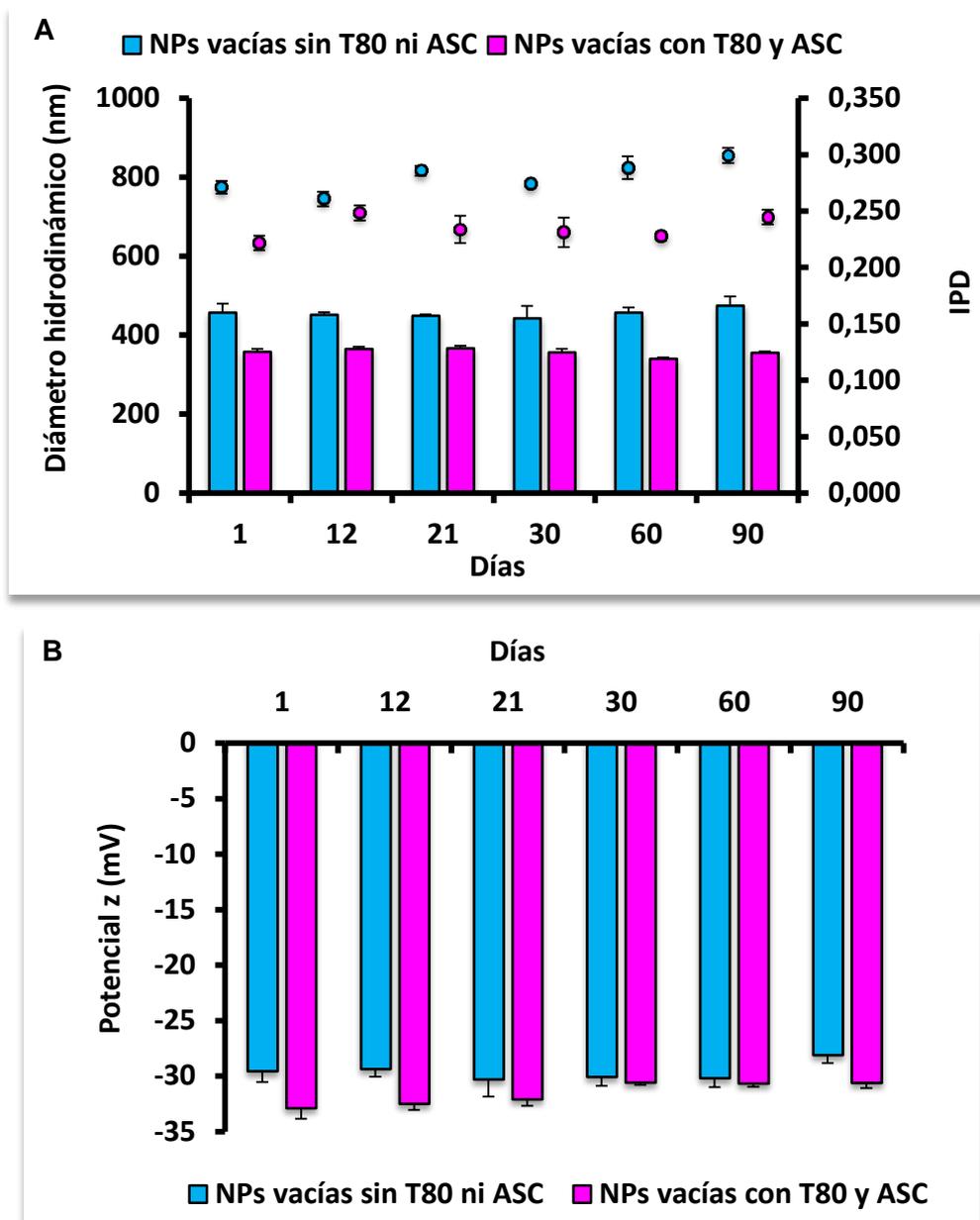


Figura 2.18. A- Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad y B- Potencial z (mV) en función del tiempo de NPs vacías con y sin ASC/T80 resuspendidas en agua, (promedio \pm DE, n=3).

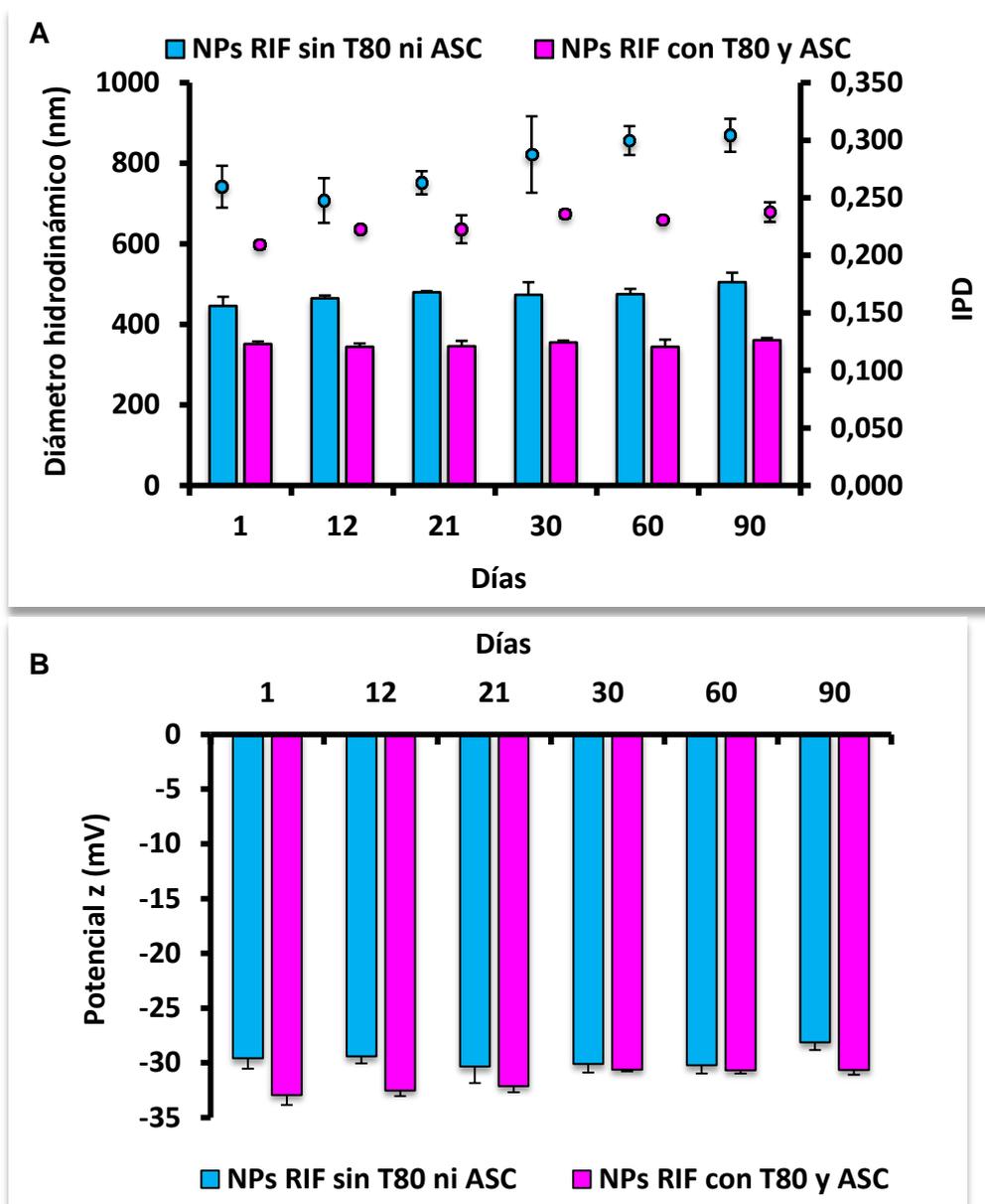


Figura 2.19. A- Diámetro hidrodinámico (nm) e índice de polidispersidad y B- Potencial z (mV) en función del tiempo de NPs RIF con y sin ASC/T80 resuspendidas en agua, (promedio \pm DE, n=3).

Las NPs con T80 se mantuvieron estables cuando se almacenaron en agua por un período de tiempo de tres meses, tanto en términos de tamaño, IPD y ζ . Las NPs sin la adición de T80 fueron inestables, debido a la formación de precipitado, además, las NPs que permanecieron dispersas en el sobrenadante, en equilibrio con el sedimento formado, presentaron un tamaño ligeramente más grandes que aquellas que contenían el surfactante en su composición. Por lo tanto, se demostró que T80 proporcionó un notable efecto estabilizador para la nanosuspensión, no solo en diferentes entornos de pH, sino también, cuando la

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

suspensión se almacenaba en agua durante 90 días en comparación con aquellas NPs sin el tensioactivo. La obtención de dispersiones de NPs estables en agua, y en diferentes entornos de pH, es crucial para la aplicación de estos sistemas nanotransportadores ya que los sistemas de liberación de fármacos experimentarán diferentes entornos de pH en el cuerpo humano.

La mayor estabilidad de las NPs, vacías y cargadas con RIF, conteniendo T80 y ASC, en comparación con las NPs sin la adición del surfactante ni ASC, no puede explicarse en términos de una mejoría de las fuerzas electrostáticas repulsivas entre las NPs, ya que ambos sistemas, con y sin T80 y ASC, presentaron valores de ζ cercanos (*Figuras 2.18.B. y 2.19.B.*). Otra explicación posible puede ser que el T80 proporcione una capa protectora en la superficie de las NPs, anclando las cadenas alquílicas del tensioactivo en los sitios hidrófobos de las NPs poliméricas y extendiendo sus dominios hidrófilos en el medio de dispersión, evitando así la agregación de las partículas⁵⁸. Reisch y colaboradores propusieron que el T80, cuando está en muy baja concentración en la formulación, se adsorbe fuertemente en los sitios hidrofóbicos de las NPs a través de sus cadenas de alquilo y, por lo tanto, genera una pantalla protectora ultradelgada que evita la agregación de las NPs⁶¹. Esta distribución del surfactante en la superficie de las NPs coincide con los resultados obtenidos con las mediciones de los ángulos de contacto que se describieron en la sección 2.3.2.2., ya que las NPs con T80 fueron más hidrofílicas en comparación con aquellas que no se obtuvieron con la adición de este surfactante.

Por otra parte, se evaluó la estabilidad del polvo liofilizado de las NPs por un periodo de 6 meses. El polvo resuspendido de las NPs vacías luego del periodo de almacenamiento en un recipiente hermético a temperatura ambiente tuvieron un tamaño de $(309,5 \pm 45,8)$ nm, con un IPD de $0,225 \pm 0,082$ y un ζ de $(-30,73 \pm 0,49)$ mV medido por DLS. Por otro lado, el polvo resuspendido de las NPs RIF, luego de los 6 meses, tuvo un tamaño de $(351,8 \pm 32,1)$ nm, un IPD de $0,231 \pm 0,025$ y un ζ de $(-28,45 \pm 0,62)$ mV. Además, en los espectros de absorción obtenidos por espectrofometría UV-Vis del sobrenadante de las NPs RIF luego de ultracentrifugar las suspensiones de las mismas no se detectó presencia del IFA, lo que demostró que el fármaco permanece encapsulado en el nanovehículo luego de ser almacenado por un período de 6 meses. Estos resultados indican que los polvos liofilizados de las NPs con ASC/T80, tanto vacías como cargadas con RIF, son estables al menos durante 6 meses de almacenamiento en envase hermético a temperatura ambiente.

2.4. Conclusiones parciales

Como conclusiones parciales de este capítulo se pueden mencionar:

- Se obtuvieron las NPs de ALG y QUIT por un método de gelación iónica sencillo, rápido y reproducible.
- Se optimizaron los parámetros de síntesis de las NPs para alcanzar las propiedades adecuadas de los sistemas nanoparticulados (menor tamaño, menor IPD, un ζ cercano a $|30|$ mV).
- Se logró encapsular la RIF con una elevada EE.
- Se confirmó mediante SEM el tamaño nanométrico de las NPs obtenidas, su morfología esférica así como su monodispersidad.
- Se evidenciaron los grupos funcionales involucrados en la formación de las NPs mediante FTIR.
- Se comprobó la formación de una nueva estructura cristalina mediante DRX y se realizaron estudios del comportamiento térmico de las NPs que permitieron sumar evidencias a las interacciones propuestas entre los polisacáridos.
- Las NPs en estado sólido fueron altamente hidrofílicas, lo que permitió su rápida redispersión luego de someterse a un proceso de liofilización. Estas NPs liofilizadas demostraron además, ser estables durante un período de tiempo de al menos 6 meses, lo cual permitiría su conservación por períodos de tiempo prolongados y a su vez, resultaron ser estables a diferentes valores de pH de interés fisiológico, lo cual es muy importante ya que las NPs se verán expuestas a diferentes entornos en el organismo que implican múltiples valores de pH a los cuales las NPs deberán permanecer estables para proteger el fármaco encapsulado hasta alcanzar su sitio de acción.

2.5. Bibliografía

1. P Torchilin, V. *Nanoparticulates as Drug Carriers*. (2006).
2. Bhatia, S. *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. Springer International Publishing Switzerland (2016). doi:10.1007/978-3-319-41129-3
3. N.BeMiller, J. 14- Algins/Alginates. in *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists* (ed. Inc., E.) 293–301 (2019). doi:10.1016/B978-0-12-812069-9.00014-5
4. Leong, J. Y. *et al.* Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology* **24**, 44–60 (2016).
5. Patel, M. A., AbouGhaly, M. H. H., Schryer-Praga, J. V. & Chadwick, K. The effect of ionotropic gelation residence time on alginate cross-linking and properties. *Carbohydr. Polym.* **155**, 362–371 (2017).
6. Ferreira, S. L. C. *et al.* Box-Behnken design : An alternative for the optimization of analytical methods. **597**, 179–186 (2007).
7. Berk, Z. Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration. *Food Process Eng. Technol.* 567–581 (2018). doi:10.1016/B978-0-12-812018-7.00023-3
8. Fonte, P., Reis, S. & Sarmiento, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *J. Control. Release* **225**, 75–86 (2016).
9. Dadparvar, M. *et al.* Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **88**, 510–517 (2014).
10. Goldberg, W. I. Dynamic light scattering. 1152–1160 (1999).
11. Glatter, O. *Dynamic Light Scattering (DLS). Scattering Methods and their Application in Colloid and Interface Science* (2018). doi:10.1016/B978-0-12-813580-8.00011-0
12. Sakho, E. H. M., Allahyari, E., Oluwafemi, O. S., Thomas, S. & Kalarikkal, N. *Dynamic Light Scattering (DLS). Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-323-46139-9.00002-5
13. Hunter, R. J. *Zeta potential in colloid science Principles and Applications*. (1988).
14. Egerton, R. F. *Physical principles of electron microscopy: An introduction to TEM, SEM, and AEM, second edition. Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM, Second Edition* (2016). doi:10.1007/978-3-319-39877-8
15. Rosenberger, M. R., Schuster, J. M., Rosenberger, M. R. & Schvezov, C. E. Evaporación de gotas sésiles en superficies sólidas. (2014). doi:10.13140/2.1.2819.2960

16. Kwok, D. Y., Gietzelt, T., Grundke, K., Jacobasch, H.-J. & Neumann, A. W. Contact Angle Measurements and Contact Angle Interpretation. 1. Contact Angle Measurements by Axisymmetric Drop Shape Analysis and a Goniometer Sessile Drop Technique. *Langmuir* **13**, 2880–2894 (1997).
17. Academic Press, I. Contact Angle Measurements with Sessile Drops and Bubbles. *J. Colloid Interface Sci.* **145**, 1–4 (1991).
18. Finos, P. Procedure to measure contact angles in fine divided solids. (2007).
19. Shen, C. *et al.* Investigation of effects of receding contact angle and energy conversion on numerical prediction of receding of the droplet impact onto hydrophilic and superhydrophilic surfaces. *Int. J. Heat Fluid Flow* **74**, 89–109 (2018).
20. Mohamed, M. A., Jaafar, J., Ismail, A. F., Othman, M. H. D. & Rahman, M. A. *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Membrane Characterization* (Elsevier B.V., 2017). doi:10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2
21. State, S. *Characterization*. (2011).
22. Carstensen, J. T. *Advanced Pharmaceutical Solids*. (2001).
23. Epp, J. *X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization. Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods* (Elsevier Ltd, 2016). doi:10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3
24. Brittain, H. G. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*. **192**, (Informa Healthcare).
25. Sarmiento, B. *et al.* Development and comparison of different nanoparticulate polyelectrolyte complexes as insulin carriers. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **12**, 131–138 (2006).
26. Rajaram, S., Vemuri, V. D. & Natham, R. Ascorbic acid improves stability and pharmacokinetics of rifampicin in the presence of isoniazid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **100**, 103–108 (2014).
27. Romero, M. R., Wolfel, A. & Igarzabal, C. I. A. Smart valve: Polymer actuator to moisture soil control. *Sensors Actuators, B Chem.* **234**, 53–62 (2016).
28. Hait, S. K. & Moulik, S. P. Determination of Critical Micelle Concentration (CMC) of Nonionic Surfactants by Donor – Acceptor Interaction with Iodine and Correlation of CMC with Hydrophile – Lipophile Balance and Other Parameters of the Surfactants. **4**, 303–309 (2001).
29. Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F. & Ferreira, D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **53**, 193–202 (2006).
30. Zimet, P. *et al.* Optimization and characterization of nisin-loaded alginate-chitosan nanoparticles with antimicrobial activity in lean beef. *LWT - Food Sci. Technol.* **91**, 107–116 (2018).

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

31. Garbuzenko, O. B., Winkler, J., Tomassone, M. S. & Minko, T. Biodegradable Janus nanoparticles for local pulmonary delivery of hydrophilic and hydrophobic molecules to the lungs. *Langmuir* **30**, 12941–12949 (2014).
32. de Pinho Neves, A. L. *et al.* Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **445**, 34–39 (2014).
33. Li, X. *et al.* Size-controlled starch nanoparticles prepared by self-assembly with different green surfactant: The effect of electrostatic repulsion or steric hindrance. *Food Chem.* **199**, 356–363 (2016).
34. Bhunchu, S., Rojsitthisak, P. & Rojsitthisak, P. Effects of preparation parameters on the characteristics of chitosan-alginate nanoparticles containing curcumin diethyl disuccinate. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **28**, 64–72 (2015).
35. Shamekhi, F., Tamjid, E. & Khajeh, K. Development of chitosan coated calcium-alginate nanocapsules for oral delivery of liraglutide to diabetic patients. *Int. J. Biol. Macromol.* **120**, 460–467 (2018).
36. Samprasit, W., Akkaramongkolporn, P., Jaewjira, S. & Opanasopit, P. Design of alpha mangostin-loaded chitosan / alginate controlled-release nanoparticles using genipin as crosslinker. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **46**, 312–321 (2018).
37. Maity, S., Mukhopadhyay, P., Paban, P. & Sankar, A. Alginate coated chitosan core-shell nanoparticles for efficient oral delivery of naringenin in diabetic animals — An in vitro and in vivo approach. *Carbohydr. Polym.* **170**, 124–132 (2017).
38. Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. & Fessi, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1688–1713 (2006).
39. Harikrishnan, A. R., Dhar, P., Agnihotri, P. K., Gedupudi, S. & Das, S. K. Wettability of Complex Fluids and Surfactant Capped Nanoparticle-Induced Quasi-Universal Wetting Behavior. *J. Phys. Chem. B* **121**, 6081–6095 (2017).
40. Kerwin, B. A. Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. *Int. J. Drug Dev. Res.* **97**, 2924–2935 (2008).
41. Picone, C. S. F. & Cunha, R. L. Formation of nano and microstructures by polysorbate-chitosan association. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **418**, 29–38 (2013).
42. Hu, G. *et al.* Physicochemical properties of nanoparticles regulate translocation across pulmonary surfactant monolayer and formation of lipoprotein corona. *ACS Nano* **7**, 10525–10533 (2013).
43. Mirtič, J., Ilaš, J. & Kristl, J. Influence of different classes of crosslinkers on alginate polyelectrolyte nanoparticle formation, thermodynamics and characteristics. *Carbohydr. Polym.* **181**, 93–102 (2018).

44. Costa, E. M. *et al.* Chitosan nanoparticles as alternative anti-staphylococci agents: Bactericidal, antibiofilm and antiadhesive effects. *Mater. Sci. Eng. C* **79**, 221–226 (2017).
45. Lacerda, L., Parize, A. L., Fávere, V., Laranjeira, M. C. M. & Stulzer, H. K. Development and evaluation of pH-sensitive sodium alginate/chitosan microparticles containing the antituberculosis drug rifampicin. *Mater. Sci. Eng. C* **39**, 161–167 (2014).
46. Hillgren, A., Lindgren, J. & Aldén, M. Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH. *Int. J. Pharm.* **237**, 57–69 (2002).
47. Peng, B., Han, X., Liu, H., Berry, R. C. & Tam, K. C. Interactions between surfactants and polymer-grafted nanocrystalline cellulose. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **421**, 142–149 (2013).
48. Guo, N. *et al.* In Situ Monitoring and Modeling of the Solution-Mediated Polymorphic Transformation of Rifampicin: From Form II to Form I. *J. Pharm. Sci.* **107**, 344–352 (2018).
49. Larosa, C. *et al.* Characterisation of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses. *Int. J. Biol. Macromol.* **115**, 900–906 (2018).
50. Anush, S. M., Vishalakshi, B., Kalluraya, B. & Manju, N. Synthesis of pyrazole-based Schiff bases of Chitosan: Evaluation of antimicrobial activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **119**, 446–452 (2018).
51. Agrawal, S., Ashokraj, Y., Bharatam, P. V, Pillai, O. & Panchagnula, R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. **22**, 127–144 (2004).
52. Sosa, M., Széliga, M. E., Fernández, A. & Bregni, C. Rifampicina y biodisponibilidad en productos combinados. *Ars Pharm.* **46**, 353–364 (2005).
53. Ibiapino, A. L., Seiceira, R. C., Pitaluga, A., Trindade, A. C. & Ferreira, F. F. Structural characterization of form i of anhydrous rifampicin. *CrystEngComm* **16**, 8555–8562 (2014).
54. Alves, R. *et al.* Thermal behavior and decomposition kinetics of rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions. **46**, (2010).
55. Luciani-giacobbe, L. C. *et al.* Very fast dissolving acid carboxymethylcellulose-rifampicin matrix : Development and solid-state characterization. *Eur. J. Pharm. Sci.* **96**, 398–410 (2017).
56. Fernandes, S., Regina, M., Moura, D., Glenn, G. M. & Ahmad, F. Thermal , microstructural , and spectroscopic analysis of Ca 2 + alginate / clay nanocomposite hydrogel beads ☆ , ☆ ☆. *J. Mol. Liq.* **265**, 327–336 (2018).
57. Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M. & Farahmandghavi, F. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties.

Capítulo 2: Desarrollo y Caracterización de nanopartículas poliméricas

Food Chem. **194**, 1266–1274 (2016).

58. Bergo, B. P. V. A. *et al.* Physical Properties of Edible Films Based on Cassava Starch as Affected by the Plasticizer Concentration and Science. **21**, 85–89 (2008).
59. Almahfood, M. & Bai, B. The synergistic effects of nanoparticle-surfactant nanofluids in EOR applications. *J. Pet. Sci. Eng.* **171**, 196–210 (2018).
60. Younus, M., Hawley, A., Boyd, B. J. & Rizwan, S. B. Bulk and dispersed aqueous behaviour of an endogenous lipid, selachyl alcohol: Effect of Tween 80 and Pluronic F127 on nanostructure. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **169**, 135–142 (2018).
61. Reisch, A., Runser, A., Arntz, Y., Mély, Y. & Klymchenko, A. S. Charge-controlled nanoprecipitation as a modular approach to ultras-small polymer nanocarriers: Making bright and stable nanoparticles. *ACS Nano* **9**, 5104–5116 (2015).

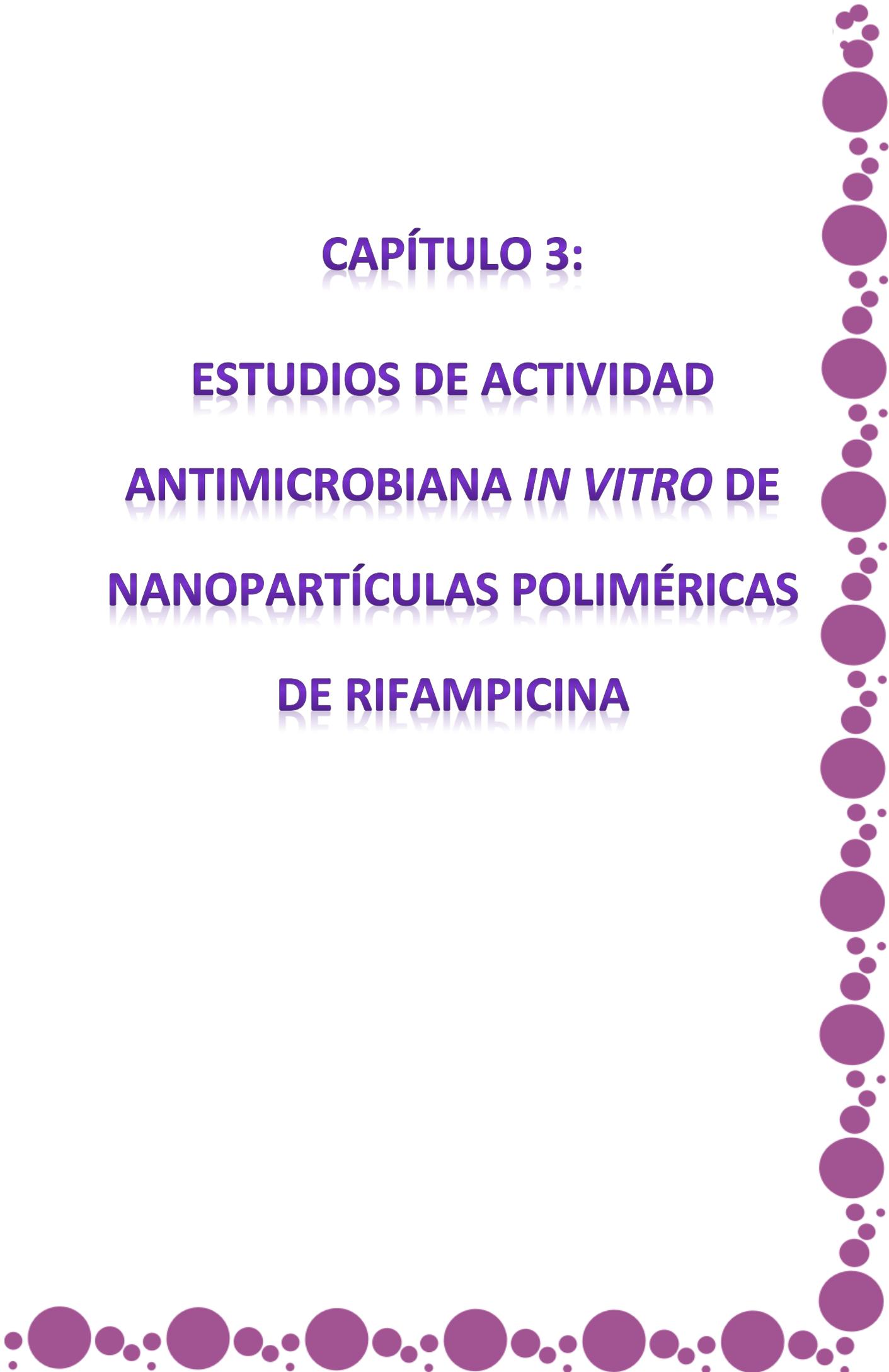
CAPÍTULO 3:

ESTUDIOS DE ACTIVIDAD

ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

DE RIFAMPICINA



CAPÍTULO 3: ESTUDIOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE RIFAMPICINA

3.1. Introducción

En la actualidad, las infecciones bacterianas se han convertido en una importante amenaza con altas tasas de morbilidad y mortalidad asociadas, esto es debido principalmente al desarrollo de resistencia a los agentes antimicrobianos existentes¹. Ante esta situación, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias que combatan las infecciones bacterianas de manera eficiente. La nanotecnología ha demostrado grandes avances en el campo del tratamiento de las infecciones. Particularmente, las estrategias de administración de los agentes terapéuticos basadas en NPs han logrado mejoras significativas en el campo de la administración de fármacos antimicrobianos². Especialmente, las NPs obtenidas con polímeros naturales representan un enfoque prometedor para encapsular antibióticos debido a sus ventajosas capacidades de dirigir los fármacos a los sitios específicos de la enfermedad, controlar las características de su liberación, y de esta manera, mejorar la farmacocinética de estos agentes terapéuticos^{3,4}.

Los estudios de actividad antimicrobiana *in vitro* son importantes como indicadores rápidos y sencillos de la potencia antimicrobiana del compuesto de interés. A continuación se describirán los fundamentos de las metodologías empleadas para los estudios de actividad antimicrobiana *in vitro* en este trabajo de Tesis.

3.1.1. Ensayo de difusión en placas de agar

El método de difusión en discos de agar fue desarrollado en 1940⁵. Es el método oficial utilizado en muchos laboratorios de microbiología clínica para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de rutina. Hoy en día, muchos estándares aceptados y aprobados son publicados por *The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* para la prueba de difusión en discos de agar para bacterias y levaduras^{6,7}. Este ensayo proporciona resultados cualitativos clasificando a la cepa bacteriana en estudio como sensible, de sensibilidad intermedia o resistente. Este método está diseñado para determinar la sensibilidad de microorganismos de crecimiento rápido y es aplicable a agentes antimicrobianos que

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana *in vitro* de nanopartículas poliméricas de rifampicina

difundan bien desde los discos, ya que de lo contrario, podrían estar dando como resultado falsas resistencias⁸. Este procedimiento consiste en inocular placas de Petri conteniendo agar con un inóculo estandarizado del microorganismo a ensayar. Luego, se colocan discos de papel de filtro (de aproximadamente 6 mm de diámetro), que contienen el compuesto de interés a una concentración deseada, sobre la superficie de agar. Las placas de Petri se incuban en condiciones adecuadas. En general, el agente antimicrobiano difunde en el agar e inhibe el desarrollo y el crecimiento del microorganismo. Por último, se miden los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano⁹.

Esta técnica no permite distinguir entre los efectos bactericidas^{viii} y bacteriostáticos^{ix} de los antimicrobianos, así como tampoco permite realizar un análisis cuantitativo para determinar, por ejemplo, la concentración inhibitoria mínima. Sin embargo, las pruebas de difusión en disco ofrecen muchas ventajas frente a otros métodos, tales como: simplicidad, bajo costo, habilidad de analizar una gran cantidad de microorganismos y agentes antimicrobianos, como así también facilidad para interpretar los resultados obtenidos¹⁰.

3.1.2. Concentración inhibitoria mínima

Concentración inhibitoria mínima (CIM): es la mínima concentración de antibiótico que es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado en el tiempo de incubación necesario, según la cepa con la que se esté trabajando. Usualmente los valores de la CIM se expresan en unidades de $\mu\text{g}/\text{mL}$ o mg/L ¹¹.

Los métodos de dilución son los más adecuados para la determinación de los valores de la CIM, ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano analizado en agar (dilución en agar) o en caldo (macro o microdilución). Las técnicas de microdilución se iniciaron en 1977 y se destacan por sus beneficios, entre los que se pueden mencionar: reducción de la cantidad necesaria de reactivos, espacio de trabajo y tiempo¹⁰. Esta metodología se lleva a cabo en placas de 96 pocillos y consiste en realizar diluciones seriadas dobles del agente antimicrobiano en estudio con una concentración conocida y constante de inóculo bacteriano; luego la placa se incuba a la temperatura y tiempo necesarios (usualmente 18 h, 37 °C), y finalmente se determina la CIM por un cambio de

^{viii} Efecto bactericida: es la muerte bacteriana inducida por un fármaco.

^{ix} Efecto bacteriostático: es la inhibición del desarrollo bacteriano por un fármaco.

color observable o desarrollo de turbidez¹². La determinación del valor de la CIM mediante métodos colorimétricos se basa en el uso de colorantes vitales tales como resazurina (RZ) y sales de tetrazolio, generalmente: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT)¹³. En este trabajo de Tesis se utilizó RZ, un indicador redox que permite detectar la viabilidad de los microorganismos por la conversión de una tinción no fluorescente, azul (entorno oxidado), a un color fucsia, altamente fluorescente, en respuesta a una reducción química del medio de cultivo resultado del crecimiento celular. La fluorescencia o señal colorimétrica generada del ensayo es proporcional a la cantidad de bacterias vivas en la muestra¹⁴.

Existen muchas directrices aprobadas para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por dilución, tanto para bacterias aerobias como anaerobias. Los estándares más reconocidos los proporcionan: *CLSI* y *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*. Esto permite que los ensayos se realicen con un enfoque estandarizado para evaluar la relevancia clínica de los resultados obtenidos¹⁵.

3.1.3. Concentración bactericida mínima

Concentración bactericida mínima (CBM): es la mínima concentración de un antibiótico que es capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99,9% de una población bacteriana previamente estandarizada en un período de incubación adecuado¹¹.

La determinación de la CBM es la metodología más frecuente para la estimación de la actividad bactericida. La CBM se puede determinar bajo un conjunto estandarizado de condiciones descritas en ciertas directrices, como el documento M26-A de CLSI¹⁶, en el cual se indica que se puede obtener la CBM con un ensayo de microdilución en caldo, subcultivando una muestra de los pocillos sobre la superficie de placas de agar no selectivo para determinar la cantidad de bacterias supervivientes, expresado como unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (UFC/mL), luego de un tiempo adecuando de incubación (frecuentemente 24 h)¹⁰.

3.1.4. Ensayo de potencial de membrana

La membrana plasmática es una barrera quimiosmótica que proporciona una interfaz entre el medio intracelular y el extracelular. Ésta presenta un potencial electroquímico (negativo en el interior) que desempeña un rol básico en el control del intercambio de

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

solutos. Alteraciones en el potencial de membrana pueden proporcionar una indicación rápida y sensible de aquellos estímulos que conducen a cambios fisiológicos importantes con respecto a la viabilidad bacteriana¹⁷.

Las moléculas fluorescentes se utilizan ampliamente como sondas de membranas biológicas, entre ellas se puede mencionar: **1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS)**. Esta sonda es un fluoróforo muy sensible a los cambios de la polaridad del entorno, cuando se encuentra en presencia de ambientes hidrofílicos exhibe una baja intensidad de fluorescencia, y por el contrario, ésta aumenta en entornos hidrofóbicos. Modificaciones en el valor del potencial eléctrico, determinadas por cambios en la intensidad de fluorescencia, evidencian alteraciones en la membrana bacteriana en presencia de la sustancia que se está estudiando¹⁸.

3.1.5. Ensayo de curva de muerte

Una de las técnicas analíticas de macrodilución en caldo, es el ensayo de curva de muerte en función del tiempo¹⁹. La viabilidad microbiana se determina por el conteo de colonias en placas de agar en puntos de tiempo predeterminados, generalmente en un lapso de 24 h. La actividad antibacteriana se define entonces como una reducción equivalente a $\geq 3 \text{ Log}_{10}$ UFC/mL en función del tiempo, en comparación con el inóculo inicial. Es un método estandarizado descrito por CLSI¹⁶.

Estos ensayos permiten graficar curvas para visualizar la actividad antimicrobiana de un agente en función del tiempo o la concentración. Al proporcionar información dinámica entre el agente antimicrobiano y las bacterias, el método de curva de muerte en función del tiempo es especialmente útil para determinar el efecto bactericida del antibiótico⁹.

3.1.6. Microscopía electrónica de barrido

La técnica SEM fue descrita anteriormente en el *Capítulo 2, sección 2.1.3.2*.

Cabe destacar que la microscopía se ha convertido en una herramienta fundamental para avanzar en la comprensión de los sistemas biológicos. En este caso en particular, la SEM es útil para estudiar interacciones a nivel de superficie entre las células bacterianas y la formulación de interés (NPs)²⁰.

3.1.7. Microscopía de transmisión electrónica

La **Microscopía de Transmisión Electrónica, TEM** (por sus siglas en inglés transmission electron microscopy), permite evaluar la ultraestructura del material en estudio mediante el análisis de cortes ultrafinos, generalmente de 90 – 120 nm. En TEM, las imágenes y contrastes se construyen utilizando la transmisión de electrones. Cuando una muestra es atravesada por un delgado haz de electrones de alta energía (usualmente 40 keV) estos electrones transmitidos son reenfocados y luego magnificados por un sistema de lentes electromagnéticas y se proyectan en una pantalla de fósforo para formar la imagen^{21,22}.

3.1.8. Microscopía de fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de interacción entre la radiación y la materia, en la cual un material absorbe radiación de una fuente específica, y muy rápidamente, emite luz cuya energía es menor (de mayor longitud de onda) que la de la radiación que ha absorbido²³. Los procesos que ocurren entre la absorción y la emisión de luz son ilustrados en el **diagrama de Jablonski**²⁴. En la *Figura 3.1.* se muestra un diagrama de Jablonski simplificado para explicar cómo se genera el fenómeno de fluorescencia. Los estados electrónicos singlete fundamental, primero y segundo están representados por S_0 , S_1 y S_2 , respectivamente. En cada uno de estos niveles de energía electrónica, los fluoróforos pueden existir en varios niveles de energía vibratoria, representados por 0, 1, 2, etc. Las transiciones entre estados se representan como líneas verticales para ilustrar la naturaleza instantánea de la absorción de la luz. Las transiciones ocurren en aproximadamente 10^{-15} s.

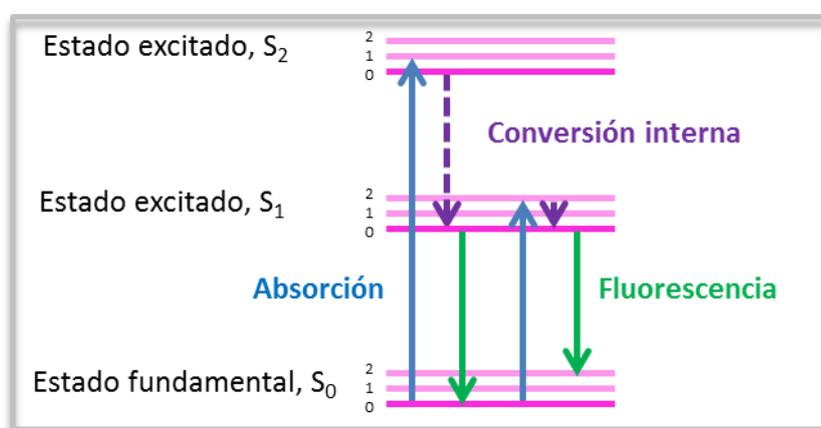


Figura 3.1. Diagrama de Jablonski simplificado para explicar el fenómeno de fluorescencia.

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

Las transiciones energéticas representadas en la *Figura 3.1. son:*

1) Cuando un fluoróforo absorbe luz, pasa del estado energético fundamental, S_0 a un estado excitado de mayor energía vibratoria S_1 o S_2 .

2) Con algunas raras excepciones, las moléculas se relajan rápidamente al nivel vibratorio más bajo de S_1 . Este proceso se llama conversión interna y generalmente ocurre dentro de 10^{-12} s o menos.

3) Pasado el tiempo de excitación la molécula emite luz de menor energía que la absorbida, volviendo a su estado fundamental, S_0 (**fluorescencia**).

La microscopía de fluorescencia aprovecha la propiedad de las sustancias fluorescentes de absorber luz a una determinada longitud de onda y emitirla en otra de mayor valor, por lo cual, mediante un sistema de filtros es posible separar la luz de excitación de la emitida, obteniendo imágenes de gran contraste. Por otro lado, a diferencia de las técnicas de microscopía por transmisión y reflexión de la luz, la microscopía de fluorescencia permite observar sólo la estructura de lo que fue específicamente marcado con sondas fluorescentes. Esta propiedad, convierte a la microscopía de fluorescencia en una herramienta idónea para observar el interior y la estructura de las muestras biológicas²⁵.

En los últimos tiempos se han desarrollado varias estrategias para sintetizar NPs poliméricas fluorescentes²⁶. Frecuentemente, se utiliza aquella que involucra la carga de componentes fluorescentes, por ejemplo, en la mayoría de los casos, colorantes fluorescentes orgánicos, en una matriz polimérica ópticamente inactiva, ya sea por simple encapsulación o por unión covalente²⁷.

3.2. Materiales y métodos

Materiales:

La selección del medio de cultivo a utilizar en los ensayos es importante para la confiabilidad y la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Para este trabajo de Tesis se seleccionaron para llevar a cabo los estudios microbiológicos frente a diferentes cepas bacterianas de *S. aureus* y *E. faecalis* los medios de cultivo agar Müller-Hinton (AMH) y caldo Müller-Hinton (CMH).

AMH y CMH son medios de cultivo nutritivos no selectivos, que promueven el desarrollo microbiano²⁸. Por su composición, AMH y CMH han sido recomendados por CLSI para ser utilizados en forma rutinaria en la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana en medio sólido y líquido respectivamente. Estos medios de cultivo presentan una serie de ventajas entre las que se pueden mencionar: buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, bajo contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina; la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente, entre una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando estos medios de cultivo²⁹.

- Para este trabajo de Tesis se utilizaron AMH y CMH de la marca comercial perteneciente al laboratorio Britania S.A.[®], Buenos Aires, Argentina.

- Las cepas clínicas y de referencia utilizadas para este trabajo de Tesis fueron: *S. aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25.923, *S. aureus* MS 9.463, *S. aureus* MR 9.455, *E. faecalis* 28.212, *Escherichia Coli* (*E. coli*) 25922, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ATCC y *Pseudomona aureuginosa* (*P. aureuginosa*) 27853 pertenecientes al laboratorio de microbiología de la Dra. Paulina Páez, UNITEFA, FCQ-UNC.

Instrumental utilizado:

- Vortex Ferca[®], Buenos Aires, Argentina.
- Estufa para cultivo Marne[®], Córdoba, Argentina.
- Microcentrifuga Giumelli[®] Z-127-D, Buenos Aires, Argentina.

3.2.1. Evaluación de la estabilidad de las NPs en medio de cultivo

Previamente a la realización de los ensayos microbiológicos se determinó la estabilidad de las NPs en el medio de cultivo a utilizar: CMH. Se resuspendieron 5 mg de polvo liofilizado de NPs RIF y NPs vacías en 5 mL de CMH y se incubó a 37 °C durante 24 h. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a realizar una inspección visual (para comprobar la ausencia o la presencia de agregados) y luego, mediante DLS, se determinó el ζ , el tamaño y el IPD de las NPs resuspendidas.

3.2.2. Ensayo de Difusión en placas de Petri.

Se cortaron discos de papel de filtro de un diámetro de 6 mm, a los cuales se les colocó 5 μ L de cada muestra empleando una pipeta automática. Las muestras se prepararon en CMH

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

y las mismas fueron: NPs RIF, solución de RIF (concentración de fármaco en ambas: 40 µg/mL) y NPs vacías como control. Luego, los discos se colocaron en placas de Petri, protegidas de la luz y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 18 h. Por otro lado, se prepararon los inóculos bacterianos a una concentración de 1×10^8 UFC/mL de las siguientes cepas bacterianas: *S. aureus* ATCC 25.923, *S. aureus* MS 9.463, *S. aureus* MR 9.455, *E. faecalis* 28.212, *E. coli* 25.922, *K. pneumoniae* ATCC y *P. aureuginosa* 27.853 y se colocaron en agitador orbital a 37 °C durante 18 h. A continuación, se sembraron las distintas cepas bacterianas en placas de Petri conteniendo 15 mL de AMH previamente esterilizado. Se colocaron los tres discos con RIF, NPs RIF y NPs vacías equidistantes en cada placa, como se muestra en la *Figura 3.2*. Posteriormente, se incubaron las placas en una estufa a 37 °C durante 18 h.

Los halos de inhibición se midieron con una regla, desde un extremo al otro, incluyendo el centro de cada disco. Los resultados se informaron en mm. Mientras mayor es el halo de inhibición, mayor es la actividad antimicrobiana del compuesto. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

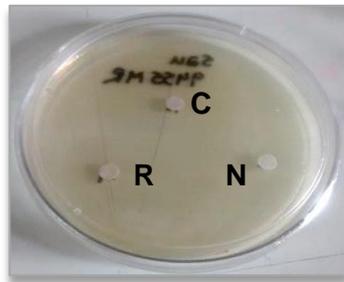


Figura 3.2. Placa de Petri utilizada en el ensayo de difusión. C: NPs vacías; R: RIF y N: NPs RIF.

3.2.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima.

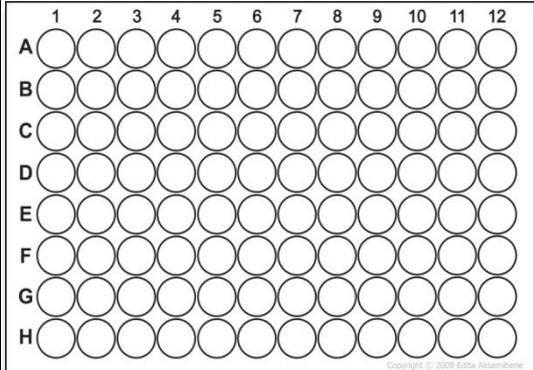
Se prepararon los inóculos con las siguientes cepas bacterianas: *S. aureus* ATCC 25.923, *S. aureus* MS 9.463, *S. aureus* MR 9.455 y *E. faecalis* 28.212, las cuales se colocaron en agitador orbital a 37 °C, durante 18 h.

La concentración de RIF fue de 0,1 mg/mL tanto para la solución de RIF como para las NPs RIF. En el caso de las NPs vacías se utilizó una cantidad equivalente al peso de las NPs cargadas. Los ensayos se realizaron utilizando CMH previamente esterilizado.

La CIM se determinó mediante la técnica de microdilución en caldo en una placa de 96 pocillos. Se realizaron diluciones seriadas 1 en 2 de cada muestra, con un volumen final de 100 µL/pocillo. Posteriormente, se adicionaron 100 µL/pocillo de suspensión del inóculo bacteriano (5×10^6 UFC/mL) según la *Tabla 3.1*. Las placas se cubrieron con papel aluminio para resguardarlas de la luz y se colocaron en una estufa de cultivo a 37 °C durante 18 h. Finalizado el tiempo del ensayo, se determinó la CIM mediante la observación visual de las placas, considerando como la mínima concentración aquella dilución que no presentó desarrollo de turbidez, es decir crecimiento microbiano.

Tabla 3.1. Esquema de plaqueo para el ensayo de CIM.

Número de pocillo	Concentración RIF (µg/mL)	Letra de pocillo	Cepa bacteriana
1	50	A y B	<i>E. faecalis</i> 28.212
2	25	C y D	<i>S. aureus</i> MS 9.463
3	12,5	E y F	<i>S. aureus</i> ATCC 29.213
4	6,25	G y H	<i>S. aureus</i> MR 9.455
5	3,125		
6	1,6		
7	0,8		
8	0,4		
9	0,2		
10	0,1		
11	0,05		
12	0,025		



El diagrama muestra una placa de 96 pocillos organizada en 8 filas (A-H) y 12 columnas (1-12). Las filas A, C, E, G y las columnas 1, 3, 5, 7, 9, 11 están sombreadas en un tono rojo claro, correspondiendo a las concentraciones de RIF de 50, 12,5, 0,2 y 0,05 µg/mL respectivamente. Las filas B, D, F, H y las columnas 2, 4, 6, 8, 10, 12 están sombreadas en un tono morado claro, correspondiendo a las concentraciones de RIF de 25, 6,25, 0,1 y 0,025 µg/mL respectivamente.

3.2.4. Determinación de la concentración bactericida mínima.

Para la determinación de la CBM se sembraron las muestras contenidas en los pocillos del ensayo anterior (3.2.3.) correspondientes a las siguientes concentraciones: 1xCIM, 2xCIM y 4xCIM. Las muestras se sembraron en placas de Petri previamente esterilizadas conteniendo AMH, y posteriormente, se incubaron en una estufa de cultivo a 37 °C durante 18 h. Finalmente, se realizó el recuento de las colonias, cuyos valores se expresaron como UFC/mL. La concentración de RIF que produjo una reducción del 99,9% de las UFC/mL con respecto al inóculo original se registró como la CBM.

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

3.2.5. Ensayo de potencial de membrana

Este ensayo se realizó para determinar posibles modificaciones en el potencial de membrana de las siguientes cepas bacterianas: *S. aureus* ATCC 29.213, *S. aureus* MR 9.455, *S.aureus* MS 9.463 y *E. faecalis* 28.212, en presencia de diferentes tratamientos con NPs vacías, NPs RIF, RIF y buffer PBS utilizado como control.

Para este ensayo se incubaron en una estufa a 37 °C, 500 µL de las cepas bacterianas antes mencionadas con 500 µL de RIF y NPs RIF a tres concentraciones diferentes: sub CIM (-CIM), CIM y supra CIM (+CIM). Por otro lado, las NPs vacías se colocaron a una sola concentración y se realizó una dilución equivalente a +CIM de las NPs RIF. Para el control se incubaron las diferentes cepas con 500 µL de PBS para tener un volumen final igual en todas las muestras. Los tiempos a los cuales se realizó el ensayo fueron: 1, 4 y 24 h. Pasado el tiempo de incubación de cada muestra, las mismas se colocaron en placas de 96 pocillos y se agregaron 40 µL de la sonda ANS 60 µM, se incubó 10 minutos a 37°C y luego se procedió a la medición de las placas en un espectrofluorómetro (Biotek®, EE.UU.), a una λ de excitación de 360 nm y una λ de emisión de 516 nm. En la *Figura 3.3.* se muestra un esquema simplificado de la metodología de trabajo.

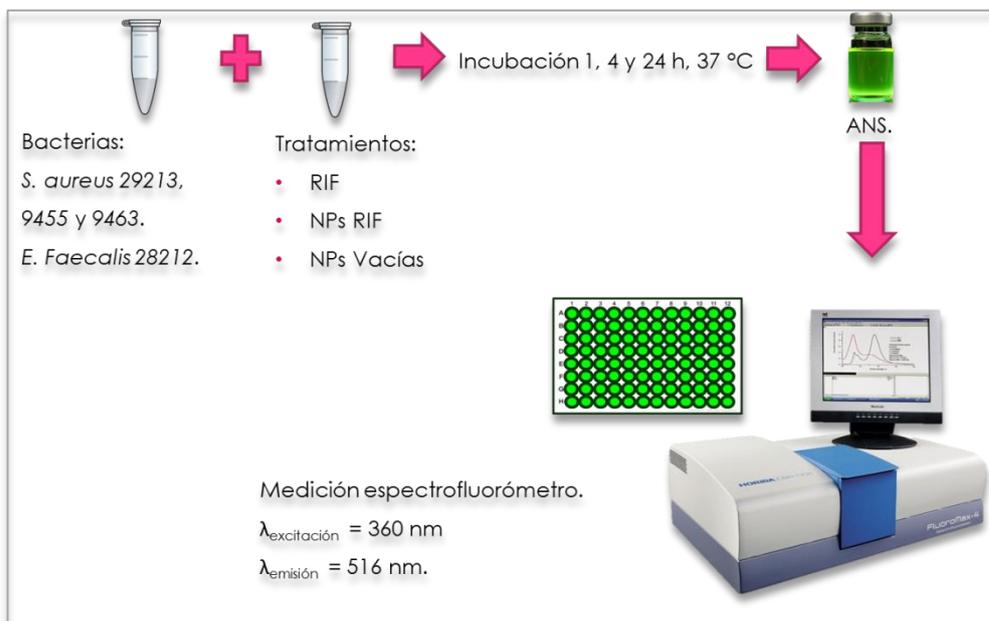


Figura 3.3. Esquema de la metodología utilizada en el ensayo de potencial de membrana.

3.2.6. Ensayo de curva de muerte

Para este ensayo se preparó un inóculo de la cepa *S. aureus* ATCC 29.213 en una concentración de 5×10^6 UFC/mL. Se seleccionó esta cepa para continuar con los estudios microbiológicos debido a que las cepas ATCC son microorganismos certificados, sus características fenotípicas y genotípicas definidas garantizan la identidad de las mismas y son empleadas como referencia para las determinaciones microbiológicas.

Se realizaron diferentes tratamientos: RIF y NPs RIF, a la concentración equivalente a la CIM, y NPs vacías, además se utilizó como control PBS. Este estudio se realizó por duplicado, para lo cual, se combinaron 500 μ L de suspensión bacteriana con 500 μ L de cada tratamiento, en tubos "Eppendorf" y se homogeneizaron con ayuda de un vortex durante 30 segundos. Los tratamientos realizados fueron: una solución de RIF y una dispersión de las NPs RIF en CMH a una concentración equivalente a la CIM previamente determinada. Una dispersión de las NPs vacías, a una dilución equivalente a la CIM de las NPs RIF, y como control se colocó buffer PBS. Las muestras se incubaron a 37 °C en una estufa de cultivo a diferentes tiempos: 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h. Pasado el tiempo de incubación, se utilizó la técnica de "microgota" para el recuento de las UFC. Para llevar esto a cabo, primero se realizó una dilución 1/10 y otra 1/100 con PBS de cada muestra para poder efectuar el recuento con mayor facilidad, y a continuación, se sembraron 10 μ L de cada muestra en placas de Petri conteniendo 15 mL de AMH previamente esterilizadas. Las placas se incubaron durante 18 h a 37 °C. Finalmente, se realizó el recuento y los cálculos adecuados para determinar las UFC/mL.

En la *Figura 3.4.* se muestra un esquema simplificado de la metodología utilizada en el ensayo de curva de muerte.

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

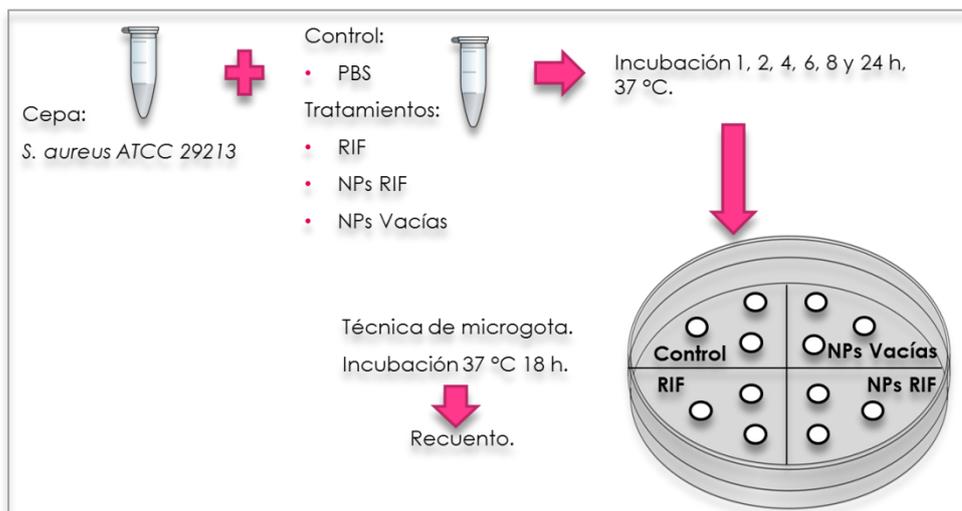


Figura 3.4. Esquema de la metodología empleada para el ensayo de curva de muerte.

3.2.7. Microscopía electrónica de barrido.

Para estudiar las posibles interacciones superficiales de las bacterias con las NPs se utilizó la técnica SEM. Para ello se preparó una suspensión bacteriana de la cepa *S. aureus* ATCC 29.213 en CMH a una concentración de 5×10^6 UFC/mL. Los diferentes tratamientos también fueron preparados en CMH. La concentración inicial de RIF libre y encapsulada en las NPs RIF fue de 1 mg/mL. La concentración de las NPs vacías correspondió al peso correspondiente a una cantidad equivalente de las NPs RIF conteniendo 1 mg/mL de RIF.

Las muestras se prepararon en tubos “Eppendorf” conteniendo:

- Control: 0,75 mL de suspensión bacteriana + 0,75 mL de CMH.
- Bacterias + RIF: 0,75 mL de suspensión bacteriana + 0,75 mL de RIF en CMH.
- Bacterias + NPs RIF: 0,75 mL de suspensión bacteriana + 0,75 mL de NPs RIF en CMH.
- Bacterias + NPs vacías: 0,75 mL de suspensión bacteriana + 0,75 mL de NPs vacías en CMH.

Las muestras se homogeneizaron utilizando un agitador vortex durante 1 minuto y luego se incubaron 3 h a 37 °C. Se seleccionó este período de incubación debido a que es suficiente para que se visualice actividad antimicrobiana y no se produzca una inhibición total del crecimiento, lo cual imposibilitaría observar las modificaciones o interacciones entre las bacterias y las NPs.

Finalmente, aproximadamente 10 μ L de cada muestra se depositaron en un soporte adecuado para SEM (SEM Specimen Stub), usando una cinta adhesiva de doble faz y sobre la

misma se adicionó una placa de silicio pulido Micro to Nano 10-008145[®] para obtener una superficie más lisa y evitar que la rugosidad de la cinta interfiera en la imagen. Las muestras se secaron en una cámara de vacío a 30 °C y luego fueron recubiertas con oro empleando un recubridor por pulverización PELCO Modelo 3 y se analizaron usando un microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss Sigma a una intensidad de 3 kV.

3.2.8. Microscopía de transmisión electrónica

Los cambios a nivel ultraestructural de las bacterias en contacto con los diferentes tratamientos, se determinaron a través de la observación de las diferentes muestras por TEM. Para esto, se preparó una suspensión bacteriana de la cepa *S. aureus* ATCC 29.213 en CMH a una concentración de 5×10^6 UFC/mL. Los diferentes tratamientos fueron preparados en CMH. La concentración inicial de RIF libre y cargada en las NPs RIF fue de 1 mg/mL. La concentración de las NPs vacías corresponde al peso correspondiente a una cantidad equivalente de las NPs RIF conteniendo 1 mg/mL de RIF. Las muestras se prepararon de la misma manera que las descritas en el procedimiento 2.7.

Posteriormente, los cultivos bacterianos se lavaron 2 veces con PBS, realizando ciclos de centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min a 25 °C y se fijaron en una mezcla de Karnovsky que contenía 4 % p/v de formaldehído y 2 % p/v de glutaraldehído en tampón de cacodilato 0,1 M durante 2 h. A continuación, las bacterias fijadas se centrifugaron y los sedimentos se lavaron y se trataron con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1 % p/v durante 1 hora, luego se tiñeron en bloque con acetato de uranilo al 1 % p/v en una solución tamponada de acetato 0,1 M pH 5,2 durante 20 minutos. Posteriormente, se procedió a la deshidratación de las muestras con soluciones seriadas de acetona:agua Milli-Q, de menor a mayor concentración de acetona (50, 70, 90 y 100) % v/v en ambiente seco y las células bacterianas se incrustaron en la resina Embed 812[®]. Después de 48 h de polimerización a 60 °C, se cortaron secciones ultrafinas de 0,1 μm usando ultramicrotomo JEOL[®] con un cuchillo de diamante. Finalmente, las grillas se tiñeron con acetato de uranilo/citrato de plomo. Las muestras se examinaron usando un microscopio electrónico de transmisión marca Zeiss Leo 906-E (Oberkochen, Alemania)[®] y se capturaron fotografías con una cámara Megaview III (Olympus, Center Valley, PA)[®].

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

3.2.9. Microscopía de fluorescencia

La preparación de las muestras para ser observadas por microscopía de fluorescencia consistió en la tinción de bacterias de la cepa *S. aureus* 29.213 con dihidrorodamina 123 (DHR), Sigma-Aldrich®, EE.UU., un colorante fluorescente intracelular³⁰. Por otro lado, las NPs vacías se marcaron con el fluoróforo fluoresceína isotiocianato (FITC), Molecular Probes™, Suecia. FITC tiene grupos funcionales que se unen covalentemente a las aminas de QUIT³¹.

Para preparar las NPs vacías marcadas con FITC (NPs-FITC), en primer lugar, se procedió a marcar QUIT con FITC. Para ello, se adicionaron 0,16 mL de una solución de FITC disuelto en MeOH de concentración 2 mg/mL, en 0,34 mL de una solución de QUIT 1% p/v, preparada en ácido acético (0,1 N): MeOH 1:1. La reacción fue llevada a cabo durante 3 h, en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, el polímero unido al fluoróforo fue precipitado utilizando una solución de NaOH 0,5 M hasta alcanzar un valor de pH= 10. El precipitado fue recuperado por centrifugación a 8000 rpm, durante 10 minutos, y luego se realizaron sucesivos ciclos de lavado en MeOH:H₂O (70:30 v/v) hasta que no se detectó presencia del compuesto fluorescente en el sobrenadante, determinado con un espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis®, a la λ de máxima absorción: 495 nm. Las muestras se colocaron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico HELLMA Analytics®³².

A continuación se procedió a obtener las NPs-FITC, para lo cual se prepararon las soluciones madres de los polisacáridos QUIT y ALG. Se dispersó QUIT previamente unido con FITC en una solución ácido acético 1 % v/v, pH 4,5, a una concentración final de 0,05 % p/v, mientras que ALG se dispersó en agua a una concentración de 0,06 % p/v, ambas dispersiones se mantuvieron con agitación continua durante toda la noche. Posteriormente, se adicionaron 12,6 mL de una solución de T80 1% p/v conteniendo ASC 1% p/v sobre 62,2 mL de una solución de ALG 0,06 % p/v, luego se agregaron gota a gota 2,9 mL de una solución de CaCl₂ 0,05 % p/v y se agitó a 300 rpm durante 7 min. Finalmente, se adicionaron 5 mL de la solución de QUIT previamente marcado con FITC, 0,05 % p/v y se agitó a 300 rpm, durante 8 min. Se trabajó a temperatura ambiente, protegiendo las muestras de la luz. Se realizaron dos ciclos de ultracentrifugación a 19000 rpm, durante 15 minutos para separar las NPs-FITC de los componentes que no interaccionaron.

Se prepararon dos muestras, en las cuales se puso en contacto 1 mL de suspensión bacteriana con 50 μ L de DHR 1 mM y se incubaron en una estufa a 37 °C durante 20 minutos en la oscuridad. Pasado este tiempo, se realizaron 3 ciclos de lavado usando PBS previamente esterilizado, centrifugando a 5.000 rpm durante 10 minutos. Luego del último ciclo de lavado, se resuspendieron los “pellets” de las bacterias marcadas con DHR (bacterias-DHR) en 0,5 mL de PBS. La muestra de interés se preparó adicionando 0,5 mL de NPs-FITC en PBS a la suspensión bacteriana, mientras que el control se preparó añadiendo 0,5 mL de PBS. Posteriormente, se incubaron estas muestras en una estufa a 37 °C durante 3 h, en la oscuridad. Pasado el tiempo de incubación se procedió a preparar las muestras para microscopía, para este fin se colocaron 15 μ L de cada muestra sobre un portaobjeto, al cual se le adicionó un cubreobjeto. Se realizaron 6 preparados de la muestra de interés: Bacterias-DHR en presencia de NPs-FITC, los cuales se observaron con diferentes microscopios inmediatamente: Axioplan (Carl Zeiss)[®], FV300 (Olympus)[®] y FV1200 (Olympus)[®], con un objetivo de inmersión en aceite de 60x. Se utilizó un láser seleccionando las λ de 488 nm y 543 nm para excitar las muestras, respectivamente, y un filtro de barrera de 530 nm y 578 nm para detectar FITC y DHR, respectivamente.

3.2.10. Prueba de sensibilidad en *Mycobacterium tuberculosis*

Se determinó la CIM en caldo Middlebrook 7H9[®], por el método de microdilución en placas de 96 pocillos utilizando RZ (Sigma-Aldrich[®], EE. UU.) para determinar la viabilidad de las bacterias. En este ensayo se usaron 9 aislamientos de *Mtb* sensibles de origen clínico referidos al Servicio de Micobacterias del INEI, ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán” y *Mtb H37Rv* como control. Se realizaron 8 diluciones en un rango de 5 a 0,039 μ g/mL de cada tratamiento (NPs vacías, NPs RIF y RIF) y se enfrentaron a un inóculo promedio de 10^4 - 10^6 UFC/mL de cada aislamiento y del control, respectivamente. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 7 días.

La CIM se determinó como la concentración más baja del tratamiento que evitó el cambio visible de color de RZ de azul a fucsia luego de 48 h de reacción.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Evaluación de la estabilidad de las NPs en medio de cultivo.

En la Figura 3.5. se muestra la estabilidad de las NPs vacías y NPs RIF en CMH a partir del análisis de la variación de su diámetro hidrodinámico, IPD y del ζ .

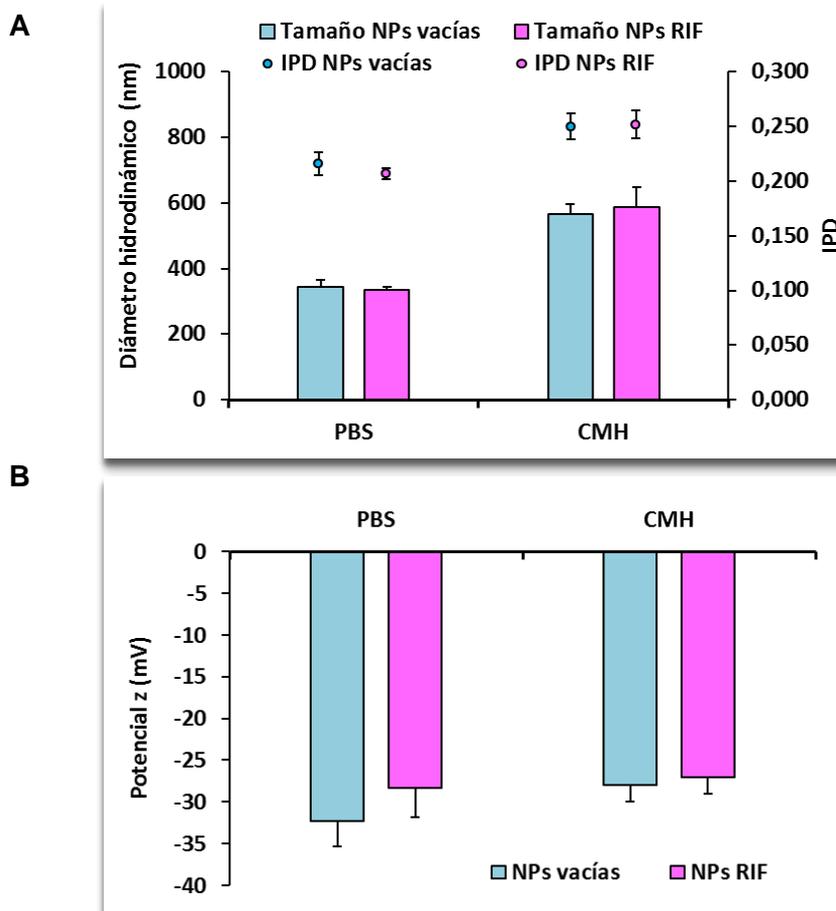


Figura 3.5. Gráfico de barras de: A- Diámetro hidrodinámico (nm) e índice de polidispersidad y B- Potencial z (mV) de NPs vacías y NPs RIF en PBS y medio de cultivo (CMH), pH 7,4.

Las NPs, tanto vacías como cargadas con RIF, fueron relativamente estables en CMH luego de ser incubadas durante 24 h a 37 °C. Se observó un leve aumento del IPD, mientras que el diámetro hidrodinámico se duplicó, lo cual puede estar relacionado a la agregación de dos o más NPs promovida por el aumento de concentración de electrolitos en el medio en el cual se encuentran dispersas, manteniéndose suspendidas en el sistema ya que no se observaron precipitados de la muestra mediante inspección visual. Por otro lado, se observó una leve

reducción en el valor del ζ para las muestras de NPs cuando fueron resuspendidas en CMH con respecto a los valores correspondientes en PBS, pero los valores obtenidos se encuentran dentro de los valores de ζ para los cuales se ha demostrado que el sistema presentaba una buena estabilidad coloidal (cercano a $|30|$ mV).

3.3.2. Ensayo de Difusión en placas de Petri.

En la *Tabla 3.2.* se muestran los valores de los halos de inhibición obtenidos para las diferentes cepas bacterianas incubadas con los distintos tratamientos (RIF, NPs RIF y NPs vacías). No se observaron diferencias significativas entre los halos de inhibición obtenidos con las NPs RIF comparados con los de RIF, esto evidenció que la actividad antimicrobiana de RIF se conservó cuando este antibiótico se vehiculizó en las NPs. En la *Figura 3.6.* se exhiben las fotografías del ensayo de difusión en placas de Petri.

Tabla 3.2. Diámetro promedio de los halos de inhibición con su respectiva DE (mm) obtenidos con el ensayo de difusión de placas de Petri.

Cepa bacteriana	Halo de inhibición promedio \pm DE (mm)		
	RIF	NPs RIF	NPs Vacías
Gram positivas			
<i>S. aureus</i> ATCC 25.923	29 \pm 3	29 \pm 1	0
<i>S. aureus</i> MS 9.463	27 \pm 2	28 \pm 1	0
<i>S. aureus</i> MR 9.455	11 \pm 1	12 \pm 2	0
<i>E. faecalis</i> 28.212	31 \pm 1	30 \pm 1	0
Gram negativas			
<i>E. Coli</i> 25.922	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC	0	0	0
<i>P. aureuginosa</i> 27.853	0	0	0

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

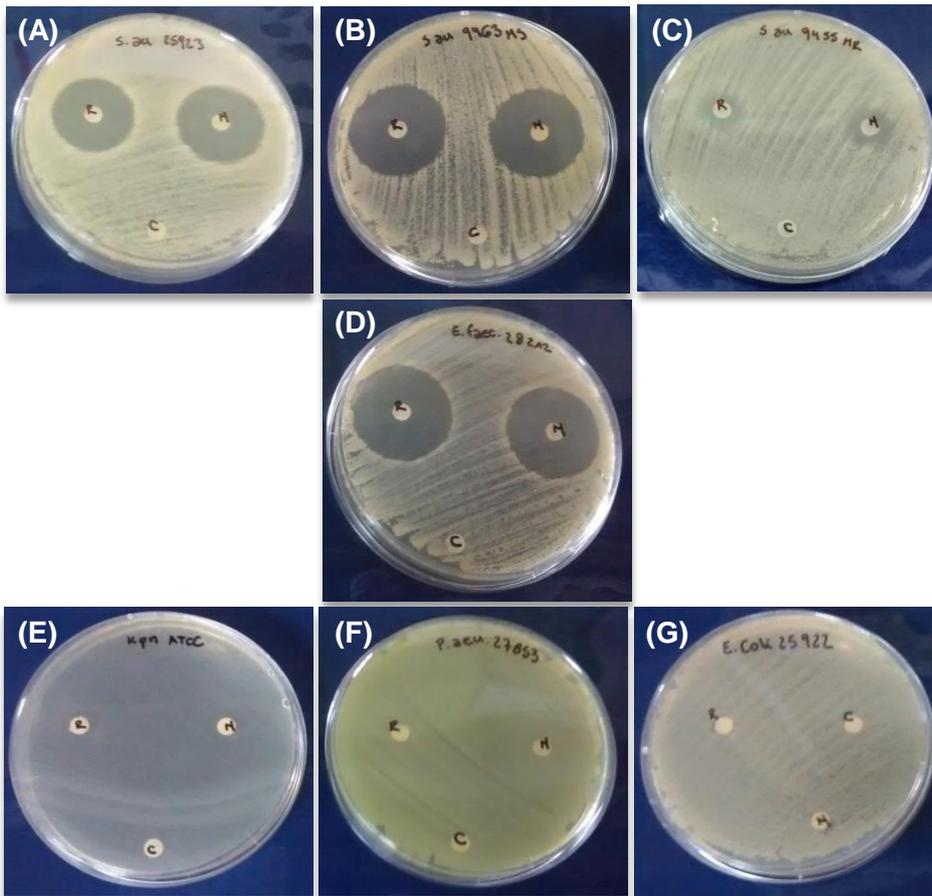


Figura 3.6. Fotografías del ensayo de difusión en placas de Petri: (A)- *S. aureus* 25.923; (B)- *S. aureus* MS 9463; (C)- *S. aureus* MR 9.455; (D)- *E. faecalis* 28.212; (E)- *K. pneumoniae* ATCC; (F)- *P. aureuginosa* 27.853; (G)- *E. coli* 25.922. Nomenclatura discos: R: RIF; N: NPs RIF y C: NPs vacías.

En este ensayo, se pudo demostrar que RIF es capaz de difundir desde las NPs obtenidas, manteniendo su actividad antimicrobiana contra las cepas Gram positivas estudiadas. Sin embargo, RIF y las NPs RIF no demostraron actividad antimicrobiana frente a las cepas Gram negativas utilizadas a ninguna de las concentraciones estudiadas. Por otro lado, se determinó que las NPs vacías no tuvieron actividad antimicrobiana frente a ninguna de las

cepas ensayadas lo cual demostró que el efecto antimicrobiano se debe al antibiótico y las NPs solo cumplen una función transportadora.

3.3.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima.

Este ensayo, a diferencia del anterior (difusión en placas de Petri) nos brinda información cuantitativa. En la *Tabla 3.3.* se encuentran los valores de la CIM para las cepas bacterianas ensayadas, obtenidos para los diferentes compuestos de interés utilizados (RIF, NPs RIF y NPs vacías).

Tabla 3.3. Valores de las CIM ($\mu\text{g/mL}$) de RIF, NPs RIF y NPs vacías encontrados para las cepas bacterianas: *S. aureus* ATCC 29.213, *S. aureus* MS 9463, *S. aureus* MR 9455 y *E. faecalis* 28212. N.I. = no demostró inhibición.

Cepa bacteriana	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
	RIF	NPs RIF	NPs Vacías
<i>S. aureus</i> ATCC 29.213	0,2	<0,025	N.I.
<i>S. aureus</i> MS 9.463	0,4	0,4	N.I.
<i>S. aureus</i> MR 9.455	3,125	1,6	N.I.
<i>E. faecalis</i> 28.212	0,4	0,4	N.I.

El valor de la CIM determinado para *S. aureus* MS 9.463 y *E. faecalis* 28.212, tanto para RIF como para las NPs RIF, fue equivalente. Es importante destacar que para las cepas *S. aureus* ATCC 29.213 y *S. aureus* MR 9.455, el valor de la CIM de las NPs RIF fue al menos 8 y 2 veces menor, respectivamente, en relación a RIF, lo cual demuestra una acción sinérgica de las NPs RIF frente a RIF. Este comportamiento está asociado probablemente a la mayor área de superficie específica de las NPs RIF, lo cual podría favorecer la interacción con las bacterias y modificar la cinética de liberación del fármaco³³. Por otra parte, las NPs vacías no

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

presentaron actividad antimicrobiana contra ninguna de las cepas estudiadas, y a ninguna de las concentraciones ensayadas.

3.3.4. Determinación de la concentración bactericida mínima.

Los valores de muerte bacteriana, expresados en %, de RIF y NPs RIF frente a las cepas *S. aureus* ATCC 29.213, *S. aureus* MS 9.463, *S. aureus* MR 9.455 y *E. faecalis* 28.212 se exhiben en la *Tabla 3.4*. Se determinó que RIF, a cada una de las concentraciones, y con las diferentes cepas estudiadas, posee un efecto bacteriostático, al igual que las NPs RIF con las cepas *S. aureus* MS 9.463 y *E. faecalis* 28.212. Por otro lado, las NPs RIF exhibieron un efecto bactericida en las cepas *S. aureus* ATCC 29.213 y *S. aureus* MR 9.455, demostrando una mayor potencia antimicrobiana de RIF cuando este antibiótico se vehiculizó en el sistema nanoparticulado desarrollado.

Tabla 3.4. Valores de porcentaje de muerte bacteriana determinados en el ensayo de CBM ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Bactericida (color violeta ■), bacteriostático (color naranja ■). N.D. = no determinado (formación de césped).

Cepa bacteriana	RIF			NPs RIF		
	4xCIM	2xCIM	CIM	4xCIM	2xCIM	CIM
<i>S. aureus</i> ATCC 29.213	N.D.	N.D.	N.D.	100	99,99	99,99
<i>S. aureus</i> MS 9.463	N.D.	N.D.	N.D.	99,83	99,66	99,47
<i>S. aureus</i> MR 9.455	99,58	98,66	N.D.	99,96	99,99	98,87
<i>E. faecalis</i> 28.212	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

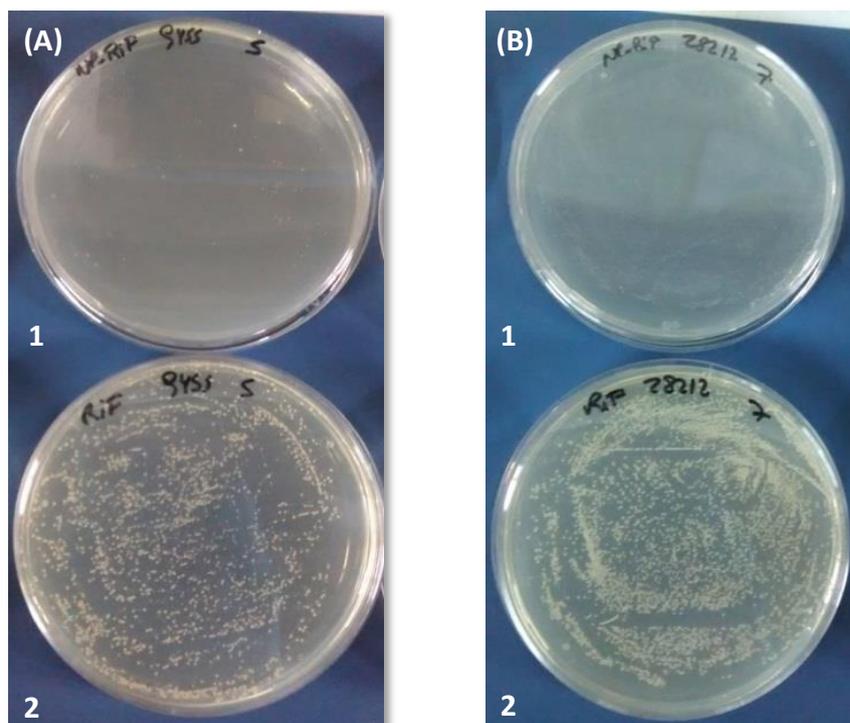


Figura 3.7. Fotografías de las placas de Petri correspondientes al ensayo de CBM: A- *S. aureus* MR 9455, 1: NPs RIF 3,125 µg/mL, 2: RIF 3,125 µg/mL y B- *E. faecalis* 28212, 1: NPs RIF 0,8 µg/mL, 2: RIF 0,8 µg/mL.

En este ensayo, se observó a nivel macroscópico, una tendencia de reducción del tamaño y la cantidad de UFC en todas las cepas ensayadas, y a todas las concentraciones de las NPs RIF estudiadas, en comparación con RIF libre. En la *Figura 3.7.* se muestran algunas fotografías de las placas correspondientes al ensayo de CBM. Estas diferencias observadas permitirían inferir que RIF al vehiculizarse en las NPs es capaz de producir cambios en la apariencia de las colonias bacterianas, que podrían indicar signos de un daño mayor que el generado con RIF libre.

3.3.5. Ensayo de potencial de membrana

Los resultados obtenidos del ensayo de potencial de membrana se muestran en la *Figura 3.8.* donde se observó que RIF y las NPs vacías no generaron cambios en la intensidad de fluorescencia, en las concentraciones y tiempos estudiados, con respecto al control, en ninguna de las cepas bacterianas ensayadas. Sin embargo, las NPs RIF mostraron un cambio significativo en la intensidad de fluorescencia en todas las cepas estudiadas, siendo este efecto más pronunciado en la cepa *S. aureus* MR 9.455. Esta modificación en la intensidad de

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

fluorescencia fue detectada a partir de la primera hora del ensayo y se mantuvo hasta las 24 h del tratamiento.

Se observó por otro lado, un aumento proporcional de la intensidad de fluorescencia con respecto a la concentración de antibiótico encapsulado en las NPs, principalmente en la cepa *S. aureus MR 9.455*. Este cambio de intensidad de fluorescencia con respecto al control podría deberse a modificaciones en el potencial electrocinético de la membrana bacteriana, lo cual podría interpretarse como modificaciones en la membrana celular frente a la sustancia con la cual se la está estimulando³⁴.

Estos resultados permiten concluir que las NPs RIF provocan alteraciones en la membrana celular de las cepas bacterias *E. faecalis 28.212*, *S. aureus ATCC 29.213*, *S. aureus MS 9.463* y *S. aureus MR 9.455*, lo cual podría indicar un daño en la integridad de la membrana externa de las células bacterianas o la capacidad de permeabilización de la membrana externa inducida por el efecto combinado de las NPs y RIF, ya que ANS no pudo penetrar la membrana bacteriana cuando las bacterias fueron tratadas con RIF libre o las NP vacías. Los resultados indican que la membrana bacteriana es un sitio de anclaje específico de las NPs RIF que mejora la acción antimicrobiana de RIF.

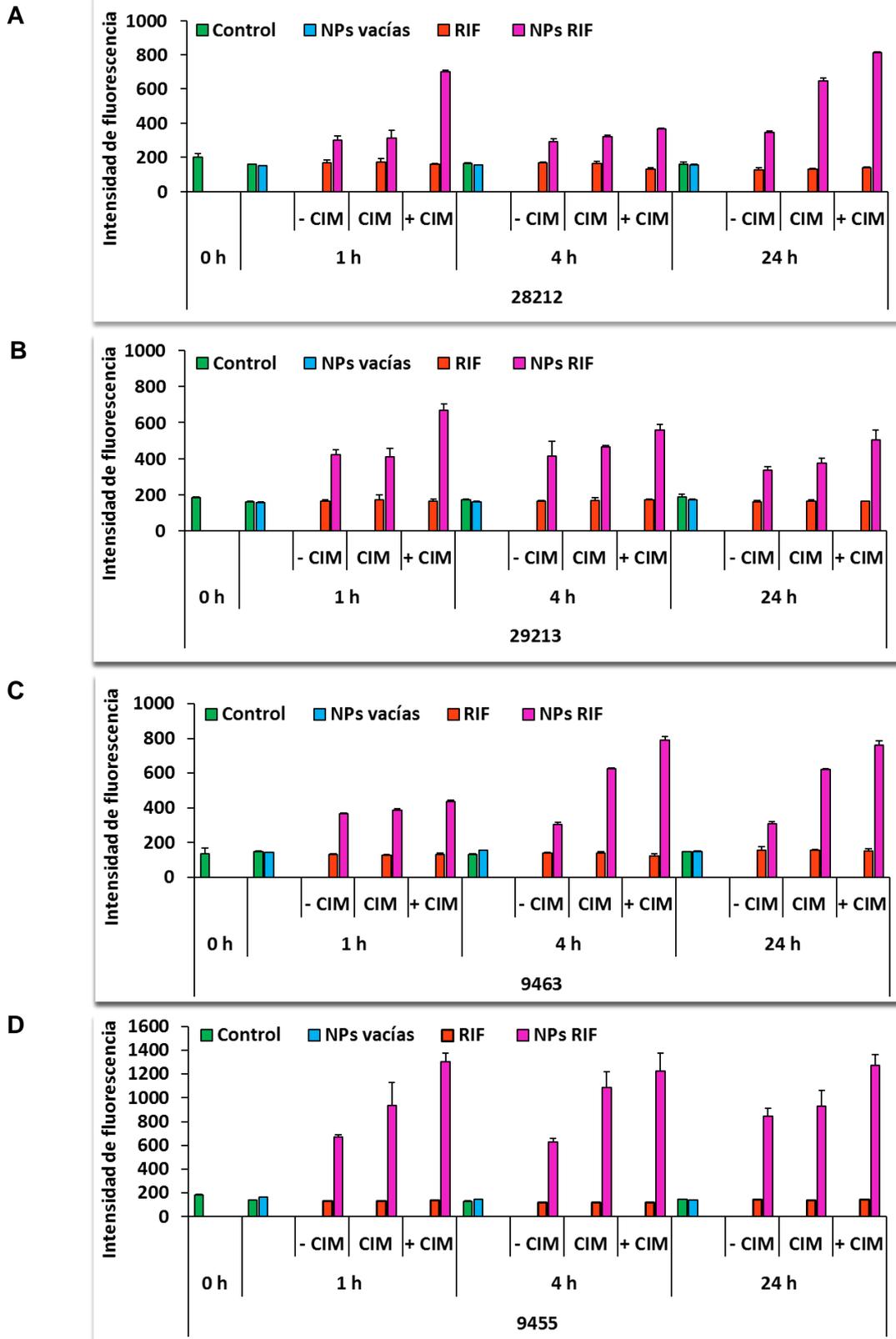


Figura 3.8. Ensayo de potencial de membrana correspondiente a: A- *E. faecalis* 28.212; B- *S. aureus* ATCC 29.213; C- *S. aureus* MS 9.463 y D- *S. aureus* MR 9.455. Intensidad de fluorescencia vs. tiempo (h) a diferentes concentraciones.

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

3.3.6. Ensayo de curva de muerte

Las curvas de la cinética de muerte de la cepa *S. aureus* ATCC 29.213 frente a RIF libre, NPs RIF y NPs vacías se muestran en la *Figura 3.9*. Los resultados de este ensayo demostraron que las NPs RIF tuvieron un efecto bactericida (determinado a partir de un descenso en 3 logaritmos) contra la cepa estudiada a partir de 4 h de incubación, mientras que, para RIF el efecto bactericida se alcanzó a partir de 6 h de incubación. Por otro lado, las NPs vacías no mostraron inhibición del crecimiento bacteriano, estos resultados son consistentes con los obtenidos en los ensayos realizados previamente (sección 3.3.2. a 3.3.5).

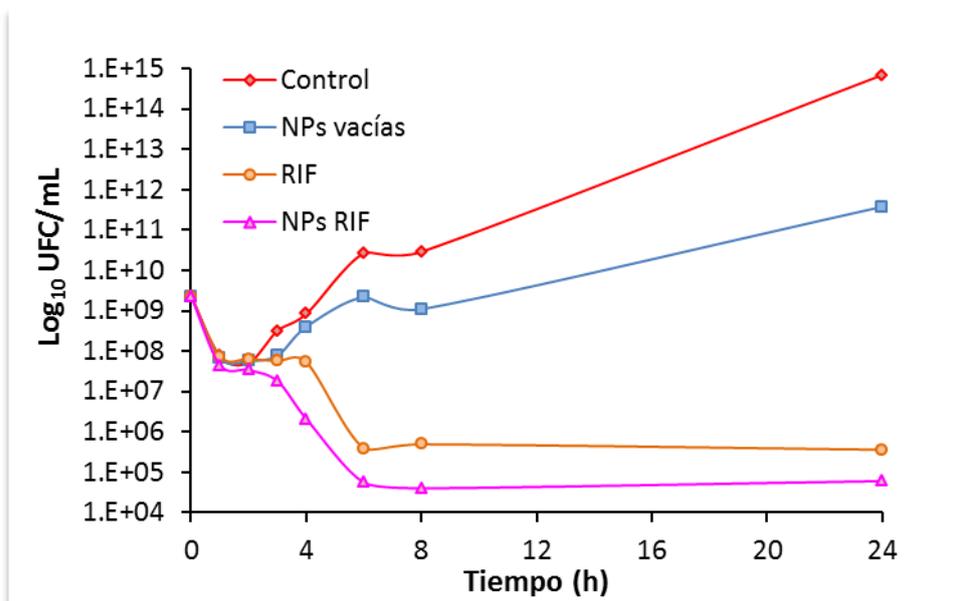


Figura 3.9. Ensayo de curva de muerte contra la cepa *S. aureus* ATCC 29.213. Log₁₀ UFC/mL ± DE vs. tiempo (h). n=2.

Finalizado el ensayo de curva de muerte, las placas se observaron con un microscopio óptico y se tomaron fotografías a los diferentes tiempos del ensayo. En las fotografías del tratamiento correspondiente al control y a las NPs vacías (*Figura 3.10.1.* y *3.10.2.*, respectivamente), las colonias presentaron un aspecto similar, preservando la morfología esférica característica de esta cepa y los bordes bien definidos. Por otro lado, las bacterias tratadas con RIF (*Figura 3.10.3.*) presentaron una ligera disminución en el tamaño de las colonias comparadas con el control, mientras que su morfología se mantuvo esférica, con bordes bien definidos, lisos y de similar densidad en comparación con el control. Por último, en las imágenes correspondientes al tratamiento con las NPs RIF (*Figura 3.10.4.*) se observó

una reducción significativa en el tamaño de las colonias, así como, cambios en su morfología, siendo estas irregulares, los bordes no se encontraron claramente definidos y las colonias presentaron una menor densidad con respecto al control.

Estos resultados podrían ser un aporte importante para contribuir en la mejora del tratamiento de las infecciones bacterianas con RIF al vehiculizar la misma en las NPs. Al lograrse un efecto bactericida en un tiempo y concentración menores, se podría lograr una reducción en la duración del tratamiento y una posible disminución de los efectos adversos.

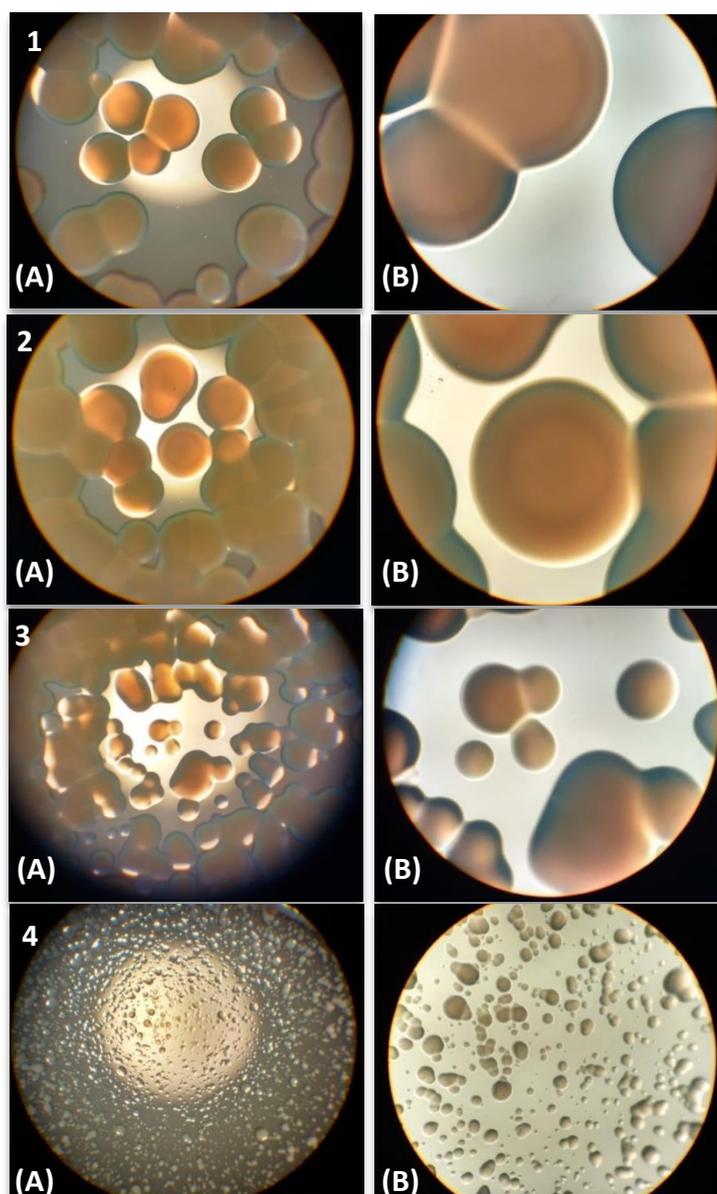


Figura 3.10. Fotografías obtenidas con microscopio óptico de las placas luego de 6 h de incubación con el ensayo de la curva de muerte. *S. aureus* ATCC 29.213. 1-Control (bacterias), 2- Tratamiento con NPs vacías, 3- Tratamiento con RIF, 4- Tratamiento con NPs RIF. Magnificación: (A) 4x, (B)

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

3.3.7. Microscopía electrónica de barrido

Se realizaron estudios microscópicos para lograr una mayor comprensión de los mecanismos subyacentes implicados en el comportamiento antibacteriano de las NPs RIF. Estos estudios se realizaron en la cepa *S. aureus* ATCC 29.213 como un modelo representativo de *S. aureus*.

Las imágenes obtenidas por SEM pertenecientes a las bacterias de la cepa *S. aureus* ATCC 29.213 sin tratamiento (muestra control) se exhiben en la *Figura 3.11*. Estas micrografías demostraron que las bacterias presentaron morfología esférica, una superficie lisa, un rango de tamaño homogéneo variando entre 550-750 nm, aproximadamente, y se encontraban distribuidas independientemente. Por otro lado, en la *Figura 3.12*. se exhiben las imágenes de las bacterias tratadas con las NPs vacías, en las cuales se observó como las NPs vacías interaccionaron con la superficie de las bacterias, ubicándose alrededor de las mismas, demostrando tener una alta afinidad sin provocar daños en las células bacterianas. Debido a esta interacción superficial, las NPs vacías promovieron que las bacterias se agrupen entre sí. En el caso de la muestra tratada con RIF (*Figura 3.13*.) se observó una menor cantidad de bacterias en el preparado, esto puede deberse al efecto del antibiótico sobre las bacterias, provocando muerte de alguna de ellas. Sin embargo, las bacterias que se lograron observar tuvieron un aspecto morfológico y un tamaño similar a las del control. Por último, en la muestra de bacterias tratadas con las NPs RIF la cantidad de células bacterianas encontradas fue muy baja, sin embargo, se lograron tomar micrografías de las escasas bacterias presentes, las cuales se muestran en la *Figura 3.14*. En las imágenes se distinguió que las bacterias presentaron un tamaño mucho más pequeño con respecto al control, no se observaron turgentes y su morfología no se encontró bien definida como en el caso del control y las muestras tratadas con RIF y las NPs vacías.

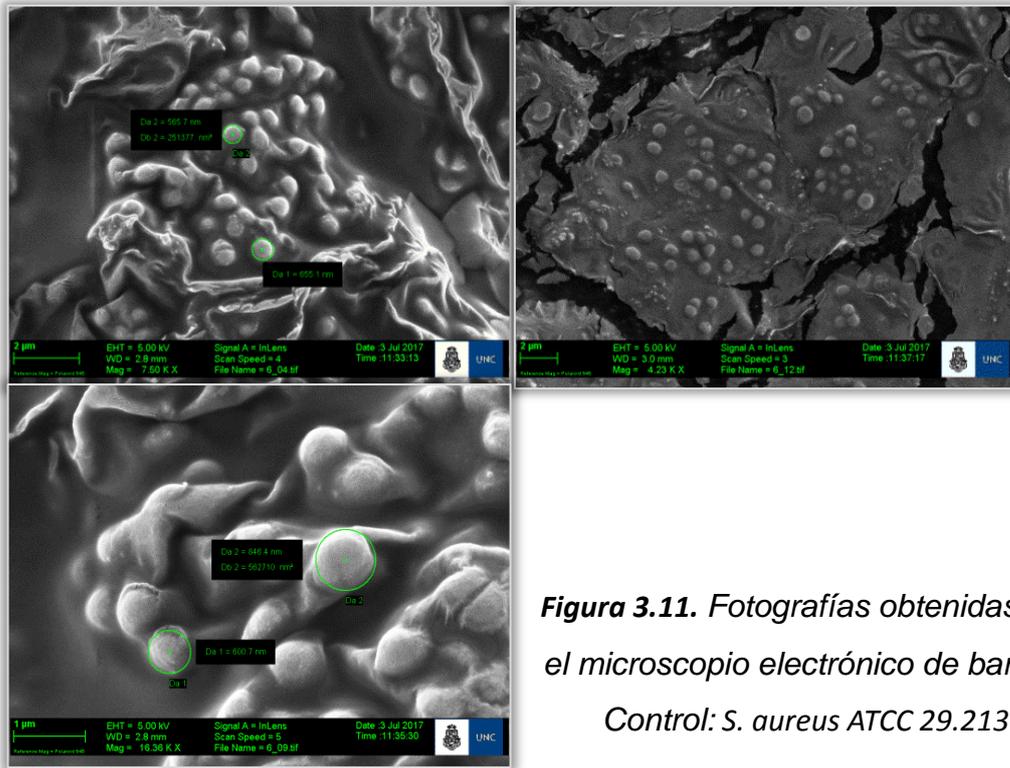


Figura 3.11. Fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido.
Control: *S. aureus* ATCC 29.213.

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifamicina

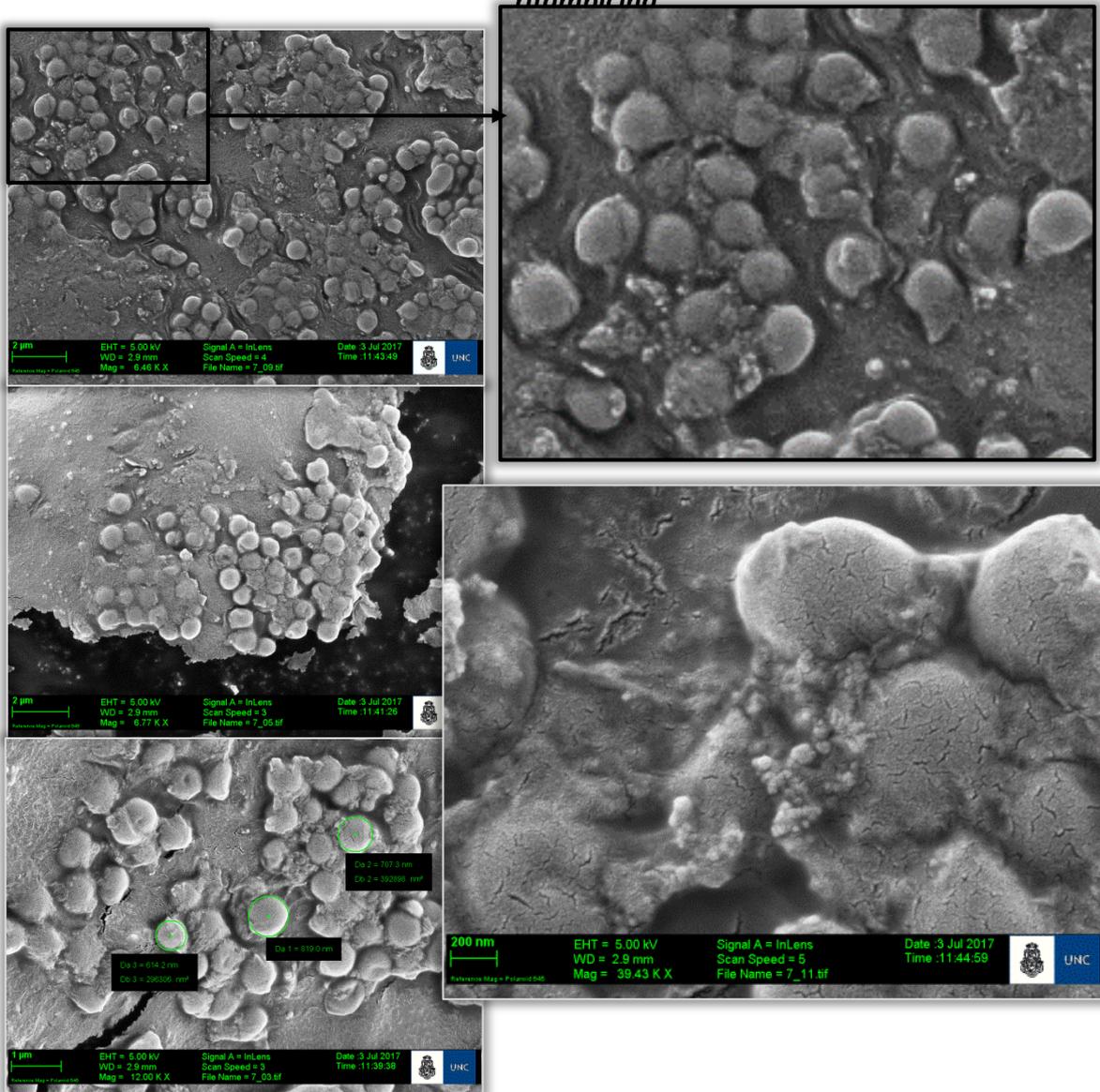


Figura 3.12. Fotografías microscopio electrónico de barrido. *S. aureus* ATCC 29.213 tratamiento con NPs vacías.

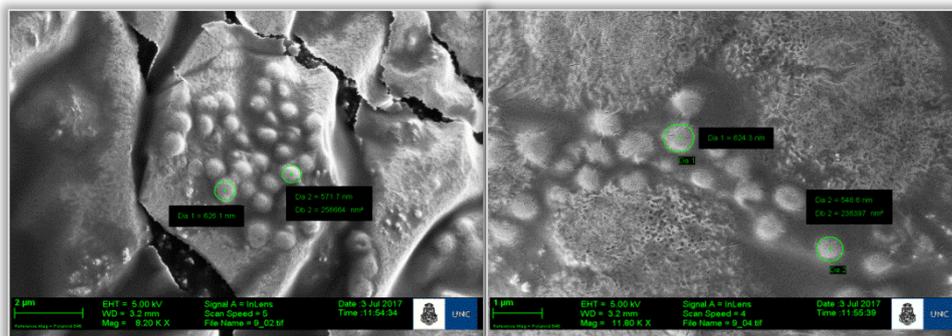


Figura 3.13. Fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido. *S. aureus* ATCC 29.213 tratadas con RIF.

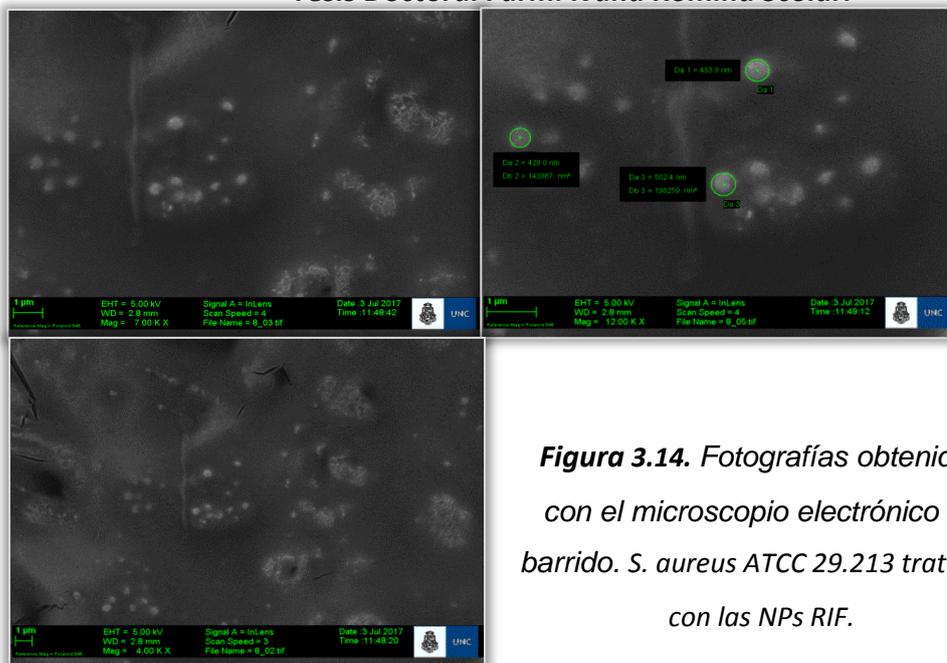


Figura 3.14. Fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido. *S. aureus* ATCC 29.213 tratadas con las NPs RIF.

Las evidencias de interacción entre las superficies de las NPs y las bacterias son relevantes para el tratamiento de infecciones bacterianas con las NPs RIF debido a que el acercamiento de las NPs con las bacterias incrementa la superficie de contacto, promoviendo un aumento de la concentración local del antibiótico. Al haber mayor concentración de antibiótico en la superficie de las bacterias, se podría suponer que ingresaría una mayor cantidad del IFA al interior de las células bacterianas, lo cual conduciría a un aumento en la muerte celular, debido a que RIF interacciona con el ARN mensajero, es decir, ejerce su acción a nivel intracelular³⁵.

3.3.8. Microscopía de transmisión electrónica

En las imágenes obtenidas por TEM exhibidas en la *Figura 3.15*, se pudo observar que las bacterias control (sin tratamiento) presentaron su forma esférica característica, el contenido intracelular fue homogéneo, y además, la pared y la membrana celular se encontraron bien definidas. Al mismo tiempo, se observaron bacterias en división celular, sin daños visibles.

En la muestra de las bacterias tratadas con las NPs vacías (*Figura 3.16*) no se observaron diferencias evidentes con respecto al control, estos resultados son acordes con lo observado en los estudios realizados previamente, confirmando que las NPs vacías son inocuas para las cepas bacterianas estudiadas.

La muestra de las bacterias tratadas con RIF (*Figura 3.17*) mostró el contenido intracelular menos homogéneo que el de la muestra control, las divisiones celulares fueron aberrantes en algunos casos y se observó ensanchamiento de la pared celular. Estas diferencias con

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

respecto al control son signos de daño debido a que el antibiótico, como se demostró en la sección 3.3.6. *Ensayo de curva de muerte*, tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano a partir de la primera hora de incubación.

Finalmente, al observar las muestras de las bacterias tratadas con las NPs RIF (*Figura 3.18.*) se evidenciaron señales de daño mayores que aquellas observadas con el tratamiento con RIF sin vehiculizar. Se pudo observar una mayor cantidad de restos celulares, cambios morfológicos notables, ausencia de la pared celular y una mayor cantidad de divisiones aberrantes. Además, en el interior de las bacterias se observaron estructuras que podrían deberse a la condensación del material genético o la desestabilización de las membranas, así como, la presencia de un gran número de vacuolas y mesosomas. Se cree que estas últimas estructuras están formadas por invaginaciones de la membrana celular, debido a daños en la misma y lesiones o defectos en el ADN^{36,37}.

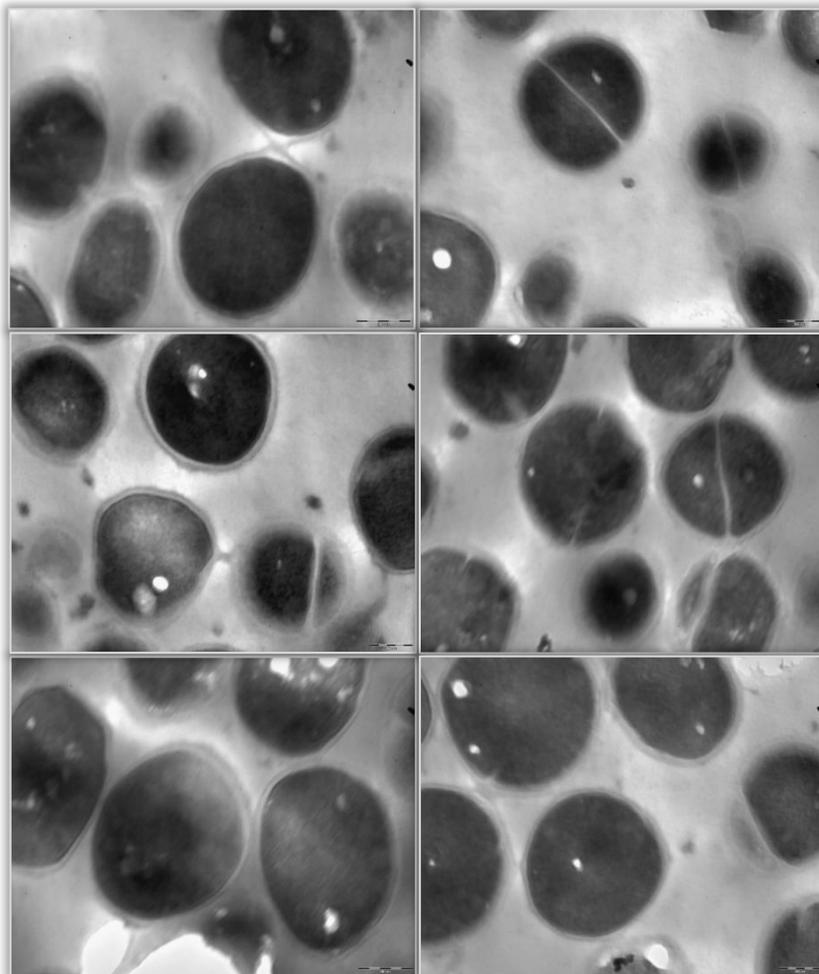


Figura 3.15. Fotografías obtenidas con el microscopio de transmisión electrónica. Control: *S. aureus* ATCC 29.213. Escala: 200nm.

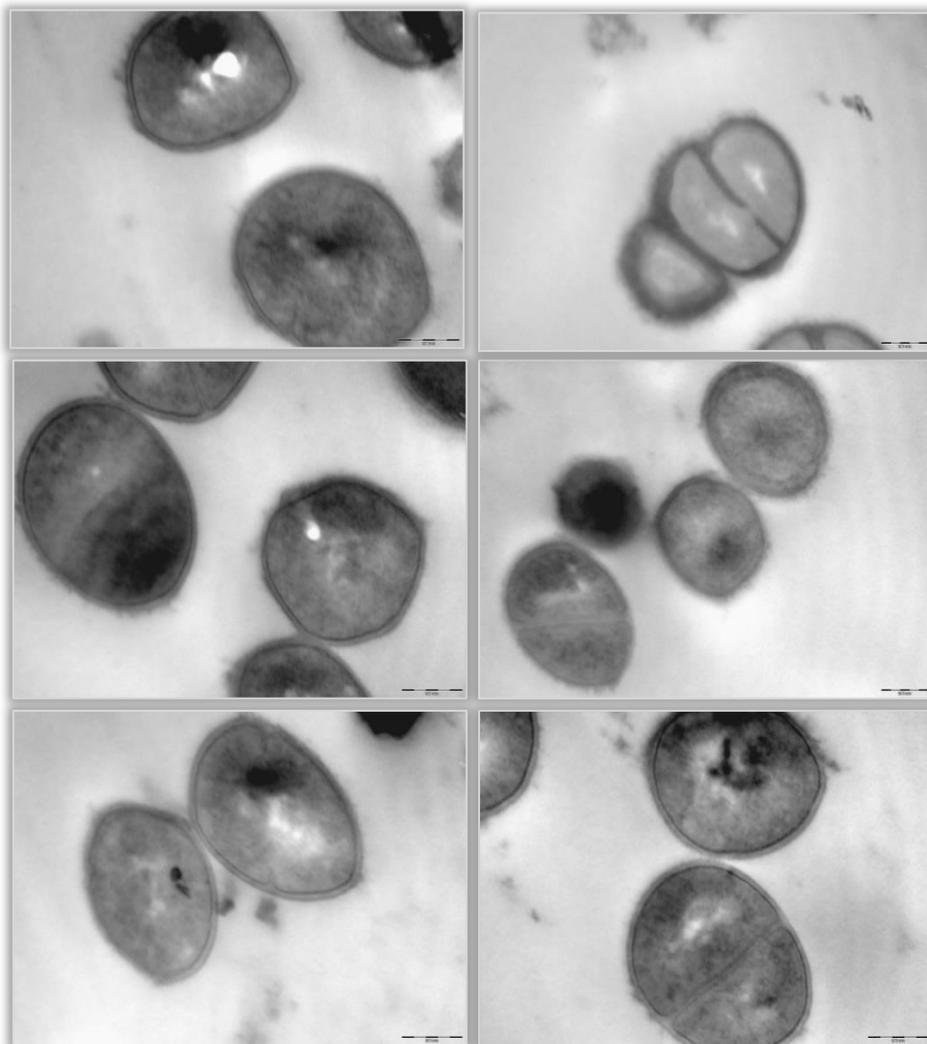


Figura 3.16. Fotografías obtenidas con el microscopio de transmisión electrónica. *S. aureus* ATCC 29.213 tratadas con las NPs vacías.

Escala: 200 nm.

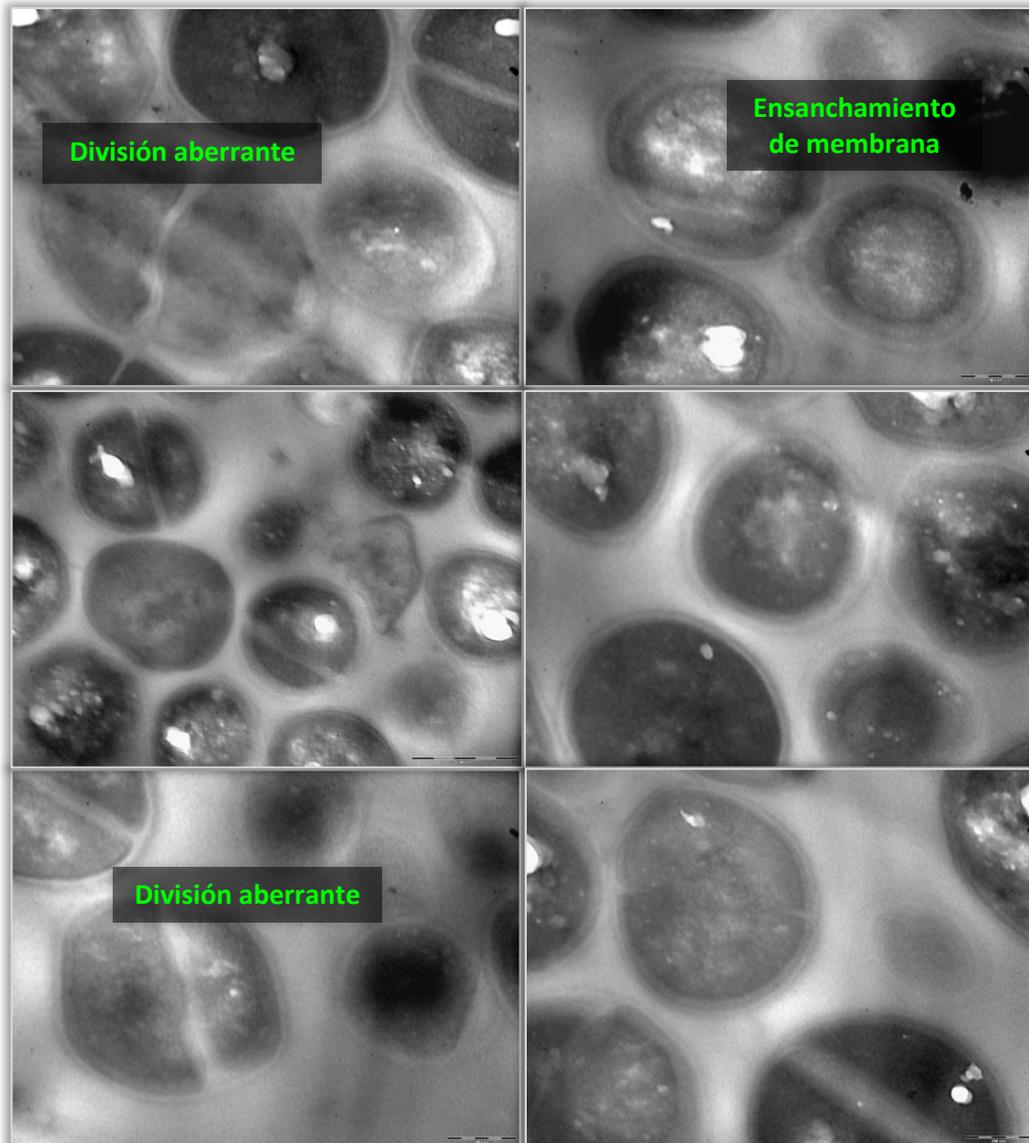


Figura 3.17. Fotografías obtenidas con el microscopio de transmisión electrónica. *S. aureus* ATCC 29.213 tratadas con la RIF. Escala: 200 nm.

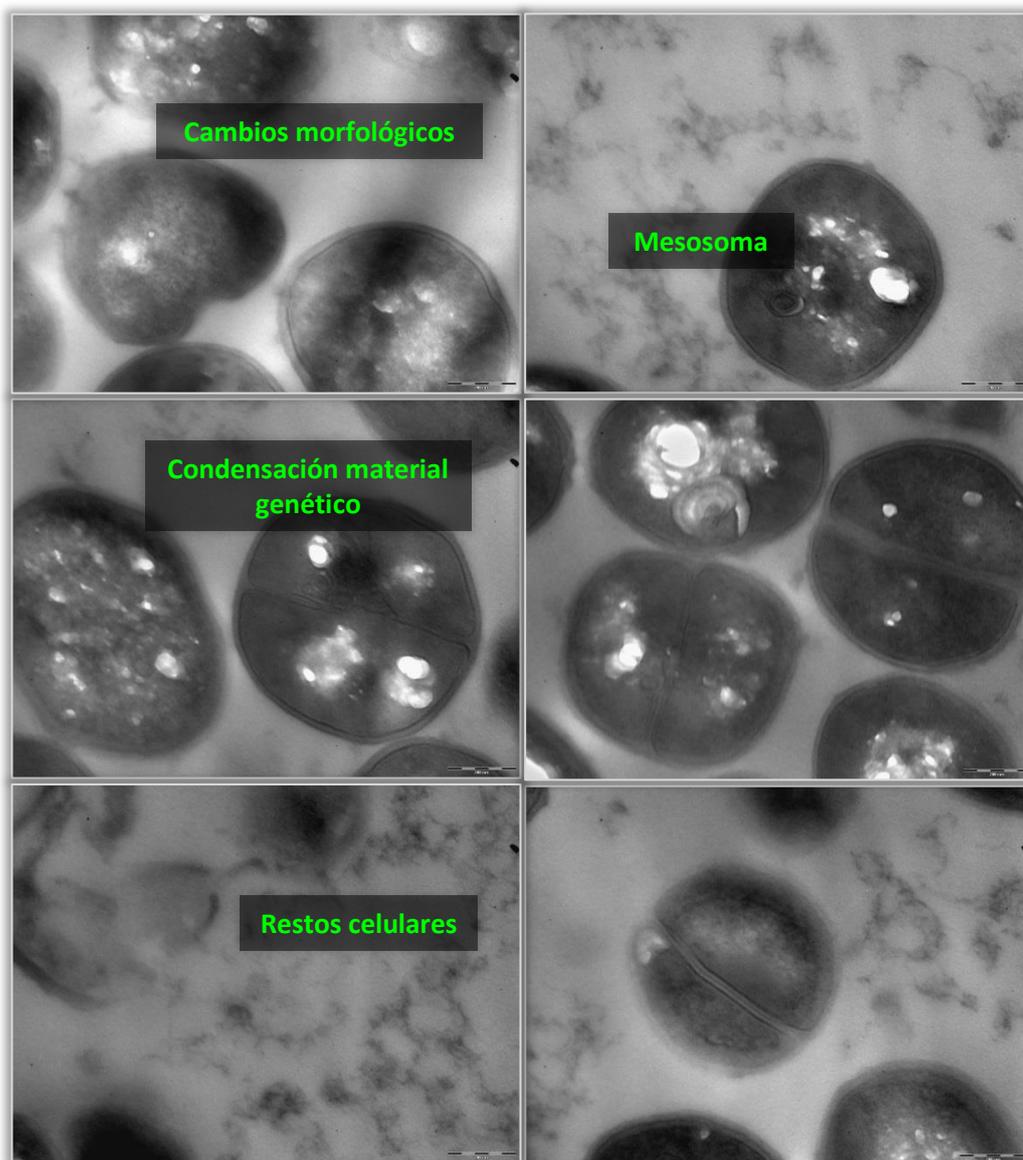


Figura 3.18. Fotografías obtenidas con el microscopio de transmisión electrónica. *S. aureus* ATCC 29.213 tratadas con las NPs RIF. Escala: 200 nm.

Este ensayo permitió demostrar, a nivel estructural, que la actividad antimicrobiana de RIF incrementó al encapsularse dentro de las NPs, debido al aumento de los signos de daño y muerte celular, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos previamente.

3.3.9. Microscopía de fluorescencia

En la *Figura 3.19.* se observan las micrografías de las bacterias-DHR sin tratamiento, mientras que en las *Figuras 3.20., 3.21. y 3.22.* se presentan las imágenes de las muestras de las bacterias-DHR tratadas con las NPs-FITC obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. Se pudo apreciar en el control que las bacterias se distribuyeron uniformemente, conservándose dispersas entre sí. Sin embargo, cuando las bacterias fueron

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

incubadas con las NPs-FITC, se pudo observar que las NPs se encontraban adheridas a la superficie de las bacterias, generando una aglomeración de las mismas. Estos resultados podrían ser consecuencia de una interacción entre la superficie de las NPs y de las bacterias, probablemente debido a una atracción electrostática entre los dominios cargados positivamente de QUIT, que se encuentra recubriendo las NPs, y los grupos cargados negativamente en la superficie de las bacterias³⁸. Estos resultados son consistentes con los obtenidos mediante SEM, confirmando la adherencia de las NPs a las bacterias, lo que contribuiría a un aumento de la concentración local del antibiótico en la superficie bacteriana, razón por la cual se evidencia un aumento de la potencia antimicrobiana de RIF cuando es vehiculizada en las NPs sintetizadas³⁹.

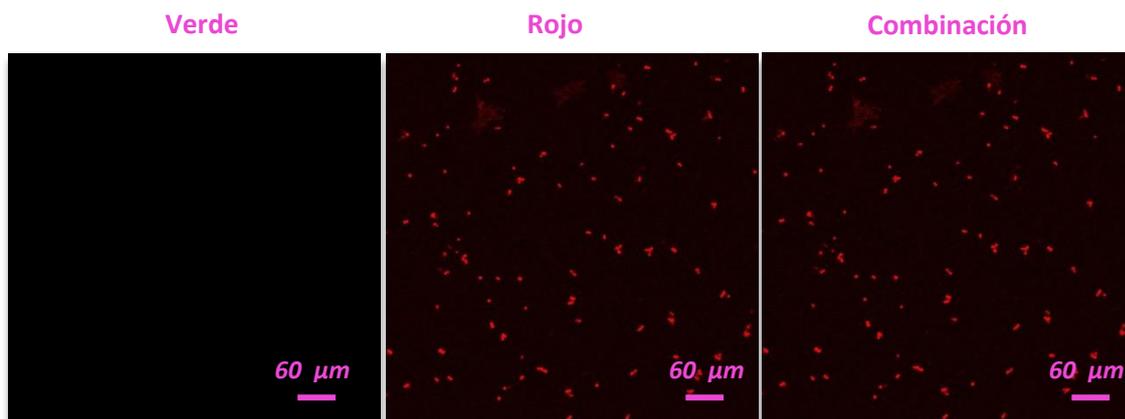


Figura 3.19. Fotografías obtenidas con el microscopio confocal de fluorescencia de *S. aureus* ATCC 29.213 marcadas con DHR, control. Imágenes de los canales verde, rojo y la combinación de ambos, 60x. Verde: - ; Rojo: Bacterias-DHR.

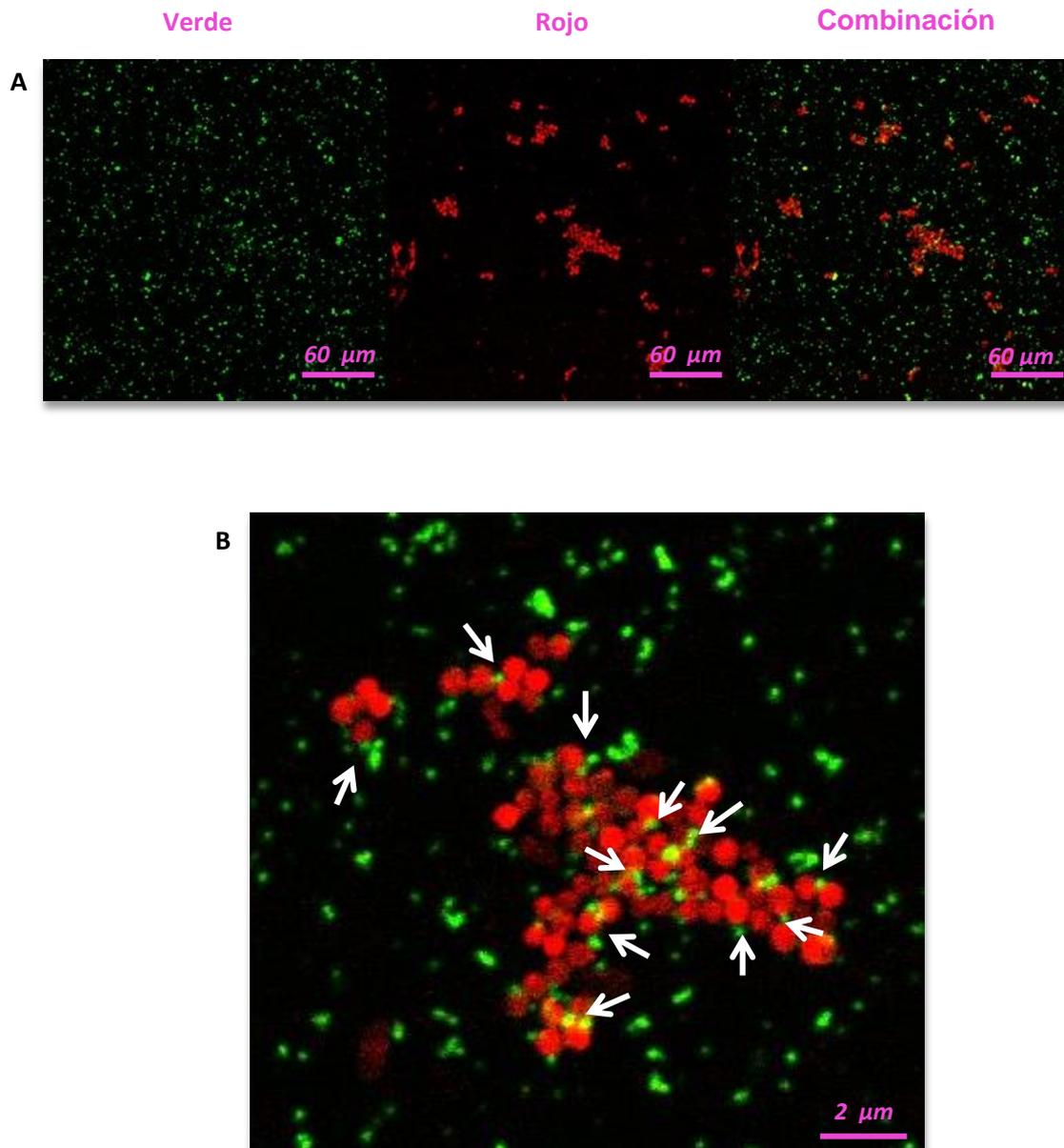


Figura 3.20. Fotografías obtenidas con el microscopio confocal de fluorescencia de *S. aureus* ATCC 29.213 marcadas con DHR tratadas con las NPs marcadas con FITC. A- Imágenes de los canales verde, rojo y la combinación de ambos, 60x, B – Imagen ampliada de la combinación de los canales verde y rojo. Verde: NPs-FITC; Rojo: Bacterias-DHR.

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

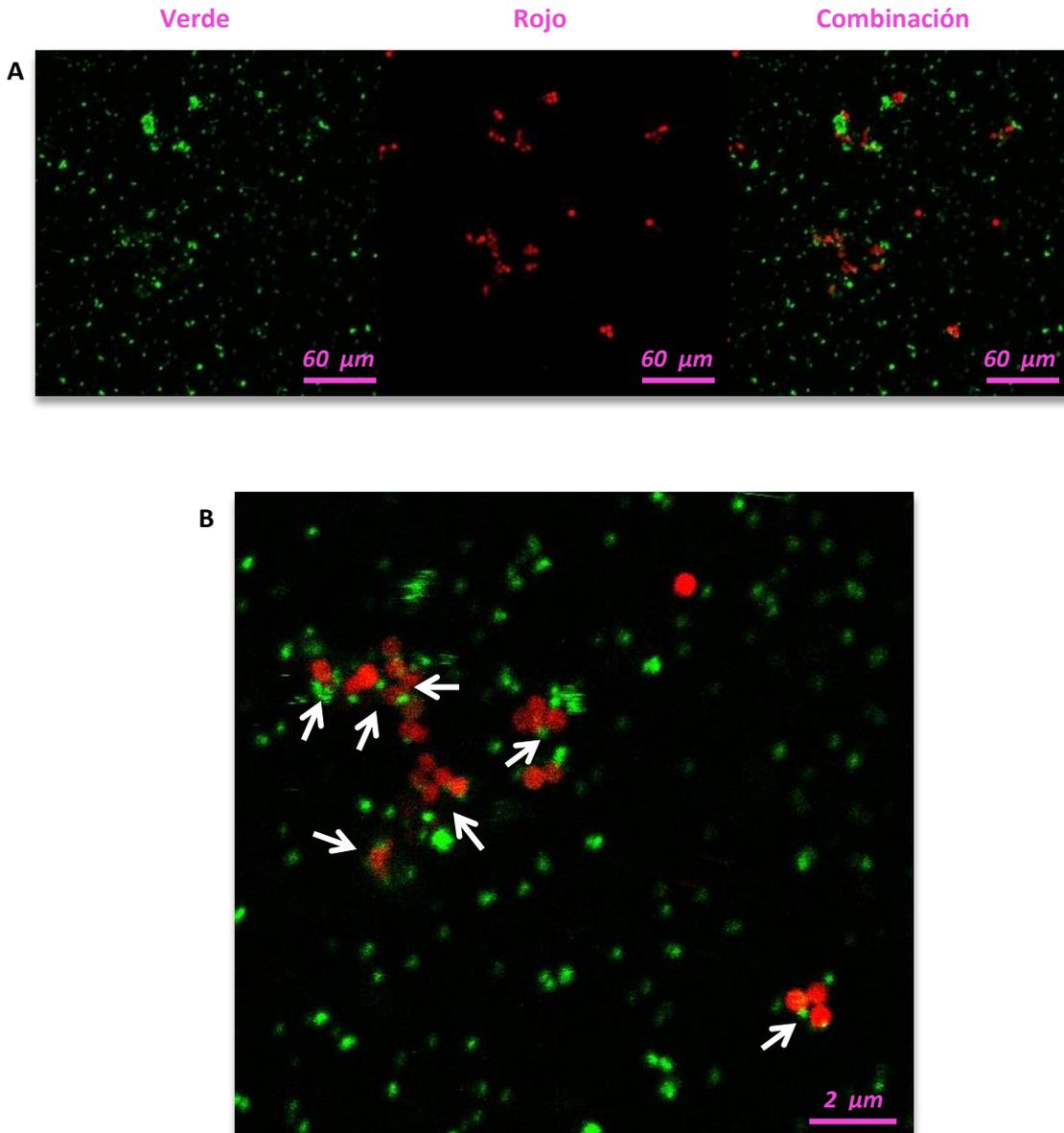


Figura 3.21. Fotografías obtenidas con el microscopio confocal de fluorescencia de *S. aureus* ATCC 29.213 marcadas con DHR tratadas con las NPs marcadas con FITC. A- Imágenes de los canales verde, rojo y la combinación de ambos, 60x, B – Imagen ampliada de la combinación de los canales verde y rojo. Verde: NPs-FITC; Rojo: Bacterias-DHR.

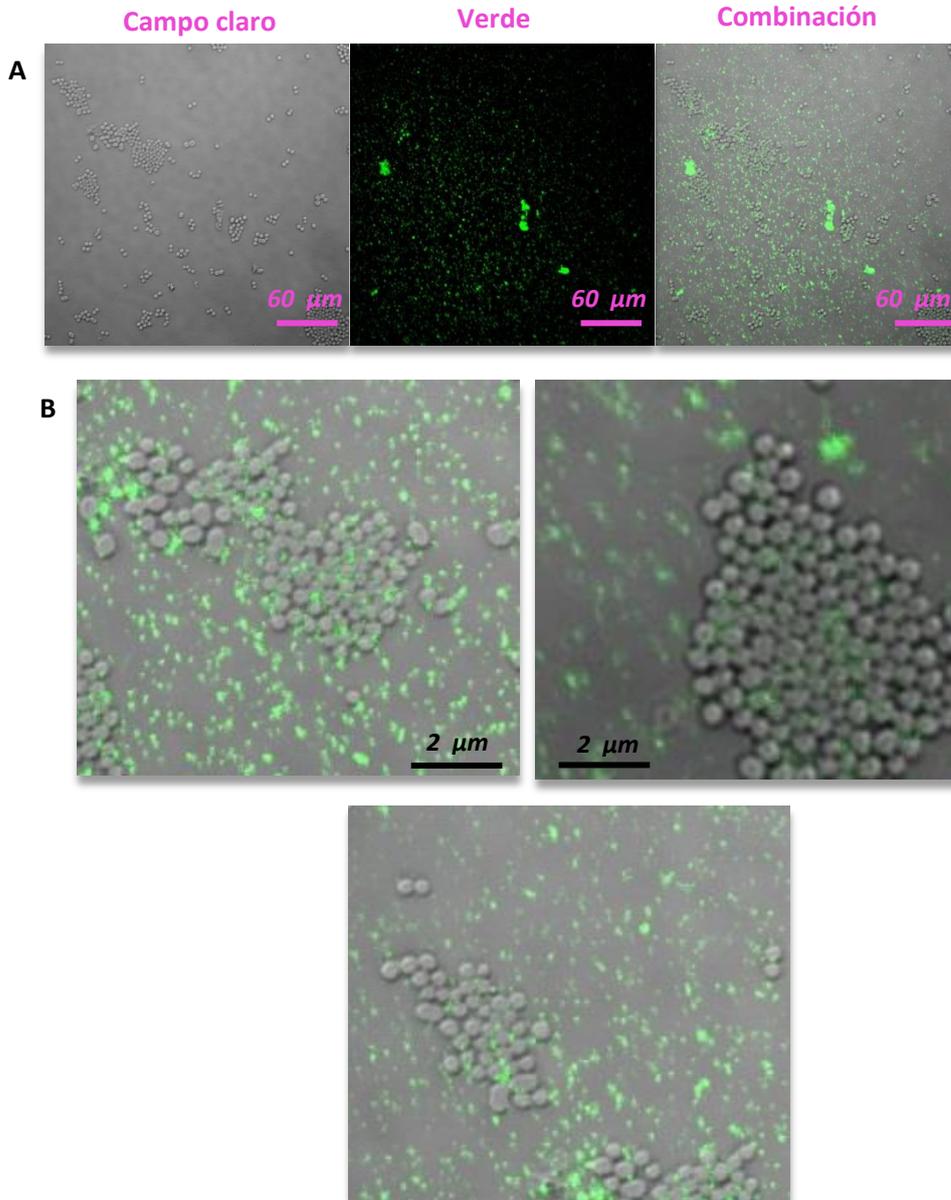


Figura 3.22. Fotografías obtenidas con el microscopio confocal de fluorescencia de *S. aureus* ATCC 29.213 tratadas con las NPs marcadas con FITC. A- Imágenes de los canales campo claro, verde y la combinación de ambos, 60x, B – Imágenes ampliadas de la combinación de los canales de campo claro y verde. Campo claro: Bacterias; Verde: NPs-FITC.

A pesar que el mecanismo de acción exacto del nanotransportador conteniendo RIF desarrollado en este trabajo de Tesis todavía no se ha podido esclarecer completamente, se puede inferir que los procesos involucrados en la acción bactericida de las NPs RIF fueron determinados a partir de los estudios realizados.

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

Los estudios microscópicos sugirieron la modificación de la membrana bacteriana producida por las NPs después de adherirse a su superficie. Esta alteración generó cambios en la permeabilidad de la membrana celular, facilitando la penetración del antibiótico o la capacidad de la misma para su adecuada osmorregulación, lo cual condujo a un aumento de la muerte celular. Por otra parte, los hallazgos obtenidos con los ensayos de potencial de membrana (*sección 3.3.5.*) apoyan al mecanismo bactericida propuesto para las NPs RIF, ya que la sonda ANS solo puede penetrar en las bacterias cuando éstas han perdido la integridad de su membrana. Además, los resultados obtenidos con los estudios de la curva de muerte de las bacterias tratadas con las NPs RIF también respaldan el mecanismo de acción propuesto para estas NPs. Las NPs RIF fueron capaces de generar daños en las bacterias, con una mejor eficiencia de muerte celular que RIF libre, la cual simplemente inhibe el crecimiento bacteriano, demostrando solo un efecto bacteriostático a menores tiempos de incubación.

El análisis estructural de las NPs RIF, como se describió en el *Capítulo 2*, reveló que QUIT y T80 parecen conferir propiedades específicas a la superficie activa de las NPs obtenidas. Teniendo en cuenta la composición de la superficie de estas NPs, especulamos que, en un primer paso, las moléculas cargadas negativamente en la superficie bacteriana externa podrían atraer los restos de grupos aminos cargados positivamente de QUIT, presentes en la superficie de las NPs, promoviendo su adhesión a las bacterias, lo cual posibilitaría el reconocimiento específico de los carbohidratos pendientes en la superficie del NPs por los receptores de la superficie bacteriana (lectinas), produciendo el llamado "efecto glicocluster"⁴⁰. El término **lectina** hace referencia a proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen específicamente carbohidratos de la superficie celular o en suspensión y desempeñan un rol fundamental en los procesos biológicos, incluidos la señalización celular, la comunicación célula-célula y el reconocimiento de patógeno-huésped. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido identificadas en diferentes organismos como virus, bacterias, hongos, plantas o animales⁴¹. Según reportes previos, algunas lectinas bacterianas presentan especificidad por ciertos monosacáridos, tales como N-acetil-D-glucosamina, el cual se encuentra presente en la superficie de las NPs obtenidas debido a que es una unidad monomérica de QUIT⁴². Por otra parte, la molécula de T80 podría insertarse en la membrana celular, a través de sus porciones hidrófobas e hidrófilas, las cuales le confieren la capacidad de incrustarse en

las membranas bacterianas e interactuar con las proteínas y los lípidos de las mismas, y de este modo, aumentar la permeabilización de la membrana celular⁴³.

3.3.10. Prueba de sensibilidad en *Mycobacterium tuberculosis*

Los resultados de este ensayo son presentados en la *Tabla 3.5*. Como se puede observar en la *Tabla 3.5*, las NPs vacías no presentaron inhibición del crecimiento bacteriano en ninguno de los 9 aislamientos estudiados ni en la cepa utilizada como control (*H37Rv*), a ninguna de las concentraciones ensayadas, en donde la máxima concentración de NPs estudiadas fue de 5 µg/mL. Por otro lado, las NPs RIF presentaron actividad antimicrobiana frente a los aislamientos estudiados, siendo sus valores de CIM menores que los de RIF sin vehiculizar, tanto para los 9 aislamientos clínicos como para la cepa control. Este resultado evidencia una mayor potencia de la actividad antimicrobiana *in vitro* cuando RIF es vehiculizada dentro de las NPs. Un mecanismo posible para explicar dicho efecto podría ser que las NPs RIF tienen la capacidad de aumentar la concentración de RIF en el interior de las bacterias a partir de la adhesión específica y de la modificación de la permeación del IFA a través de la membrana por parte de T80.

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

Tabla 3.5. Valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$) encontrados para los distintos tratamientos para aislamientos de *Mtb*. N.I. = no demostró inhibición.

Aislamiento N°	Concentración Inhibitoria Mínima ($\mu\text{g/mL}$)		
	NPs vacías	NPs RIF	RIF
<i>H37Rv (Control)</i>	N.I.	<0,039	0,078
27.883	N.I.	0,078	0,310
27.884	N.I.	<0,039	0,310
27.894	N.I.	0,078	0,310
27.895	N.I.	0,310	1,250
27.896	N.I.	<0,039	0,150
27.897	N.I.	0,150	0,620
27.898	N.I.	0,310	1,250
27.899	N.I.	0,310	0,620
27.900	N.I.	<0,039	0,150

Estos resultados son promisorios para plantear una farmacoterapia local dirigida a mejorar el tratamiento de la TB.

3.4. Conclusiones parciales

Como conclusiones parciales de este *Capítulo* se pueden mencionar:

- Las NPs RIF demostraron mayor actividad antimicrobiana *in vitro* en comparación con el fármaco libre contra diferentes cepas bacterianas: *S. aureus* ATCC 29.213 y *S. aureus* MR 9.455 y los aislamientos clínicos del *Mtb*.
- Las NPs RIF demostraron un efecto bactericida contra las cepas *S. aureus* ATCC 29.213 y *S. aureus* MR 9.455, a diferencia de RIF sola, que solo produjo un efecto bacteriostático a tiempos de incubación inferiores a las 6 horas. Por otra parte, se observaron cambios morfológicos a nivel macro y microscópico en las colonias de todas las cepas estudiadas (*S. aureus* MS 9.463, *E. faecalis* 28.212 y las mencionadas anteriormente) cuando las mismas fueron tratadas con las NPs RIF, con respecto al control y a los demás tratamientos (RIF libre y NPs vacías).
- Se evidenció que las NPs RIF poseen un efecto bactericida a partir de las 4 horas, a diferencia de RIF que posee este efecto a partir de las 6 horas para la cepa *S. aureus* ATCC 29.213 con lo cual se concluye que el tratamiento con NPs RIF tiene un efecto antibacteriano más rápido que el fármaco libre, lo cual es positivo como una herramienta para prevenir el desarrollo de resistencia bacteriana.
- Las NPs RIF produjeron notables cambios morfológicos y ultraestructurales en las bacterias de la cepa *S. aureus* 29.213, utilizada como cepa de referencia, en comparación con lo observado para RIF libre.
- Los estudios con microscopía de fluorescencia demostraron que las NPs se adhieren a la superficie de las células bacterianas, lo que conduciría a un aumento de la concentración local de RIF en la superficie bacteriana, aumentando la eficacia del antibiótico.
- Los resultados indicaron que la superficie de las NPs RIF desempeñaría un papel crucial en los procesos de adhesión de estos sistemas a la superficie bacteriana, las alteraciones en la integridad de la membrana celular y la captación celular del antibiótico en las bacterias. Se propuso como mecanismo de acción una unión selectiva de las NPs con las bacterias promovida por una interacción entre los carbohidratos del polisacárido QUIT de las NPs y las lectinas de las bacterias. Por otro lado, contribuye a este mecanismo el tensioactivo

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

T80, modificando la permeación de la membrana celular facilitando el ingreso de RIF a la célula bacteriana donde la misma ejerce su acción por inhibición de ARN mensajero.

3.5. Bibliografía

1. Sjollema, J. *et al.* In vitro methods for the evaluation of antimicrobial surface designs. *Acta Biomater.* **70**, 12–24 (2018).
2. Wang, L., Hu, C. & Shao, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine* **12**, 1227–1249 (2017).
3. Lam, S. J., Wong, E. H. H., Boyer, C. & Qiao, G. G. Antimicrobial polymeric nanoparticles. *Prog. Polym. Sci.* **76**, 40–64 (2018).
4. Friedman, A. J. *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan-alginate nanoparticles: A targeted therapy for cutaneous pathogens. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1231–1239 (2013).
5. Heatley, N. G. A Method for the Assay of Penicillin. *Biochem. J.* **38**, 61–65 (1944).
6. Clinical and Laboratory Standards Institute, C. M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. *Clin. Lab. Stand. Inst.* **35**, 73 (2015).
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. M44-A2: Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline—Second Edition. *CLSI Doc. M44-A2*, 29(17) (2009).
8. Jorgensen, J. H. & Ferraro, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1749–1755 (2009).
9. Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., Arts, J. J. C. & Habibovic, P. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 187–208 (2017). doi:10.1007/s10096-017-3089-2
10. Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibsouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **6**, 71–79 (2016).
11. Tietze, K. J. Review of Laboratory and Diagnostic Tests. *Clin. Ski. Pharm.* 86–122 (2012). doi:10.1016/B978-0-323-07738-5.10005-5

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

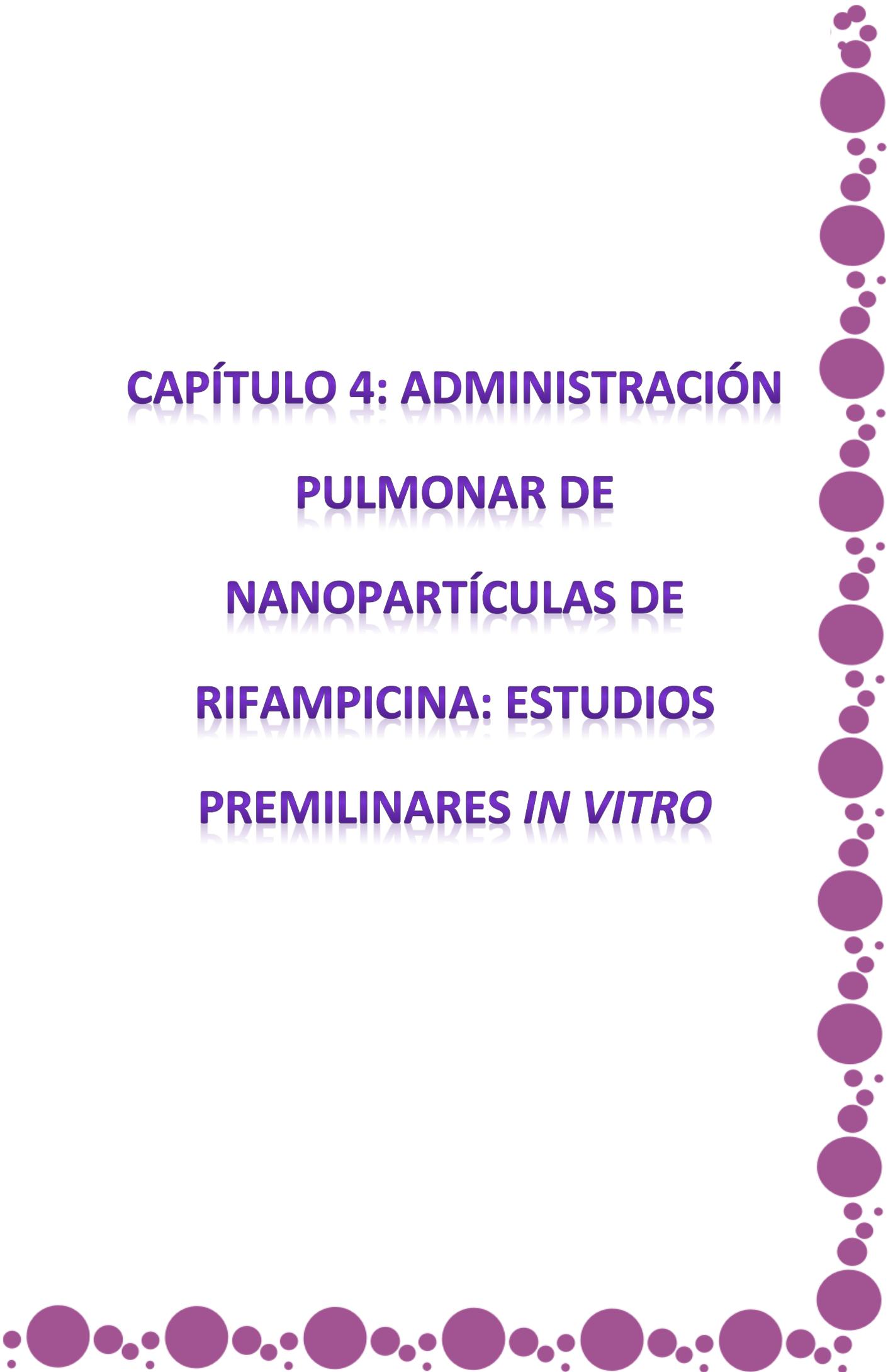
12. Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **3**, 163–175 (2008).
13. Scorzoni, L. *et al.* Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *J. Microbiol. Methods* **123**, 68–78 (2016).
14. Caleffi-Ferracioli, K. R., Maltempe, F. G., Siqueira, V. L. D. & Cardoso, R. F. Fast detection of drug interaction in Mycobacterium tuberculosis by a checkerboard resazurin method. *Tuberculosis* **93**, 660–663 (2013).
15. Syal, K. *et al.* Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics* **7**, 1795–1805 (2017).
16. NCCLS. M26-A. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. **19**, (1999).
17. Gould, S. B. Membranes and evolution. *Curr. Biol.* **28**, R381–R385 (2018).
18. Páez, P. L., Becerra, M. C. & Albesa, I. Impact of ciprofloxacin and chloramphenicol on the lipid bilayer of staphylococcus aureus: Changes in membrane potential. *Biomed Res. Int.* **2013**, (2013).
19. Bax, H. I. *et al.* The role of the time-kill kinetics assay as part of a preclinical modeling framework for assessing the activity of anti-tuberculosis drugs. *Tuberculosis* **105**, 80–85 (2017).
20. Yoshihara, K. *et al.* Bacterial adhesion not inhibited by ion-releasing bioactive glass filler. *Dent. Mater.* **33**, 723–734 (2017).
21. Egerton, R. F. *Physical principles of electron microscopy: An introduction to TEM, SEM, and AEM, second edition. Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM, Second Edition* (2016). doi:10.1007/978-3-319-39877-8
22. Tang, C. Y. & Yang, Z. *Transmission Electron Microscopy (TEM). Membrane Characterization* (Elsevier B.V., 2017). doi:10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5
23. Waters, J. C. & Wittmann, T. *Concepts in quantitative fluorescence microscopy. Methods in Cell Biology* **123**, (Elsevier Inc., 2014).

24. Adams, F. & Barbante, C. *Spectroscopic Imaging. Comprehensive Analytical Chemistry* **69**, (2015).
25. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy. Principles of fluorescence spectroscopy, Springer, New York, USA, 3rd edn, 2006.* (2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4
26. Ruedas-Rama, M. J., Walters, J. D., Orte, A. & Hall, E. A. H. Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: A review. *Anal. Chim. Acta* **751**, 1–23 (2012).
27. Wu, W., Tian, Z. & Li, A. D. Q. 3.25 Fluorescent Nanoparticles for Biological Imaging. *Compr. Biomater. II* **3**, 535–548 (2017).
28. Eucast. EUCAST DISCUSSION DOCUMENT E.Dis 5.1 Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**, 1–7 (2003).
29. CLSI, C. and L. S. I. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute* (2017).
30. Qin, Y., Lu, M. & Gong, X. Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell Biol. Int.* **32**, 224–228 (2008).
31. Malatesta, M. *et al.* Internalized chitosan nanoparticles persist for long time in cultured cells. *Eur. J. Histochem.* **59**, 17–21 (2015).
32. Malatesta, M. *et al.* Diaminobenzidine photoconversion is a suitable tool for tracking the intracellular location of fluorescently labelled nanoparticles at transmission electron microscopy.
33. Huh, A. J. & Kwon, Y. J. ‘Nanoantibiotics’: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J. Control. Release* **156**, 128–145 (2011).
34. Zorova, L. D. *et al.* Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* **552**, 50–59 (2018).
35. Zaw, M. T., Emran, N. A. & Lin, Z. Mutations inside rifampicin-resistance determining

Capítulo 3: Estudios de actividad antimicrobiana in vitro de nanopartículas poliméricas de rifampicina

- region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J. Infect. Public Health* (2018). doi:10.1016/j.jiph.2018.04.005
36. Hartmann, M. *et al.* Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3132–3142 (2010).
37. Bai, J. *et al.* In vitro and in vivo characterization of the antibacterial activity and membrane damage mechanism of quinic acid against Staphylococcus aureus. *J. Food Saf.* **38**, 1–9 (2018).
38. Ayala Valencia, G. Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. *Sci. Agroaliment.* **2**, 32–38 (2015).
39. Smitha, K. T., Nisha, N., Maya, S., Biswas, R. & Jayakumar, R. Delivery of rifampicin-chitin nanoparticles into the intracellular compartment of polymorphonuclear leukocytes. *Int. J. Biol. Macromol.* **74**, 36–43 (2015).
40. Eissa, A. M., Abdulkarim, A., Sharples, G. J. & Cameron, N. R. Glycosylated Nanoparticles as Efficient Antimicrobial Delivery Agents. *Biomacromolecules* **17**, 2672–2679 (2016).
41. Jayawardena, H. S. N., Wang, X. & Yan, M. Classification of lectins by pattern recognition using glyconanoparticles. *Anal. Chem.* **85**, 10277–10281 (2013).
42. Lis, H. & Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition[†]. *Chem. Rev.* **98**, 637–674 (1998).
43. Das Ghatak, P., Mathew-Steiner, S. S., Pandey, P., Roy, S. & Sen, C. K. A surfactant polymer dressing potentiates antimicrobial efficacy in biofilm disruption. *Sci. Rep.* **8**, 1–9 (2018).

**CAPÍTULO 4: ADMINISTRACIÓN
PULMONAR DE
NANOPARTÍCULAS DE
RIFAMPICINA: ESTUDIOS
PREMILINARES *IN VITRO***



CAPÍTULO 4: ADMINISTRACIÓN PULMONAR DE NANOPARTÍCULAS DE RIFAMPICINA: ESTUDIOS PREMILINARES IN VITRO

4.1. Introducción

En la última década ha habido un notable crecimiento en la investigación y aplicación de la nanotecnología que ha resultado en un interés por esclarecer su comportamiento en el organismo, tanto desde el punto de vista beneficioso, así como una preocupación generalizada sobre la potencial toxicidad de las NPs¹.

La vía pulmonar es una ruta deseable para la administración de sistemas nanoparticulados para tratar infecciones locales, tal como la TB, ya que permite un mayor tiempo de residencia de los sistemas de administración de fármacos en el pulmón, favoreciendo la liberación controlada local de los IFAs, así como, un transporte dirigido a sitios específicos como los MAs u otros. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las NPs se distribuyen a través del epitelio pulmonar son poco conocidos². Al pensar en una farmacoterapia por vía de administración pulmonar hay que tener en cuenta las características anátomo-fisiológicas del sitio de acción, las cuales fueron descritas en la sección 1.1.3.1. de este trabajo de Tesis.

4.1.1. Mucoadhesión

La **mucoadhesión** es la capacidad de uno o más compuestos de adherirse a la capa de gel de “mucus” que recubre las mucosas del organismo³. El “mucus” se encuentra revistiendo en forma de capa protectora principalmente los tractos gastrointestinal, respiratorio, vaginal y ocular⁴.

La capa de “mucus” que recubre el tracto respiratorio tiene una velocidad de recambio cada 10 a 20 minutos. Generalmente, las NPs que exhiben propiedades mucoadhesivas no pueden llegar a la profundidad del epitelio y se eliminan con la renovación del “mucus”⁵. Middleton y colaboradores realizaron importantes aportes

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

relacionados con la interacción de *Mtb* con la mucosa respiratoria. Estos autores realizaron un diseño experimental de cultivos de órganos construidos con tejido de cornete nasal humano, que fueron infectados con *Mtb*, y posteriormente fueron examinados mediante SEM. A partir de estos estudios, se descubrió que las micobacterias se adhieren principalmente a la matriz extracelular en áreas mucosales dañadas y al “mucus”⁶. Estos antecedentes resaltan la importancia del “mucus” como mecanismo protector frente al *Mtb*, permitiendo su eliminación con el aclaramiento mucociliar. Este escenario plantea la necesidad de que las NPs administradas por vía pulmonar no afecten las propiedades reológicas o de expansión del “mucus”, para conservar su rol en la inmunidad innata frente a esta infección.

Diversos trabajos de investigación demuestran que las NPs cargadas positivamente pueden entrecruzarse con las fibras de MUC, formando así complejos de NPs-MUC en estado de gel, lo cual puede inducir la formación de mucosidad altamente viscosa y obstaculizar la hidratación y la dispersión del “mucus”, dando lugar a un transporte mucociliar alterado en diversas mucosas epiteliales. El resultado de la acumulación de “mucus” viscoso que recubre el epitelio pulmonar podría exacerbar los síntomas de los individuos que presenten enfermedades infecciosas pulmonares y elevar las posibilidades de morbilidad en los sistemas pulmonares sanos^{5,7}. En este sentido, se investigaron las propiedades mucoadhesivas de los nuevos sistemas obtenidos en este trabajo de Tesis.

4.1.2. Reología

La reología es la ciencia que estudia la relación entre la deformación y el flujo de los materiales cuando son sometidos a un estrés. En tanto que, la reometría describe los métodos de medida e instrumentos que permiten obtener los datos reológicos de un material.

En esta área se deben definir algunos parámetros fundamentales:

- *Velocidad de deformación o cizallamiento ($\dot{\gamma}$):* es el gradiente de velocidad establecido en un fluido como resultado de un esfuerzo cortante aplicado. Se expresa en unidad s^{-1} .

- **Esfuerzo de corte (τ):** es el componente de la tensión que, fijado un plano, actúa tangencialmente al mismo. Es igual al vector de fuerza aplicada dividido por el área sobre la cual actúa la fuerza y se expresa en unidades de fuerza por unidad de área, Pa.

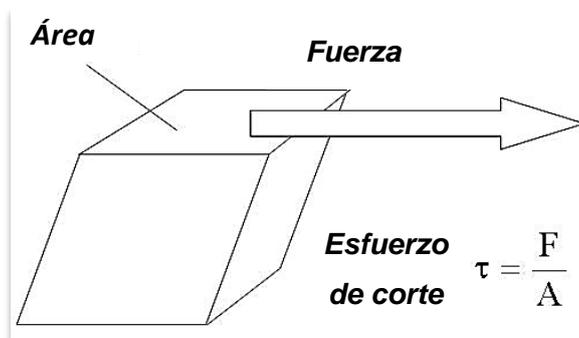


Figura 1.2. Representación gráfica del concepto de esfuerzo cortante.

- **Viscosidad dinámica (η):** Es la resistencia a fluir de un material. Se expresa en unidades de Pa.s ó mPa.s = cP.

Estos estudios permiten caracterizar las NPs en función de su estabilidad con respecto a la tendencia a aglomerarse, por otro lado, es una técnica útil para estudiar el comportamiento de las NPs en presencia de diferentes fases continuas, resultando una técnica complementaria a los estudios de bioadhesión^{8,9}.

4.1.3. Surfactante pulmonar

El **Surfactante Pulmonar (SP)** es un complejo de fosfolípidos, lípidos neutros y cuatro proteínas específicas (SP-A, SP-B, SP-C y SP-D) sintetizadas y secretadas por las células alveolares tipo-II, que tapizan la interfase aire-líquido del alveolo en los pulmones, disminuyendo su tensión superficial. El SP cumple un rol vital en la fisiología pulmonar. Sus funciones principales son:

- **Biofísicas:** Evita el colapso alveolar y la obstrucción bronquial durante la respiración normal o forzada.
- **Inmunológicas:** Protege a los pulmones contra injurias e infecciones causadas por la inhalación de partículas y microorganismos.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares *in vitro*.

4.1.4. Estudios de liberación *in vitro* de fármacos

La liberación de fármacos desde una formulación se refiere al proceso en el que los solutos de fármaco migran desde la posición inicial en el sistema polimérico a la superficie externa del polímero y luego al medio de liberación, generalmente soluciones tamponadas que simulan valores de pH de interés fisiológico.

Los estudios de liberación de fármacos *in vitro* consisten en dilucidar los mecanismos y la cinética por los cuales el fármaco es liberado desde los nuevos sistemas. Existen diferentes modelos matemáticos que permiten asociar los mecanismos de liberación, así como la cinética para las nuevas formulaciones¹⁰. Idealmente, un método de liberación *in vitro* debería simular condiciones *in vivo* para permitir formular hipótesis sobre los mecanismos de liberación de los IFAs desde sus formulaciones *in vivo*. Existen varios factores que pueden afectar directamente la cinética de liberación de fármacos desde la matriz en la cual se encuentra disperso. En la *Figura 4.1.* se resumen los principales^{11,12}.



Figura 4.1. Factores que repercuten en la cinética de liberación de fármacos.

4.1.5. Nanocitotoxicidad *in vitro*

Debido a las propiedades únicas que presentan los materiales nanoparticulados, principalmente su gran área superficial, fue necesario establecer una nueva disciplina para estudiar sus efectos en la salud y el ambiente, la **nanotoxicología**¹³. Este concepto se introdujo por primera vez en el año 2004, por Donalson y colaboradores, hace

referencia a una nueva rama de la toxicología que estudia los posibles efectos adversos causados por los nanomateriales, en busca de una contribución en el desarrollo nanotecnológico de manera sostenible y segura¹⁴.

Existen diversas técnicas para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de diferentes formulaciones¹⁵. Para este trabajo de Tesis se seleccionó un ensayo colorimétrico. El colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es un compuesto hidrofílico de color amarillo que se reduce a un compuesto hidrofóbico azul, formazán. La reducción metabólica de MTT es causada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, de esta manera se puede determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad de formazán producido¹⁶.

4.1.6. Cromatografía líquida de alta eficacia

Para la cuantificación de RIF en el interior celular se precisó de un método sensible y confiable que permitiera determinar IFAs en concentraciones muy bajas. La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography) es una técnica ampliamente utilizada para tal fin.

Existen directrices, tales como Food and Drug Administration (FDA)¹⁷ e International Council for Harmonisation (ICH)¹⁸, que establecen parámetros para desarrollar y validar métodos bioanalíticos para cuantificar fármacos por HPLC. A continuación se describirán los principales.

La **especificidad** o **selectividad** es la capacidad de un método de evaluar inequívocamente un analito en presencia de otros componentes. Por ejemplo: impurezas, productos de degradación, matriz biológica, etc.

La **linealidad** de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo determinado. La linealidad debe establecerse a lo largo del intervalo del procedimiento analítico por medio de un método estadístico apropiado (por ejemplo, cálculo de regresión por cuadrados mínimos). Los datos obtenidos a partir de la mejor recta, pueden ser útiles para estimar matemáticamente el grado de linealidad. Deben

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

informarse el coeficiente de determinación, la pendiente y el intercepto de la recta de regresión:

- El coeficiente de determinación, r^2 , se calcula para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto y su valor debe tender a 1 para cumplir con la linealidad.
- La pendiente, **a**, es un parámetro indicativo de la sensibilidad del método.
- La ordenada al origen, **b**, se determina para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse a un error aleatorio¹⁹.

La **sensibilidad** del método se describe teniendo en cuenta los parámetros Límite de detección (**LD**) y Límite de cuantificación (**LC**).

- El LD de un procedimiento analítico individual, es la cantidad más baja de analito que puede detectarse en una muestra, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas.
- El LC de un procedimiento analítico individual, es la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas.

Ambos parámetros pueden determinarse por el análisis de muestras con concentraciones conocidas del analito y estableciendo el mínimo nivel al cual dicho analito puede ser detectado o cuantificado en forma confiable, según corresponda.

La **exactitud**, también conocida como error sistemático, hace referencia a la proximidad entre un valor medido en relación al valor real. Se calcula como el porcentaje de recuperación obtenido a partir de la valoración de una cantidad agregada conocida del analito en la muestra, para tres niveles de concentraciones (baja, media y alta) (*Ecuación 4.1*)

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Concentración observada}}{\text{Concentración esperada}} \times 100$$

Ecuación 4.1.

La **precisión** de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo múltiple de la misma muestra homogénea en las condiciones descriptas. La precisión

puede considerarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

- La **repetibilidad** expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación durante un corto intervalo de tiempo. La repetibilidad también se denomina precisión intra-día.

- La **precisión intermedia** expresa las variaciones dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.

- La **reproducibilidad** expresa la precisión entre los laboratorios (estudios colaborativos, generalmente aplicados a la estandarización de la metodología).

La precisión de un procedimiento analítico generalmente se expresa como el coeficiente de variación de una serie de mediciones (*Ecuación 4.2*).

$$CV (\%) = \frac{DE}{Promedio} \times 100$$

Ecuación 4.2.

La **estabilidad** del fármaco es función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas del IFA, la matriz biológica o medio de disolución y el recipiente donde se guarda la muestra. Se debe evaluar la estabilidad del analito durante la recolección y manipulación de las muestras, después del almacenamiento a largo plazo (congelamiento y temperatura de almacenamiento prevista) y corto plazo (temperatura ambiente). Las condiciones utilizadas en los experimentos de estabilidad deben reflejar las situaciones que puedan ocurrir durante la manipulación y el análisis de las muestras.

4.1.7. Inmunofluorescencia

La microscopía de fluorescencia fue ampliamente descrita en la sección 3.1.8. de este trabajo de Tesis. Es relevante destacar que este tipo de microscopía ha sido un gran aporte para el estudio del tráfico intracelular de nuevos sistemas transportadores, a través de la técnica de inmunofluorescencia²⁰.

La inmunofluorescencia es una técnica en la cual se utilizan anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente y permite marcar inequívocamente

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares *in vitro*.

diferentes compartimentos o estructuras de una célula, por ejemplo, faloidina (Fd). Fd es una micotoxina, perteneciente al grupo de las falotoxinas producida por el hongo *Amanita phalloides* y posee la capacidad de unirse específicamente a las fibras de actina. Si Fd se conjuga con un marcador fluorescente, tal como la rodamina (Rd), se obtiene un anticuerpo primario: rodamina-faloidina (Rd-Fd), y esto permitirá visualizar por microscopía de fluorescencia el citoesqueleto de las células²¹. Mediante la inmunofluorescencia también se pueden teñir otros compartimentos de las células, por ejemplo, se puede utilizar Rd-Fd en combinación con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Este compuesto (anticuerpo secundario) es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN, por lo tanto, permite observar con una fuerte coloración azul el núcleo de las células²².

4.2. Materiales y métodos

Para indagar sobre el comportamiento de las NPs desarrolladas en este trabajo de Tesis, como sistemas de transporte para administrarse a través de la vía pulmonar, se realizaron diferentes ensayos *in vitro* en líneas celulares de pulmón. Los estudios *in vitro* con líneas celulares son ampliamente utilizados para investigar acerca de posibles interacciones, mecanismos, efectos citotóxicos, entre otros, de nuevos materiales y las células. Para el crecimiento celular adecuado se deben simular las condiciones fisiológicas, para esto se debe seleccionar un medio de cultivo adecuado, que aporte los nutrientes necesarios. Para este trabajo de Tesis se utilizó como medio de cultivo "Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)". DMEM es un medio de cultivo muy versátil, que permite el crecimiento de un amplio espectro de células eucariotas. Por otro lado, es necesaria la adición de factores de crecimiento y hormonas. El suero fetal bovino (SFB) es un complemento que se utiliza frecuentemente con dicho fin. Además, se deben agregar inhibidores del crecimiento de microorganismos para evitar la contaminación de los cultivos ya que esto puede interferir en los resultados obtenidos²³.

Materiales utilizados:

- Para los estudios de mucoadhesión se utilizó MUC tipo III, obtenida de estómago de cerdo (Sigma-Aldrich®, EE.UU.), fue adquirida en Merck, Buenos Aires, Argentina.
- Para el estudio de la interacción de las NPs con SP se utilizó el producto “extracto de lavado bronquio-alveolar bovino en solución clorofórmica”, PROSURF-B®. Donado por Nialtec S.A., Buenos Aires, Argentina.
- La rifamicina empleada fue de la marca Parafarm®, adquirida en Todo Droga, Córdoba, Argentina
- Todos los experimentos de cuantificación mediante HPLC se realizaron con metanol grado HPLC marca Sintorgan®, adquirido por Proveduría Científica, Río Tercero, Córdoba, Argentina.
- Los reactivos químicos fueron de grado analítico o superior y se utilizaron sin una purificación adicional.
- El agua utilizada en todos los estudios fue producida con un sistema de purificación Milli-Q (Millipore®, Bedford, MA).

Equipos utilizados:

- Evaporador rotatorio BÜCHI Rotavapor R-114, México.
- Incubador Sanyo CO₂ incubator MCO-18-AIC(UV), Japón. Condiciones de trabajo: 37 °C, atmósfera 5 % CO₂ y 95 % humedad.
- Microcentrifuga Giumelli® Z-127-D, Buenos Aires, Argentina.
- Cromatografo Jasco®, equipado con una bomba cuaternaria y un detector de longitud de onda múltiple Jasco® UV-2077 Plus.

4.2.1. Estudio de las propiedades mucoadhesivas de las nanopartículas

Las propiedades mucoadhesivas de estos nuevos sistemas nanotransportadores fueron evaluadas mediante diferentes técnicas *in vitro*, las cuales se describen a continuación.

4.2.1.1. Método de la partícula de mucina

Para realizar este ensayo se preparó una solución de MUC 0,04 % p/v en PBS a pH 6,8, la cual se dejó toda la noche bajo agitación constante y a temperatura ambiente

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

para facilitar una adecuada homogenización. Por otra parte, se obtuvo el polvo liofilizado de las NPs vacías y NPs cargadas con RIF. Se resuspendió 1 mg de polvo liofilizado de NPs vacías y 1 mg de polvo liofilizado de NPs cargadas con RIF en 1 mL de solución de MUC. Por otro lado, se preparó una suspensión conteniendo 1 mg de NPs vacías y otra 1 mg de NPs cargadas con el IFA, en 1 mL de PBS pH 6,8. También, se preparó una muestra conteniendo 1 mL de la solución de MUC, la cual se utilizó como control. Las suspensiones obtenidas se colocaron en un agitador orbital a 180 rpm durante 30 min a 37 °C. Finalmente, se realizaron mediciones de ζ , diámetro hidrodinámico e IPD mediante DLS de todas las muestras preparadas.

4.2.1.2. Reometría

Las propiedades reológicas de las soluciones acuosas de ALG 0,06 % p/v, QUIT 0,05 % p/v y las suspensiones acuosas de las NPs vacías y de las NPs cargadas con RIF al 0,06 % p/v, MUC a las concentraciones de 1 y 3 % p/v y las mezclas obtenidas por la combinación de las NPs con MUC, se estudiaron con un Reómetro Rheoplus MCR 301. Los estudios se realizaron utilizando una geometría cono plato (CP50-1) con un diámetro de 49,956 mm, un ángulo de cono de 1,006 ° y un truncamiento de 50 μ m. Las mediciones en el estado estacionario se llevaron a cabo en el rango de velocidad de corte de 0,001 -10.000 s^{-1} .

Las muestras de las mezclas entre NPs y MUC se prepararon combinando cantidades iguales de las NPs vacías o cargadas con RIF con MUC al 1 y 3 % p/v, las cuales se estabilizaron en un agitador orbital a 180 rpm durante 30 min y se evaluaron las siguientes temperaturas: 25, 34 y 37 °C.

4.2.1.3. Microscopía electrónica de barrido

Para realizar este ensayo se preparó una suspensión de MUC en una concentración de 0,04 % p/v en PBS a pH 6,8, la cual se dejó toda la noche con agitación constante y a temperatura ambiente para facilitar una adecuada homogenización. Por otra parte, se prepararon las NPs cargadas con RIF y se obtuvo el polvo liofilizado de las mismas.

Se resuspendió 1 mg del polvo liofilizado de las NPs RIF en 1 mL de PBS y luego, se combinaron cantidades iguales de la suspensión de MUC y las NPs RIF (NPs RIF + MUC),

se dejó equilibrar esta mezcla por 24 h, en un agitador orbital a 180 rpm y a una temperatura de 37 °C. Las muestras de la suspensión de MUC, utilizada como control, y de la suspensión de NPs RIF + MUC se estudiaron por SEM, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.2.7.

4.2.1.4. Espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier

Para evaluar si existen grupos involucrados en las interacciones entre MUC y las NPs, se obtuvieron los espectros de FTIR de MUC, NPs vacías, NPs RIF sin y con MUC (liofilizadas) y las respectivas MFs, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.2.3. de este trabajo de Tesis.

4.2.2. Estudio de las interacciones entre las nanopartículas y el surfactante pulmonar

Para obtener el SP en estado sólido, se evaporó el cloroformo de la solución de PROSURF-B® en evaporador rotatorio a 25 °C. El residuo evaporado se dispersó en una solución de NaCl 0,85 % p/v bajo agitación durante 3 h y a una temperatura de 50 °C. Por otra parte, se prepararon, por triplicado, muestras de SP combinado con las NPs vacías y con las NPs RIF. Se utilizó la dispersión de SP en NaCl como control. Las muestras obtenidas se dejaron en un baño termostatzado a 37 °C con agitación constante, durante diferentes periodos de incubación, 5 y 24 h. Posteriormente, las muestras fueron analizadas por su tamaño, IPD y ζ mediante DLS y a nivel microscópico por SEM.

Para obtener las muestras para su posterior análisis por SEM en primer lugar se combinaron cantidades iguales de una dispersión de SP en NaCl 0,85 % p/v con NPs vacías y NPs RIF preparadas en NaCl 0,85 % p/v. Se incubaron las muestras en un baño termostatzado a 37 °C, con agitación constante, durante 24 h. Finalmente, las muestras se acondicionaron siguiendo el procedimiento descrito en 3.2.7.

4.2.3. Estudios de liberación *in vitro* de rifampicina

Para este estudio se prepararon muestras sólidas de RIF y NPs RIF, conteniendo una cantidad equivalente de RIF, las cuales se resuspendieron en 2 mL de soluciones

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares *in vitro*.

tamponadas preparadas a diferentes valores de pH (acetato de sodio 50 mM pH 5,5 y fosfato de sodio monobásico 50 mM a valores de pH de 6,8 y 7,4) y se colocaron en los compartimientos donador de una celda de difusión horizontal de Franz (Figura 4.2.) en condiciones de sumidero (10% de saturación). Los compartimientos receptores de las celdas contenían las soluciones tamponadas sin RIF ni NPs RIF. Se colocó una membrana de diálisis (Sigma-Aldrich®, EE. UU.) compuesta por celulosa regenerada (MWCO 12-14 kDa) entre los compartimientos de la celda de difusión de Franz. A diferentes tiempos predeterminados, se tomaron alícuotas de 1 mL del compartimiento receptor y el mismo volumen extraído se reemplazó con la solución

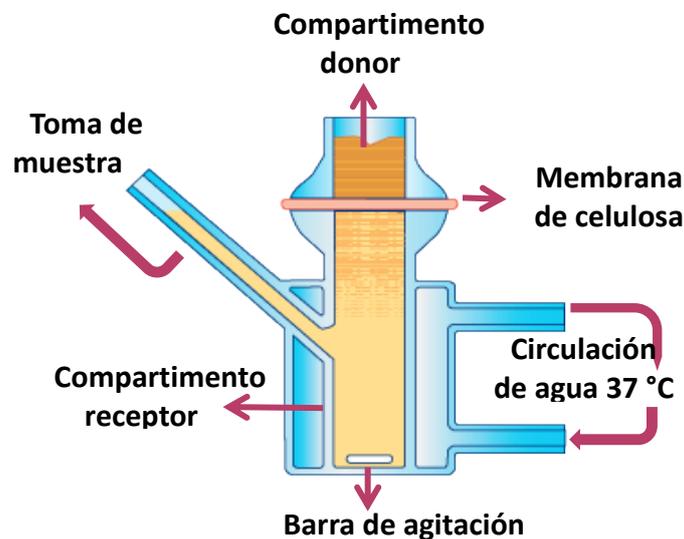


Figura 4.2. Esquema de celda de Franz vertical.

tamponada correspondiente para mantener constante el volumen del compartimiento receptor de la celda de difusión. Las muestras se analizaron usando un espectrofotómetro UV-vis a $\lambda = 334$ nm (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis®) y luego se graficó el promedio del porcentaje acumulado de fármaco liberado en función del tiempo. El ensayo se realizó por triplicado.

4.2.4. Estudio de estabilidad en medio de cultivo

Previo a la realización de los ensayos en cultivos celulares *in vitro* se procedió a determinar la estabilidad de las NPs en el medio de cultivo a utilizar: DMEM (Sigma-Aldrich®, EE. UU.), suplementado con SFB (Gibco®, EE.UU), para lo cual se siguió el siguiente procedimiento experimental.

Se resuspendieron 5 mg de polvo liofilizado de NPs RIF y NPs vacías en 5 mL de DMEM suplementado con dos concentraciones de SFB: 1 y 10 % v/v. Las NPs se incubaron a 37 °C durante 24 h. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a realizar una inspección visual (para comprobar la ausencia o presencia de agregados) y luego mediante DLS se determinó el ζ , tamaño e IPD de las suspensiones resultantes.

4.2.5. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

La toxicidad celular *in vitro* de las NPs se evaluó mediante el ensayo MTT en 3 líneas celulares: células epiteliales de riñón de mono verde (VERO), fibroblastos humanos de pulmón (MRC5) y células humanas de epitelio basal alveolar de carcinoma de pulmón (A549). Las células se cultivaron en DMEM, suplementado con 10 % v/v de SFB, 4 mM de L-glutamina (Gibco®, EE. UU.), 4 mM de piruvato sódico (Sigma-Aldrich®, EE. UU.) y 10.000 UI/mL de penicilina/estreptomicina con una densidad celular por pocillo de 10.000 (~ 80% de confluencia), a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5%, con un 95% de humedad. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos.

Se preparó una solución de RIF y dispersiones de las NPs RIF y las NPs vacías en DMEM con SFB al 10 % v/v. Se extrajo el medio de cultivo y se añadieron 100 μ L/pocillo de cada tratamiento a las células, los cuales tuvieron concentraciones finales que variaban de 5 a 400 μ g/mL de RIF y se incubaron durante 5 y 24 h (*Figura 4.3*). Luego, las células se lavaron dos veces con 100 μ L de solución tamponada pH 7,4 precalentada a 37 °C. A continuación, se añadió MTT preparado en solución tamponada con una concentración de 250 μ g/mL y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. La sal violeta de formazan se solubilizó en 200 μ L/pocillo de isopropanol y finalmente, se midió la absorbancia a una λ de 560 nm en un lector espectrofotométrico de placas. Los datos se expresaron como porcentaje de viabilidad celular con respecto al control.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

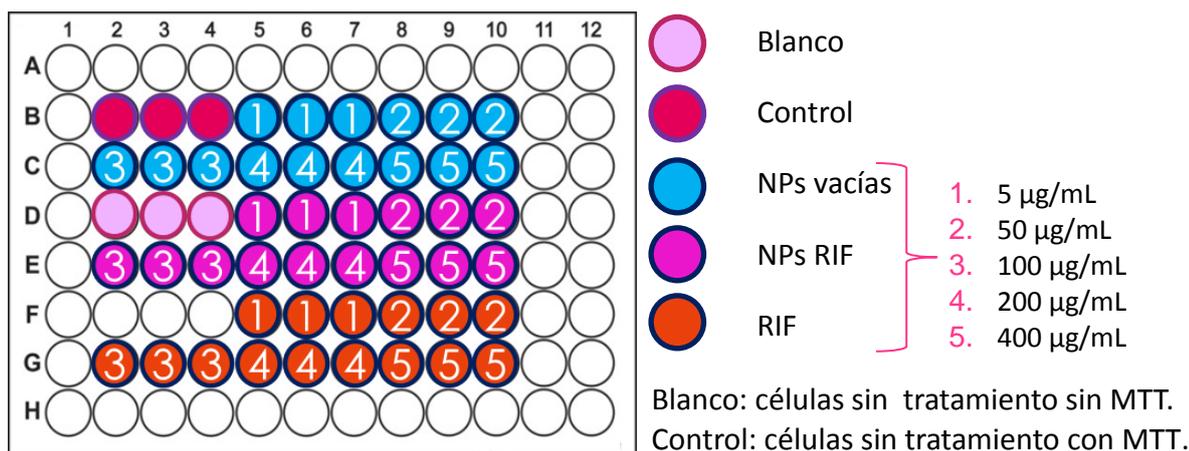


Figura 4.3. Esquema de tratamientos en placa multiwell de 96 pocillos para ensayo MTT en líneas celulares: VERO, MRC5 y A549.

Estos ensayos se realizaron en colaboración con:

Dra. Mariela Sanchez-Borzzone, Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT), CONICET, Cátedra de Química Biológica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias de Exactas, Físicas y Naturales, UNC. Con la Dra. Sanchez-Borzzone se trabajó con la línea celular VERO y en este caso se utilizó como solución tamponada pH 7,4: HEPES, la marca del medio de cultivo utilizado fue: Sigma-Aldrich®, EE. UU., SFB: PAA, Austria, lector espectrofotométrico de placas: Thermo Scientific, EE. UU.

Dra. Melina Musri,. Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC), CONICET. Con la Dra. Musri se trabajó con las líneas celulares MRC5 y A549 y en este caso se utilizó como solución tamponada pH 7,4: PBS, la marca del medio de cultivo utilizado fue: Gibco®, EE. UU., SFB Gibco®, EE.UU., y el lector espectrofotométrico de microplacas: BioTek® EL800, EE. UU.

Todos los pasos de los ensayos fueron realizados en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar, en sala de cultivo celular y con el material de trabajo previamente esterilizado por autoclave o comercializado estéril, como en el caso de material descartable como las placas o pipetas serológicas. El último paso del procedimiento (adición de isopropanol y lectura de las absorbancias), se realizó fuera de la sala de cultivo celular ya que no se requirió esterilidad.

4.2.6. Ensayo de internalización celular de rifampicina

4.2.6.1. Validación del método por cromatografía líquida de alta resolución

Para validar el método analítico de HPLC para cuantificar RIF en el ensayo de internalización celular se determinaron las variables recomendadas por las guías ICH y FDA mencionadas en la sección 4.1.6. de este *Capítulo*.

La cuantificación de RIF se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficacia Jasco, utilizando una columna C18 de fase reversa Restek de 15 cm x 4,5 mm x 5 µm, con una precolumna C18 Phenomenex y aplicando las condiciones cromatográficas que se describen a continuación. La fase móvil utilizada fue metanol:buffer fosfato 15 mM pH 7, en una proporción 60:40. El flujo fue de 0,8 mL/min, el volumen de inyección de 15 µL y la columna se mantuvo termostata a 30 °C. Se utilizó como estándar interno (EI) rifamicina (RIM), en una concentración constante de 17,05 µg/mL. El tiempo de adquisición fue de 5 minutos y la longitud de onda a la cual se realizó la cuantificación del analito y el EI fue de 334 nm. Se adicionó un estabilizante para prevenir la oxidación de RIF y RIM, en este caso, una solución de ASC en PBS a una concentración 50 µg/mL²⁴.

En primer lugar, se evaluó la **selectividad** del método analítico propuesto. Para este fin se prepararon por triplicado 5 muestras individuales: una contenía únicamente DMEM, otra RIM en PBS, otra RIF en PBS, otra ASC en PBS y finalmente se preparó una muestra conteniendo los cuatro componentes juntos. También se realizó lo mismo con el buffer de lisis celular en reemplazo de DMEM (ver composición en sección 4.2.6.2.). Todas las muestras fueron inyectadas, 5 veces cada una, y se corroboró que el método sea selectivo para cada uno de los componentes presentes en la muestra (medio de cultivo DMEM o buffer de lisis, RIM, RIF y ASC).

La curva de calibrado se realizó en buffer de lisis ya que en el ensayo de internalización los “pellets” de las muestras obtenidos serán resuspendidos en el mismo, se utilizaron 14 datos, por triplicado, en un rango de concentraciones entre 0,27 y 272,3 µg/mL de RIF, y una concentración constante de 17,05 µg/mL de RIM, añadiendo a todas las muestras 20 µL de la solución de estabilizante.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

Para evaluar la **linealidad** se realizó la regresión lineal de la curva de calibrado de los datos obtenida graficando $\frac{\text{Área analito}}{\text{Área EI}}$ en función de $\frac{\text{Concentración analito } (\mu\text{g/mL})}{\text{Concentración EI } (\mu\text{g/mL})}$. Además, se determinó la **sensibilidad** del método mediante la dilución de muestras de concentración conocida hasta obtener el **LC** y **LD**.

Con el fin de determinar la **precisión** y la **exactitud** del método analítico propuesto, se seleccionaron tres concentraciones de RIF: baja: 1,36 $\mu\text{g/mL}$, media: 109,09 $\mu\text{g/mL}$ y alta: 272,73 $\mu\text{g/mL}$, y se mantuvo constante la concentración de EI, RIM en 17,05 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras se prepararon y acondicionaron como se mencionó anteriormente, en buffer de lisis y añadiendo la solución de ASC. Se realizaron 5 inyecciones consecutivas de cada una de ellas.

En primer lugar, se calculó el promedio de los valores correspondientes a las relaciones de áreas RIF/RIM y sus respectivas DEs, con estos datos se calculó el coeficiente de variación (CV), utilizando la *Ecuación 4.2*. Como se mencionó anteriormente en la sección 4.1.6., el CV nos permite determinar si el método cumple con la **precisión inter e intra día**.

Para calcular la **exactitud** la concentración de RIF se determinó a partir de las áreas obtenidas a los 3 niveles de concentración (alto, medio y bajo) y la concentración esperada. Para obtener el valor de exactitud en porcentaje se aplicó la *Ecuación 4.1*.

Debido a que las muestras se sometieron a un ciclo de congelación y descongelación, se procedió a evaluar la estabilidad de las mismas en las condiciones del ensayo de internalización. Se prepararon 3 muestras, a los 3 niveles de concentración mencionados anteriormente y se procedió a realizar su cuantificación por HPLC con el método validado a fin de obtener la concentración inicial. Luego las muestras se almacenaron en tubos "Eppendorf" de 1,5 mL a - 4 °C resguardadas de la luz, se sometieron a 3 ciclos de congelado/descongelado y se cuantificó la cantidad de RIF y RIM en cada uno de los ciclos. Con los datos obtenidos se procedió a calcular el porcentaje de recuperación según la *Ecuación 4.1*. a fin de determinar si las muestras cumplen con lo establecido por las guías FDA, ICH^{17,18}.

4.2.6.2. Cuantificación del contenido de rifampicina intracelular

Se cuantificó el contenido intracelular de RIF en las líneas celulares A549 y MRC5, para esto sembraron 40.000 células por pocillo suspendidas en DMEM suplementado con 10 % v/v de SFB en placas de 24 pocillos. Se incubó 24 h en un incubador (Sanyo CO₂ incubator) para que las células se adhieran a la placa y alcancen aproximadamente un 80 % de confluencia. Pasado este tiempo, se extrajo el medio de cultivo y se colocaron 500 µL por pocillo de cada tratamiento, 5 y 50 µg/mL según el esquema presentado en la *Figura 4.4*. Las placas se colocaron en el incubador durante 24 h. Luego, se extrajo cada tratamiento y se lavó dos veces con 500 µL de PBS estéril. Paralelamente a esto, se conservaron las muestras de los tratamientos incubados con las células y el control para ser luego medidos mediante DLS. Se adicionaron 200 µL de tripsina (TPS) 1X a las células adheridas y luego de incubar aproximadamente 5 min a 37 °C, se controló que las células se hayan despegado de la placa y se procedió a inactivar TPS con DMEM. De este modo se obtuvieron las células en suspensión, las cuales se centrifugaron a 2.000 rpm, 5 min y luego se realizó el recuento de las células viables con azul de tripán en cámara de Neubauer. Se realizaron dos ciclos de centrifugación a 2.000 rpm durante 5 min, realizando lavados con PBS para eliminar el medio de cultivo. Los “pellets” del segundo ciclo de lavado se resuspendieron en buffer de lisis, compuesto por: Tris HCl 25 mM pH 7,4, tritón 1 % v/v, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 8 y glicerol 5 % v/v y se centrifugaron a 8.000 rpm durante 5 min. Luego se filtraron los sobrenadantes con jeringas de tuberculina y portafiltros conteniendo una membrana de 0,45 µm. Para la preparación de las muestras se colocaron 150 µL de sobrenadante previamente filtrado, 50 µL de solución de RIM con una concentración constante de 17,05 µg/mL y 20 µL de solución de ASC 50 µg/mL en insertos de vidrio Agilent® dentro de viales Agilent® color ámbar y luego fueron cuantificadas por HPLC con el método previamente validado.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

Se calculó la cantidad de RIF intracelular utilizando la ecuación de la regresión lineal del método analítico previamente validado, normalizada por el número de células viables y la misma se expresó como la cantidad de RIF en $\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células.

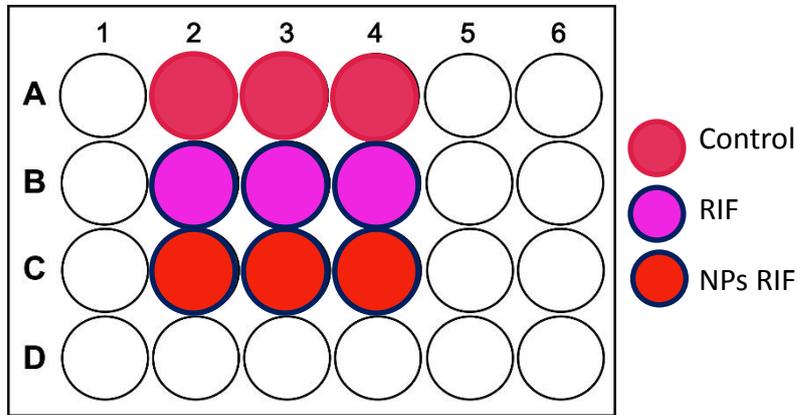


Figura 4.4. Esquema de plaqueo del ensayo de cuantificación de RIF intracelular en células MRC5 y A549.

4.2.6.3. Estudio cualitativo de la estabilidad química de rifampicina

A partir del ensayo realizado en la sección anterior, se determinó cualitativamente la estabilidad química de RIF con el fin de investigar si las NPs ejercen un efecto protector de la degradación del IFA cuando el mismo se expone, durante 24 h, al entorno celular. Para evaluar este efecto se expusieron muestras de una concentración conocida de RIF durante 24 h a 25 °C y resguardadas de la luz (excepto para las muestras destinadas al estudio de la fotosensibilidad de RIF), a diferentes factores agresivos (fotosensibilidad, oxidación e hidrólisis catalizada por ácidos y/o bases) para dilucidar si el método de HPLC validado en la sección 4.2.6.1. permitiría detectar productos de degradación.

Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

- Fotosensibilidad: se preparó una muestra de RIF en buffer PBS pH 7 y la misma se expuso durante 24 h a luz visible.
- Oxidación: se preparó una solución de RIF en H_2O_2 30 % v/v, pH 7.
- Hidrólisis ácida: se preparó una solución de RIF en HCl 0,1 M, pH 2.

- Hidrolisis básica: se preparó una solución de RIF en NaOH 0,1 M, pH 12.
- Control: se preparó una solución de RIF en PBS pH 7, con adición de ASC.

Las muestras se colocaron en viales color ámbar conteniendo insertos de 250 μL y a cada una se le agregaron 20 μL de una solución acuosa de ASC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se procedió a analizar las mismas mediante HPLC por el método descrito en la sección 4.2.6.1. Luego se analizaron cualitativamente los cromatogramas obtenidos por HPLC, para detectar la presencia o ausencia de productos de degradación en las muestras analizadas. Finalmente, se compararon los cromatogramas obtenidos en el ensayo 4.2.6.2, tanto para RIF como para las NPs RIF, a fin de determinar la existencia o ausencia de productos de degradación al encontrarse en contacto con las células (A549 y MRC5). Todos los estudios se realizaron por triplicado.

4.2.7. Estudios in vitro de internalización celular de las nanopartículas obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia

Para preparar las muestras para microscopía en primer lugar las células fueron sembradas en cubreobjetos redondos de 12 mm en placas de 24 pocillos. El procedimiento se realizó en área estéril bajo campana de flujo laminar, los cubreobjetos se manipularon usando pinzas metálicas rociadas con etanol 70 °. Luego se embebieron en alcohol 70 ° y se flamearon utilizando un mechero, se dejaron enfriar un segundo y posteriormente se colocó un cubreobjeto por pocillo en la placa. Se colocaron 200 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de una solución de gelatina en PBS 0,2 % p/v, se realizó presión suavemente con la punta de un tip en cada vidrio para favorecer su fijación a la placa, se dejó reposar 15 min y luego la solución de gelatina fue reemplazada por una suspensión de células MRC5 y A549 en DMEM suplementado con 10 % v/v de SFB, con una densidad de 40.000 células por pocillo y se incubó durante 24 h.

Una vez fijadas las células a los cubreobjetos, se realizaron los diferentes tratamientos, los cuales son representados en la *Figura 4.5*, utilizando como controles las líneas celulares (A549 y MRC5) sin NPs-FITC y las NPs-FITC sin células. Se incubó la

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

placa durante 24 h. Las muestras de NPs-FITC fueron preparadas según el protocolo descrito en el *Capítulo 3 sección 3.2.9*.

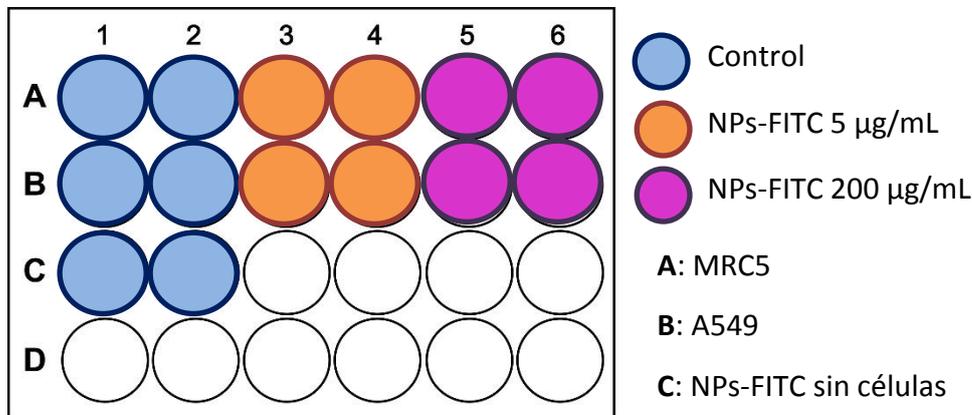


Figura 4.5. Esquema de plaqueo del ensayo de internalización de NPs RIF en células MRC5 y A549.

Finalizado el tiempo de incubación, se procedió a realizar la **técnica de inmunofluorescencia** para poder observar las muestras de células y NPs en el microscopio de fluorescencia. El procedimiento consistió en una serie de pasos, los cuales se describen a continuación: en primer lugar se realizó la **fijación** de las células, para esto se removió el medio de cultivo y se lavó dos veces con PBS. Luego, se adicionó paraformaldehído (PFD) en solución tamponada (PBS) en una concentración de 3,7% v/v y se dejó actuar por 10 min a 4 °C. Pasado este tiempo, se procedió al siguiente paso que consistió en la **permeabilización**. Para esto se extrajo el PFD, se lavó dos veces con PBS, y se adicionaron 150 µL de la solución permeabilizante (0,2 % v/v tritón x100 y 3 % v/v de albúmina de suero bovino (BSA, según sus siglas en inglés bovine serum albumin) en PBS durante 10 minutos. Se extrajo la solución permeabilizante y se lavó dos veces con 150 µL de la solución de lavado (0,1 % tween 20 y 0,2 % de BSA en PBS). Posteriormente, se adicionó la solución del **anticuerpo primario** (Rd-Fd) preparada en la misma solución de lavado y se incubó durante 1 h protegiendo las muestras de la luz. Se lavó 5 veces con 150 µL de la solución de lavado. A continuación se adicionó el **anticuerpo secundario** (DAPI) y se incubó durante 15 minutos en oscuridad. Se lavó 5 veces con 150 µL de la solución de lavado. Finalmente,

se depositaron 10 μ L de medio de montaje anhidro (DPX, FlukaTM, Alemania) en el portaobjeto y se colocó rápidamente el cubreobjeto con las células hacia abajo.

Los preparados fueron preservados en oscuridad, y se almacenaron a 4 °C durante 24 h. Posteriormente, fueron observados en el microscopio confocal de fluorescencia FV 300, con un objetivo de inmersión en aceite de 60x. Se utilizó un láser de λ de 405 nm, 488 nm y 543 nm para excitar las muestras y un filtro de barrera de λ establecidas a 470 nm, 530 nm y 578 nm para detectar DAPI, Rd-Fd y FITC, respectivamente.

4.2.8. Análisis estadístico de los datos

Para este trabajo de Tesis se emplearon dos métodos para realizar el análisis estadístico de los datos.

Uno de los análisis estadísticos realizados fue el **test-t de Student**. En este test, se rechaza la hipótesis nula (H_0) cuando el valor de probabilidad (p-valor) es menor al nivel de significancia elegido. Es decir, si se trabaja con un 95% de confianza, p-valor es igual a 0,05. H_0 plantea que no hay diferencia entre las muestras comparadas. Por lo tanto, se considera que una diferencia es estadísticamente significativa cuando se cumple que el p-valor es menor a 0,05.

También se realizó **ANOVA de un factor**. El ANOVA sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. Se trata, por lo tanto, de una generalización de una prueba t para dos muestras independientes en el caso de diseños con más de dos muestras. La hipótesis que se pone a prueba en el ANOVA es que las medias poblacionales son iguales. La estrategia para poner a prueba la hipótesis de igualdad de medias consiste en obtener un estadístico, llamado F, que refleja el grado de parecido existente entre las medias que se están comparando. El valor de la distribución F es conocido y está tabulado; si este estadístico de contraste supera cierto valor crítico (F crítico), las diferencias entre las medias muestrales son estadísticamente significativas

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Estudio de las propiedades mucoadhesivas de las nanopartículas

4.3.1.1. Método de la partícula de mucina

En la *Figura 4.6.* se exhiben los resultados de tamaño, IPD y ζ de las NPs, vacías y cargadas con RIF, en presencia de MUC. No se observaron modificaciones en el ζ ni en el tamaño de las partículas de MUC al ponerse en contacto con las NPs, tanto vacías como cargadas con RIF (*Figura 4.6.A.*) en comparación con las partículas de MUC sola, indicando que estos componentes no interaccionan entre sí. Esto podría deberse a que las NPs poseen una carga neta total negativa, lo cual no favorece que se produzcan interacciones electrostáticas entre las NPs y los grupos ionizados de MUC.

Estos resultados indican que las NPs no interaccionan electrostáticamente con la MUC. Sin embargo, la mucoadhesión pueden deberse a otro tipo de interacciones, no solo electrostáticas, tales como enlaces puente hidrógeno o covalentes. Por lo tanto, se procedió a complementar los estudios de las propiedades mucoadhesivas con otras técnicas complementarias.

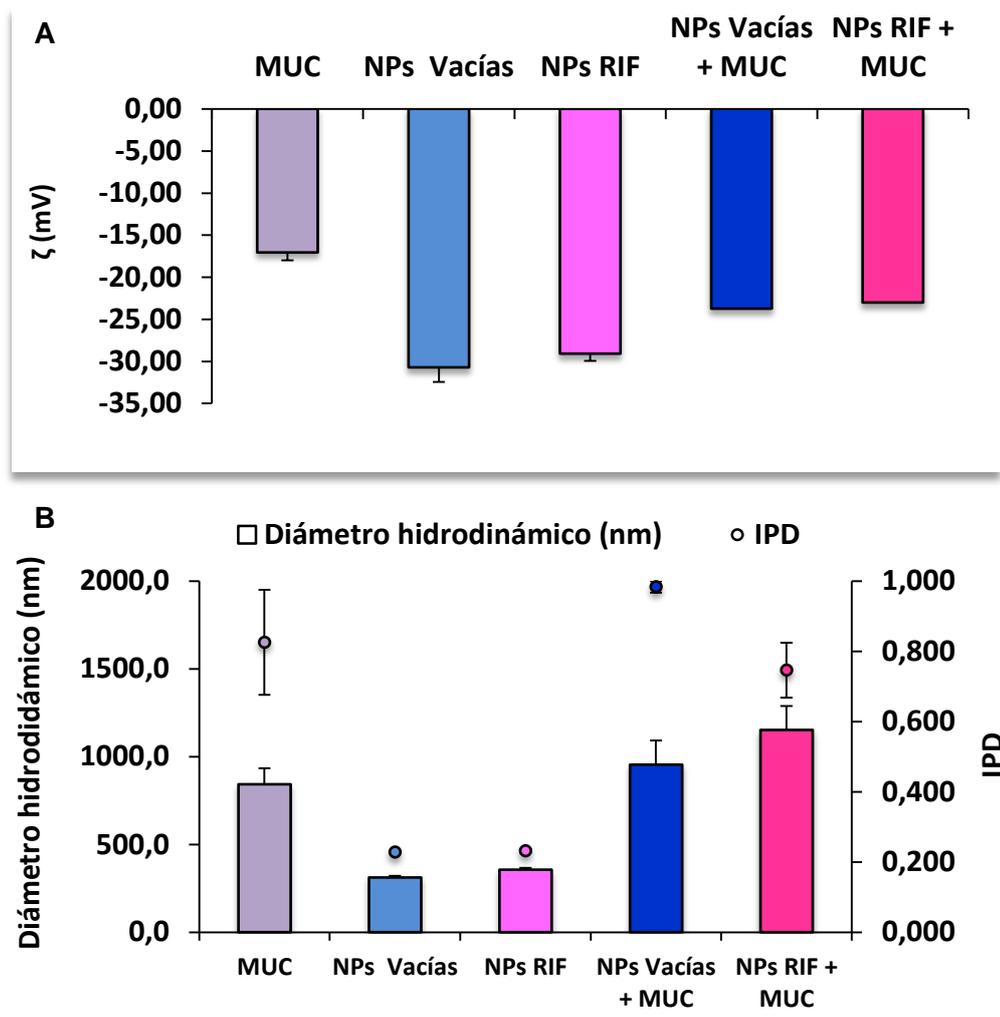


Figura 4.6. A- Potencial ζ (mV) y B- Diámetro hidrodinámico (nm) e índice de polidispersidad de las partículas de MUC, las NPs vacías y cargadas y las combinaciones entre la MUC con ambas NPs.

4.3.1.2. Comportamiento reológico de las NPs

Para evaluar los efectos de las NPs obtenidas en el comportamiento reológico de la MUC, se determinó el cambio en la viscosidad de la MUC luego de la incubación de la misma con las NPs utilizando un reómetro.

En primer lugar se estudió el comportamiento reológico de las NPs solas, es decir, en ausencia de MUC. La *Figura 4.7.* muestra las curvas de la η de los polímeros ALG y QUIT y las NPs vacías y cargadas con RIF en función de γ a 25 °C, 34 °C y 37 °C. Las

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

soluciones de los polímeros solos revelaron un comportamiento newtoniano a un rango bajo de $\dot{\gamma}$, entre 250 y 1.500 s^{-1} , es decir, el valor de η fue casi constante, lo que podría atribuirse a que las cadenas de los polímeros se encontrarían relajadas a bajos valores de $\dot{\gamma}$. Sin embargo, se observó un comportamiento de espesamiento ligeramente cizallante a valores de $\dot{\gamma}$ más altos, debido a que la η comenzó a aumentar gradualmente a medida que aumentaban las $\dot{\gamma}$. Este fenómeno podría explicarse por la formación de agregados hidrosolubles denominados “hydroclusters”, inducidos por la acción de un esfuerzo cortante (*Figura 4.8*). Cuando no se aplica tensión, las fuerzas de repulsión entre las partículas son suficientes para permitir que fluyan homogéneamente a través del líquido, sin embargo, cuando se aplica un esfuerzo, estas fuerzas interpartículas resultarían reducidas, generando un agrupamiento de las partículas (“hydroclusters”). Los “hydroclusters” hacen que sea más difícil para las partículas fluir una alrededor de la otra, lo que genera un aumento de la η ²⁵.

Las suspensiones de NPs, tanto vacías como cargadas con RIF, mostraron un comportamiento reológico similar al observado con las soluciones conteniendo los polímeros solos (*Figura 4.7*). Sin embargo, el comportamiento de espesamiento por cizallamiento de las NPs fue menos pronunciado que el encontrado con las soluciones poliméricas. Las suspensiones de NPs mostraron valores ligeramente menores de η sobre todas las $\dot{\gamma}$ investigadas, pero este efecto fue más significativo a valores de $\dot{\gamma}$ más bajos. Las diferencias en la η pueden explicarse debido a las diferentes propiedades interfaciales de las NPs en comparación con las soluciones poliméricas. El menor tamaño, la forma y las cargas superficiales de las NPs podrían favorecer el movimiento browniano de las mismas y evitar su aglomeración y la formación de “hydroclusters”. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en las mediciones del θ_c [H₂O] en la sección 2.3.2.2. de este trabajo de Tesis, donde se observó que las NPs son altamente hidrofílicas, lo cual puede relacionarse con su resistencia a la aglomeración en medios acuosos.

Los resultados evidencian que las NPs son altamente estables, esto puede deberse a su carga superficial neta, la cual favorece que predominen fuerzas repulsivas entre las partículas evitando así la floculación o la aglomeración entre las mismas. La superficie de las NPs probablemente se encuentre estabilizada estéricamente por la disposición

de las cadenas poliméricas y del surfactante. Se ha reportado que cuando las partículas se comportan como esferas rígidas y no predominan fuerzas atractivas, las partículas permanecerán estabilizadas por su movimiento browniano²⁶.

Por otra parte, se observó en todas las muestras ensayadas que, a medida que aumenta la temperatura la viscosidad disminuye, este efecto está ampliamente reportado en bibliografía y es debido a un aumento en la energía cinética de las partículas y, por tanto, las fuerzas de cohesión disminuyen en magnitud^{27,28}.

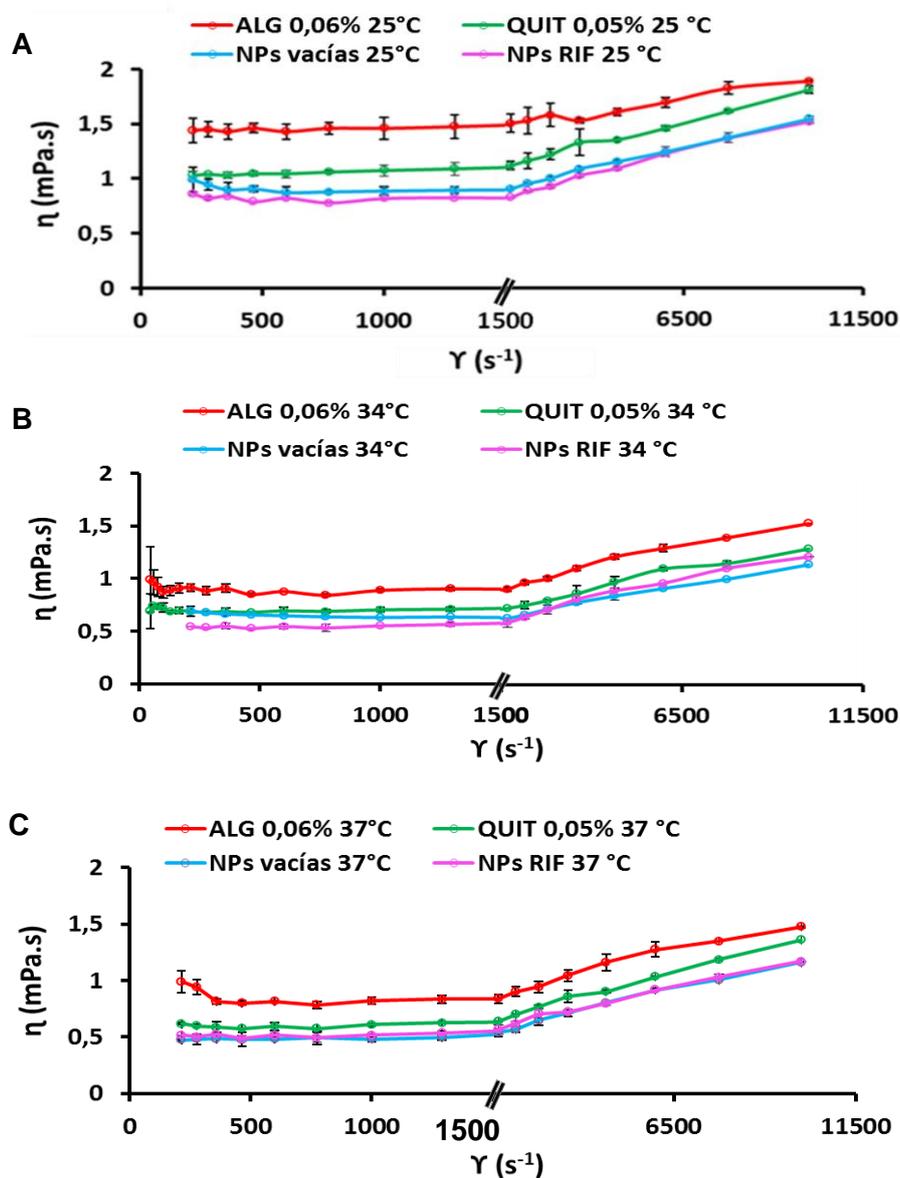


Figura 4.7. Perfiles de viscosidad (mPa.s) en función de la velocidad de cizalla (s^{-1}) de ALG, QUIT y NPs vacías y cargadas, con RIF a diferentes temperaturas: A- 24 °C; B- 34 °C y C- 37 °C. (promedio \pm DE, n=3) Cambio en la escala del eje y de 500 a 5000 s^{-1} .

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

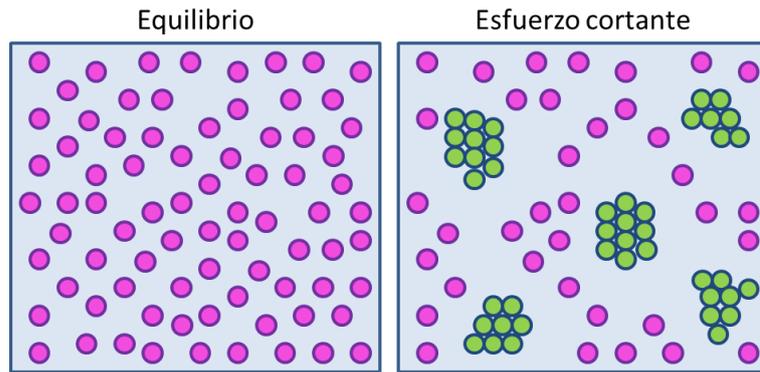


Figura 4.8. Representación gráfica de la formación de “hydroclusters” (verde) constituidos por las partículas (fucsia) bajo la acción de un esfuerzo cortante.

La *Figura 4.9.* muestra los perfiles de viscosidad de las NPs solas, tanto vacías como cargadas, de MUC y la combinación de ambos componentes. Si bien se evidenció una leve tendencia de aumento en la viscosidad o espesamiento de las muestras de MUC en contacto con las NPs, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Se ha demostrado que las NPs cargadas negativamente tienen un menor impacto en las propiedades reológicas del “mucus”⁷, lo cual es coincidente con los resultados obtenidos. Esto brinda un escenario alentador para considerar a las NPs RIF como posibles candidatos en el tratamiento de la TB pulmonar, debido a que el “mucus” debe preservar su comportamiento viscoelástico para cumplir su función como mecanismo de defensa frente a agentes extraños y permitir su remoción mediante el aclaramiento mucociliar.

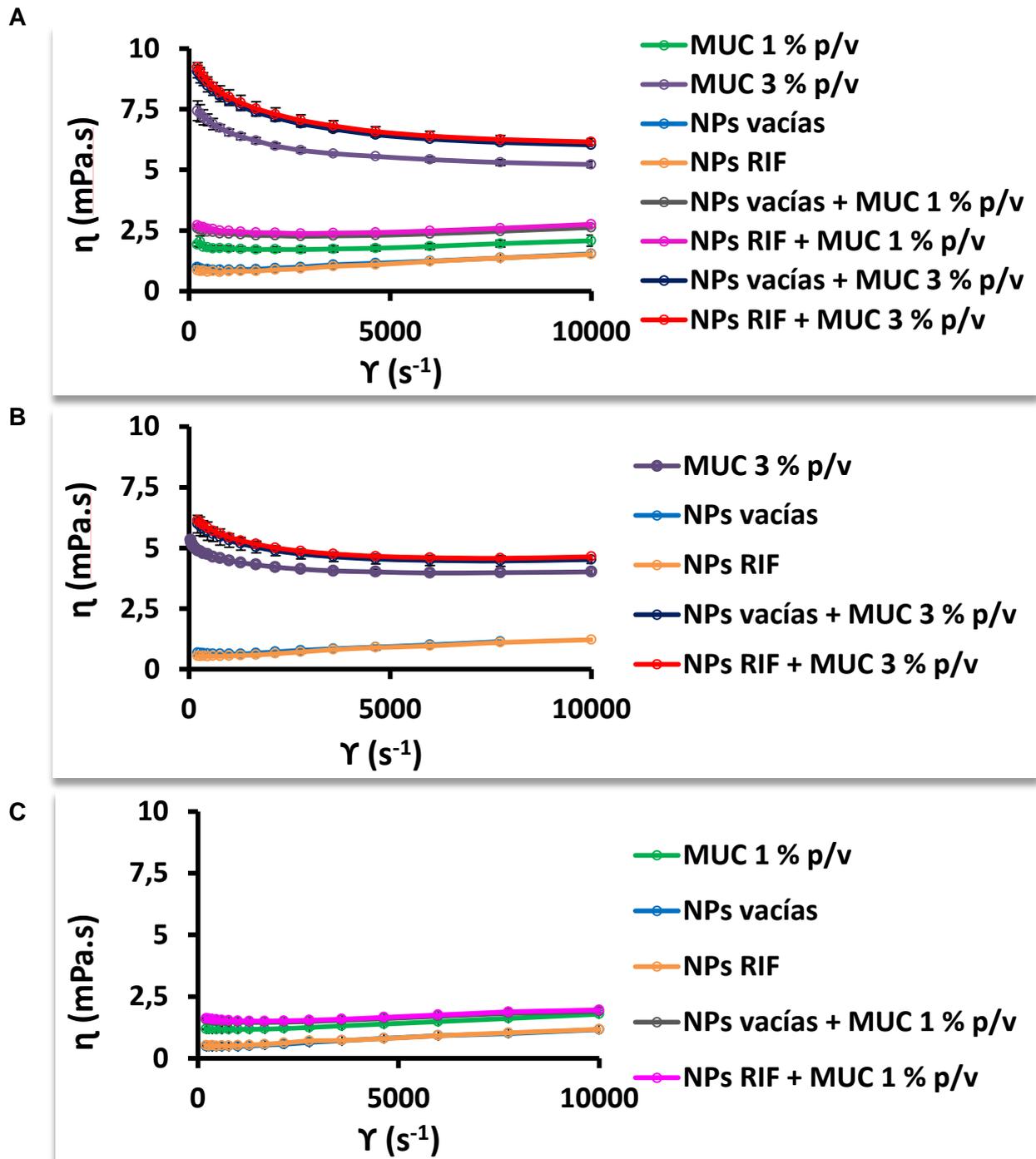


Figura 4.9. Perfiles de viscosidad (mPa.s) en función de velocidad de cizalla (s^{-1}) de MUC 1 y 3 % p/v, NPs vacías y cargadas con RIF y la mezcla de ambas NPs con MUC a diferentes temperaturas: A- 24 °C; B- 34 °C y C- 37 °C. (promedio \pm DE, n=3).

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

4.3.1.3. Microscopía electrónica de barrido

Se observó en las imágenes de SEM de las NPs incubadas con MUC (*Figura 4.10.4-B*) que algunas NPs se encuentran adheridas en la superficie de las fibras de MUC, sin embargo, no se observaron modificaciones en la estructura de MUC, es decir, esto sugiere la existencia de interacciones entre las NPs y las fibras MUC, las cuales permiten que las NPs se adhieran a la superficie de MUC y probablemente puedan penetrar a través de los poros de la misma hasta llegar al sitio diana. Las NPs no modificaron la arquitectura de la glicoproteína (*Figura 4.10.1-B*), la cual se observó en su estado hidratado, al igual que ocurrió con MUC control, sin las NPs (*Figura 4.10.1-A*), indicando que no ocurrió un proceso evidente de deshidratación. Por otro lado, las NPs en contacto con MUC (*Figura 4.10.4-B*) permanecieron intactas, preservando tanto su morfología esférica como su tamaño.

En base a lo expuesto anteriormente, se podría postular que las NPs conseguirían penetrar los poros generados en la malla de MUC, los cuales tienen un tamaño comprendido en el rango de 20 a 800 nm de diámetro, sin quedar irreversiblemente retenidas en la matriz de la glicoproteína, lo que les permitiría alcanzar el epitelio pulmonar sin afectar la capa de “mucus” que lo recubre⁴. MUC tiene un rol importante en la defensa innata del organismo frente a las infecciones y la eliminación de las partículas extrañas, por lo tanto, es muy importante que los nuevos nanosistemas no alteren el movimiento mucociliar ya que esto podría empeorar el cuadro infeccioso que presente el paciente²⁹.

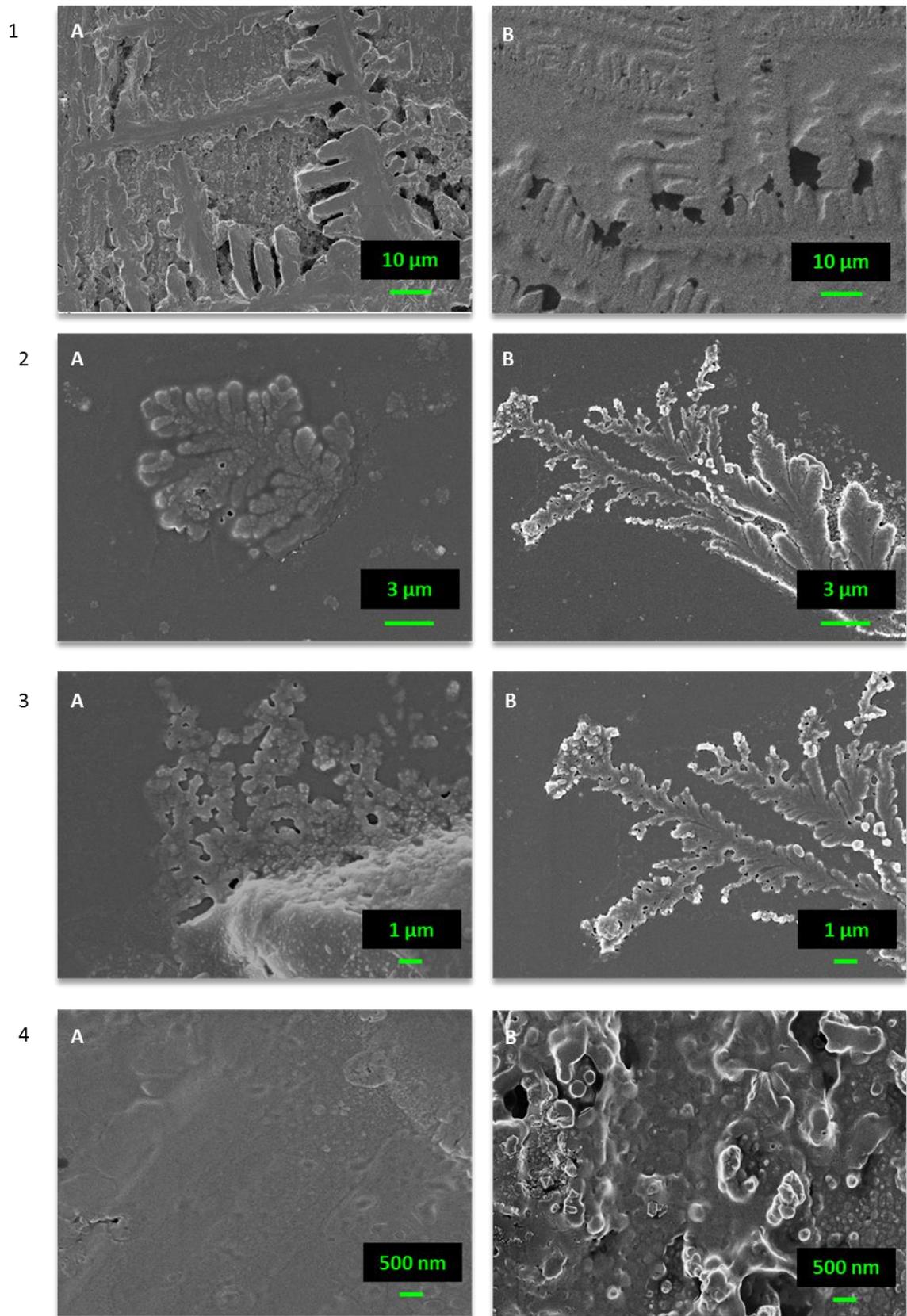


Figura 4.10. Imágenes obtenidas mediante SEM de: A- MUC; B- NPs RIF en presencia de MUC. Magnificación: 1- 10 μm ; 2- 3 μm ; 3- 1 μm y 4- 500 nm.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

4.3.1.4. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

En la *Figura 4.11.* se exhiben los espectros de FTIR de MUC, NPs vacías y cargadas con RIF y las combinaciones entre MUC y las NPs, así como sus correspondientes MFs. El espectro FTIR de MUC presentó las siguientes señales características de la glicoproteína: una banda intensa a 3.395 cm^{-1} , asignada a las vibraciones de estiramiento del solapamiento de los grupos hidroxilos (OH) con las aminas (NH) primaria y secundaria; a una frecuencia de 2.918 cm^{-1} , una banda correspondiente a las vibraciones de estiramientos simétricos y asimétricos de los enlaces de C-H^{30,31}. Otra banda a 1.653 cm^{-1} se asignó al carbonilo correspondiente al grupo amida primaria, mientras que a 1.552 cm^{-1} una banda que corresponde a las deformaciones N-H del grupo amina y la banda de tensión C-N de amida y aminas. A frecuencias menores a 1.400 cm^{-1} (en la zona de la huella dactilar) se observaron las vibraciones correspondientes a los enlaces de los anillos carbohidrato de MUC.

En el espectro FTIR de MUC incubada con las NPs vacías se observó el ensanchamiento de la banda ubicada en la región $3.000\text{-}3.500\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a los grupos funcionales OH y NH presentes tanto en MUC como en las NPs, con un desplazamiento de la banda ubicada a 3.395 cm^{-1} de MUC a una frecuencia inferior (3.371 cm^{-1}), mientras que en la MF correspondiente a los componentes individuales de las NPs vacías y MUC se observó un ensanchamiento y corrimiento a una frecuencia mayor de esta banda, debido a la superposición de las bandas individuales de los componentes que forman la MF. Por otro lado, se observó una variación de la banda de las NPs en presencia de la MUC, en comparación con la MUC sola, de 1.653 cm^{-1} a 1.644 cm^{-1} que podría indicar la participación del C=O (amida I) en la interacción de las NPs y MUC. También se observó la desaparición de la banda 1.604 cm^{-1} de las NPs vacías correspondiente a la banda asignada a los estiramientos de los grupos carboxilatos (COO^-) de ALG, lo cual podría indicar la participación de estos grupos funcionales en enlaces puente hidrógeno con MUC.

En el espectro FTIR de las NPs vacías en contacto con MUC en relación al espectro de NPs vacías solas, se observó un corrimiento de 1.528 cm^{-1} a 1.556 cm^{-1} , que podría indicar una interacción electrostática de los grupos NH^{3+} de las NPs y los COO^- de MUC. Además, a partir de las diferencias en la zona de la huella dactilar de las NPs y la

mezcla de las NPs y MUC se evidenció la formación de uniones entre la glicoproteína y los nanovehículos.

En el espectro de la MF de los componentes pertenecientes a las NPs vacías y MUC, se observó un ensanchamiento de todas las bandas de absorción analizadas, demostrando una superposición de las bandas individuales correspondientes a las NPs vacías y MUC.

En cuanto al espectro FTIR de las NPs RIF combinadas con MUC se observaron cambios similares a aquellos obtenidos con las NPs vacías en contacto con la MUC, que indicarían interacciones entre las NPs y la glicoproteína. Por otro lado, se observó en el FTIR de las NPs RIF en combinación con MUC, la señal correspondiente al anillo furanona de RIF (1.731 cm^{-1}), lo que evidenciaría la presencia de este IFA en el sistema.

En la MF de los componentes individuales correspondientes a las NPs RIF y MUC se observó un ensanchamiento de todas las bandas de absorción analizadas, demostrando que el espectro obtenido correspondió a la superposición de las señales correspondientes a los componentes de las NPs RIF y aquellos provenientes de la MUC.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

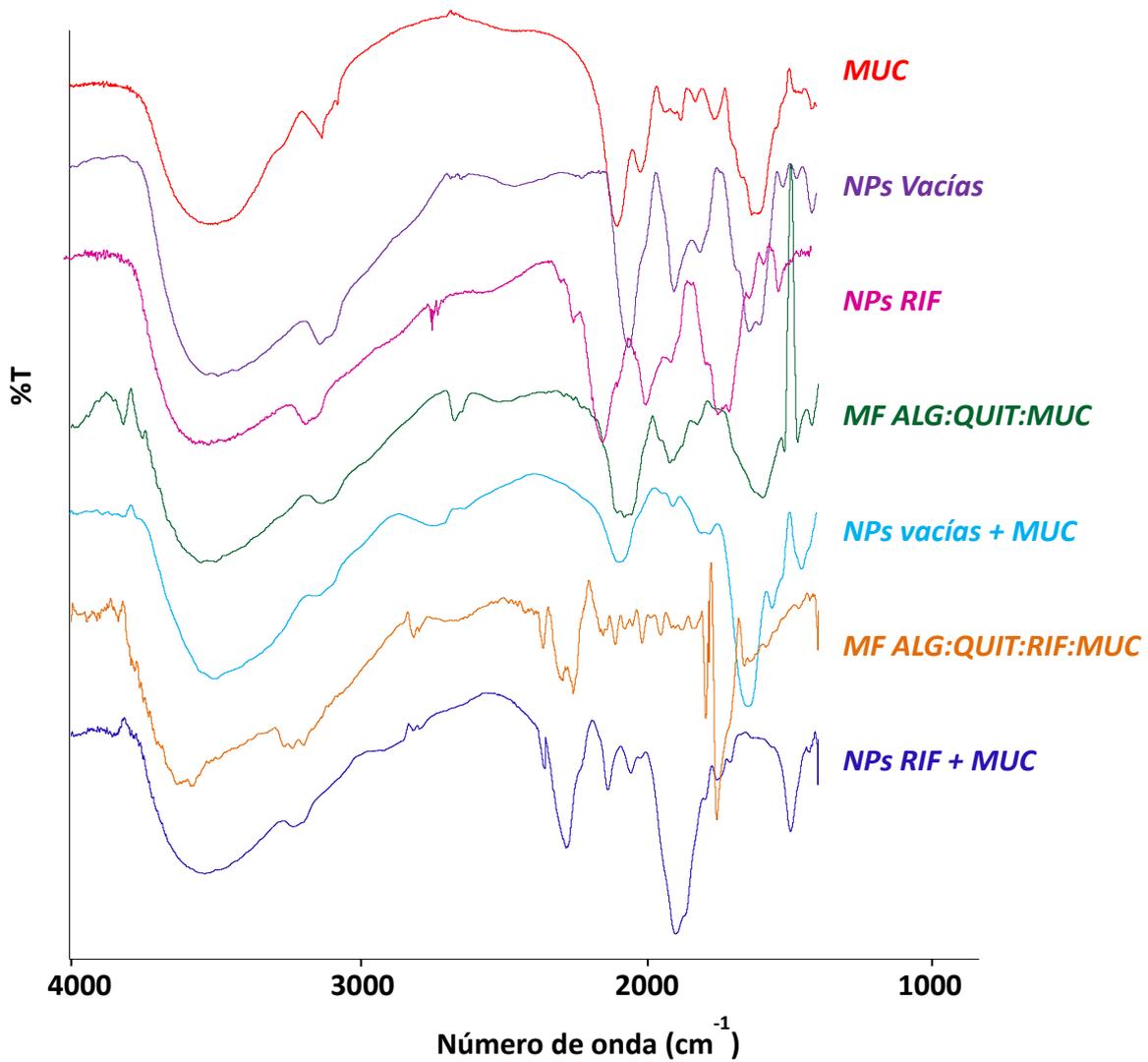


Figura 4.11. Espectros FTIR de la MUC, las NPs vacías y cargadas con RIF, la combinación de ambos componentes y sus correspondientes MFs.

4.3.2. Estudio de la interacción de las nanopartículas con el surfactante pulmonar

En las *Figuras 4.12. y 4.13.* se observa como varía el tamaño, el IPD y el ζ cuando las NPs vacías y cargadas con RIF, respectivamente, toman contacto con el SP.

Como se puede apreciar en las *Figuras 4.12. y 4.13.* el ζ del SP no se modificó en presencia de las NPs, tanto vacías como cargadas con RIF. Por otro lado, con respecto al tamaño no se observó una variación en el mismo con respecto al valor del SP sin NPs, esto podría sugerir que no se forman agregados de mayor tamaño o en mayor cantidad al mantenerse en contacto la suspensión de surfactante con las NPs, lo cual sugiere que ambos se mantienen dispersos, estables, sin alterarse su comportamiento coloidal. Los valores de IPD son muy elevados, cercanos a 1, tanto para el SP solo como en combinación con las NPs, esto se debe a que los componentes del SP son macromoléculas, es decir que poseen un alto PM y al encontrarse dispersos en la solución fisiológica forman grandes agregados, como se puede apreciar en las micrografías de la *Figura 4.14*, sin embargo, se puede destacar que los IPDs no variaron significativamente al encontrarse el SP en presencia de las NPs, con lo cual se puede concluir que las NPs no alteran el estado de agregación del SP.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

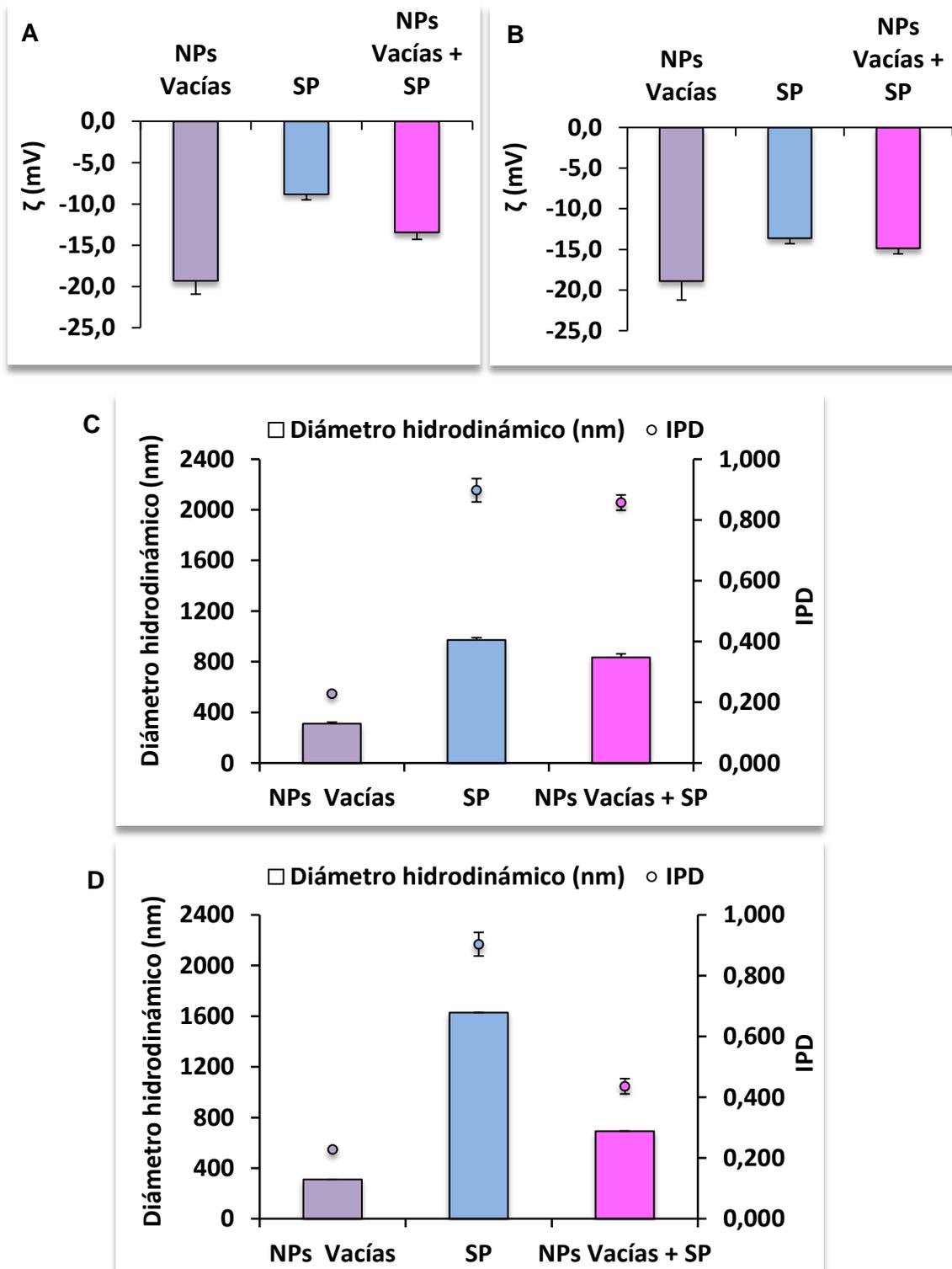


Figura 4.12. Potencial ζ (mV), A- 5h; B- 24 h. Diámetro hidrodinámico (nm) e índice de polidispersidad, C- 5 h y D- 24 h de NPs vacías, SP y NPs vacías + SP (promedio \pm DE, n=3).

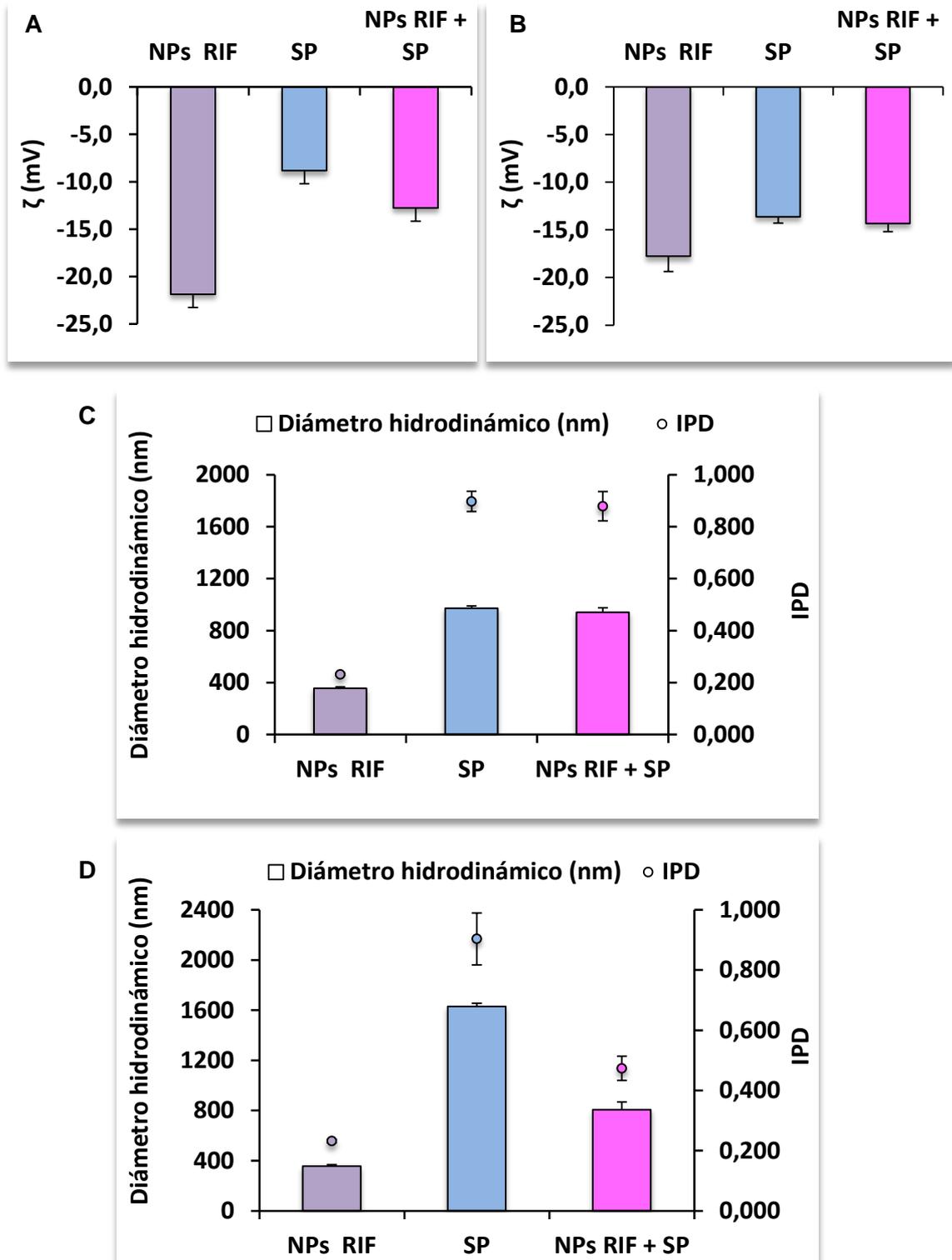


Figura 4.13. Potencial ζ (mV), A- 5h; B- 24 h. Diámetro hidrodinámico (nm) e índice de polidispersidad, C- 5 h y D- 24 h de NPs RIF, SP y NPs RIF + SP (promedio \pm DE, n=3).

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

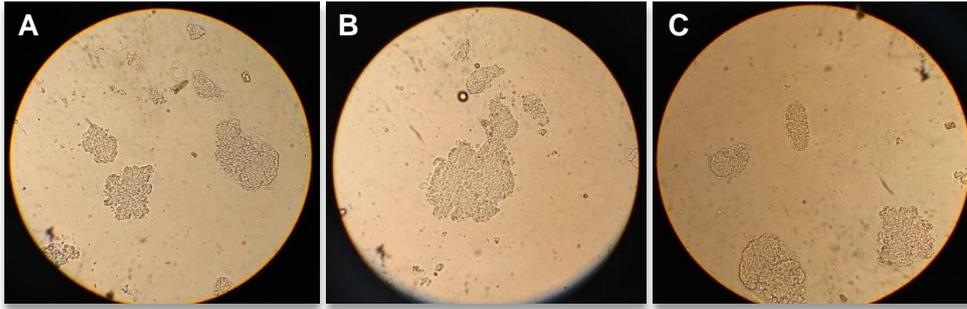


Figura 4.14. Imágenes obtenidas por microscopio óptico de: A- SP; B- SP con NPs vacías y C- SP con NPs RIF. Magnificación: 60x.

En la *Figura 4.15*, se exhiben las imágenes obtenidas mediante SEM de las muestras de SP solo y combinado con las NPs, tanto vacías como cargadas con RIF (*Figura 4.15. 4. A, B y C*, respectivamente) a diferentes niveles de magnificación. Las muestras presentaron apariencia similar, homogénea, sin presencia de aglomerados de gran tamaño. Se puede apreciar en la *Figura 4.15. 1. A, B y C* que las muestras exhibieron una superficie similar, levemente rugosa, sin embargo, para una mayor magnificación de la imagen con una escala de 200 nm se observó la presencia de NPs tanto vacías como cargadas (*4.15. 5. B y C*, respectivamente) en la superficie del surfactante. Esto demuestra, por un lado, que las NPs permanecieron estables al encontrarse en contacto con el SP, ya que las mismas no se desintegraron y no se evidenciaron alteraciones en su morfología ni tamaño. Por otra parte, se observó que la estructura y el comportamiento de agregación del SP no fue alterado por la presencia de las NPs.

De los resultados obtenidos mediante este ensayo podría extrapolarse la conclusión de que no se modifican las propiedades biofísicas del SP, por lo tanto las NPs podrían ser un posible vehículo para la administración de medicamentos por vía inhalatoria para favorecer el tratamiento de enfermedades que comprometen el sistema respiratorio.

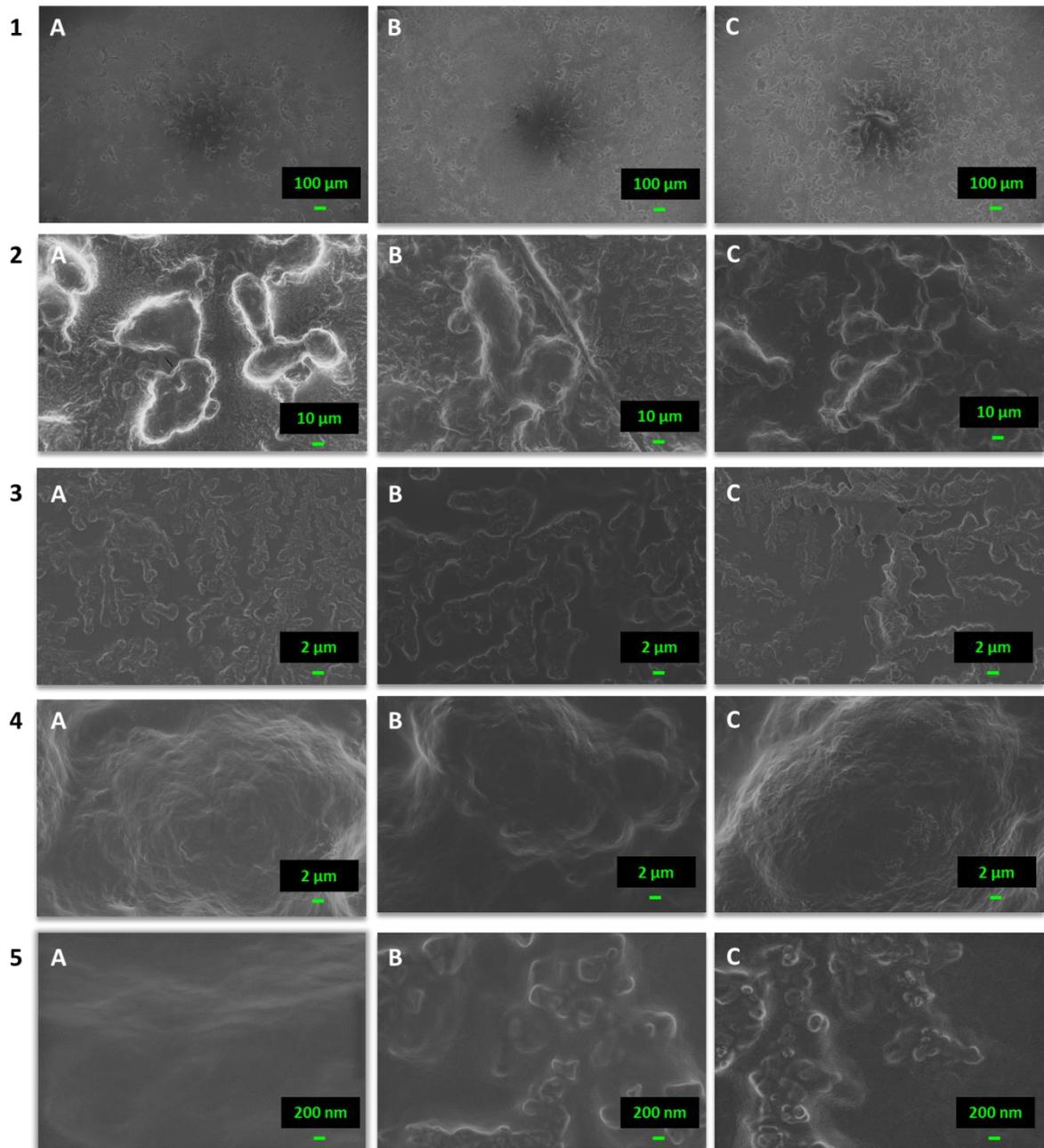


Figura 4.15. Imágenes obtenidas por SEM de: A- SP; B- SP con NPs vacías y C- SP con NPs RIF. Escala: 1- 100 μm; 2- 10 μm; 3 y 4- 2 μm y 5- 200 nm.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares *in vitro*.

4.3.3. Estudios de liberación *in vitro* de rifampicina

El comportamiento *in vitro* de liberación de RIF, tanto desde las NPs así como de RIF sin vehiculizar, se investigó a los valores de pH 5,5, 6,8 y 7,4 a 37 °C. Los perfiles de liberación del fármaco desde las diferentes formulaciones se muestran en la *Figura 4.16*.

Se observó que la difusión de RIF libre a través de la membrana fue más del 95 % en casi 5 h a todos los valores de pH ensayados, mientras que, en el caso de RIF contenida en las NPs, no se observó liberación del fármaco a ninguno de los valores de pH estudiados en un periodo de 24 h.

Estos resultados sugieren que las NPs mantienen el IFA encapsulado a estos valores de pH, es decir, se podría postular que las NPs permanecerían estables hasta alcanzar su sitio de acción, donde posiblemente RIF se pueda liberar por algún mecanismo más complejo que involucre la degradación de los polisacáridos que forman las NPs o interacciones con enzimas u otras proteínas del organismo³².

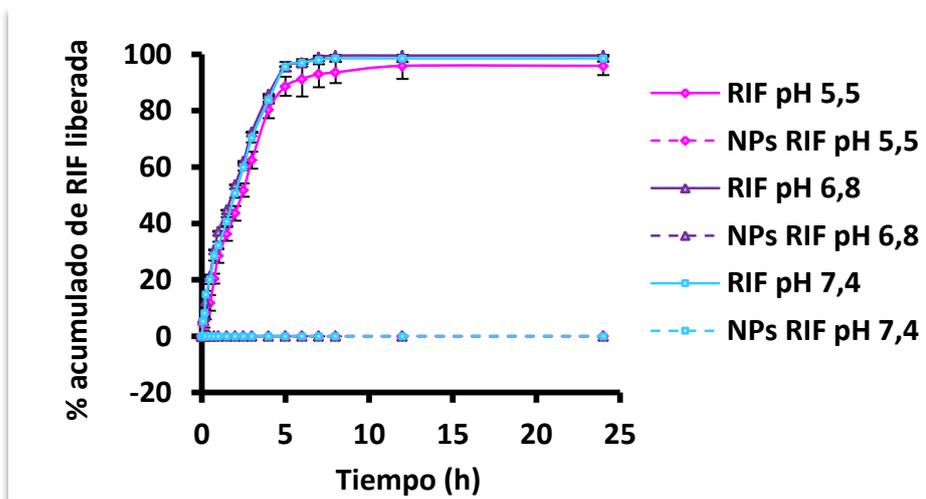


Figura 4.16. Porcentaje acumulado de rifampicina liberada desde las NPs a diferentes valores de pH en función del tiempo.

Estos resultados, al igual que los obtenidos con la interacción con el “mucus” y el SP son alentadores, ya que el objetivo es que este nuevo sistema nanotransportador se mantenga intacto hasta alcanzar las regiones más profundas del pulmón, donde se encuentran los MAs, ya que allí es donde se aloja y reproduce el *Mtb*.

4.3.4. Estudio de estabilidad de las nanopartículas poliméricas en medio de cultivo

Las NPs, tanto vacías como cargadas con RIF, se dispersaron completamente en el medio de cultivo DMEM suplementado con SFB, sin observarse agregados presentes. Luego del período de incubación, se apreció que a medida que aumenta la concentración de SFB disminuye la estabilidad de las NPs, esto es coherente ya que con el aumento de la fuerza iónica, las NPs tienden a presentar menor estabilidad por la alta concentración de electrolitos en el medio que determina la neutralización de las cargas en la superficie de las NPs. En la *Figura 4.17. A*, se observa como disminuye el valor del ζ a medida que aumenta la concentración de SFB. Sin embargo, los valores de ζ para las NPs resuspendidas en DMEM con 10 % v/v de SFB se mantuvieron alejados de 0, cercanos a -20 mV, con lo cual las NPs presentaron una estabilidad aceptable. En la *Figura 4.17. B*, se observa que las NPs, tanto vacías como cargadas con RIF, tendieron a aumentar su tamaño e IPD, de igual manera, se encontraron dentro del rango nanométrico (<1 μm). Esta diferencia de tamaño e IPD puede corresponder a la aglomeración causada por el aumento de fuerza iónica del medio.

En función de los resultados obtenidos se decidió realizar los ensayos *in vitro* con el medio de cultivo DMEM y la concentración de SFB necesaria, frecuentemente se requiere un 10 % v/v de SFB.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares *in vitro*.

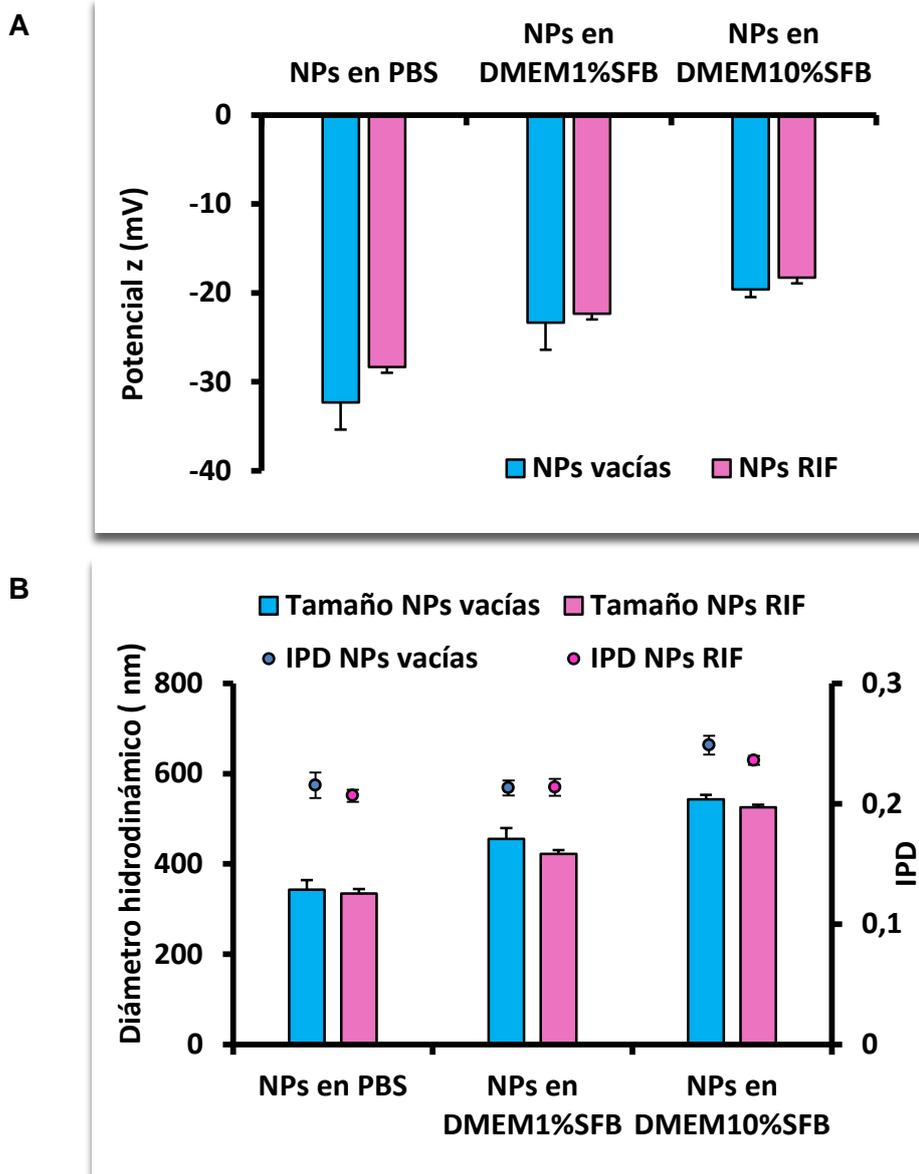


Figura 4.17. A- Potencial z (mV) y B- Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad de las NPs vacías y NPs RIF en PBS y medio de cultivo DMEM y SFB.

4.3.5. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad *in vitro* de RIF, NPs vacías y NPs RIF se evaluó frente a las líneas celulares VERO, MRC5 y A549 mediante el ensayo MTT y los resultados se muestran en la *Figura 4.18*.

En el caso de las células VERO, los resultados mostraron que la viabilidad celular de las NPs vacías o cargadas con RIF fue cercana al 100 % después de 5 y 24 h de

incubación (*Figura 4.18. A.i. y ii.*, respectivamente), para todas las concentraciones investigadas, en comparación con el control que consistió en células incubadas solo con el medio de cultivo; mientras que RIF libre mostró un porcentaje de viabilidad celular inferior al 90 % a partir de una concentración de 100 µg/mL, cuando se incubó con estas células durante 5 y 24 horas. Además, después de un período de incubación de 24 h, RIF libre, a una concentración de 400 µg/mL, proporcionó una viabilidad celular inferior al 70 %, porcentaje considerado como el límite por debajo del cual debe considerarse un efecto citotóxico¹⁵.

Al evaluar los datos obtenidos para la línea celular MRC5 (*Figura 4.18. B.*) se demostró que al cabo de 5 h de incubación no se manifiestan efectos citotóxicos para ninguno de los tratamientos realizados, es decir, NPs vacías, NPs RIF y RIF libre. Por otro lado, luego de 24 h de incubación RIF libre comienza a exhibir una reducción de la viabilidad celular a partir de los 50 µg/mL, siendo la misma cercana a un 80 % con respecto al control. A una concentración elevada de RIF, 400 µg/mL, la viabilidad celular disminuyó considerablemente, alcanzando un valor cercano a 30 % con respecto al control. Mientras que RIF al ser vehiculizada en las NPs disminuyó considerablemente su efecto citotóxico, mostrando una viabilidad celular de aproximadamente un 70 % a una concentración de 400 µg/mL. Por su parte, las NPs vacías no mostraron efectos citotóxicos a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Por último, al analizar los datos obtenidos para la línea celular A549, se observó que a las 5 h de incubación (*Figura 4.18. C.i.*), tanto NPs vacías como cargadas con RIF, mostraron una viabilidad celular cercana al 100 % con respecto al control para todas las concentraciones investigadas. Por su parte, a partir de una concentración de 200 µg/mL, RIF libre presentó una viabilidad celular cercana al 70 % con respecto al control. Luego de un período de incubación de 24 h (*Figura 4.18. C.ii.*) se observó una disminución de la viabilidad celular de RIF a partir de 100 µg/mL, con valores cercanos al 60 %, mientras que a una concentración elevada, 400 µg/mL, la viabilidad celular fue cercana al 40 % con respecto a las células sin tratar. Por otro lado, las NPs RIF no mostraron una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad celular con respecto al control a ninguna de las concentraciones ensayadas, excepto a la concentración más alta, 400 µg/mL, donde se observó una viabilidad celular de

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

aproximadamente un 75 % con respecto al control, sin embargo, este porcentaje es considerado por encima del nivel mínimo a partir del cual el efecto citotóxico es significativo¹⁵. Las células tratadas con las NPs vacías tuvieron una viabilidad celular cercana al 100 % para todas las concentraciones utilizadas luego de un periodo de 24 h de incubación.

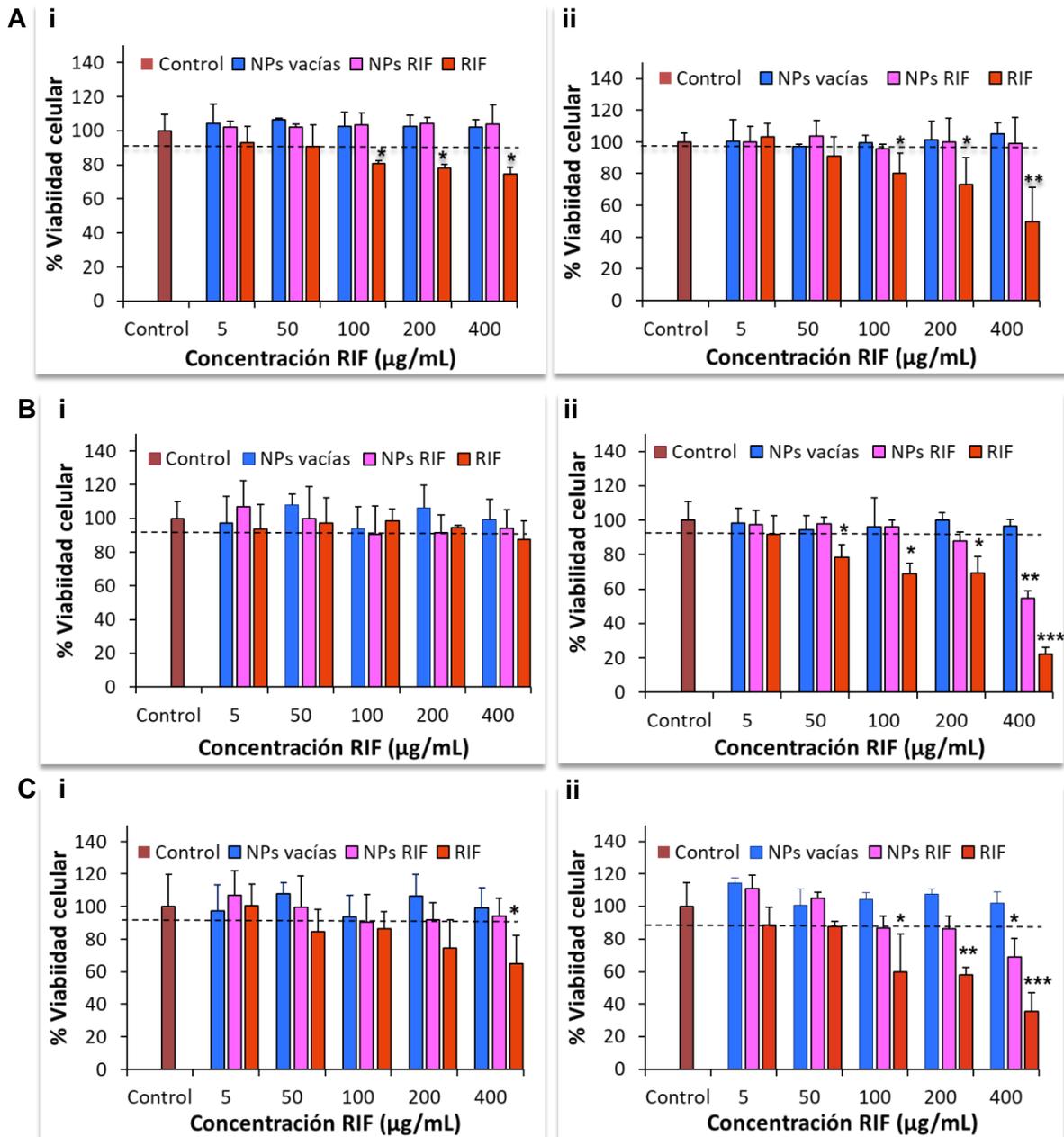


Figura 4.18. Gráfico de barras % viabilidad celular \pm DE vs. Concentración de RIF ($\mu\text{g/mL}$) en las líneas celulares: A- VERO; B- MRC5 y C- A549. Tiempo incubación: i. 5 h; ii. 24 h. $n=6$. *, ** y ***, diferencias estadísticamente significativas, p -valor $< 0,05$; $< 0,01$ y $< 0,001$, respectivamente.

El ensayo de MTT se realizó para evaluar la actividad metabólica de las células después de exponerlas a las diferentes formulaciones, ya que una reducción de la actividad metabólica celular es un indicador del daño celular³³.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

No se observaron pruebas de citotoxicidad aguda para las NPs vacías en ninguna de las líneas celulares utilizadas, ni a ningún valor de concentración ensayado. Además, las NPs cargadas pudieron disminuir la citotoxicidad de RIF en todas las líneas celulares evaluadas, en comparación con RIF libre, incluso a dosis elevadas y en un período de exposición prolongado (24 h).

4.3.6. Ensayo de internalización celular de rifampicina

4.3.6.1. Validación del método por cromatografía líquida de alta eficacia

Para validar el método analítico para cuantificar RIF mediante HPLC se evaluó en primer lugar la selectividad. Se demostró que el método propuesto fue selectivo, ya que no se observaron interferencias entre el analito, el EI, ASC y el medio de cultivo o el buffer de lisis. En la *Figura 4.19.* se observa la resolución de los picos de cada compuesto analizado. El tiempo de retención para el EI fue de 2,3 y 2,5 min, en DMEM y en buffer de lisis, respectivamente. Para RIF se encontró un tiempo de retención de 3,9 y 4,1 min en DMEM y en buffer de lisis, respectivamente. El DMEM tuvo un tiempo de retención de 1,6 min, y tanto el buffer de lisis como ASC no presentaron absorción a la longitud de onda utilizada, por lo cual, no interfirieron en la corrida cromatográfica. Los resultados se exhiben en la *Tabla 4.1.* y *4.2.*

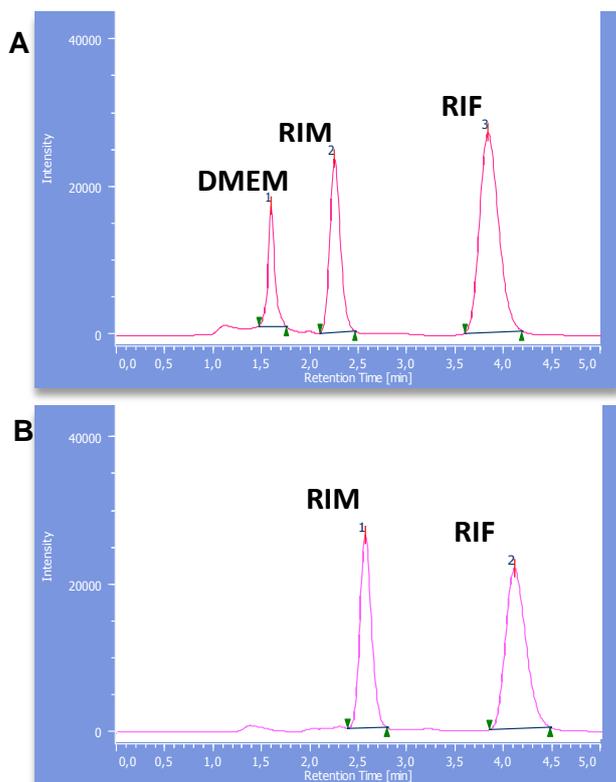


Tabla 4.1. Tiempos de retención de DMEM con 10 % v/v SFB, RIF y RIM.

Analito	Tiempo de retención (min)
DMEM	1,6
RIM	2,3
RIF	3,9

Tabla 4.2. Tiempos de retención de RIF y RIM en buffer de lisis.

Analito	Tiempo de retención (min)
RIM	2,5
RIF	4,1

Figura 4.19. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC de A- RIF y RIM en DMEM con 10 % v/v SFB; B- RIF y RIM en buffer de lisis.

En la *Figura 4.20.* se presenta la curva de calibrado con la ecuación de ajuste de la regresión lineal. Estos resultados indicaron que se cumplió con la linealidad en todo el rango de trabajo, ya que r^2 es cercano a 1. Además, se halló que el LD de RIF fue $(0,05 \pm 0,01) \mu\text{g/mL}$ y el LC de RIF correspondió a una concentración de $(0,27 \pm 0,04) \mu\text{g/mL}$.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

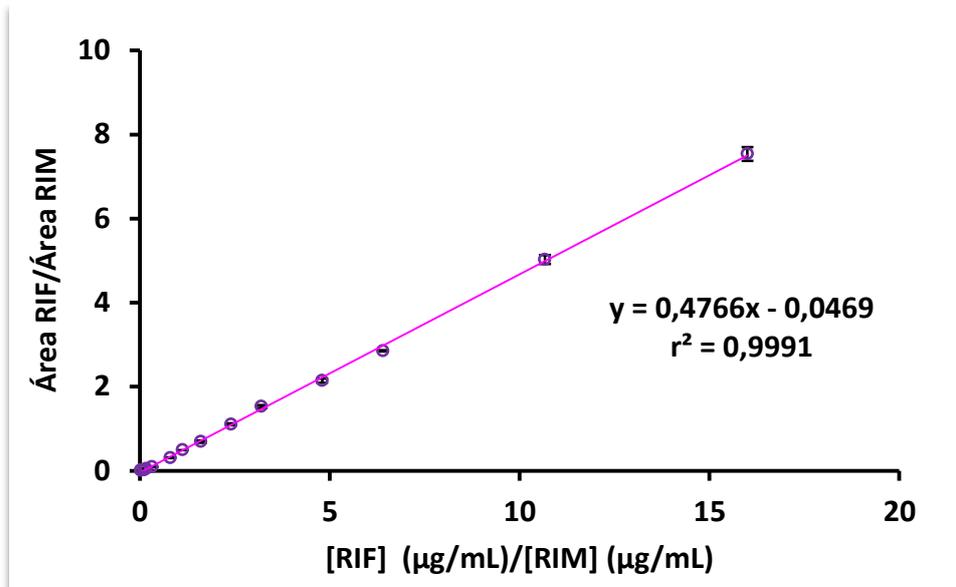


Figura 4.20. Curva de calibrado de RIF en buffer de lisis, promedio área RIF/área RIM \pm DE vs. [RIF] μ g/mL/[RIM] μ g/mL, $n=3$.

El CV calculado para la precisión inter e intra día, fue menor al 10 %. Cuando se trabaja con cultivos celulares, se considera la complejidad de la matriz, resultando el criterio de aceptación un CV entre el 5 – 10 %¹⁹. Por otra parte, los valores de recuperación (%) para la determinación de la exactitud estuvieron entre el 100 y 110 % del valor esperado. Por lo tanto, el método propuesto cumple con las exigencias de precisión y exactitud determinadas por las directrices FDA e ICH^{17,18}. Los resultados se presentan en la *Tabla 4.3*.

Tabla 4.3. Valores correspondientes al cálculo de precisión y exactitud con sus respectivas DEs para el método analítico propuesto.

[RIF] (μ g/mL)	Precisión \pm DE (%)		Exactitud \pm DE (%)
	Intra día	Inter día	
1,36	5,220 \pm 0,001	5,067 \pm 0,001	105 \pm 1
109,09	2,37 \pm 0,01	1,335 \pm 0,006	101 \pm 1
272,73	0,259 \pm 0,004	0,352 \pm 0,005	101 \pm 2

Por otro lado, las muestras resultaron ser estables luego de ser congeladas y descongeladas en 3 ciclos a una temperatura de - 4 °C, obteniéndose un % recuperación entre 95-110 % (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Estabilidad congelación de muestras.

[RIF] (µg/mL)	% Recuperación ± DE	
	RIF	RIM
1,36	98 ± 2	104 ± 2
109,09	107 ± 2	101,8 ± 0,6
272,73	106 ± 1	108,2 ± 0,3

A través de los resultados obtenidos de los parámetros analizados para validar el método analítico, se puede concluir que el mismo cumple con las normas de calidad establecidas para cuantificación de fármacos mediante procedimientos analíticos, por lo tanto se utilizó este método para realizar el ensayo descrito en la siguiente sección (4.3.6.2.).

4.3.6.2. Cuantificación del contenido intracelular de rifampicina

Para poner a punto el ensayo de cuantificación del contenido intracelular de RIF se trabajó con la línea celular MRC5 y se utilizó una concentración de 200 µg/mL de RIF libre y una cantidad equivalente de RIF vehiculizada en las NPs. En este ensayo se emplearon las células en estado quiescente y con un 90 % de confluencia para determinar si existen diferencias entre estos dos estados.

Como puede observarse en la *Figura 4.21. A*, RIF ingresa en menor concentración a las células cuando las mismas se encuentran en estado quiescente, es decir sobrecrecidas, y no se observan diferencias estadísticamente significativas en estas células en el ingreso intracelular de RIF, cuando se administra en forma libre o encapsulada en las NPs. Esto puede deberse a que al encontrarse sobrecrecidas las células, se altera su división celular, así como los mecanismos de transporte, lo que podría ser una posible explicación de que la internalización de moléculas de fármaco o

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

de NPs se vea reducida con respecto al estado confluyente. Por otra parte, en las células con un 90 % de confluencia, se observó una mayor internalización de RIF cuando la misma estaba vehiculizada en las NPs, en comparación con RIF libre. Sin embargo, debido a que la concentración de RIF fue elevada, muchas células murieron cuando se pusieron en contacto con RIF libre. Por este motivo, se decidió continuar los ensayos con concentraciones más bajas de RIF probadas anteriormente en el ensayo de citotoxicidad (sección 4.3.5.) para evitar estos inconvenientes.

Se trabajó a dos concentraciones de RIF, tanto libre como su cantidad equivalente cargada en las NPs: 5 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en dos líneas celulares, MRC5 y A549. Los resultados se presentan en la *Figura 4.21. B. y C.* para MRC5 y A549, respectivamente.

Con respecto a la concentración más baja de RIF (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), no se observaron diferencias significativas entre RIF libre y vehiculizada en las NPs, para ninguna de las líneas celulares utilizadas y a ninguno de los tiempos de incubación.

Por otro lado, para la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RIF con un tiempo de incubación de 5 h, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad internalizada de RIF, entre RIF libre y vehiculizada en las NPs, para la línea celular MRC5, contrariamente a lo observado para la línea celular A549, donde a partir de 5 h ya se observa un aumento significativo en la cantidad de RIF internalizada cuando este fármaco se administró vehiculizado en las NPs. En el caso de esta concentración a un tiempo de incubación mayor, 24 h, se observó que en ambas líneas celulares se internalizó una mayor cantidad de RIF cuando este IFA se vehiculizó en las NPs, en comparación con RIF libre.

Estos resultados evidenciaron que la internalización de RIF es dependiente del tiempo de contacto entre la formulación y las células cuando se encuentra vehiculizada en las NPs, en comparación con RIF libre, donde no se observaron diferencias significativas a las 5 y 24 h. Además, la internalización de RIF fue dependiente de la concentración, para ambas líneas celulares, ya que se observó que a mayor concentración de RIF, la cantidad internalizada fue superior, tanto para RIF libre como encapsulada.

Al comparar los datos obtenidos de las NPs cargadas con una concentración de RIF equivalente a 50 µg/mL, incubadas con las líneas celulares MRC5 y A549, durante 5 y 24 h, se observó que la cantidad de RIF intracelular fue mayor para la línea celular A549 en comparación con MRC5, esto podría deberse a varios factores, uno de ellos puede ser la forma y tamaño de las células, con lo cual estará o no favorecido el ingreso de las NPs al interior celular³⁴.

Otra posible explicación puede atribuirse a que las NPs, posiblemente, atenúen la activación de gp-P³⁵. Como se describió en el *Capítulo 1*, sección 1.1.2.3., RIF es sustrato de gp-P, esta proteína de membrana es responsable de la eliminación del fármaco hacia el exterior de la célula, evitando su acumulación y su acción en el interior de la misma, lo que conlleva a una disminución de la eficacia del tratamiento, y a un desarrollo de resistencia. En la línea celular A549 existe una sobreexpresión de gp-P, debido a que son células tumorales³⁶. En este trabajo de Tesis se encontró que las NPs, debido a su pequeño tamaño, pueden transportar al fármaco evitando que el mismo sea expulsado hacia el exterior celular por gp-P. Por su parte, al encontrarse RIF encapsulada dentro del nanovehículo, posiblemente no pueda ser reconocida por gp-P y de este modo se podría explicar la mayor acumulación de este IFA en el interior celular³⁵.

En el caso de pacientes infectados con el *Mtb*, y especialmente quienes cursan esta infección concomitantemente con el SIDA, existe una sobreexpresión de gp-P en células monocíticas infectadas del pulmón³⁷. Por lo tanto, el tratamiento de la TB con RIF podría ser más eficaz si la misma se administra por vía pulmonar vehiculizada en las NPs, ya que podría aumentar su concentración intracelular, aumentando así la concentración local del fármaco.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

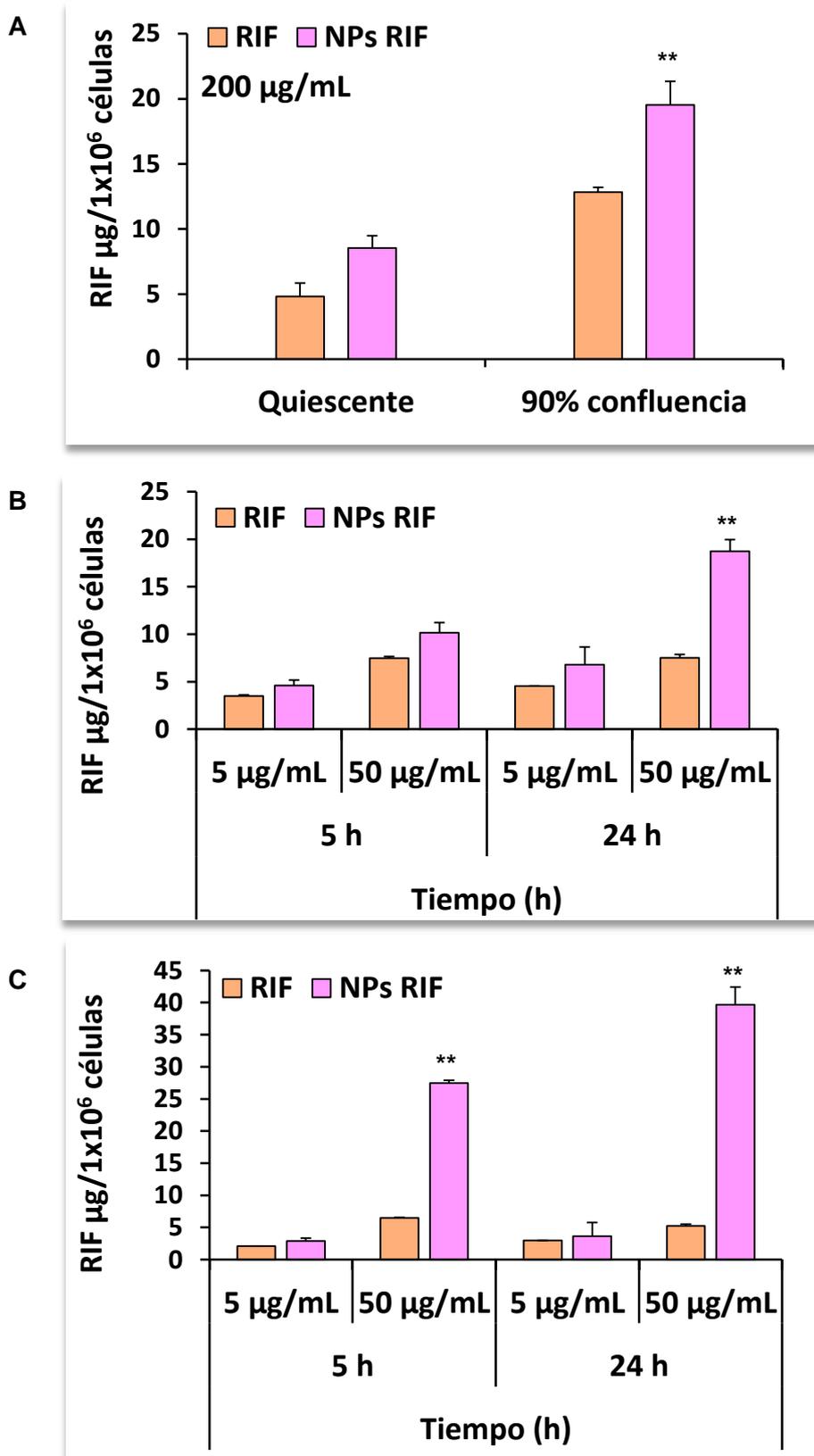


Figura 4.21. Cantidad de RIF promedio (µg) normalizada por 1×10^6 células \pm DE en función de estado de las células: A-MRC5; y en función del tiempo (h) y la concentración de RIF: B-MRC5; C-A549. $n=3$. *, ** y ***, diferencias estadísticamente significativas, p -valor $< 0,05$; $< 0,01$ y $< 0,001$, respectivamente.

Por otro lado, se midieron mediante DLS los sobrenadantes de las muestras de células incubadas con NPs RIF, RIF libre y el control (células sin tratamiento) para evaluar si las NPs sufrían alguna alteración en presencia de las células. Se corroboró que algunas de las NPs RIF estaban presentes en el espacio extracelular y conservaban su tamaño (250 nm) y su ζ cercano a -20 mV.

Para confirmar si las NPs ingresan a las células o si solo se ubican e interaccionan en el espacio extracelular, se realizó un ensayo de microscopía confocal de fluorescencia, cuyos resultados son presentados en la sección 4.3.7.

4.3.6.3. Estudio cualitativo de la estabilidad química de rifampicina

En la *Figura 4.22.* se observan los cromatogramas obtenidos para las diferentes condiciones a las cuales fue expuesta una solución de RIF de concentración conocida. Se puede apreciar que se detectaron productos de degradación para las condiciones agresivas a las cuales fue expuesta RIF durante 24 h, tanto para la degradación oxidativa, la hidrólisis ácida y básica, mientras que no se observaron productos de degradación cuando fue expuesta a la luz visible.

Al comparar los cromatogramas obtenidos con los productos de degradación con los obtenidos en la cuantificación de RIF intracelular (tanto para la línea celular MRC5 como A549) en el ensayo 3.6.2., se determinó que RIF sin vehiculizar sufre un proceso de hidrólisis ácida al estar expuesta al entorno de las células. Esta conclusión se obtuvo al superponer los cromatogramas obtenidos para las soluciones de RIF expuestas a factores agresivos con las muestras procesadas para el ensayo de internalización celular, sin el agregado de EI, demostrando la coincidencia de un producto con un tiempo de retención de 3,8 min, perteneciente a la hidrólisis ácida de RIF (*Figura 4.22. E*). Sin embargo, no se observó ningún producto de degradación cuando RIF fue vehiculizada en las NPs (*Figura 4.22. F*).

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

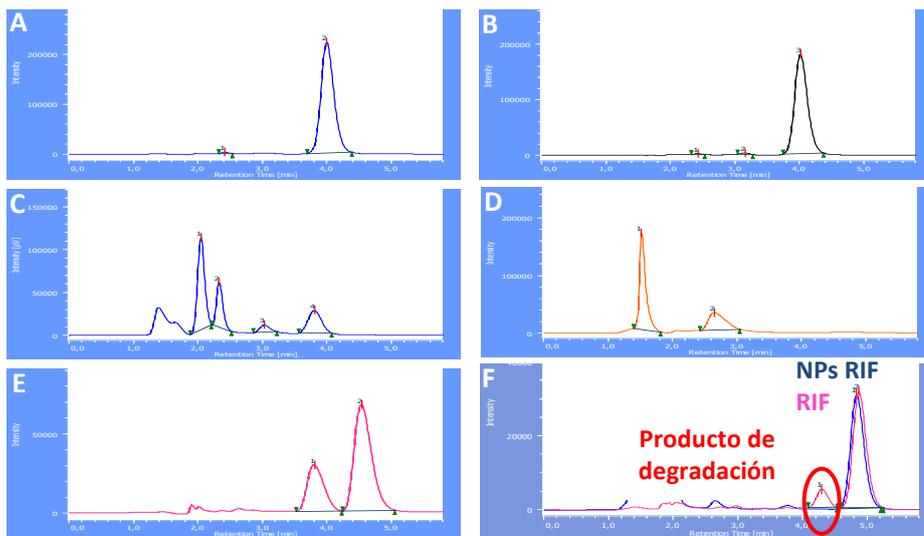


Figura 4.22. Cromatogramas de soluciones de: A- RIF en buffer pH 7; B- RIF expuesta a la luz visible, pH 7; C- RIF en H₂O₂ 30 % v/v pH 7; D- RIF en NaOH 0,1 M pH 12; E- RIF en HCl 0,1 M pH 2 y F- RIF (rosa) y NPs RIF (azul) muestras de ensayo de internalización en MRC5 y A549.

Se demostró mediante el análisis cualitativo de los cromatogramas de HPLC que se mejoró la estabilidad de RIF cuando la misma es vehiculizada en las NPs, ya que en ninguna de las muestras cuantificadas de las NPs RIF se observó el producto de degradación correspondiente a la hidrólisis ácida, el cual que puede deberse a formación de ácidos débiles, como ácido láctico, generados a partir del metabolismo celular.

Para profundizar sobre los posibles efectos protectores de las NPs a fenómenos de degradación a los cuales es susceptible el fármaco, deberían realizarse estudios de estabilidad más exhaustivos, lo cual escapa al alcance de los objetivos planteados en esta Tesis.

4.3.7. Ensayo de internalización celular de las nanopartículas mediante microscopía confocal de fluorescencia

Cuando las NPs entran en contacto con la membrana celular pueden interactuar con los componentes de la misma o con la matriz extracelular e ingresar a la célula, principalmente a través de endocitosis³⁸. Según reportes previos, las NPs compuestas de ALG y QUIT pueden ingresar a diferentes células por endocitosis mediada por receptores, tales como clatrina o caveolina^{1,39,40}.

En las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia (*Figura 4.23*) se puede apreciar como las NPs se intercalan con las fibras de actina, y también, como se localizan rodeando al núcleo dentro de las células.

En el caso de las células epiteliales alveolares (A549), la distribución de NPs es más homogénea que en los fibroblastos (MRC5). Esto puede deberse a las diferencias en la morfología y el tamaño de las células. Las NPs conservaron su tamaño y morfología en presencia de las células, las cuales se mantuvieron preferentemente como partículas dispersas y no se observaron aglomerados. No se detectó autofluorescencia de las células o del material polimérico de las NPs, lo cual descartó la interpretación errónea de los resultados. La micrografía adquirida sobre el plano axial xz (*Figura 4.23. B-2*) permite diferenciar claramente entre el espacio extracelular y las NPs internalizadas, las cuales se encuentran intercaladas entre las fibras de actina. Estos resultados respaldan la hipótesis formulada en el ensayo anterior (4.3.6.2), donde el aumento de la concentración de RIF en el interior de las células está directamente relacionado con la internalización de las NPs a la región intracelular. Por otro lado, recientes estudios han hallado que ALG puede incrementar el mecanismo de fagocitosis^{41,42}, lo cual es relevante para promover la captación de las NPs por parte de células fagocíticas tales como los MAs. En este sentido, resultaría interesante continuar los estudios de internalización celular de las NPs en MAs.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

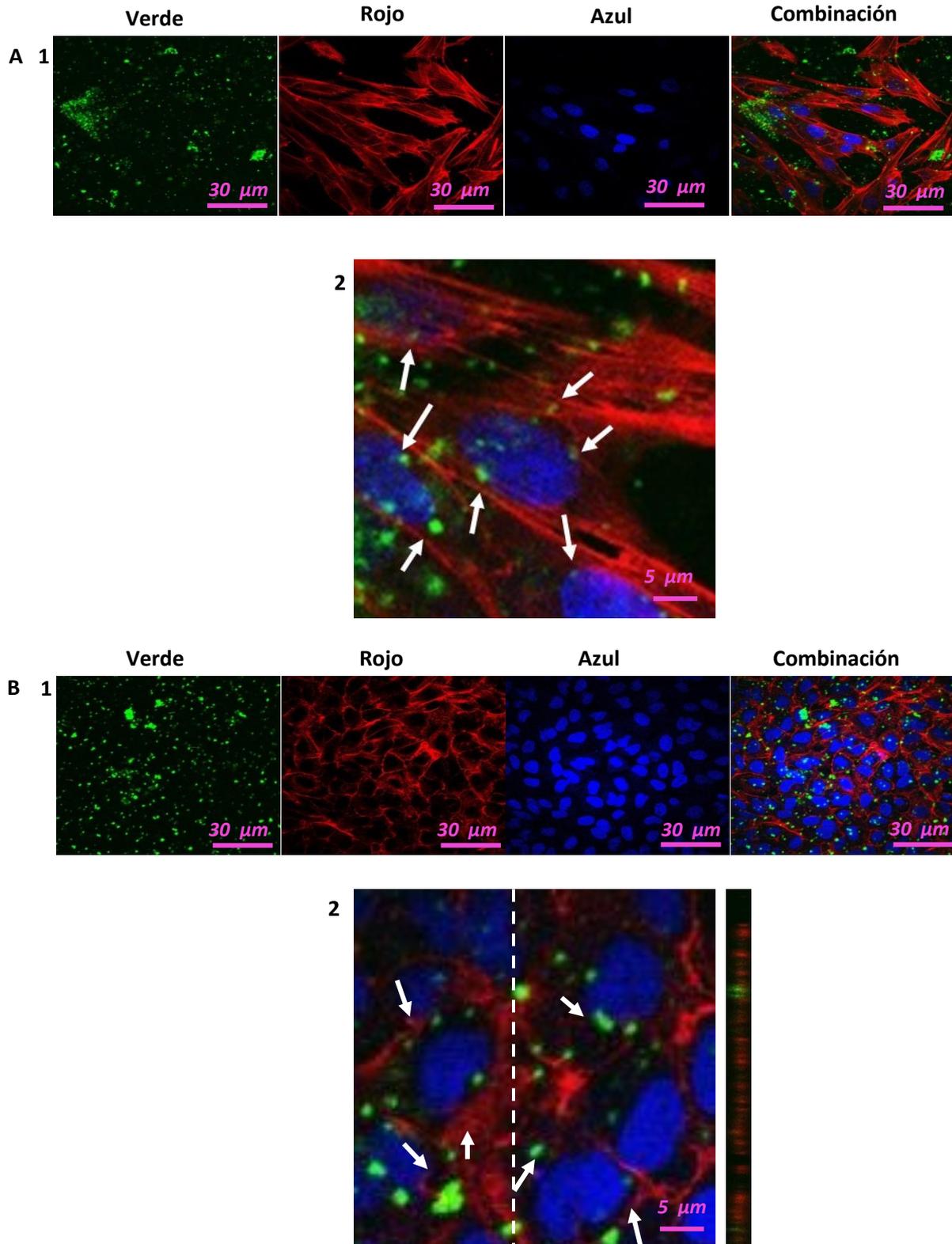


Figura 4.23. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia. A- MRC5 B- A549, 2- Sección óptica (xz) línea punteada representa el plano del corte axial. Verde: NPs; Rojo: fibras de actina y Azul: núcleo.

4.4. Conclusiones parciales

Como conclusiones parciales de este Capítulo se pueden mencionar:

- Se evaluaron las características mucoadhesivas de las NPs donde se pudo determinar que las mismas tienen afinidad por MUC pero no modifican la arquitectura de esta glicoproteína ni sus características reológicas, lo cual es fundamental para que se preserven los mecanismos de defensa normales de MUC en el sistema respiratorio.
- Se estudió la interacción de las NPs con los componentes del SP mediante lo cual se demostró que las NPs no provocan cambios evidentes en el SP. Estos hallazgos son relevantes debido a que las alteraciones en el SP pueden comprometer la funcionalidad del pulmón, favoreciendo que el mismo colapse.
- Se determinó que las NPs permanecen inalteradas y son estables en diferentes entornos fisiológicos a los valores de pH 5,5, 6,8 y 7,4 a 37 °C.
- Se demostró que las NPs vacías obtenidas no presentaron un efecto de toxicidad celular *in vitro* en las diferentes líneas celulares estudiadas: VERO, MRC5 y A549.
- Se evidenció que las NPs disminuyeron el efecto citotóxico de RIF libre, lo cual es un aspecto importante para evitar el daño celular.
- Se determinó que las NPs ingresaron a las células, lo que condujo a que aumente la concentración intracelular de RIF.
- Las NPs previnieron la degradación de RIF en el entorno celular de las líneas celulares MRC5 y A549.

Mediante los estudios *in vitro* realizados, los nuevos sistemas nanoparticulados desarrollados demostraron altas probabilidades como posibles candidatos a ser utilizados en la farmacoterapia por vía de administración pulmonar, para tratar patologías en las cuales se necesita una acción en el interior celular, como es el caso de la TB pulmonar, donde la bacteria se aloja en los MAs.

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

4.5. Bibliografía

1. Behzadi, S. *et al.* Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 4218–4244 (2017).
2. Thorley, A. J., Ruenraroengsak, P., Potter, T. E. & Tetley, T. D. Critical determinants of uptake and translocation of nanoparticles by the human pulmonary alveolar epithelium. *ACS Nano* **8**, 11778–11789 (2014).
3. Mansuri, S., Kesharwani, P., Jain, K., Tekade, R. K. & Jain, N. K. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *React. Funct. Polym.* **100**, 151–172 (2016).
4. Lock, J. Y., Carlson, T. L. & Carrier, R. L. Mucus models to evaluate the diffusion of drugs and particles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **124**, 34–49 (2017).
5. Netsomboon, K. & Bernkop-Schnürch, A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **98**, 76–89 (2016).
6. Middleton, a M. *et al.* Interaction of Mycobacterium tuberculosis with human respiratory mucosa. *Tuberculosis (Edinb)*. **82**, 69–78 (2002).
7. Chen, E. Y. T., Wang, Y. C., Chen, C. S. & Chin, W. C. Functionalized positive nanoparticles reduce mucin swelling and dispersion. *PLoS One* **5**, (2010).
8. Yuan, B., Ritzoulis, C. & Chen, J. Rheological investigations of beta glucan functionality: Interactions with mucin. *Food Hydrocoll.* **87**, 180–186 (2019).
9. Wang, L., Wu, Y., Li, J., Qiao, H. & Di, L. Rheological and mucoadhesive properties of polysaccharide from *Bletilla striata* with potential use in pharmaceuticals as bio-adhesive excipient. *Int. J. Biol. Macromol.* **120**, 529–536 (2018).
10. Siepmann, J. & Siepmann, F. Mathematical modeling of drug delivery. *Int. J. Pharm.* **364**, 328–343 (2008).
11. Faisant, N., Akiki, J., Siepmann, F., Benoit, J. P. & Siepmann, J. Effects of the

- type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory. *Int. J. Pharm.* **314**, 189–197 (2006).
12. Hu, Q., Katti, P. S. & Gu, Z. Enzyme-responsive nanomaterials for controlled drug delivery. *Nanoscale* **6**, 12273–12286 (2014).
 13. Shvedova, A., Pietroiusti, A. & Kagan, V. Nanotoxicology ten years later : Lights and shadows ☆. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **299**, 1–2 (2016).
 14. Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W. & Borm, P. J. A. Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.* **61**, 727–728 (2004).
 15. International Standard Organization. in *Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro Methods*. 10993-5. (2009).
 16. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
 17. Validation, B. M. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. *Fda* 1–22 (2018).
 18. Ich. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *Int. Conf. Harmon.* **1994**, 17 (2005).
 19. Quattrocchi, O. A., Abelaira, S. I. & Laba, R. F. Introduccion a la HPLC. *Introd. a la HPLC Apl. y Práctica* 405 (1992).
 20. Wu, W., Tian, Z. & Li, A. D. Q. 3.25 Fluorescent Nanoparticles for Biological Imaging. *Compr. Biomater. II* **3**, 535–548 (2017).
 21. Spudich, J. A. Effects of Cytochalasin B on Actin Filaments. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **37**, 585–593 (1973).
 22. Farahat, A. A. *et al.* *Exploration of DAPI analogues: Synthesis, antitrypanosomal activity, DNA binding and fluorescence properties.* *European Journal of Medicinal Chemistry* **128**, (Elsevier Masson SAS, 2017).

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanopartículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

23. Shen, J., Ly, K. & Hoang, Y. *Cell Culture Medium. Human Stem Cell Manual* (Elsevier Inc., 2013). doi:10.1016/B978-0-12-385473-5.00005-9
24. Goutal, S. *et al.* Validation of a simple HPLC-UV method for rifampicin determination in plasma: Application to the study of rifampicin arteriovenous concentration gradient. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **123**, 173–178 (2016).
25. Peker, S. M., Helvacı, Ş. Ş., Yener, H. B., İkizler, B. & Alparslan, A. *Solid-Liquid Two Phase Flow.* **2**, (2008).
26. Ding, J., Tracey, P. J. & Whitten, P. G. Review on shear thickening fluids and applications. **2**, 161–173 (2013).
27. Picone, C. S. F. & Cunha, R. L. Formation of nano and microstructures by polysorbate-chitosan association. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **418**, 29–38 (2013).
28. Goharshadi, E. K. & Azizi-Toupkanloo, H. Silver colloid nanoparticles: Ultrasound-assisted synthesis, electrical and rheological properties. *Powder Technol.* **237**, 97–101 (2013).
29. Schuster, B. S., Suk, J. S., Woodworth, G. F. & Hanes, J. Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease. *Biomaterials* **34**, 3439–3446 (2013).
30. Hsein, H., Garrait, G., Beyssac, E. & Hoffart, V. Whey protein mucoadhesive properties for oral drug delivery: Mucin-whey protein interaction and mucoadhesive bond strength. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **136**, 799–808 (2015).
31. Mashingaidze, F. *et al.* Poly(ethylene glycol) enclatherated pectin-mucin submicron matrices for intravaginal anti-HIV-1 drug delivery. *Int. J. Pharm.* **503**, 16–28 (2016).

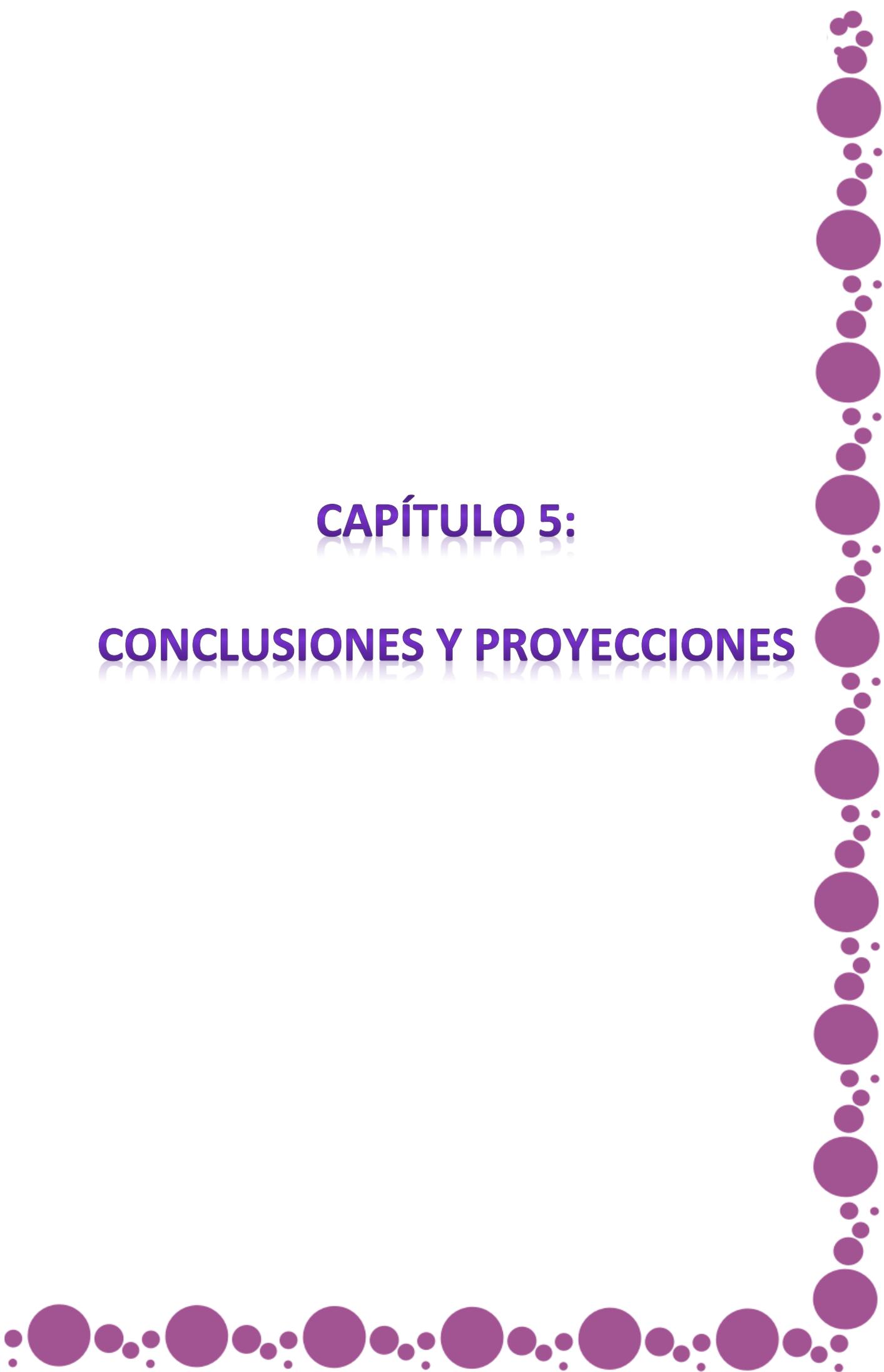
32. Yao, F. & Weiyuan, J. K. Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non- degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **7**, 429–444 (2010).
33. Scherließ, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *Int. J. Pharm.* **411**, 98–105 (2011).
34. Farvadi, F. *et al.* Journal of Colloid and Interface Science Cell shape affects nanoparticle uptake and toxicity: An overlooked factor at the nanobio interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **531**, 245–252 (2018).
35. Salomon, J. J. & Ehrhardt, C. Nanoparticles attenuate P-glycoprotein/MDR1 function in A549 human alveolar epithelial cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **77**, 392–397 (2011).
36. Ruiz Gómez, M. J., Souvion Rodríguez, A. & Martínez Morillo, M. La glicoproteína-P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia de los pacientes con cáncer. *An. Med. Interna* **19**, 477–485 (2002).
37. Gollapudi Biochem Biophys Res Comm 1994.pdf.
38. Engin, A. B. *et al.* Mechanistic understanding of nanoparticles' interactions with extracellular matrix: The cell and immune system. *Part. Fibre Toxicol.* **14**, 1–16 (2017).
39. Huang, M., Ma, Z., Khor, E. & Lim, L. Uptake of FITC-Chitosan Nanoparticles by A549 Cells. **19**, 4–5 (2002).
40. Salatin, S. & Yari Khosroushahi, A. Overviews on the cellular uptake mechanism of polysaccharide colloidal nanoparticles. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 1668–1686 (2017).
41. Fang, W. *et al.* Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).

Capítulo 4: Administración pulmonar de nanoparículas de rifampicina: estudios preliminares in vitro.

42. Bi, D. *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Alginate enhances Toll-like receptor 4-mediated phagocytosis by murine RAW264 . 7 macrophages. **105**, 1446–1454 (2017).

CAPÍTULO 5:

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES



CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

5.1. Conclusiones finales

Los resultados obtenidos en el desarrollo del presente trabajo de Tesis, permitieron cumplir con los objetivos planteados.

- 1) *Desarrollo y caracterización de sistemas de liberación de fármacos nanoparticulados, combinando quitosano y alginato.*

Para abordar este objetivo se utilizó una técnica de gelación iónica mediante la cual se obtuvieron NPs poliméricas, de ALG y QUIT, encapsulando un antibiótico, RIF, por un método sencillo, rápido y reproducible. Se incorporó un surfactante no iónico a estos nuevos sistemas, T80, y se alcanzaron las características óptimas con respecto al tamaño, el IPD, el ζ y la EE. Por otro lado, el agregado de T80 logró aumentar la estabilidad de las NPs, evitando su aglomeración a diferentes valores de pH.

Se obtuvo un polvo liofilizado de las NPs como producto final con la adición de sucrosa como crioprotector. Las NPs fueron altamente hidrofílicas, lo que permitió su rápida redispersión luego de someterse a un proceso de liofilización. Estas NPs liofilizadas, además, demostraron ser estables durante un período de tiempo de al menos 6 meses, lo cual permitiría su conservación por períodos de tiempo prolongados y a su vez, resultaron ser estables a diferentes valores de pH de interés fisiológico, 5,5; 6,8 y 7,4 lo cual es muy importante ya que las NPs se verán expuestas a diferentes entornos en el organismo que implican múltiples valores de pH a los cuales las NPs deberán permanecer estables para proteger el fármaco encapsulado hasta alcanzar su sitio de acción.

Se caracterizaron las NPs obtenidas utilizando diversas técnicas. Se confirmó mediante SEM el tamaño nanométrico de las NPs obtenidas, su morfología esférica, así como su monodispersidad. Se evidenciaron los grupos funcionales involucrados en la formación de las NPs mediante FTIR, los cuales fueron principalmente los iones carboxilato de ALG y los grupos amino de QUIT. Por otro lado, se comprobó la formación de una nueva estructura cristalina mediante DRX y se realizaron estudios del comportamiento térmico de las NPs que permitieron sumar evidencias a las interacciones propuestas entre los polisacáridos.

Capítulo 5: Conclusiones y proyecciones

2) Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sistemas obtenidos.

Para llevar a cabo este objetivo se realizaron diversas técnicas *in vitro* evaluando la actividad antimicrobiana de las NPs RIF en comparación con RIF y con las NPs vacías. Las NPs RIF demostraron mayor actividad antimicrobiana *in vitro* en comparación con el fármaco libre en diferentes cepas bacterianas Gram positivas de *S. aureus*, *E. faecalis* y aislamientos clínicos de *Mtb*.

Las NPs RIF manifestaron un efecto bactericida contra las cepas *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* MR 9455, a diferencia de la RIF sola, que solo produjo un efecto bacteriostático a tiempos de incubación inferiores a las 6 h. Por otra parte, se observaron cambios morfológicos a nivel macro y microscópico en las colonias de todas las cepas estudiadas (*S. aureus* MS 9463, *E. faecalis* 28212 y las mencionadas anteriormente) cuando las mismas fueron tratadas con las NPs RIF, con respecto al control y a los demás tratamientos (RIF libre y NPs vacías).

Se evidenció que las NPs RIF poseen un efecto bactericida a partir de las 4 horas, a diferencia de la RIF que posee un efecto bactericida a partir de las 6 horas para la cepa *S. aureus* ATCC 29213, con lo cual se concluye que el tratamiento con las NPs RIF tiene un efecto antibacteriano más rápido que el fármaco libre, lo cual es positivo como una herramienta para prevenir el desarrollo de resistencia bacteriana.

Las NPs RIF produjeron notables cambios morfológicos y ultraestructurales en las bacterias de la cepa *S. aureus* ATCC 29213, utilizada como cepa de referencia, en comparación con RIF libre.

Los estudios con microscopía de fluorescencia demostraron que las NPs se adhieren a la superficie de las células bacterianas, lo que conduciría a un aumento de la concentración local de RIF en la superficie bacteriana, aumentando la eficacia del antibiótico. Los resultados indicaron que la superficie de las NPs RIF desempeñarían un papel crucial en los procesos de adhesión de estos sistemas a la superficie bacteriana, alteraciones en la integridad de la membrana celular y captación celular del antibiótico por parte de las bacterias.

3) *Estudio de las propiedades mucoadhesivas de los nuevos sistemas.*

Se evaluaron las características mucoadhesivas de las NPs mediante diferentes metodologías *in vitro*. Se determinó que las NPs tienen afinidad por MUC, pero no modifican la arquitectura de esta glicoproteína ni sus características reológicas, lo cual es fundamental para que se preserven los mecanismos de defensa en el pulmón, ya que el “mucus” forma parte del sistema inmunológico innato.

Además de las propiedades mucoadhesivas de las NPs, debido a las características anátomo-fisiológicas del pulmón, se estudió la interacción de las NPs con los componentes del SP. Se observó un comportamiento similar al observado con MUC, es decir, las NPs no provocan cambios evidentes en el SP. Estos hallazgos son relevantes debido a que las alteraciones en el SP pueden comprometer la funcionalidad del pulmón, produciendo su colapso.

4) *Caracterización de los perfiles de liberación de los fármacos en los sistemas obtenidos.*

Mediante un estudio de liberación *in vitro* se corroboró que RIF se mantiene encapsulada en las NPs a diferentes valores de pH fisiológicos: 5,5; 6,8 y 7,4 a 37 °C durante 24 h, lo cual es relevante para que el IFA se transporte correctamente hasta alcanzar el sitio de acción.

5) *Estudio de la eficacia de los sistemas en el pasaje de los fármacos a través de las membranas biológicas de interés y sus potenciales efectos tóxicos.*

Se demostró que las NPs vacías obtenidas no presentaron un efecto de toxicidad celular *in vitro* en las líneas celulares estudiadas, VERO, MRC5 y A549. Por otro lado, se evidenció que las NPs RIF disminuyeron el efecto citotóxico de la RIF libre, lo cual permitiría evitar el daño celular.

Además, se determinó que las NPs ingresaron a las células, lo que condujo a que aumente la concentración intracelular de RIF. Además, las NPs permitieron la prevención de la degradación de RIF en el entorno celular.

Los nuevos sistemas nanoparticulados desarrollados demostraron altas probabilidades como posibles candidatos a ser utilizados en farmacoterapia por vía de administración pulmonar para tratar patologías en las cuales se necesita una acción en el interior celular,

Capítulo 5: Conclusiones y proyecciones

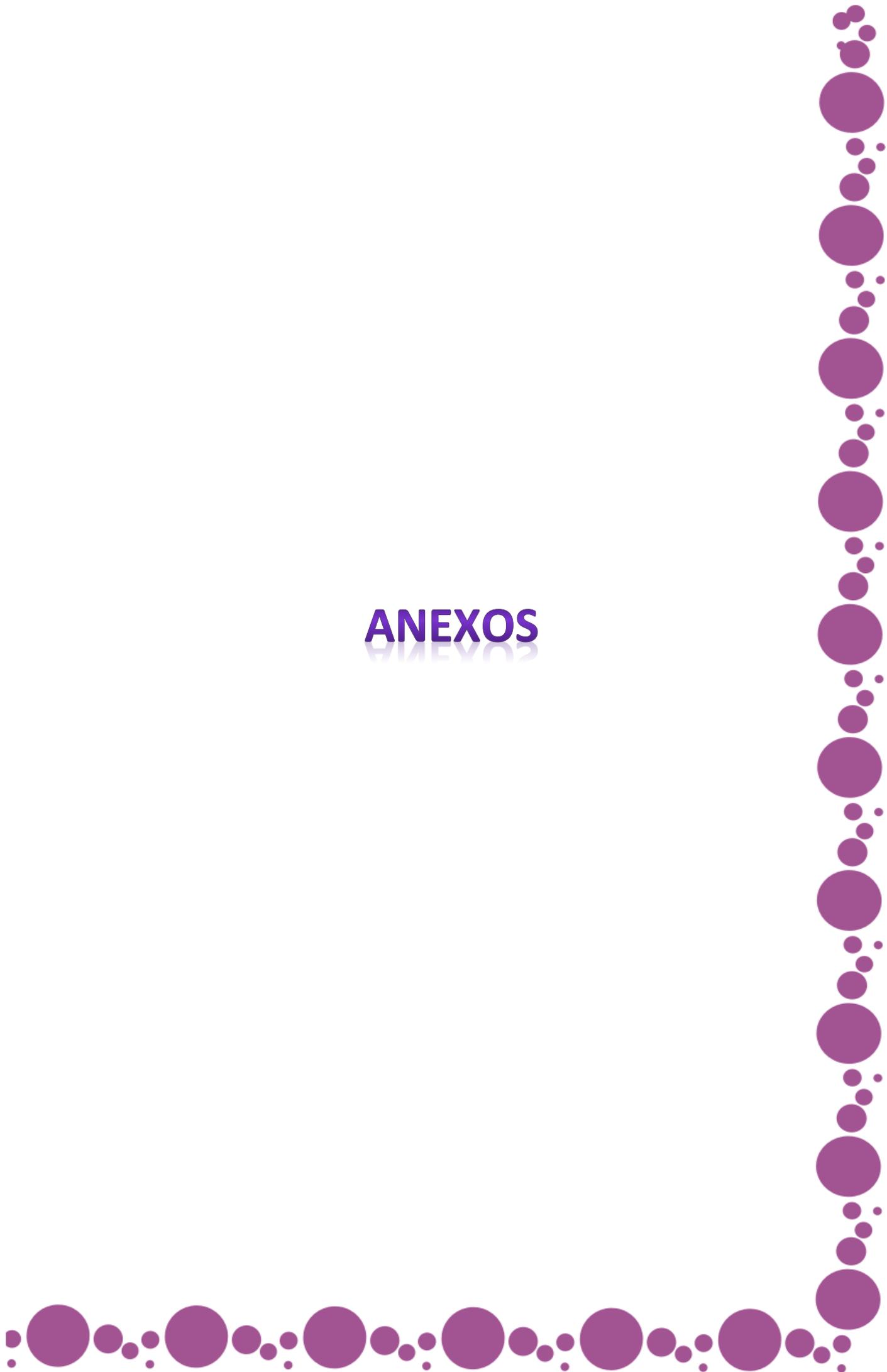
como es el caso de la TB pulmonar, lo que permitiría aumentar la concentración local del fármaco en el tejido pulmonar, donde ocurre la infección primaria. Además permitirían una reducción del riesgo de toxicidad sistémica y contribuirían a la mejora del cumplimiento por parte del paciente.

5.2. Proyecciones

Como proyecciones de este trabajo de Tesis se proponen las siguientes:

- Estudiar en profundidad el mecanismo de acción a través del cual las NPs RIF ejercen su acción bactericida.
- Realizar estudios en líneas celulares humanas de MAs para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de las NPs, su internalización e investigar los mecanismos involucrados en este proceso.
- Evaluar los posibles efectos tóxicos, la biodistribución, la farmacocinética, entre otros aspectos de relevancia biofarmacéutica para profundizar en los conocimientos sobre el comportamiento *in vivo* de las NPs.
- Diseñar y desarrollar inhaladores de polvo seco para la administración pulmonar de las NPs.

ANEXOS



ANEXO I

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados
(la respuesta es Tamaño (nm); $\alpha = 0,05$)

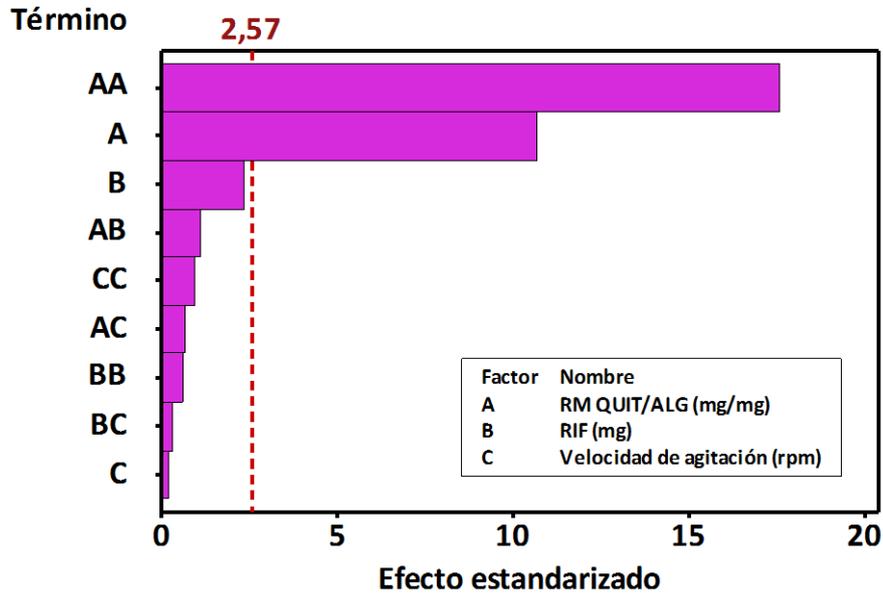


Figura I.1. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la respuesta tamaño en función de los factores RM QUIT/ALG, RIF y velocidad de agitación.

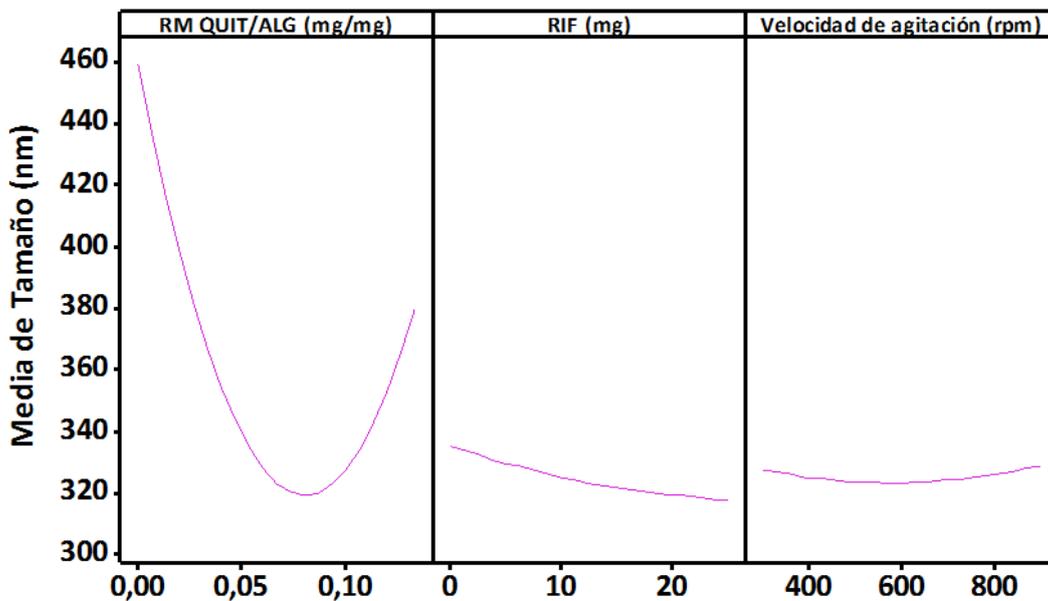


Figura I.2. Gráfica de efectos principales para la respuesta tamaño en función de los factores RM QUIT/ALG, RIF y velocidad de agitación.

Anexo I

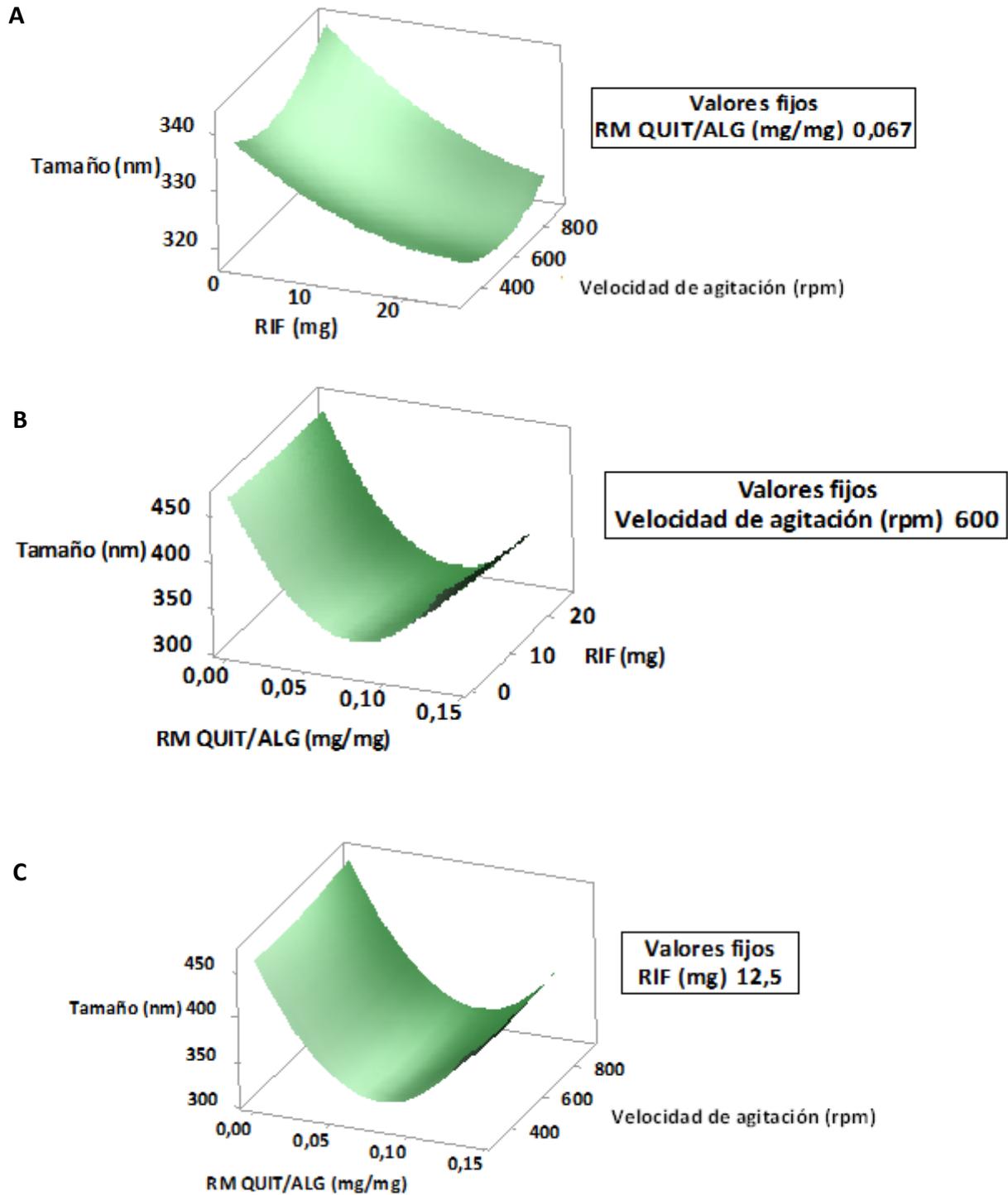


Figura I.3. Gráficas de superficie para la respuesta tamaño en función de los factores A- velocidad de agitación y RIF, B- RIF y RM QUIT/ALG y C- velocidad de agitación y RM QUIT/ALG.

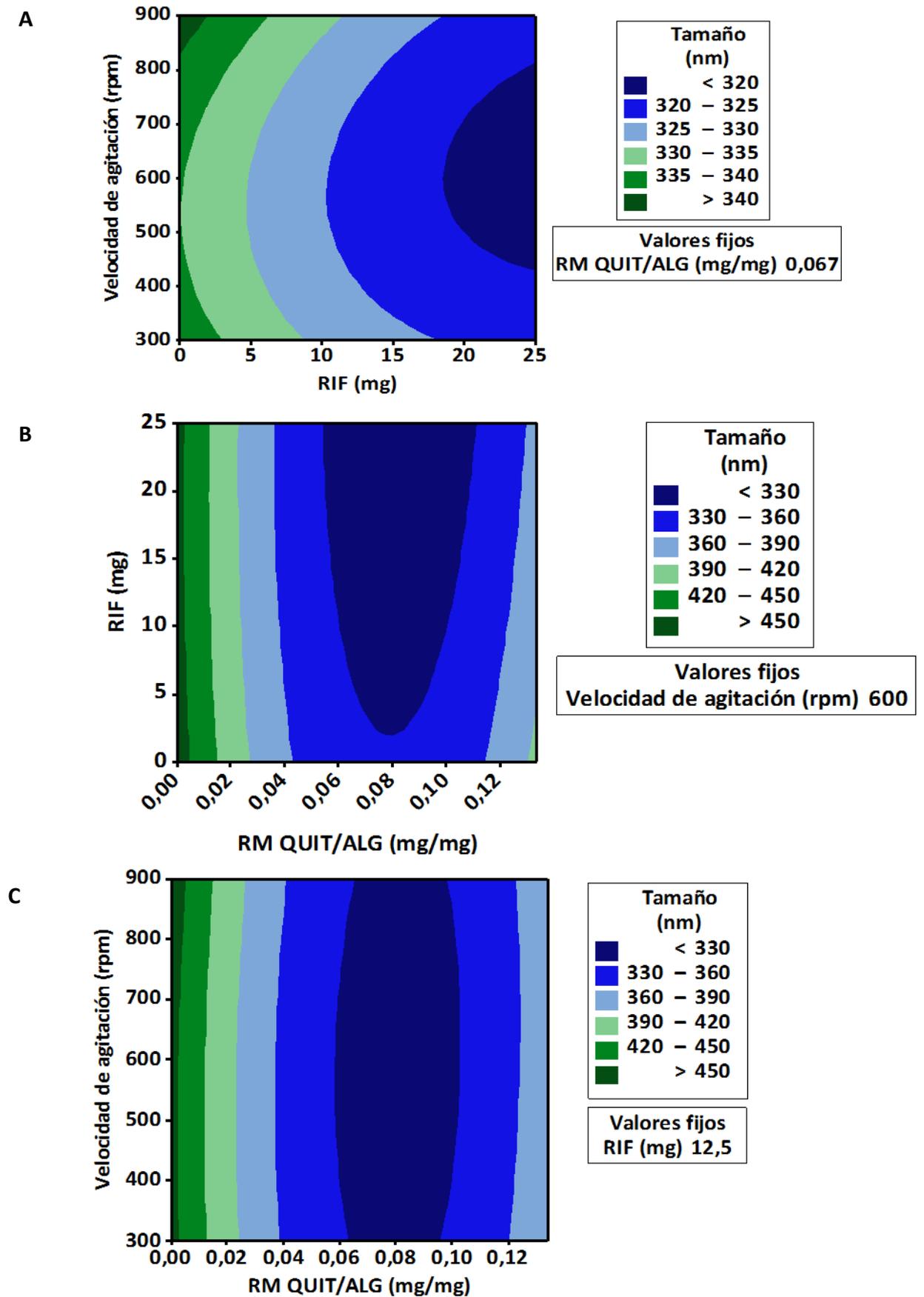


Figura I.4. Gráficas de contorno para la respuesta tamaño en función de los factores A- velocidad de agitación y RIF, B- RIF y RM QUIT/ALG y C- velocidad de agitación y RM QUIT/ALG.

ANEXO II

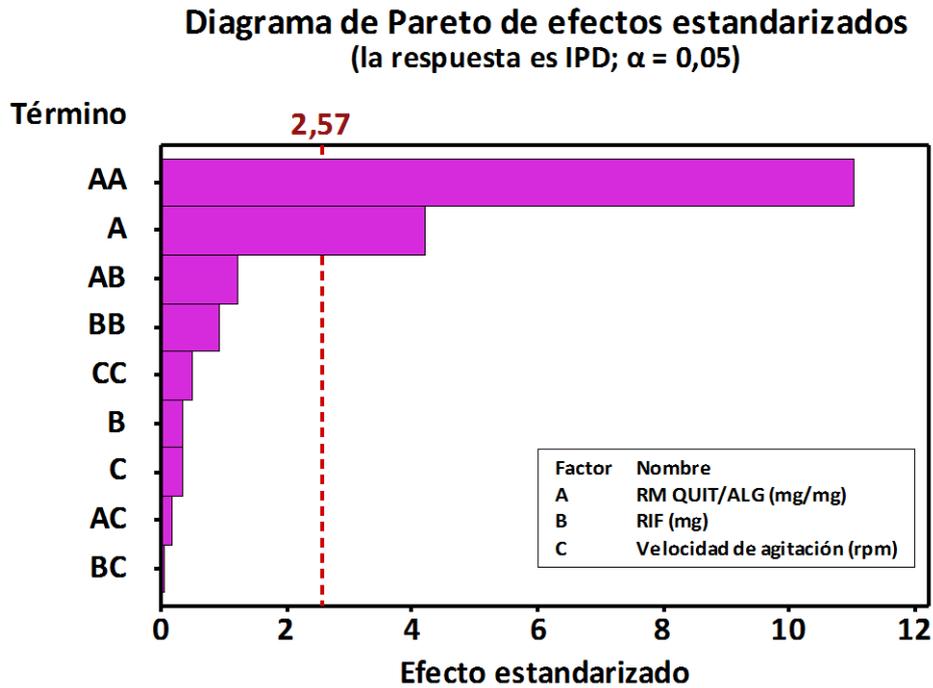


Figura II.1. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la respuesta IPD en función de los factores RM QUIT/ALG, RIF y velocidad de agitación.

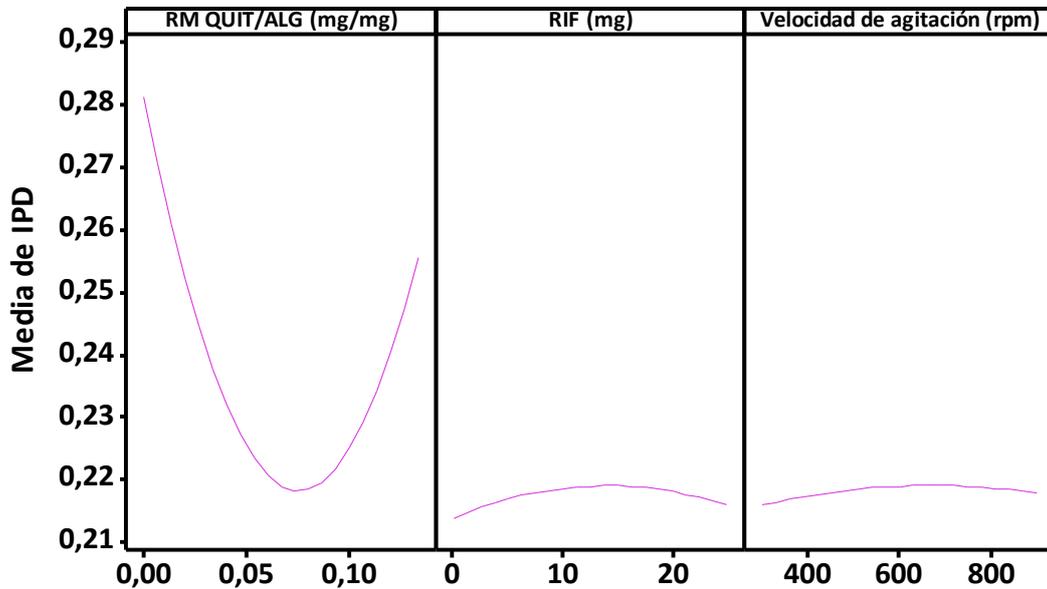


Figura II.2. Gráfica de efectos principales para la respuesta IPD en función de los factores RM QUIT/ALG, RIF y velocidad de agitación.

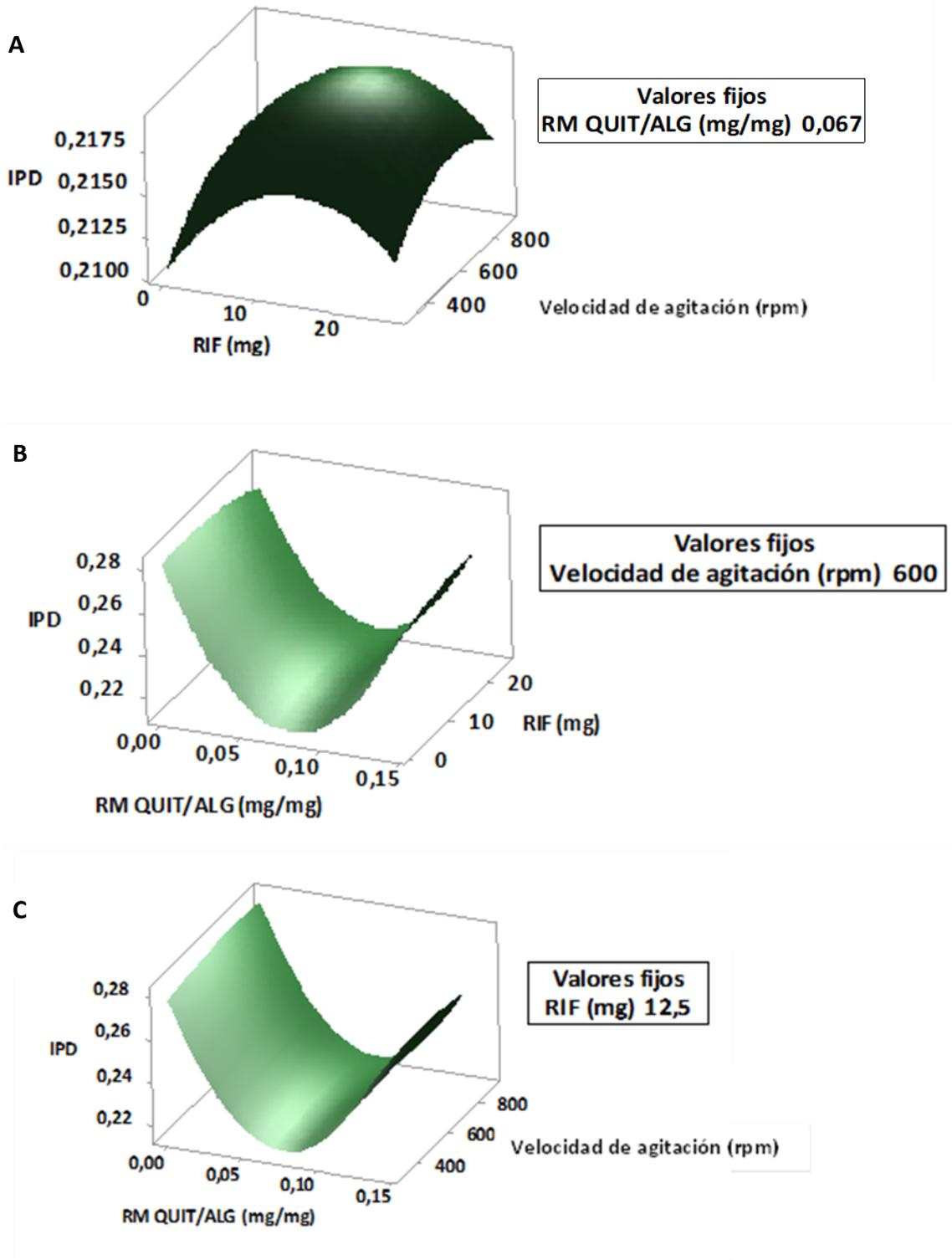


Figura II.3. Gráficas de superficie para la respuesta IPD en función de los factores A- velocidad de agitación y RIF, B- RIF y RM QUIT/ALG y C- velocidad de agitación y RM QUIT/ALG.

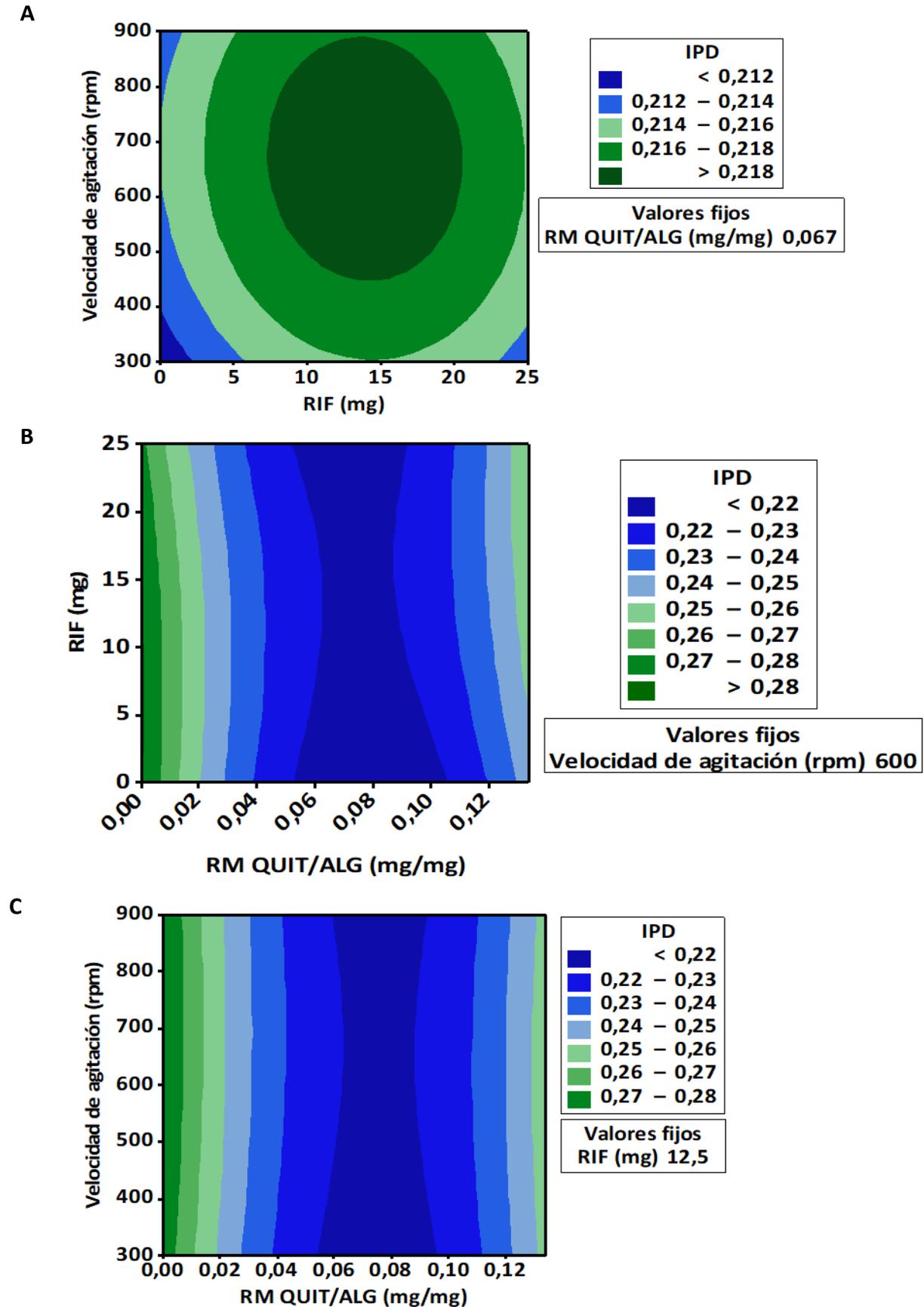


Figura II.4. Gráficas de contorno para la respuesta IPD en función de los factores A- velocidad de agitación y RIF, B- RIF y RM QUIT/ALG y C- velocidad de agitación y RM QUIT/ALG.

Anexo II

ANEXO III

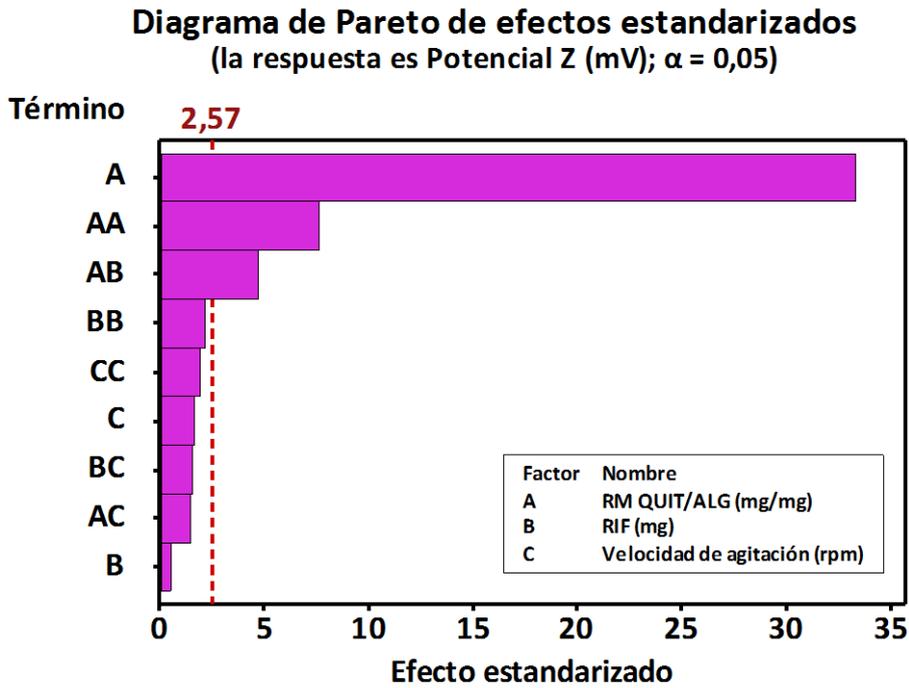


Figura III.1. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la respuesta potencial z en función de los factores RM QUIT/ALG, RIF y velocidad de agitación.

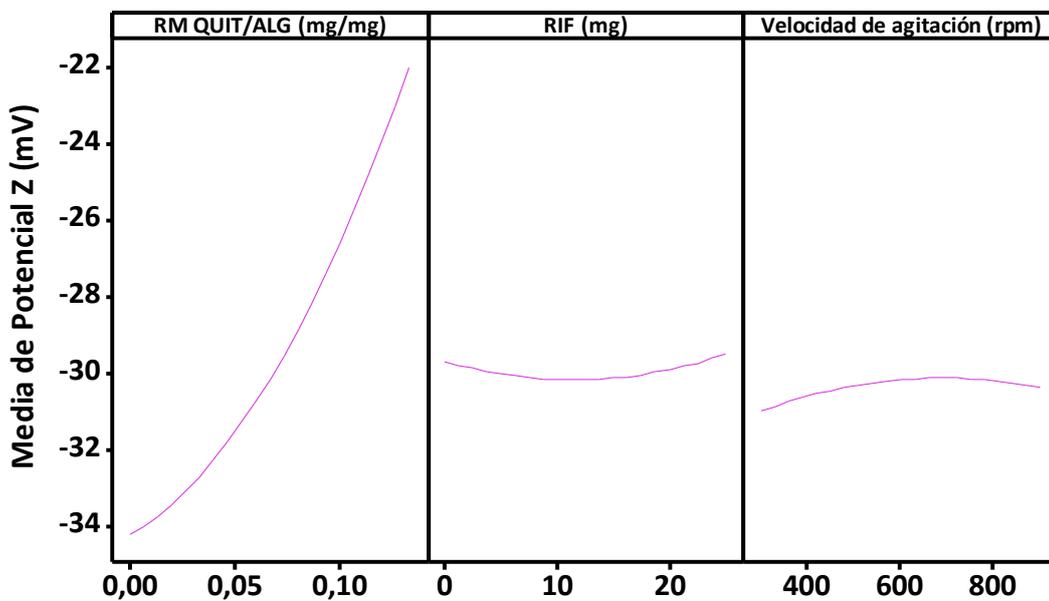
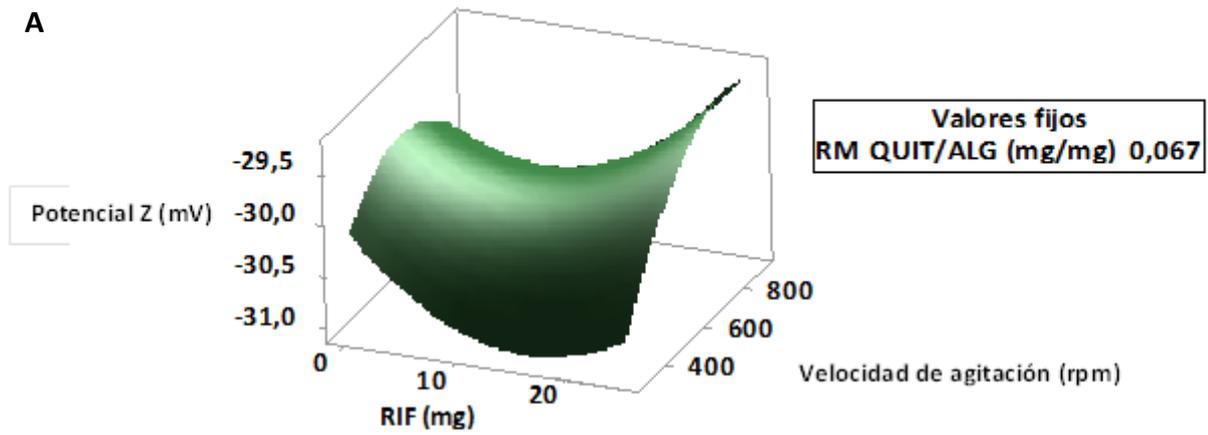


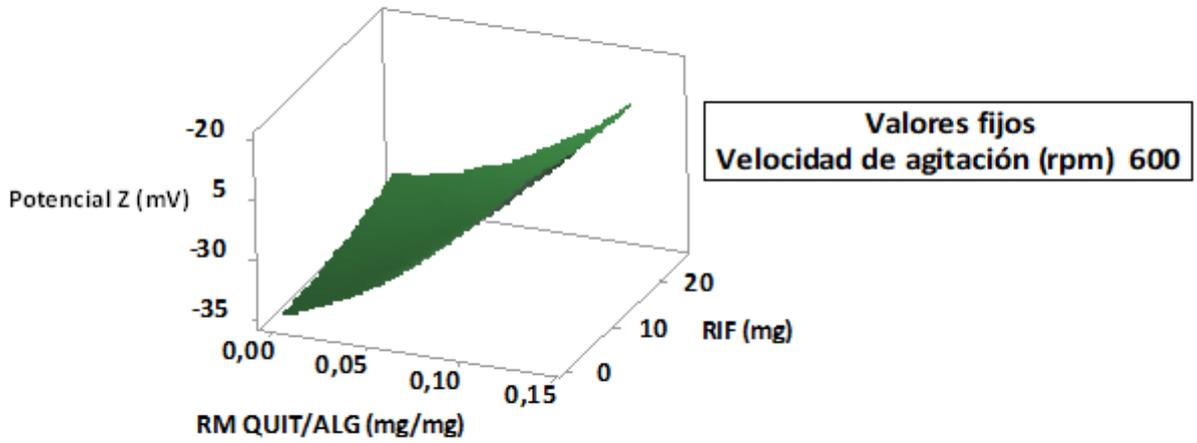
Figura III.2. Gráfica de efectos principales para la respuesta potencial z en función de los factores RM QUIT/ALG, RIF y velocidad de agitación.

Anexo III

A



B



C

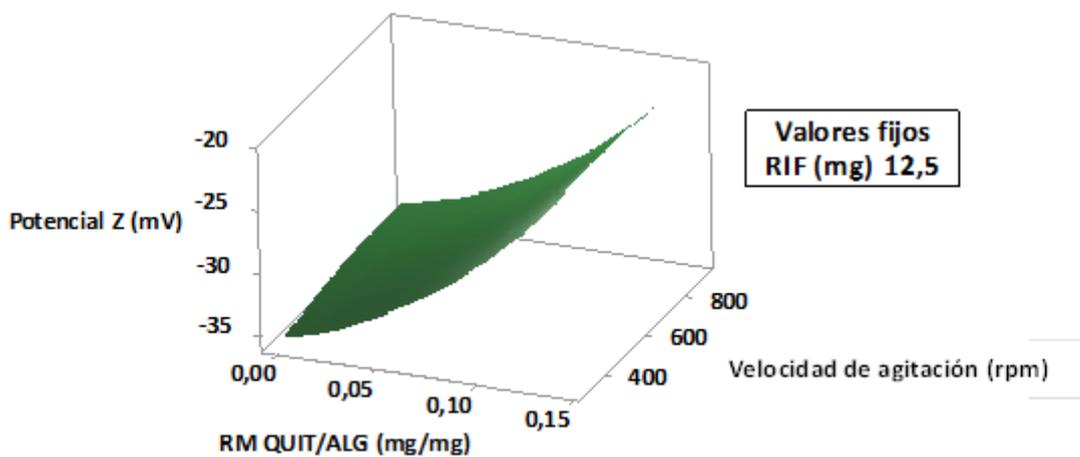


Figura III.3. Gráficas de superficie para la respuesta potencial z en función de los factores A- velocidad de agitación y RIF, B- RIF y RM QUIT/ALG y C- velocidad de agitación y RM QUIT/ALG.

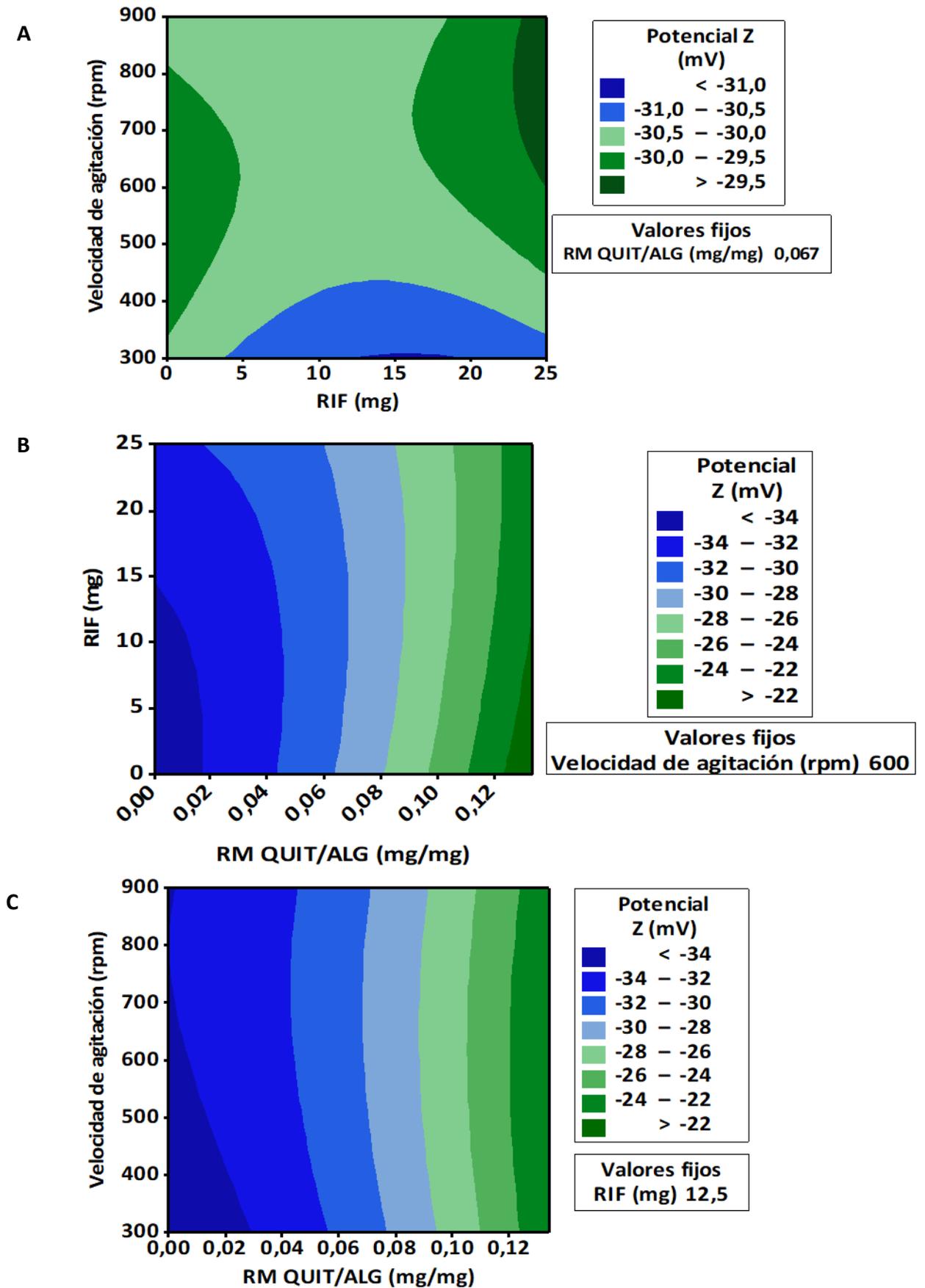


Figura III.4. Gráficas de contorno para la respuesta potencial z en función de los factores A- velocidad de agitación y RIF, B- RIF y RM QUIT/ALG y C- velocidad de agitación y RM QUIT/ALG.

Anexo III

ANEXO IV

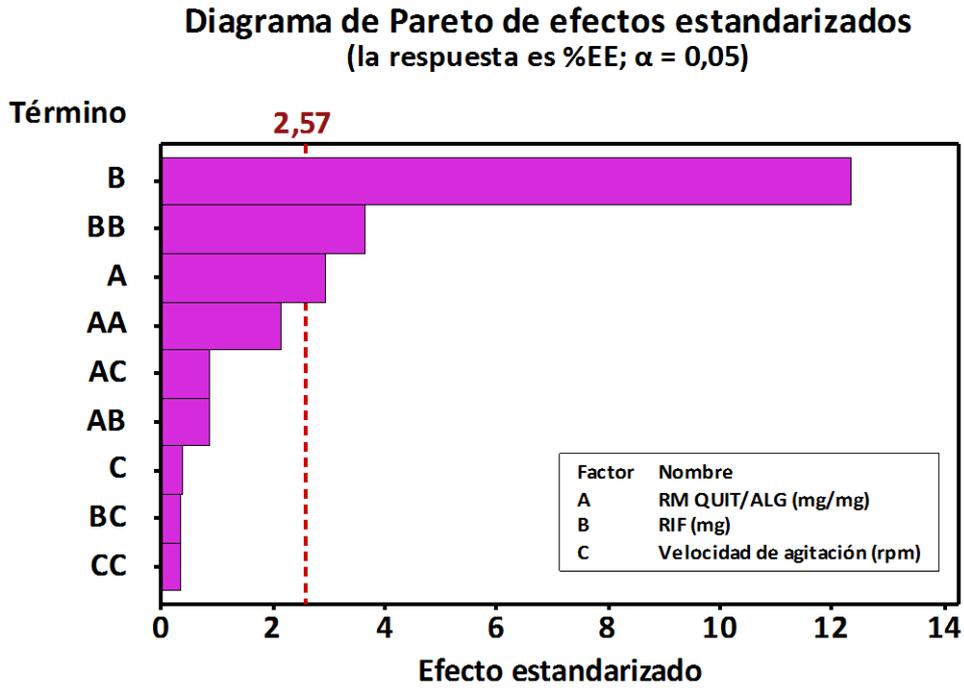


Figura IV.1. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la respuesta eficiencia de encapsulación en función de los factores RM QUIT/ALG, RIF y velocidad de agitación.

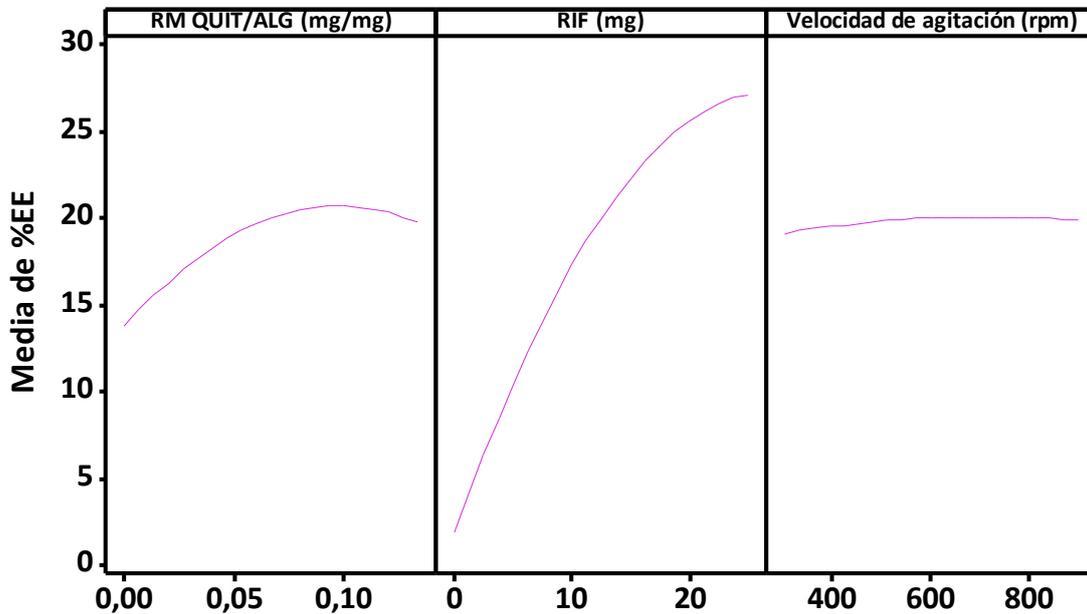
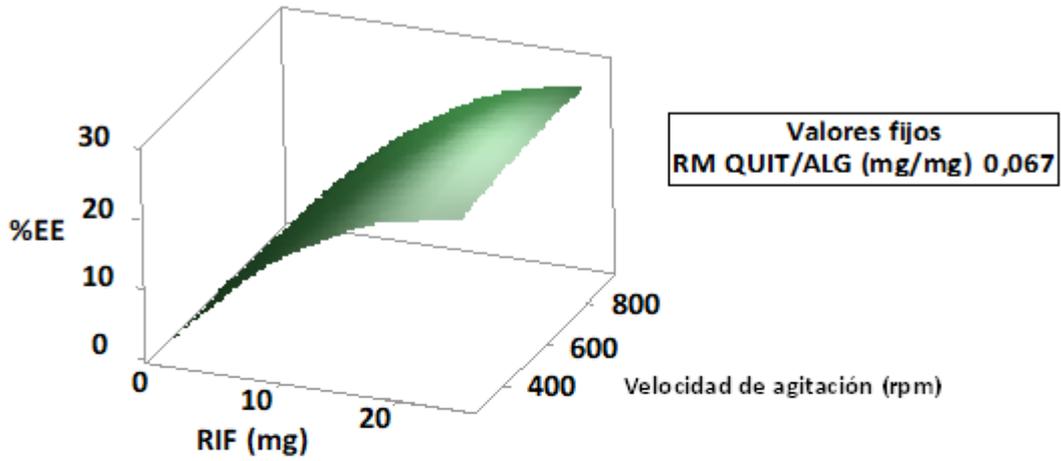


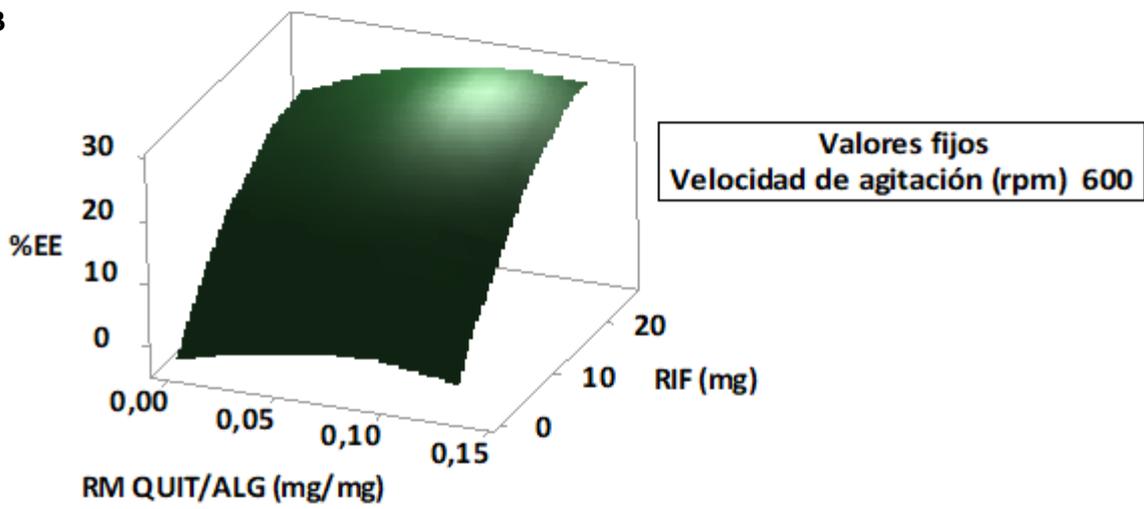
Figura IV.2. Gráfica de efectos principales para la respuesta eficiencia de encapsulación en función de los factores RM QUIT/ALG, RIF y velocidad de agitación.

Anexo IV

A



B



C

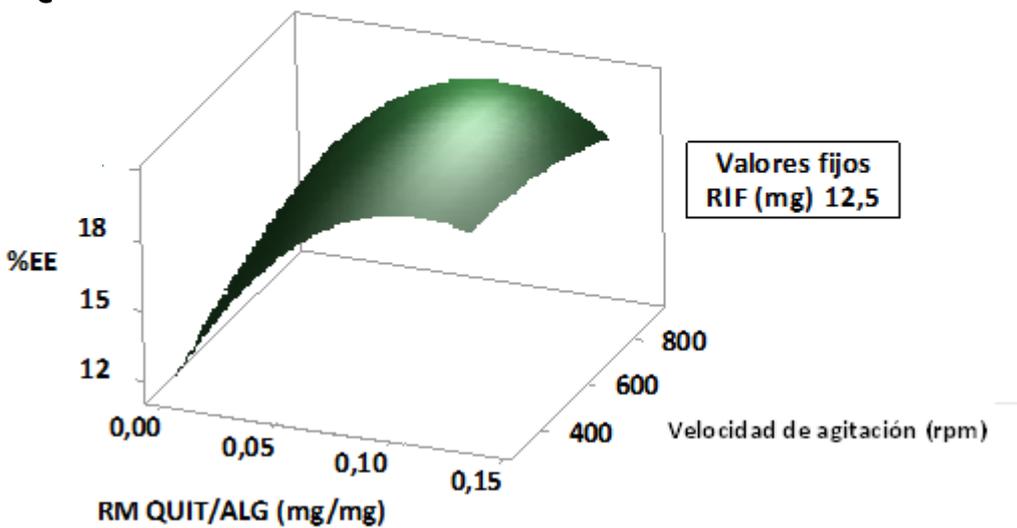


Figura IV.3. Gráficas de superficie para la respuesta eficiencia de encapsulación en función de los factores A- velocidad de agitación y RIF, B- RIF y RM QUIT/ALG y C- velocidad de agitación y RM QUIT/ALG.

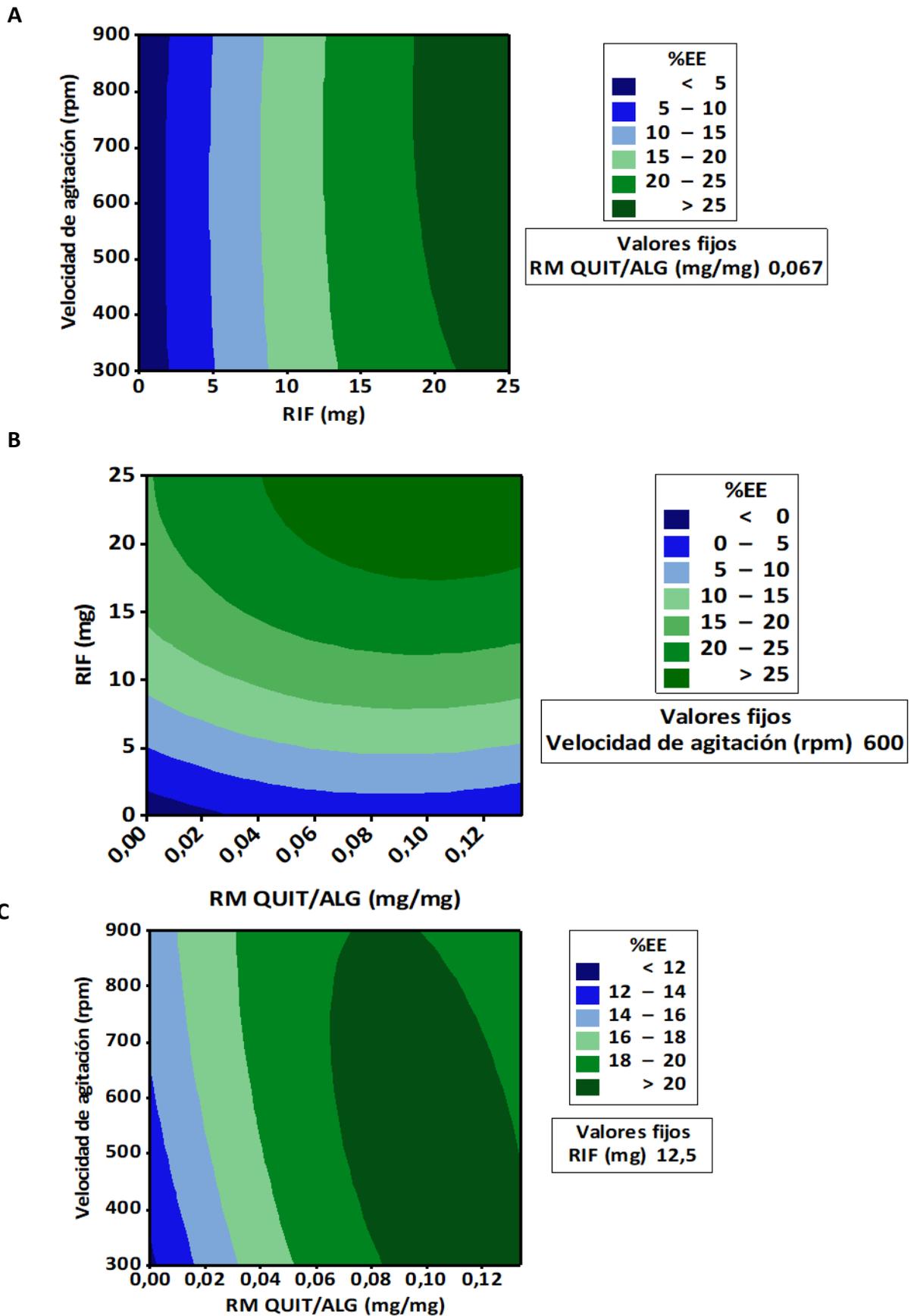


Figura IV.4. Gráficas de contorno para la respuesta eficiencia de encapsulación en función de los factores A- velocidad de agitación y RIF, B- RIF y RM QUIT/ALG y C- velocidad de agitación y RM QUIT/ALG.

ANEXO V

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados
(la respuesta es Tamaño (nm); $\alpha = 0,05$)

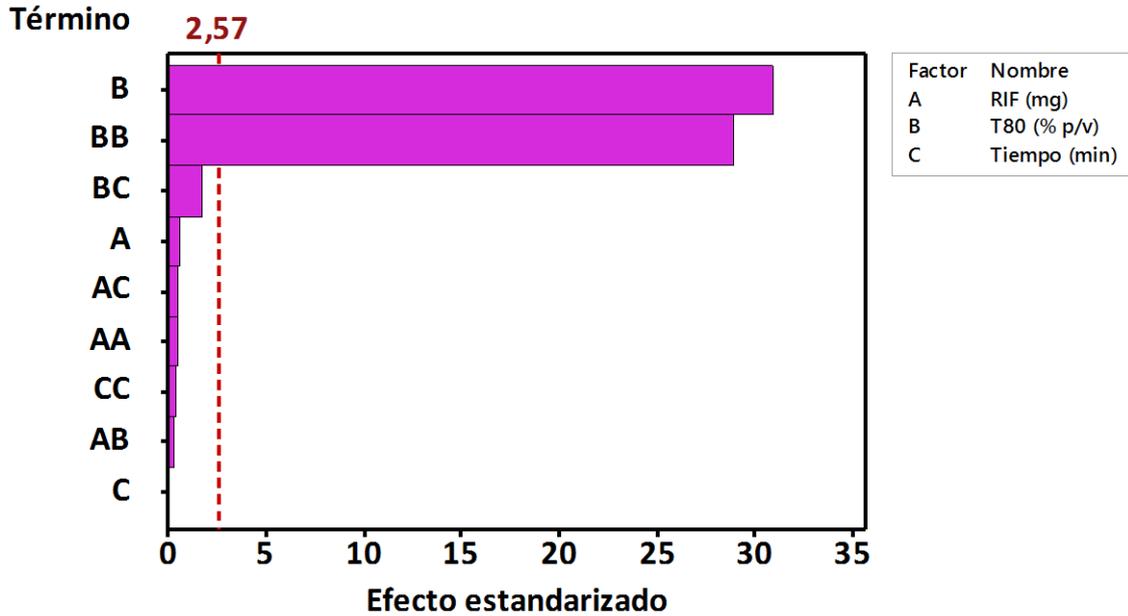


Figura V.1. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la respuesta tamaño en función de los factores RIF, T80 y tiempo de agitación.

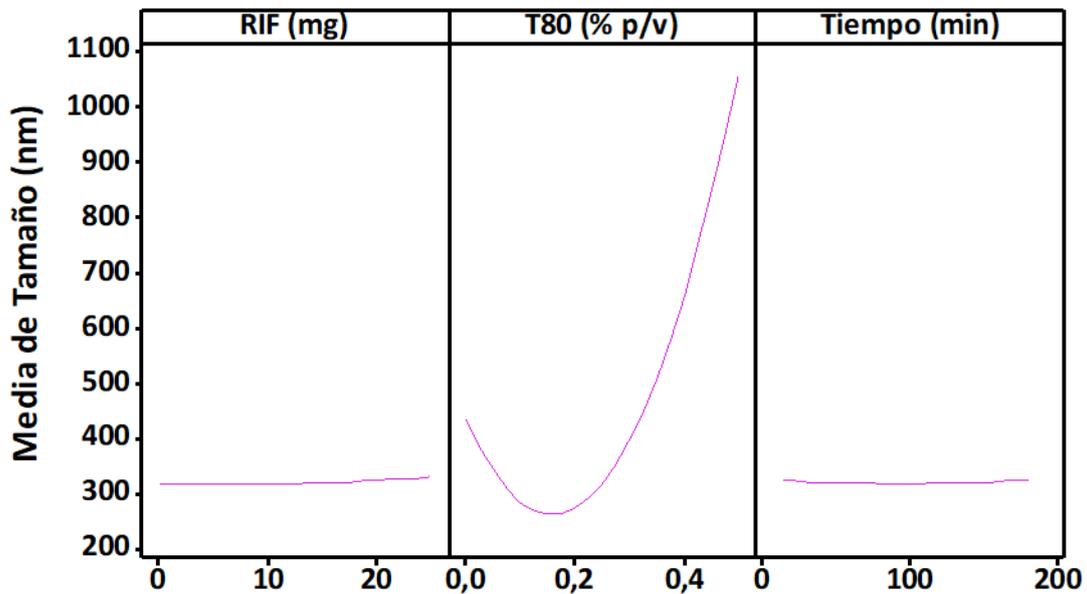


Figura V.2. Gráfica de efectos principales para la respuesta tamaño en función de los factores RIF, T80 y Tiempo.

Anexo V

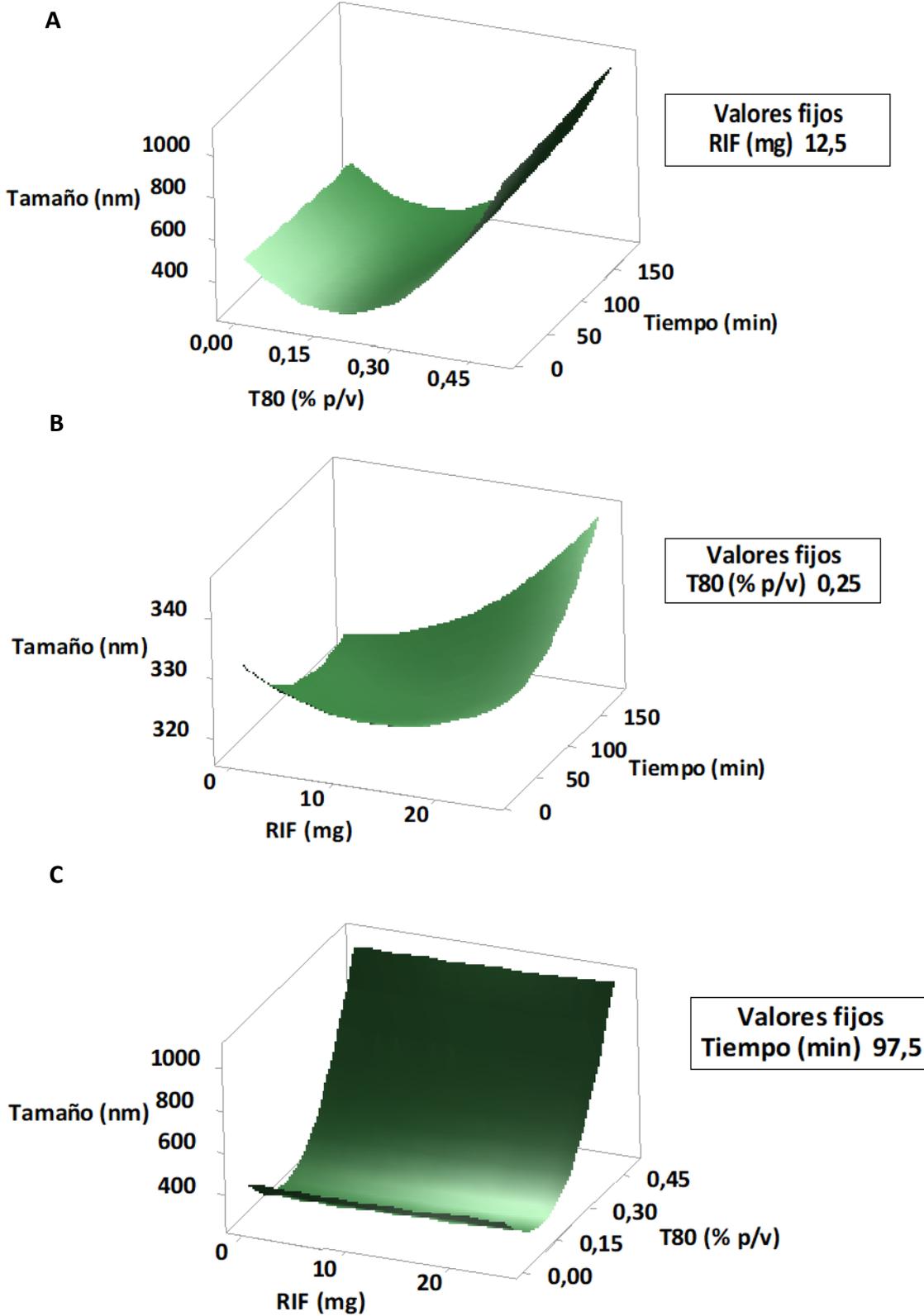


Figura V.3. Gráficas de superficie para la respuesta tamaño en función de los factores A- tiempo y T80, B- Tiempo y RIF y C- T80 y RIF

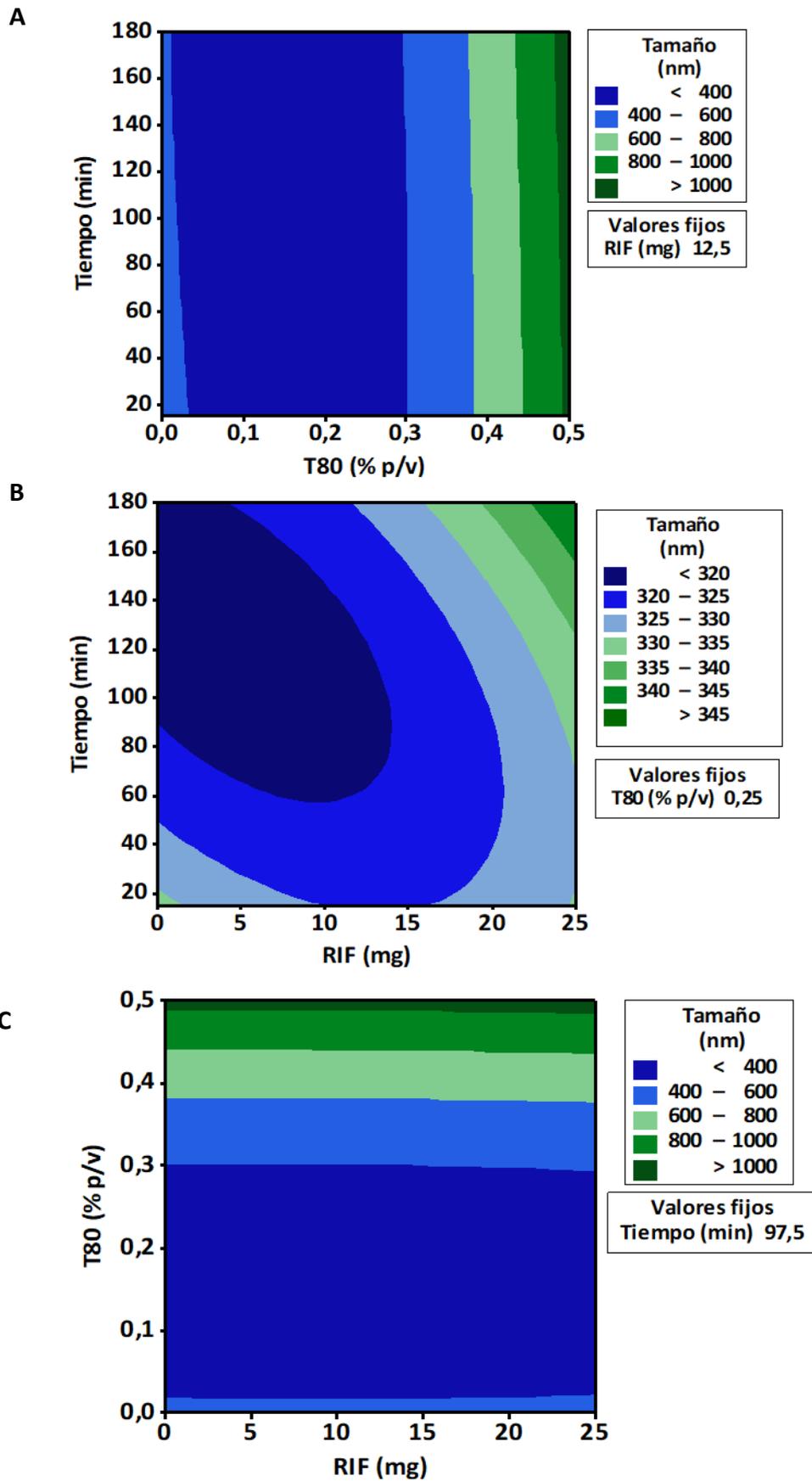


Figura V.4. Gráficas de contorno para la respuesta tamaño en función de los factores

A- Tiempo y T80, B- Tiempo y RIF y C- T80 y RIF

ANEXO VI

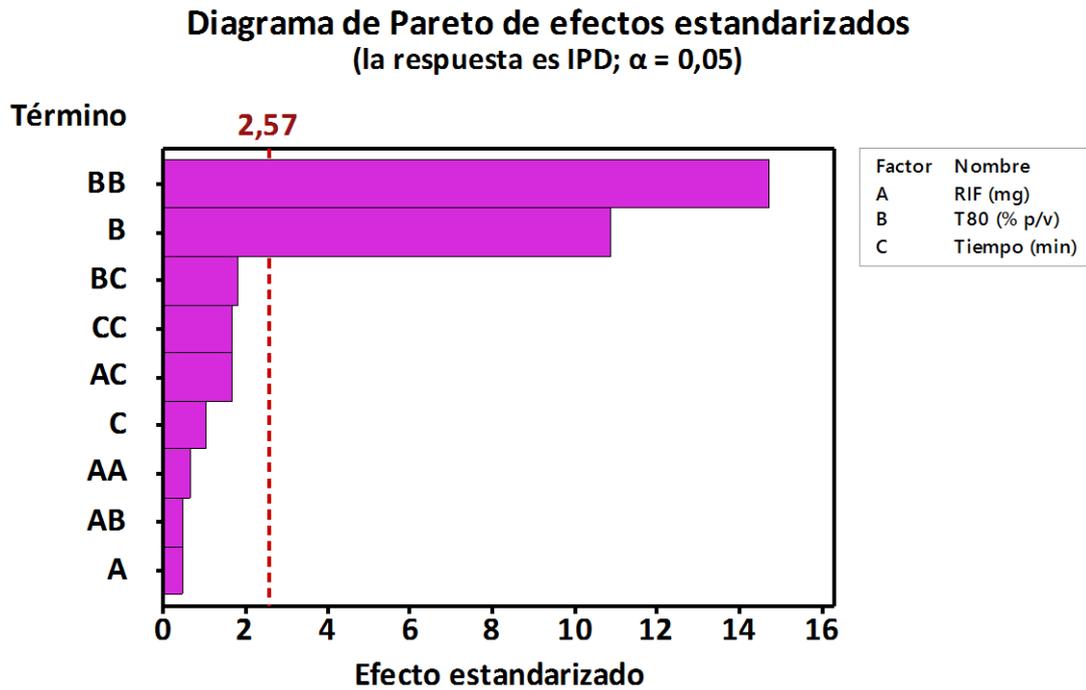


Figura VI.1. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la respuesta IPD en función de los factores RIF, T80 y tiempo de agitación.

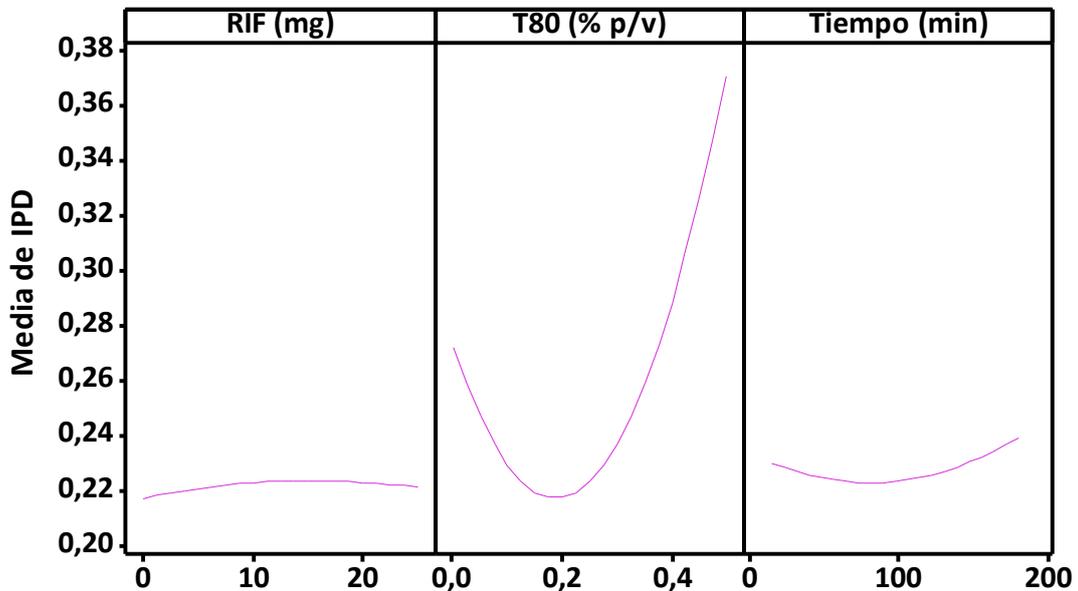


Figura VI.2. Gráfica de efectos principales para la respuesta IPD en función de los factores RIF, T80 y Tiempo.

Anexo VI

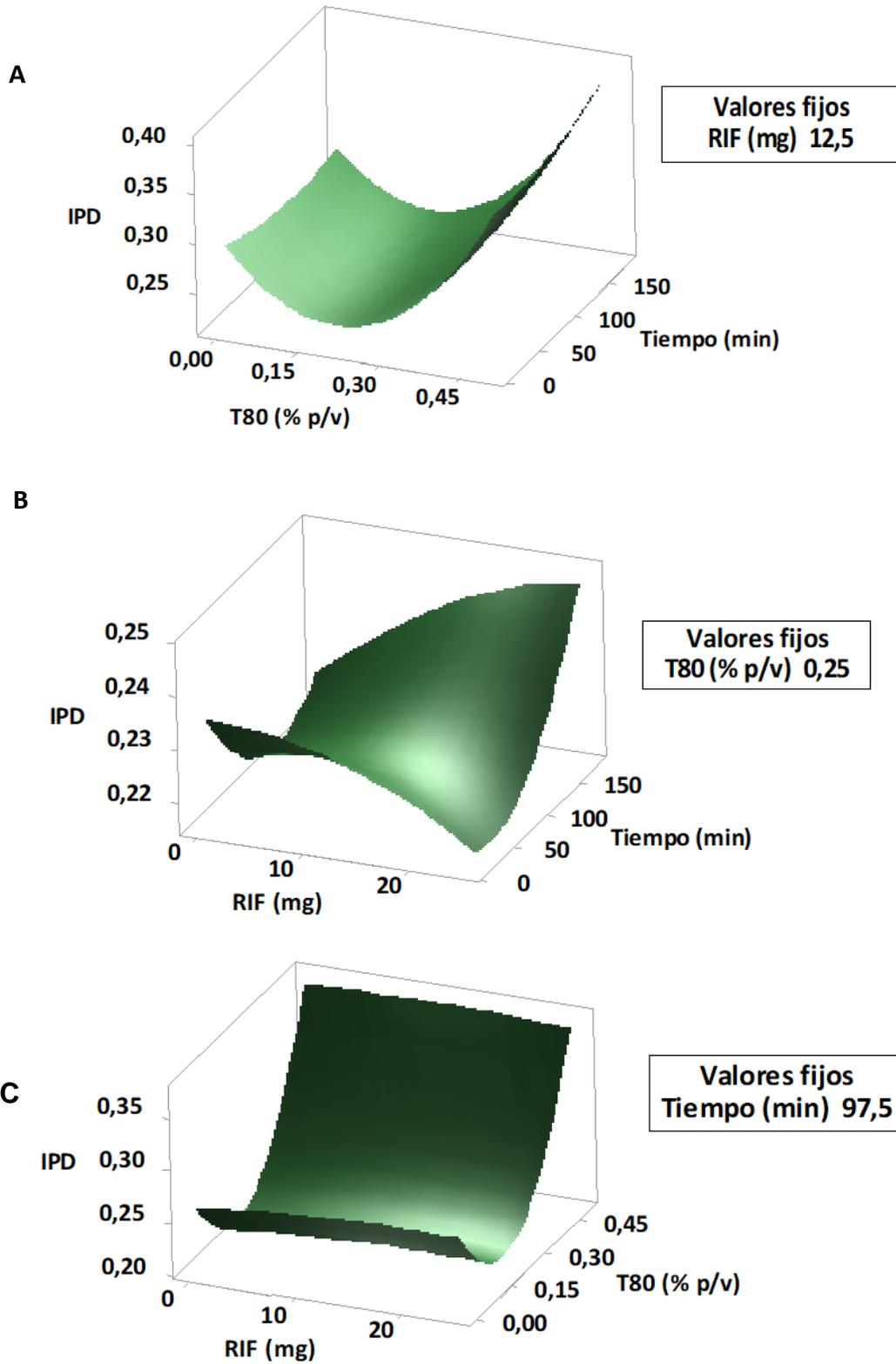


Figura VI.3. Gráficas de superficie para la respuesta IPD en función de los factores A- tiempo y T80, B- Tiempo y RIF y C- T80 y RIF

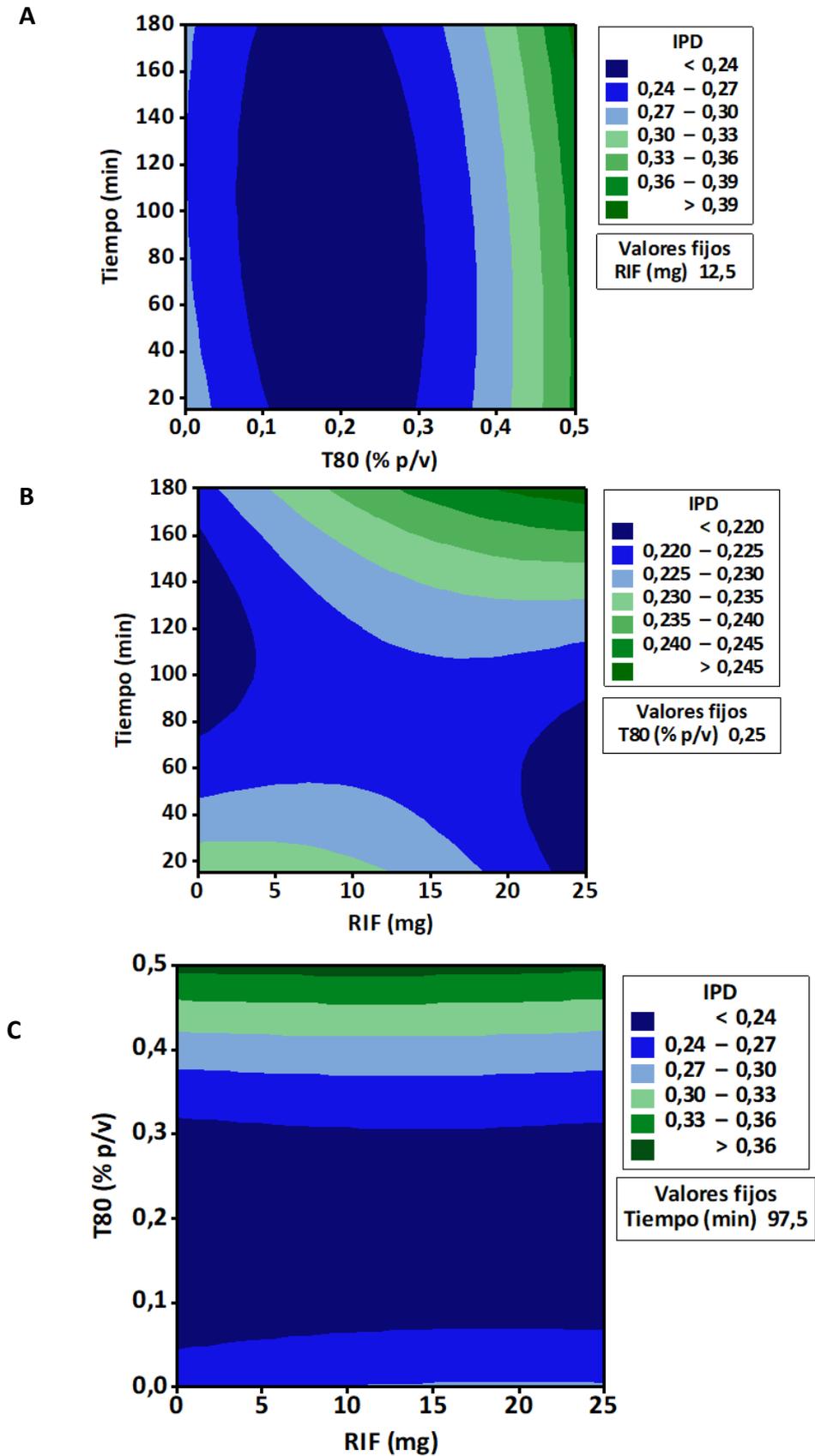


Figura VI.4. Gráficas de contorno para la respuesta IPD en función de los factores A- Tiempo y T80, B- Tiempo y RIF y C- T80 y RIF

ANEXO VII

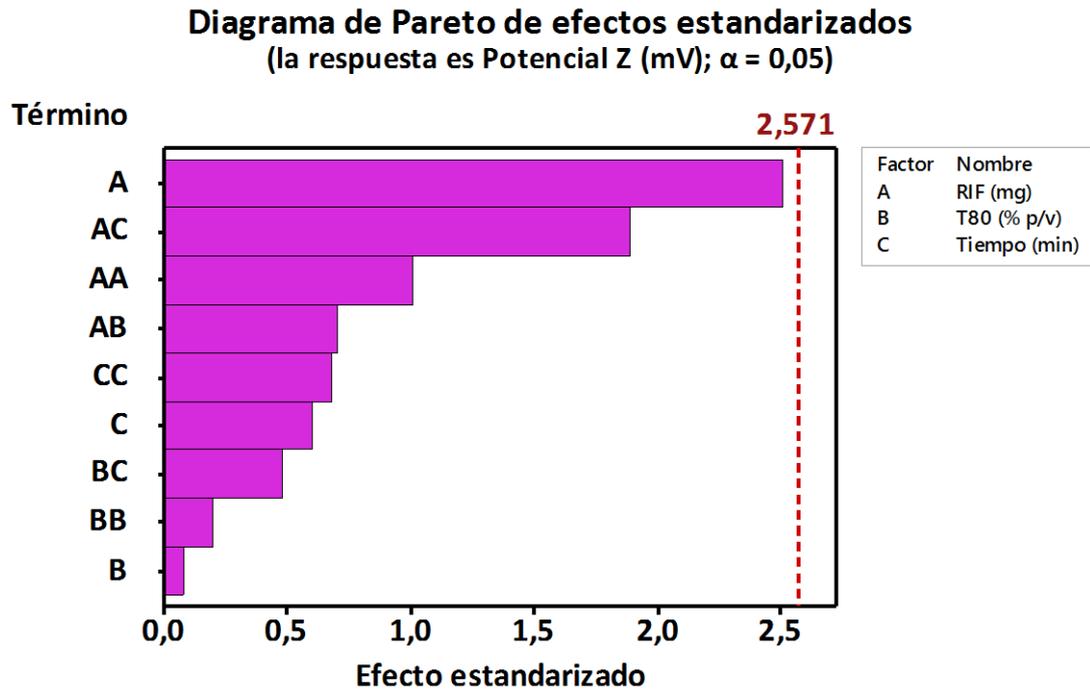


Figura VII.1. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la respuesta potencial z en función de los factores RIF, T80 y tiempo de agitación.

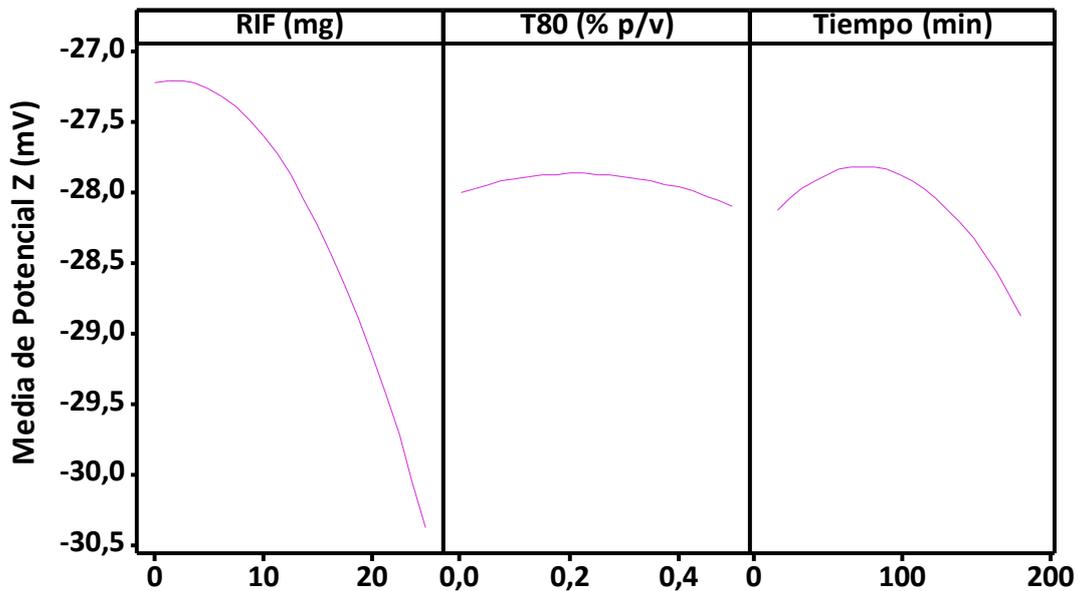


Figura VII.2. Gráfica de efectos principales para la respuesta potencial z en función de los factores RIF, T80 y Tiempo.

Anexo VII

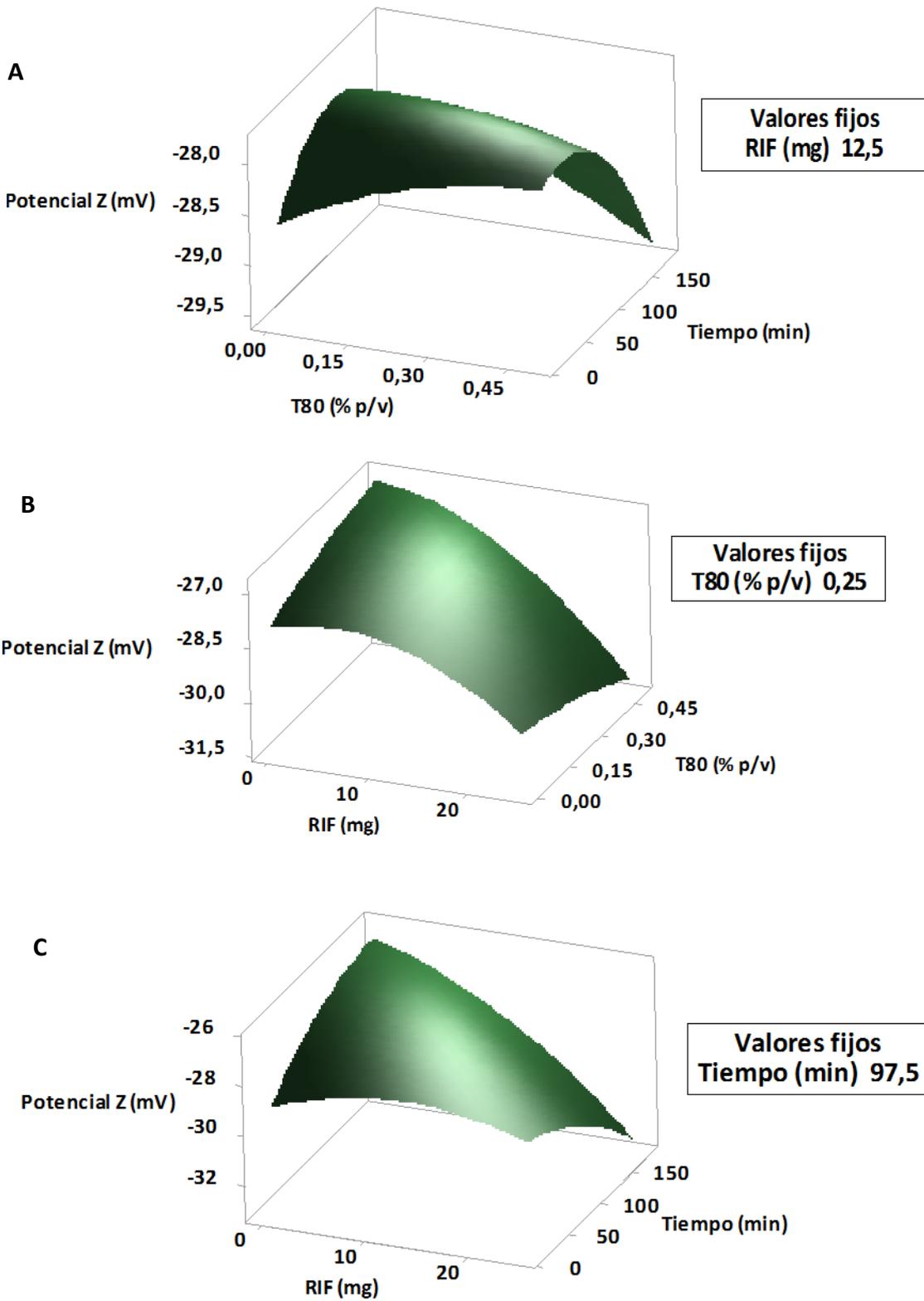


Figura VII.3. Gráficas de superficie para la respuesta potencial z en función de los factores A- tiempo y T80, B- Tiempo y RIF y C- T80 y RIF

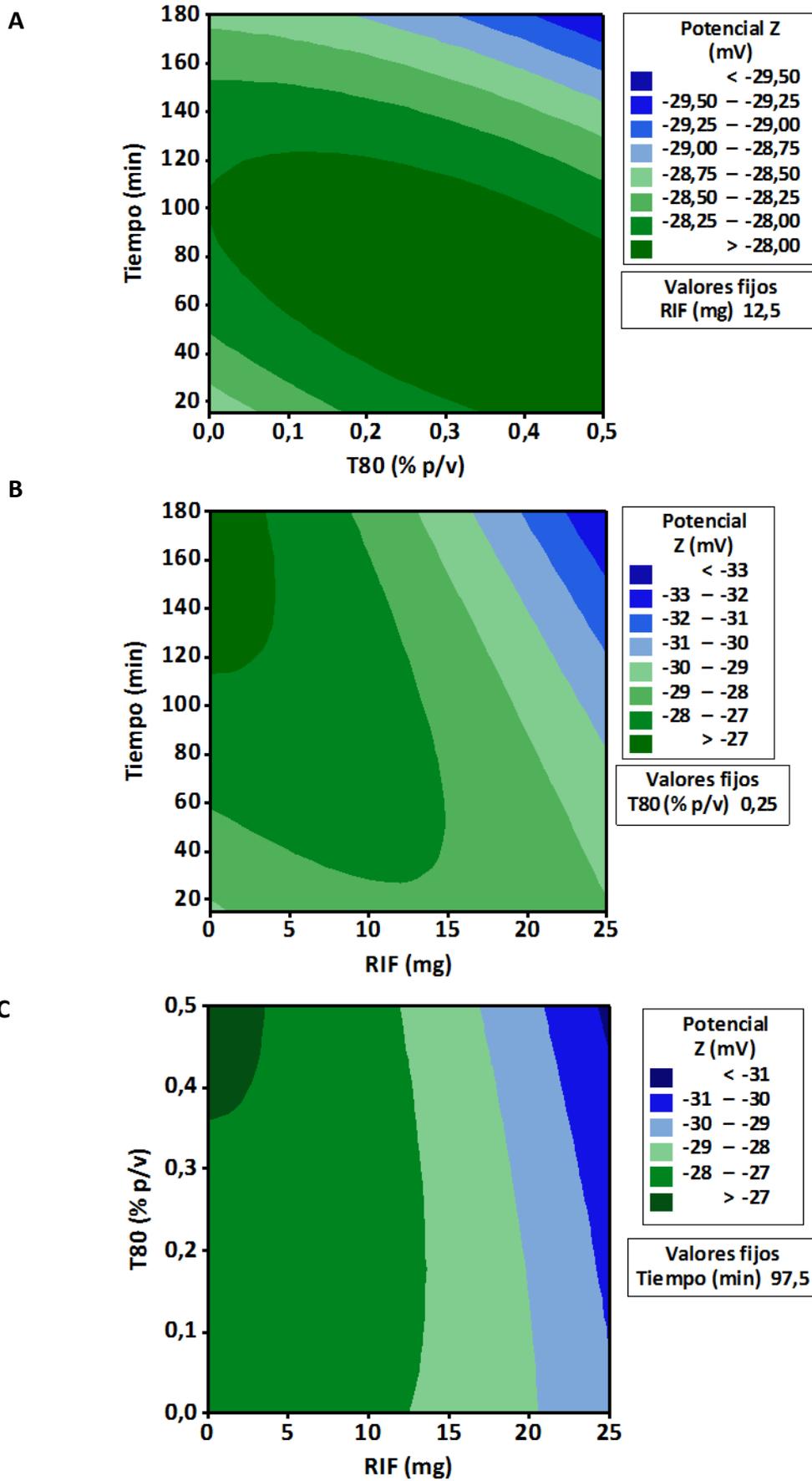


Figura VII.4. Gráficas de contorno para la respuesta potencial z en función de los factores A- Tiempo y T80, B- Tiempo y RIF y C- T80 y RIF

Anexo VII

ANEXO VIII

Diagrama de Pareto de efectos estandarizados
(la respuesta es %EE; $\alpha = 0,05$)

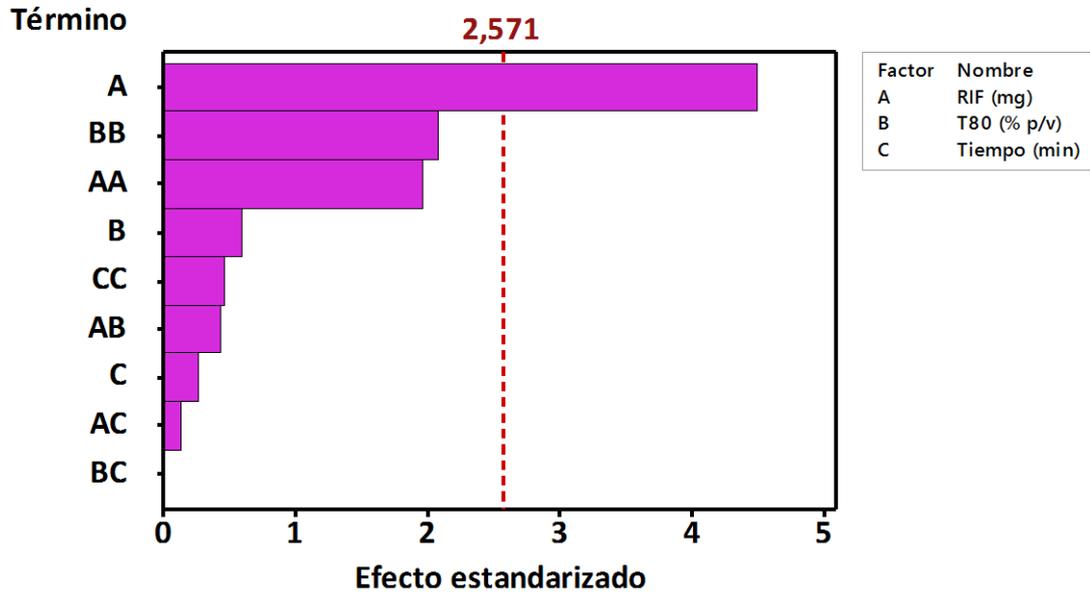


Figura VIII.1. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para la respuesta eficiencia de encapsulación en función de los factores RIF, T80 y tiempo de agitación.

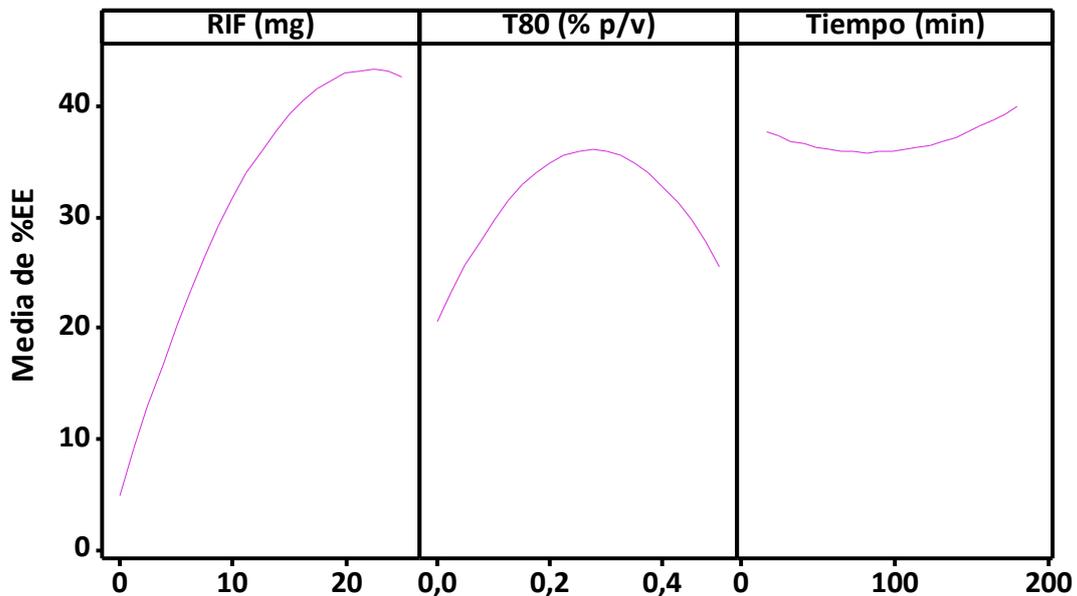


Figura VIII.2. Gráfica de efectos principales para la respuesta eficiencia de encapsulación en función de los factores RIF, T80 y Tiempo.

Anexo VIII

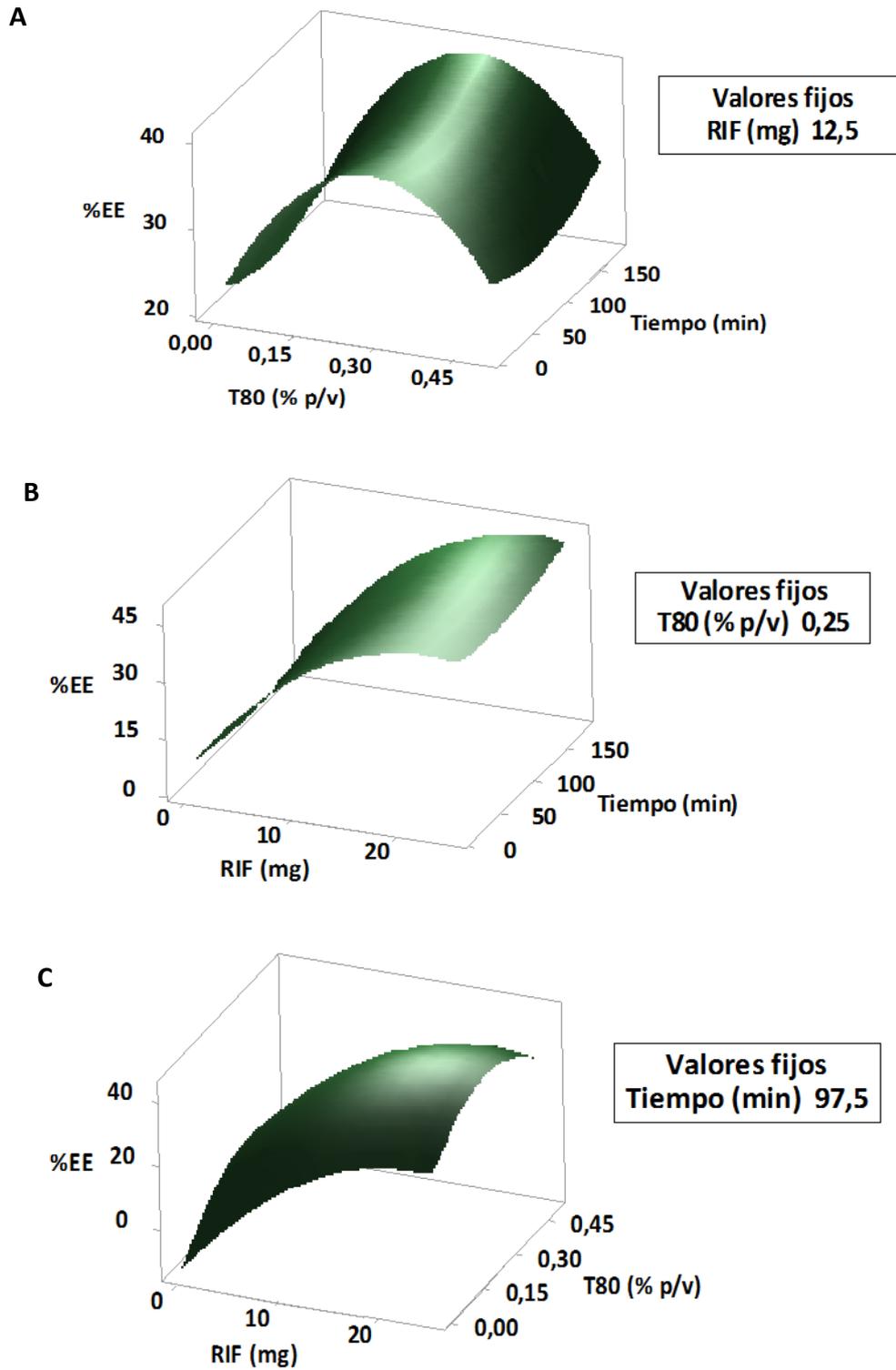


Figura VIII.3. Gráficas de superficie para la respuesta eficiencia de encapsulación en función de los factores A- tiempo y T80, B- Tiempo y RIF y C- T80 y RIF.

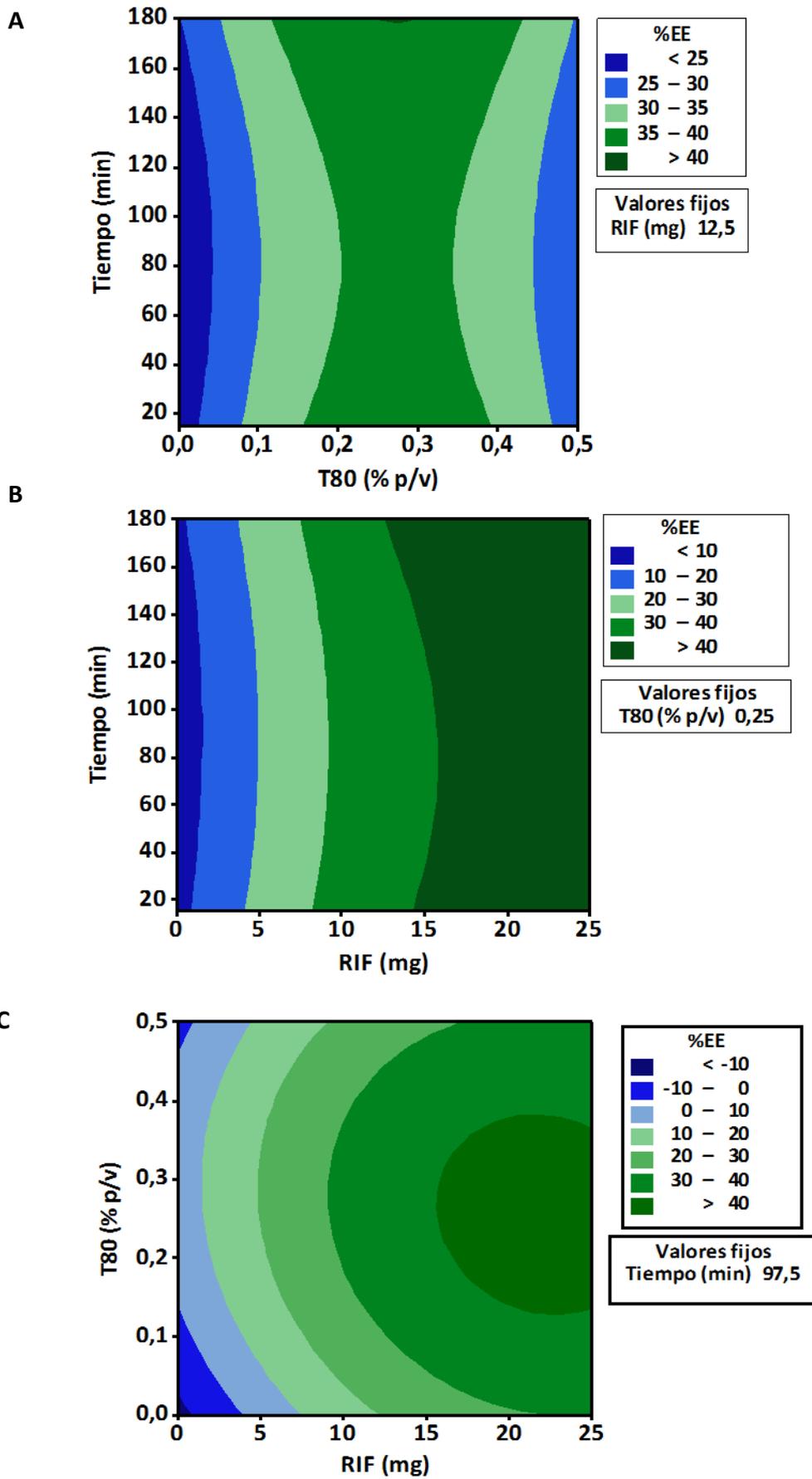


Figura VIII.4. Gráficas de contorno para la respuesta eficiencia de encapsulación en función de los factores A- Tiempo y T80, B- Tiempo y RIF y C- T80 y RIF.

Anexo VIII

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Trabajos de investigación publicados en revistas internacionales con referato relacionados al presente trabajo de Tesis

- Ivana R. Scolari, Paulina L. Páez, Mariela E. Sánchez-Borzone, Gladys E. Granero. Promising Chitosan-Coated Alginate-Tween 80 Nanoparticles as Rifampicin Coadministered Ascorbic Acid Delivery Carrier Against *Mycobacterium tuberculosis*. AAPS PharmSciTech (2019) 20:67. DOI: 10.1208/s12249-018-1278-7

Presentaciones a congresos internacionales relacionados al presente trabajo de Tesis

- Scolari I., Paez P., Sánchez-Borzone M., Granero G desarrollo de nanopartículas poliméricas de rifampicina para combatir la tuberculosis. RICiFa 2018. Centro de Convenciones La Punta, San Luis, Argentina. 14 a 16 de noviembre, 2018.
- Scolari I., Páez P., Granero G. Development, characterization and biological activity of alginate/chitosan/rifampicin nanoparticles. RICiFa 2016. Centro Cultural Fontanarrosa, Rosario, Santa Fe, Argentina. 27 y 28 de octubre, 2016.
- Scolari I., Granero G. Desarrollo de sistemas nanoparticulados de rifampicina con alginato/quitosano/tween 80. COIFFA 2015. Pabellón Argentina, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 4, 5 y 6 de noviembre, 2015.

