

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA
Unitat de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

TARGETING OF ANTILEISHMANIAL DRUGS PRODUCED BY
NANOTECHNOLOGIES

GEORGINA PUJALS I NARANJO

Barcelona, 2007

ANNEX

**“VEHICULITZACIÓ DE FÀRMACS A CÈL·LULES
DIANA PEL TRACTAMENT DE LA
LEISHMANIOSIS MITJANÇANT
NANOTECNOLOGIES”**

OBJECTIUS	203
SECCIÓ BIBLIOGRÀFICA	205
1. LEISHMANIOSIS	205
2. ANTIMONIALS	207
2.1. ANTIMONIAT DE MEGLUMINA	207
3. SISTEMES D'ALLIBERACIÓ MODIFICADA	211
3.1. Introducció.....	211
3.2. Sistemes d'alliberació de fàrmacs antileishmania a macròfags.....	211
3.3. Recaptació de nano-microesferes pels macròfags	212
3.4. Alliberació per via oral	213
4. MICROENCAPSULACIÓ DE FÀRMACS	214
4.1. Introducció.....	214
4.2. Mètodes de microencapsulació.....	215
4.3. Materials utilitzats en microencapsulació.....	216
4.4. Assajos de dissolució <i>in vitro</i> de sistemes d'alliberació formats per microesferes.....	216
SECCIÓ EXPERIMENTAL	221
5. DESENVOLUPAMENT D'UNA FORMULACIÓ D'ANTIMONIAT DE MEGLUMINA	221
5.1. INTRODUCCIÓ.....	221
5.2. MATERIALS	222
5.3. MÈTODES	226
5.3.1. Obtenció de l'antimoniat de meglumina per liofilització.....	226
5.3.2. Caracterització de l'antimoniat de meglumina.....	226
5.3.3. Desenvolupament d'una nova formulació d'antimoniat de meglumina. 227	
5.3.3.1. Emulsions, autoemulsions i nanosuspensions	228
5.3.3.2. Nano/microesferes obtingudes per atomització.....	229
5.3.3.2.1. Caracterització de les microesferes obtingudes per atomització	231
5.3.3.2.2. Preparació de nano-microesferes mitjançant l'atomització d'una emulsió O/A.....	233
5.3.3.2.2. Preparació de nano-microesferes mitjançant l'atomització d'una solució.....	234
5.3.4. Investigació de la influència de la superfície de microesferes en el procés de recaptació en macròfags utilitzant punts quàntics	235
5.3.4.1. Caracterització de la solució de punts quàntics	236
5.3.4.2. Encapsulació dels punts quàntics en microesferes	236
5.3.4.2.1. Caracterització de microesferes.....	237
5.3.4.2.2. Estudis de recaptació de les microesferes	237
5.3.5. Estudis parasitològics <i>in vitro</i>	238
5.3.5.1. Cultius de promastigots de <i>L.infantum</i>	238
5.3.5.2. Cultius d'amastigots de <i>L.infantum</i>	238
5.3.5.3. Preparació de les mostres	238
5.3.5.4. Assajos en promastigots	239
5.3.5.5. Assaig en amastigots intracel·lulars	240
5.3.5.6. Assaig de citotoxicitat	240

5.3.5.7. Anàlisi estadístic	241
5.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ	241
5.4.1. Obtenció d'antimoniato de meglumine per liofilització.....	241
5.4.2. Caracterització d'AMG	241
5.4.3. Desenvolupament d'una nova formulació d'antimoniato de meglumina.	242
5.4.3.1. Emulsions, autoemulsions i nanosuspensions	242
5.4.3.2. Nano/microspheres obtingudes per atomització.....	242
5.4.3.2.1. Microspheres de quitosa obtingudes per l'atomització d'una emulsió O/A.....	242
5.4.3.2.3. Optimització de l'obtenció de microesferes de quitosa atomitzant una solució.....	245
5.4.4. Investigació de la influència de la superfície de microesferes en el procés de recaptació en macròfags utilitzant punts quàntics.	250
5.4.4.1. Caracterització de la solució de punts quàntics	250
5.4.4.2. Encapsulació dels punts quàntics en microesferes	250
5.4.4.2.1. Caracterització de microesferes.....	250
5.4.4.2.2. Estudis de recaptació de microesferes	251
5.4.5. Estudis parasitològics <i>in vitro</i>	251
5.5. CONCLUSIONS	256

OBJECTIUS

Actualment la leishmaniosis és una malaltia que afecta a més de dotze milions de persones al món. Durant els últims 60 anys, els antimonials pentavalents disponibles, estibogluconat sòdic i l'antimoniato de meglumina, han estat considerats els fàrmacs de primera elecció pel tractament i control de la leishmaniosis. Normalment, aquests fàrmacs s'administren intramuscularment produint dolor local i a més, a causa de la seva ràpida eliminació, és necessari un programa de tractament amb dosis múltiples. Els efectes tòxics com l'artràlgia, nàusees, dolor abdominal, pancreatitis química i cardiotoxicitat suposen una altra desavantatge dels antimonials. Cal afegir també que en zones endèmiques la creixent aparició de resistències està esdevenint una problemàtica en quant l'alt nombre de fallades terapèutiques.

Ni els fàrmacs de segona línia com la pentamidina i l'amfotericina B, els quals són molt més tòxics i difícils d'administrar, ni el recent agent per via oral miltefosina, suposen una clara alternativa pel tractament de la leishmaniosis visceral. Per aquesta raó es creu interessant continuar buscant noves opcions i alternatives pel tractament d'aquesta parasitosis.

L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un efectiu sistema d'alliberació d'antimoniato de meglumina mitjançant nanotecnologies pel tractament de la leishmaniosis el qual pogués ser administrat per via parenteral o oral en un futur. A més a més, per assegurar l'efectivitat de les formulacions desenvolupades, les mateixes seran assajades *in vitro* front *L.infantum*. La intenció és preparar un sistema d'alliberació que dirigeixi el fàrmac a cèl·lules diana mitjançant diferents estratègies tecnològiques com per exemple l'elaboració de nano-micropartícules per atomització. Aquestes formulacions haurien de dirigir el fàrmac antileishmania als macròfags, els quals són les cèl·lules hoste del paràsit *Leishmania*. Si aquest propòsit s'aconseguís, s'estaria augmentant la disponibilitat del fàrmac i per tant es podrien administrar dosis més baixes amb la consegüent avantatge de reduir els efectes secundaris i millorar l'eficiència del tractament.

L'objectiu principal es podria resumir com el desenvolupament i caracterització d'una nova formulació d'antimoniato de meglumina utilitzant la nanotecnologia. Aquest objectiu implicaria:

1. Estudiar l'efectivitat i citotoxicitat *in vitro* de les formulacions preparades front *Leishmania*.
2. Desenvolupar estudis de recaptació *in vitro* per part dels macròfags utilitzant els quantum dots pels estudis d'imatge.
3. Estudiar els perfils de dissolució de l'antimoniato de meglumina formant part del nou sistema d'alliberació elaborat.

SECCIÓ BIBLIOGRÀFICA

1. LEISHMANIOSIS

La leishmaniosis engloba un conjunt de malalties molt dispars entre sí, produïdes per un protozou que pertany al gènere *Leishmania*. Tenen en comú l'agent causal (*Leishmania*), el vector (el dípter nematòcer del gènere *Phlebotomus*), el reservori (afecta fonamentalment a l'home i al gos) i el parasitisme de les cèl·lules del sistema reticuloendotelial de l'hoste (sobretot macròfags). En l'home la malaltia es presenta almenys en quatre formes diferents: visceral, cutània, mucocutània i cutània difusa segons de l'espècie que es tracti i la resposta immunològica, i en el cas del gos apareix com asimptomàtica entre un 50 i un 60 %.

Leishmania és un paràsit digènic que es presenta en forma de promastigot (sense flagel) en l'hoste intermediari, i en forma d'amastigot intracel·lular quan parasita als hostes vertebrats.

Actualment en el món, uns dotze milions de persones pateixen algun tipus de leishmaniosis i cada any apareixen 1,5 milions de casos nous, dels que 500.000 són viscerals i 1.000.000 cutanis.

La teràpia principal consisteix en la utilització de compostos basats en antimoni pentavalent com l'estibogluconat sòdic i l'antimoni de meglumina. Ells han estat els fàrmacs de primera elecció pel tractament de la leishmaniosis durant els últims 60 anys. Es poden administrar tant intravenosa com intramuscularment i s'associen a toxicitat gastrointestinal, hepàtica, pancreàtica i cardíaca. Es creu que entre el 5 % i el 70 % dels pacients tractats amb aquests fàrmacs convencionals no responen al tractament degut a diverses causes com: factors immunològics i fisiològics del pacient, deficiències en la farmacocinètica o composició del medicament però, sobretot, a causa de l'aparició de resistències.

Els fàrmacs de segona elecció utilitzats serien l'amfotericina B normal o liposomal, la pentamidina i l'interferó gamma. Desafortunadament, tots aquests tractaments també

requereixen d'una administració en dosis múltiples i per via parenteral, via no gaire òptima per ser utilitzada en moltes zones endèmiques o epidèmiques. També s'han usat alguns antifúngics com el ketoconazol i l'itraconazol, l'al·lopurinol i la paromomicina. La primera medicació via oral pel tractament de la leishmaniosis visceral és la miltefosina tot i que també presenta certa toxicitat (potencial teratogen) i la seva llarga semivida i el seu estret marge terapèutic estan provocant també l'aparició de resistències.

Els vectors que es troben dins les construccions poden ser controlats mitjançant insecticides però no aquells que viuen a l'exterior. Actualment no existeix una manera totalment efectiva en que gossos sans o infectats puguin ser protegits de les picades dels vectors. Tampoc es troba disponible encara una vacuna efectiva per prevenir la leishmaniosis.

Recentment la leishmaniosis ha estat inclosa en el programa internacional "Innovative and Intensified Disease Management (IDM)" dins el "Program of Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)". Amb ell es pretén incrementar la consciència i donar suport als països afectats, controlar la malaltia, la seva epidemiologia i l'aparició de resistències, col·laborar amb la comunitat científica, afavorir l'accés als fàrmacs i eines de diagnòstic existents, garantir la qualitat dels fàrmacs i donar suport al desenvolupament de noves eines terapèutiques.

Durant els últims anys s'han realitzat molts estudis farmacològics de fàrmacs antileishmania, la majoria d'ells *in vitro*, gràcies a la possibilitat d'obtenir cultius dels diferents estadis de *Leishmania* (promastigots i amastigots). No existeix, però, una metodologia estàndard per aquests estudis (taula 2). S'ha vist que no hi ha una susceptibilitat específica dels diferents estadis del paràsit front l'antimoni pentavalent, és per això que la determinació del creixement utilitzant formes extracel·lulars mitjançant l'activitat àcida de les fosfatases és un mètode fàcil de valorar els compostos antileishmania. S'utilitzarà el substrat p-nitrofenilfosfat (incolor) el qual mitjançant la fosfatasa del paràsit es transformarà en p-nitrofenol (groc) (figura 10).

2. ANTIMONIALS

Els compostos amb antimoni trivalent es van utilitzar pel tractament de la tripanosomiasis i la leishmaniosis entre el 1908 i el 1920. A causa de la seva toxicitat els compostos trivalents es van substituir pels pentavalents. Durant els últims 60 anys els antimonials pentavalents disponibles, s'han usat com tractament de primera línia pel control de la leishmaniosis visceral, cutània i mucocutània. S'administren habitualment per via intramuscular provocant dolor local i degut a la seva ràpida eliminació requereixen d'un règim de dosis múltiples. Es recomana una dosi de 20 mg/kg/dia sense límit de dosi diària.

2.1. ANTIMONIAT DE MEGLUMINA

Característiques físiques i químiques

L'antimoniat de meglumina (AMG) és un sòlid d'estructura amorfa susceptible de la degradació tèrmica i que al rebre calor es transforma en sals no volàtils.

Mitjançant estudis amb ressonància magnètica nuclear i espectroscòpia de masses s'ha vist que es formen complexos entre la N-metilglucamina i l'antimoni. El complex més abundant és el format mitjançant quatre hidroxils de dues molècules de N-metilglucamina amb un antimoni (NMG-Sb-NMG) (figura 12). També existeixen les (NMG-Sb)_n-NMG. Aquestes molècules existeixen en equilibri en solució aquosa. S'ha de fer constar que el grau de polimerització podria influenciar en l'alliberació del fàrmac, el segrest per part del sistema reticuloendotelial i la distribució de l'antimoni pentavalent.

És ben conegut que el paràsit de la leishmaniosis viu i es replica en les vacuoles àcides dels macròfags. Això implica que el fàrmac per aconseguir arribar al paràsit ha de ser capaç de travessar diferents compartiments amb diferents pH. Per això és important determinar l'estat d'ionització del fàrmac i poder avaluar la influència que pot tenir per passar a través de les membranes i en la retenció dins de les vacuòles àcides. La constant de protonació obtinguda en un estudi fou de 10.26 ± 0.02 i 12.36 ± 0.02 . Això implica que el fàrmac té dos protons dissociables. El primer seria atribuïble al grup amino ($pK_a=10.26$) i el segon al grup àcid antimònic ($pK_a=2.10$). Es pot observar que entre els pH 4.5 i 7.5, el complex existeix en un 100% en la forma zwitterica. Això ens

indica que l'estat d'ionització no depèn del pH dins dels intervals fisiològics (entre 5 i 7.5).

Altres característiques :

Aspecte: Pólvora blanca sense olor.

Solubilitat: Fàcilment soluble en aigua, lleugerament soluble en alcohol i cloroform.

pH: 5-8 (50g/l)

Coefficient de partició (octanol/aigua): $\log(Pow)$: -2.70

Higroscòpic, termo i fotosensible.

Mecanisme d'acció

L'antimoni de meglumina es classifica com leishmaniacida. Tot i haver estat utilitzat durant els últims 60 anys el seu mecanisme d'acció no està del tot clar. L'antimoni pentavalent es considera un pro-fàrmac el qual s'ha d'activar per conversió a la forma trivalent, en canvi tant el lloc i el mecanisme de reducció encara no estan ben definits. Una vegada l'antimoni pentavalent s'activa per conversió a la forma trivalent, disminueix la capacitat reguladora de les formes tiòliques ja que promou la disminució del tripanotíon i glutatíon i a la vegada augmenten les formes disulfúriques per haver inhibit la tripanotíon reductasa. Això provoca una pertorbació del potencial redox dins la cèl·lula (figura 14).

Farmacocinètica

Absorció: Pobre absorció al tracte gastrointestinal, per aquest motiu s'administra per via parenteral.

Distribució: Es troba en altes concentracions en plasma, fetge i melsa. El volum aparent de distribució és de $0,22 \pm 0,057$ L/Kg per pes corporal.

Metabolisme: Hepàtic; petites quantitats d'antimoni pentavalent es redueixen a l'estat trivalent.

La semivida calculada després d'una administració intramuscular en una dosi que correspondria a 10 mg/kg d'antimoni pentavalent: $t_{1/2 \alpha} = 51$ min, $t_{1/2 \beta} = 2,02$ h,

$t_{1/2 \beta} = 76$ h (es creu que pot estar relacionat amb la conversió de l'Sb^V a l'Sb^{III} el qual podria contribuir a la toxicitat associada amb teràpies llargues a altes dosis).

T_{max}: aproximadament 2 h, després d'una administració d'antimoni de meglumina en una dosi 10 mg/kg.

C_{max}: 9-12 mg/L, després d'una administració d'antimoni de meglumina en una dosi 10 mg/kg.

Eliminació: Renal: ràpida, més del 50 % és excretat de forma inalterada per orina en 24 h després d'administrar una dosi única per via parenteral, l'excreció és del 100 % a les 48 h.

Toxicitat

El tractament amb compostos d'antimoni pentavalent són generalment ben tolerats, però l'estat general dels pacients, normalment amb malnutrició i amb el sistema immunitari afectat, pot influenciar amb el grau de manifestació dels efectes adversos. Les reaccions adverses són principalment cardiovasculars, hepàtiques, gastrointestinals o renals. L'AMG pot interaccionar amb agents que perllonguen l'interval QT com els antiarítmics tipus IA, IC, III i els antidepressius tricíclics.

Resistències

L'ús dels antimonials es troba amenaçat per l'emergent aparició de resistències. Tot i que els antimonials pentavalents s'han estat utilitzant durant molts anys com a fàrmacs de primera elecció han aparegut un gran nombre de fallides terapèutiques. Aquestes fallides poden donar-se al principi o durant el tractament. S'ha vist que la immunitat a través de les cèl·lules T és molt important per evitar les recaigudes i podria explicar el fet que molts pacients amb VIH les patissin. Tot i així s'ha vist que pacients immunocompetents infectats amb soques sensibles als antimonials també pateixen recaigudes si el tractament és massa breu (15 dies). S'ha comprovat que la sensibilitat de les soques de *L.infantum* disminueix progressivament en pacients que pateixen recaigudes tractats amb AMG. Això també succeeix en el cas dels gossos. La pitjor

situació de resistències es viu a la Índia on més d'un 65 % dels nous pacients amb leishmaniosis visceral mostren resistències des d'un principi.

Els baixos nivells d' Sb^{III} en soques resistents sembla estar causat per una disminució de la recaptació del mateix degut a una baixa expressió del gen "aquaglyceroporin (AQP1)", el qual codifica la proteïna responsable de la recaptació del metall trivalent. Una vegada l' Sb^{III} es troba en la cèl·lula, es conjugarà amb el tripanotíon, la qual serà segregada dins una vacuola per la glicoproteïna-P A (GPA).

Glicoproteïna-P

La GPA és una proteïna de membrana de la família dels transportadors d'ATP codificada pel gen MDR1 en humans. Es localitza principalment en la part apical de les cèl·lules epitelials, en la superfície luminal de l'intestí prim, colon, cèl·lules de l'endoteli capil·lar del cervell i en els túbuls proximals del ronyó. Aquesta expressió polaritzada és indicativa del seu paper com un sistema de detoxificació natural. S'han estudiat els substrats que tendeixen a interactuar amb la GPA i s'ha vist que s'engloba un ampli ventall d'estructures diverses. Les GPA localitzades en la membrana apical de les cèl·lules intestinals d'absorció poden reduir la biodisponibilitat d'un gran nombre de fàrmacs administrats via oral.

S'ha trobat que el paràsit del gènere *Leishmania* és capaç de sobreexpressar el gen GPA situat en la regió H del seu material genètic i presentar varies còpies de la GPA i conferir-li resistència als metalls pesants. Actualment es coneixen fàrmacs que reverteixen aquesta resistència als antimonials tant *in vitro* com *in vivo*, per exemple el Verapamil. El problema és que es necessiten altes concentracions de fàrmac per una eficient i efectiva inhibició i per tant s'augmenta el risc d'efectes secundaris. És per això que s'intenten trobar productes naturals que inhibeixin la GPA sense que tinguin activitat pròpia.

S'ha vist que existeixen molts excipients i tensioactius que inhibeixen aquesta GPA i fins i tot podrien actuar com promotors d'absorció del fàrmac.

3. SISTEMES D'ALLIBERACIÓ MODIFICADA

3.1. Introducció

Al llarg de l'existència de la indústria farmacèutica els medicaments han consistit bàsicament en simples formulacions de fàrmacs d'acció ràpida i que s'administren per via oral o bé en forma d'injectables. D'ençà les últimes tres dècades, però, han anat apareixent formulacions capaces de controlar el grau i el temps d'alliberació del fàrmac (fàrmacs d'alliberació controlada) o bé capaces de dirigir el fàrmac a àrees específiques del cos. Els sistemes habituals d'alliberació de fàrmacs presenten alguns problemes que calen resoldre. Per exemple, moltes vegades la potència i els efectes terapèutics d'un fàrmac es veuen limitats o bé reduïts a causa d'una degradació parcial abans que arribi al lloc d'acció. A més, en molts casos, aquestes formes convencionals provoquen acusats increments de concentracions fins a nivells tòxics. També cal destacar que les medicacions injectables serien menys cares i s'administrarien més fàcilment si es poguessin administrar oralment.

L'objectiu dels nous sistemes d'alliberació és vehiculitzar els fàrmacs de manera intacta a les cèl·lules diana i per fer-ho moltes són les investigacions que recorren a la micro i nanotecnologia.

3.2. Sistemes d'alliberació de fàrmacs antileishmania a macròfags

No és freqüent l'aparició de nous fàrmacs antiparasitaris al mercat i per això es considera una bona estratègia l'optimització de formulacions i aplicacions de fàrmacs ja existents i coneguts, com per exemple l'AMG. Aquestes formulacions millorades haurien de potenciar l'eficiència del fàrmac i reduir els efectes secundaris a un relatiu baix cost.

El fet que l'agent causal de la leishmaniosis sigui un patògen intracel·lular fa que els fàrmacs antileishmania hagin d'arribar a les cèl·lules hoste i resistir la degradació intracel·lular. Una manera d'aconseguir-ho és administrant el fàrmac en forma de liposomes, nano o micropartícules polimèriques o nanosuspensions. Aquestes fórmules poden augmentar la recaptació del fàrmac pels macròfags com s'ha estudiat en molts casos d'infecció per *Leishmania* (taula 4 de la memòria). En alguns casos, si es

conjuguen aquests sistemes amb lligands adequats, es pot afavorir encara més el reconeixement cel·lular i la seva recaptació. En el cas de la leishmaniosis s'han utilitzat sistemes conjugats amb manoses. El disseny d'aquests sistemes va tenir com a premissa el fet que una de les rutes de fagocitosis del paràsit *Leishmania*, per part dels macròfags, és a través de la interacció de polisacàrids de membrana, que contenen manoses, en la superfície del paràsit i els receptors de manoses que contenen els macròfags. En conseqüència aquests sistemes poden potenciar l'efecte del fàrmac i destruir el paràsit en el lloc on resideix, imitant el procés d'invasió.

Les formulacions antileishmania més estudiades són basades en liposomes i microesferes però s'ha vist en estudis comparatius que les microesferes resulten ser més actives. A més cal destacar que els liposomes són poc estables, no es poden administrar oralment i l'escalatge resulta difícil. Per això es creu convenient desenvolupar un sistema d'alliberació biopolimèric en forma de microesferes utilitzant tècniques escalables.

3.3. Recaptació de nano-microesferes pels macròfags

Normalment el fet que el sistema reticuloendotelial fagociti els sistemes d'alliberació col·loïdals administrats, suposa un obstacle per alliberar el fàrmac al teixit diana. En canvi, per malalties com la leishmaniosis suposa una avantatge. Molts són els estudis que investiguen el paper que juguen les propietats físico-químiques d'aquests sistemes en el procés de recaptació. La mida de partícula, la composició de superfície, la concentració, la hidro o lipoficitat s'ha vist que hi afecta. Es creu que aquelles partícules més hidrofòbiques i relativament grans seran més susceptibles a ser fagocitades. Tot i el gran nombre d'estudis, resulta difícil generalitzar les propietats físico-químiques que milloren la fagocitosis. S'ha vist que els macròfags tenen uns sistemes de reconeixement específic per diferents molècules i per això moltes vegades s'utilitzen materials que afavoreixin aquest reconeixement per afavorir la fagocitosis, un d'aquests materials és el quitosà.

Existeixen moltes tècniques per estudiar la recaptació de micropartícules per cèl·lules fagocítiques:

1. Conjuguar les micropartícules amb colorants com l'isotiocianat de fluoresceïna (FITC),
2. Conjuguar les micropartícules amb biotina i incubar-les amb un conjugat fluorescent d'estreptavidina,

3. Tenyir les cèl·lules amb colorant com la solució d'hematoxilina o Giemsa, i fer un recompte per microscòpia confocal, de fluorescència o òptica.

Cal destacar que els components orgànics fluorescents presenten una sèrie de desavantatges, ràpidament perden coloració (en segons o hores) el qual no permet fer estudis de recaptació a llarg termini. Tampoc es poden utilitzar més d'un component alhora per estudis on es vulguin diferenciar més d'una estructura ja que: a) els colorants orgànics fluorescents tenen un ampli espectre d'emissió i per tant hi hauria superposició de senyals; i b) perquè un colorant orgànic només pot ser excitat per una determinada radiació en un estret interval de longitud d'ona i per tant serà necessari el mateix nombre de fonts d'excitació que colorants utilitzats. És per tot això que durant els últims anys s'han començat a utilitzar els **punts quàntics** semiconductors (**QDs**). Aquests tenen un alt interès ja que tenen alts coeficients molars d'extinció (10-20 vegades més brillants que un colorant orgànic), un ampli espectre d'absorció (es poden excitar diferents tipus de QDs amb una única font d'excitació) i un estret i simètric espectre de fluorescència des de l'UV a l'IR, poden emetre llum de diferents colors només variant-ne la mida i alta resistència a la degradació (figures 15 i 16 de la memòria).

Els millors QDs disponibles per aplicacions biològiques són els composts per nuclis de CdSe coberts per una capa de ZnS. Aquesta capa inactiva la superfície del nucli, protegeix de l'oxidació i millora el rendiment de fluorescència. S'han estat utilitzant per marcar cèl·lules, embrions, anticossos, proteïnes o ADN. L'únic inconvenient és la toxicitat, per arreglar-ho s'han estat modificant les superfícies dels QDs amb polímers com el quitosà i se n'ha millorat la biocompatibilitat. També s'han incorporat en microesferes per estudis de luminescència o per marcadors biològics.

3.4. Alliberació per via oral

L'administració de fàrmacs per via oral és sens dubte la via més fàcil i convenient, sobretot si és necessari un tractament en dosis múltiples. Lamentablement no tots els fàrmacs s'hi poden administrar per falta de biodisponibilitat com és el cas de l'AMG. S'estan estudiant diferents estratègies per millorar l'absorció de certs fàrmacs, per exemple es poden utilitzar lligands intestinals específics o bé sistemes d'alliberació mucoadhesius constituïts per polímers com el quitosà. També cap la possibilitat d'associar els fàrmacs en sistemes de transport com les ciclodextrines, les quals són

oligosacàrids cíclics compostos per unitats de glucoses i tenen la capacitat de formar complexos d'inclusió en solucions aquoses (figura 18).

Les β -ciclodextrines s'han usat per formar complexos amb l'AMG els quals han mostrat efectivitat en models de leishmaniosis cutània quan s'han administrat per via oral.

4. MICROENCAPSULACIÓ DE FÀRMACS

4.1. Introducció

La microencapsulació és el procés de recobriment d'un nucli o sòlid, amb materials de diferent naturalesa, que dona lloc a partícules de mida micromètrica anomenades micropartícules.

Hi ha quasi una infinitat d'aplicacions de la microencapsulació en el camp de l'agricultura, alimentació, cosmètica, farmàcia, etc. En quant a la microencapsulació de fàrmacs, les aplicacions es poden agrupar en aquestes grans categories:

1. **Formes d'alliberació retardada:** l'acció retardada es pot aconseguir amb l'ús d'un recobriment especial, per exemple entèric. També s'utilitza per protegir el fàrmac de la degradació àcida de l'estómac o bé evitar els efectes secundaris relacionats a la presència del fàrmac a l'estómac.
2. **Formes d'alliberació sostinguda:** algunes micropartícules permeten una alliberació gradual del fàrmac per mantenir la resposta terapèutica durant un període de temps. La major avantatge és la reducció de la freqüència d'administració i l'evitar els efectes nocius d'increments i reduccions sobtades de fàrmac en sang.
3. **Formes d'alliberació controlada:** aquesta aplicació està en creixent ús en el desenvolupament de mètodes per dirigir fàrmacs microencapsulats a cèl·lules o teixits diana.

Les micropartícules poden ser per elles mateixes una forma d'administració o bé ser incloses en una forma farmacèutica secundària. Normalment, els productes destinats a la vehiculització del fàrmac s'acostumen a administrar parenteralment bé per infusió o per implant i per tant es requereix la seva esterilitat. També caldrà controlar-ne la mida de partícula. Altres vies interessants d'administració de micropartícules són l'intranasal,

l'intraocular i l'inhalatòria. En quant als productes orals, es podran administrar en càpsules de gelatina dura, comprimits, etc.

4.2. Mètodes de microencapsulació

Avui en dia existeixen més d'un centenar de processos de microencapsulació diferents els quals es poden classificar principalment en dos grups, processos químics o processos mecànics o físics.

En quant als processos químics destaquen els mètodes de la coacervació o separació de fases i els mètodes de polimerització.

La **coacervació** consisteix en provocar una separació de fases en una solució d'un o més polímers liòfils, en forma de gotetes de col·loide líquides en lloc de produir agregats sòlids. Quan aquestes solucions col·loïdals es sotmeten a canvis de temperatura, pH o composició apareix una nova fase que s'organitza en gotetes riques en polímer denominat coacervat (figura 21). Hi ha dos tipus de coacervació la **simple** i la **complexa**. En la primera només intervé la ionització d'un polímer (generalment gelatina) i en la segona, la coacervació té lloc per la interacció de dos polímers de càrrega elèctrica oposada que provoca una complex, la solubilitat del qual, disminueix i com a conseqüència es produeix la separació de fases.

La **polimerització interfacial** consisteix en el següent: la partícula o substància a microencapsular es troba dispersada en un dissolvent adequat que conté un monòmer en dissolució. L'addició d'un catalitzador provoca la unió de les unitats del monòmer donant lloc a un polímer al voltant de cada partícula dispersada.

En quant als mètodes mecànics es destacaran els mètodes de l'evaporació de solvent (doble emulsió), fluids supercrítics, atomització i atomització-liofilització.

La tècnica de la **doble emulsió** és la més utilitzada per la microencapsulació de fàrmacs. Es basa en l'evaporació de la fase interna d'una emulsió per agitació. Una solució aquosa de fàrmac s'addiciona a una solució orgànica de polímer (per exemple cloroform) amb potent agitació per formar l'emulsió primària A/O. Aquesta emulsió s'afegirà a un gran volum de solució aquosa que conté una proporció de tensioactiu PVA o PVP, i es formarà la doble emulsió A/O/A. La doble emulsió formada serà

sotmesa a una forta agitació fins que el dissolvent orgànic s'evapori per complert. Les microesferes formades es podran recuperar per filtració o centrifugació, seran rentades i secades.

La microencapsulació per **fluids supercrítics** (per exemple CO₂) comprèn els següents passos:

1. Barreja del component a microencapsular amb un polímer de recobriment.
2. Administrar un fluid supercrític capaç d'inflar el polímer de la barreja sota una temperatura i pressió suficient per mantenir el fluid en estat supercrític.
3. Permetre que el fluid supercrític penetri i liqui el polímer sota una temperatura i pressió suficient per mantenir el fluid en estat supercrític.
4. Ràpidament alliberar la pressió per solidificar el polímer al voltant del nucli per formar la microcàpsula (figura 24).

Aquest mètode requereix que ni el polímer ni el nucli a encapsular siguin solubles en el fluid supercrític.

La tècnica de l'**atomització** es descriu en l'apartat de metodologia. En quant a la variació d'aquesta tècnica, l'**atomització-liofilització** cal a dir que consisteix en la dissolució del fàrmac i la seva atomització en un medi criogènic (per exemple nitrogen líquid) el qual genera una dispersió de gotes sobtadament congelades. Aquesta dispersió és secada en un liofilitzador.

4.3. Materials utilitzats en microencapsulació

Existeixen molts tipus de materials amb els que es pot dur a terme el procés de microencapsulació, entre els més comuns figuren els derivats cel·lulòsics, derivats de l'àcid metacrílic i acrílic, derivats de l'àcid polilàctic, polisacàrids i proteïnes entre d'altres.

4.4. Assajos de dissolució *in vitro* de sistemes d'alliberació formats per microesferes

Tot i que actualment ja són moltes les formulacions que existeixen al mercat en forma de microesferes, encara no existeix una tècnica estandarditzada i validada pels estudis de dissolució *in vitro* que permeti predir el comportament *in vivo* de les formulacions. Per dissenyar un mètode apropiat d'anàlisi *in vitro*, la selecció de la temperatura i el

medi de dissolució són molt importants. La temperatura i el pH s'acostumen a mantenir a pH fisiològics (37 °C i pH 7,4) i un altre paràmetre important és mantenir les condicions "sink". Típicament, es considera que es mantenen les condicions "sink" si quan s'ha dissolt el 100 % del fàrmac, la màxima concentració de producte a determinar és inferior a 1/3 de la seva concentració de saturació.

Els mètodes més utilitzats es poden agrupar en tres categories: mètode de separació de la mostra, cèl·lula de flux i diàlisi.

El **mètode de separació de la mostra** consisteix en introduir les microesferes de fàrmac en un vas i monitoritzar l'alliberació del fàrmac analitzar al cap d'uns temps el sobrenedant o el fàrmac romanent en les microesferes. Aquest mètode és força utilitzat però presenta el problema de l'agregació de les microesferes i la pèrdua durant el mostratge conduint a inferiors percentatges d'alliberació.

La tècnica que utilitza les **cèl·lules de flux** consisteix en fer passar contínuament medi a través d'una columna on es dipositen les microesferes i a continuació s'analitza l'eluent. La majoria d'estudis utilitzen modificacions de l'aparell USP 4 (figura 25) tot i existir un equip específic al mercat (Sotax). L'avantatge principal d'aquest mètode és que es poden agafar contínuament mostres i ser analitzades alhora que es reemplaça el medi automàticament. Com a desavantatge cal destacar que acostumen a haver-hi variacions en el flux del medi degut a una oclusió del filtre (a causa de la degradació del polímer). A més els fluxos de medi solen ser baixos i sembla ser la causa de l'habitual aparició de les baixes o perllongades alliberacions de fàrmac.

El mètode de la **diàlisi** permet una separació física de les microesferes de fàrmac del medi de dissolució mitjançant una membrana la qual permet agafar mostra sense que les microesferes interfereixin. El més comú és usar una bossa de diàlisi que contingui una suspensió de microesferes i col·locar-ho en un vas amb el medi de dissolució. La difusió del fàrmac cap a l'exterior es pot incrementar agitant el medi i alhora evitant els efectes de la capa d'aigua immobilitzada al voltant de la bossa. Els mètodes d'agitació usats acostumen a ser un agitador horitzontal o l'aparell USP II amb pales.

Una altra metodologia és utilitzar una membrana de diàlisi al final d'un tub (figura 26) o bé dos cambres separades per una membrana. Els estudis que comparen aquesta tècnica

amb la de la bossa de diàlisi mostren que existeixen diferències en el grau i perfil d'alliberació del fàrmac ja que el volum de medi al voltant de la bossa és superior i es simulen millor les condicions *in vivo*.

Entre els estudis d'alliberació *in vitro* de fàrmacs continguts en microesferes de quitosà es pot observar la varietat de tècniques utilitzades. En alguns es col·loquen les microesferes directament en els vasos de l'aparell USP II amb pales en una solució reguladora de fosfat a pH 7,4, 37 °C sota 50 rpm d'agitació. En altres s'usen les cistelles (USP I) on les microesferes es dipositen dins de càpsules de gelatina dura. Altres estudis simplement determinen la quantitat de fàrmac dispersant les microesferes en un medi, agitant per vibració i analitzant el contingut de fàrmac a la superfície i al sobrenedant. Altres usen les bosses de diàlisi lligant-les a les pales de l'aparell USP II.

Majoritàriament, els fàrmacs s'alliberen de les micropartícules per més d'un tipus de mecanisme. En el cas de l'alliberació en microesferes de quitosà es creu que intervenen tres mecanismes diferents: a) l'alliberació del fàrmac contingut en la superfície de la partícules, difusió a través de la matriu inflada i c) alliberació per l'erosió del polímer (figura 27).

Per descriure la cinètica d'alliberació dels fàrmacs dins de les microesferes es poden utilitzar diferents models matemàtics, i aquell que ajusti millor les dades experimentals serà el que el defineixi. Bàsicament les expressions matemàtiques que defineixen millor les cinètiques d'alliberació de fàrmac i permeten discernir el mecanisme d'alliberació són les equacions de Higuchi (1) i Korsmeyer Peppas (2).

La primera equació indica que la fracció de fàrmac alliberat és proporcional a l'arrel quadrada del temps:

$$Mt/M_{\infty} = K_H t^{1/2} \quad (1)$$

on k_H és la constant de Higuchi i Mt i M_{∞} són les quantitats acumulades de fàrmac a temps t i temps infinit respectivament.

A vegades el mecanisme d'alliberació difereix de la llei de Fick i apareix algun mecanisme anòmal. En aquests casos es pot utilitzar una equació més genèrica:

$$Mt/M_{\infty} = K_K t^n \quad (2)$$

On M_t/M_∞ és la fracció de fàrmac a temps t ; K_K és la constant que comprèn les característiques estructurals i geomètriques de la microesfera; i n , l'exponent d'alliberació que depèn del mecanisme d'alliberació i s'usa per caracteritzar-lo.

Si el valor de n és 0,5 o menys, el mecanisme d'alliberació segueix una difusió Fickiana (de manera que l'equació 2 tendeix a la 1), i valors superiors a 0,5 s'atribueixen a transferències de substància que segueixen un model no-fickià (transport anòmal).

L'alliberació del fàrmac segueix l'ordre zero (transport anomenat cas II) si el valor de n és 1 (l'alliberació del fàrmac és independent del temps).

Pels valors de n majors d'1, el mecanisme d'acció és atribuït a un transport anomenat super cas II.

Ambdues equacions són aproximacions a curts temps i es limita el seu ús per la descripció del primer 60 % d'alliberació de fàrmac.

Una altra alternativa per la descripció dels perfils de dissolució es basen en l'ús empíric de la funció de Weibull (3).

$$M_t = M_\infty \cdot [1 - e^{-(t-t_0/t_d)^\beta}] \quad (3)$$

On t_d i β són constants. Tot i que la funció de Weibull s'ha usat empíricament per l'anàlisi de l'alliberació de fàrmacs, existeix una correlació provada entre els valors de β i els mecanismes difusionals d'alliberació. Per valors de β inferiors a 0,75 l'alliberació segueix la llei de Fick tant en espais euclidians ($0,69 < \beta < 0,75$) o fractals ($\beta < 0,69$). Valors de β entre 0,75 i 1,0 indiquen una combinació de mecanismes. El cas específic de $\beta = 1$ és compatible amb una alliberació de primer ordre i finalment quan $\beta > 1$ la corba sigmoide indica que un mecanisme complex defineix l'alliberació del fàrmac.

SECCIÓ EXPERIMENTAL

5. DESENVOLUPAMENT D'UNA FORMULACIÓ D'ANTIMONIAT DE MEGLUMINA

5.1. INTRODUCCIÓ

El present desenvolupament d'una nova formulació d'AMG comença amb l'elaboració d'emulsions, autoemulsions i nanosuspensions però més endavant es centra principalment en la microencapsulació del fàrmac per atomització utilitzant el quitosà com a polímer. La tècnica de l'atomització s'usa per la producció de dos tipus de nano-microesferes, per un costat aquelles que provenen d'emulsions i per un altre les que provenen de solucions. En ambdós casos es fa una caracterització morfològica i se'n estudia l'efectivitat *in vitro* en front *Leishmania*. A més, l'habilitat per ser fagocitades pels macròfags s'investiga utilitzant punts quàntics.

Les microesferes lipídiques s'elaboren en base a un disseny experimental el qual permet estudiar la influència de la concentració lipídica, la temperatura d'entrada d'atomització i el mètode d'emulsificació sobre les propietats morfològiques, humitat residual, rendiment del procés i eficiència d'encapsulació. Alguns components lipídics utilitzats en aquestes formulacions han estat seleccionats amb la intenció de revertir la resistència a l'antimoni causada per la GPA. Per estudiar la influència d'aquestes inhibidors sobre l'efectivitat, s'han desenvolupat un grup de formulacions específiques i s'han assajat *in vitro* front *Leishmania*.

Les nano-microesferes que provenen de solucions han estat estudiades en base a un disseny experimental fraccionat on els estudis de dissolució i efectivitat també han estat inclosos.

La formulació que es seleccioni pel tractament de la leishmaniosis, que produeixi una activitat *in vitro* front *Leishmania*, que mostri una bona habilitat a ser fagocitada pels macròfags, que no sigui citotòxica, seria un candidat ideal per estudis posteriors en un futur pròxim. Per exemple, seria interessant incloure la formulació d'AMG seleccionada

en una forma farmacèutica secundària la qual pogués ser testada *in vivo* per via oral mitjançant càpsules, comprimits, etc. o via parenteral, per exemple mitjançant implants.

5.2. MATERIALS

Els materials es llistaran segons si són productes químics, soques de paràsits, cultius, equips o softwares. Entre els productes químics, es vol destacar el paper important del polímer quitosà utilitzat pel l'encapsulació de l'AMG per les seves propietats físiques, químiques i biològiques. Aquest polímer catiònic natural és inert, no tòxic i biodegradable. Té la capacitat d'interaccionar amb els receptors de les manoses, presents en els macròfags i produir la migració dels neutròfils en el lloc on s'administra. És per aquest motiu que si s'usa per encapsular l'AMG ajudarà a la internalització del fàrmac als macròfags i en conseqüència entrar més fàcilment en contacte amb el paràsit. A més s'ha utilitzat molt en la indústria farmacèutica per les seves propietats bioadhesives i gelificants. Se'l considera un ideal potenciador de l'absorció a través de l'epiteli intestinal, mucosa nasal, bucal, pulmonar i ocular.

Productes químics:

Antimonials

- Solució estàndard d'antimoni.
- Antimoniat de meglumina (Glucantime[®]).
- Antimoniat de meglumina pur.

Excipients i material auxiliar

- Triglicèrids de cadena mitja (triglicèrids d'àcid caprílic(càpric):
 1. Estasan[®]
 2. Labrafac CC[®]
 3. Captex 300[®]
- Monooleat de polioxietilen 20 de sorbità (Tween 80[®]).
- Oli de ricí polioxil 40 hidrogenat:

1. Cremophor RH-40[®]
 2. Lipocol LAV HCO-40[®]
- Lecitina de soja:
 3. Lecimuthin 100[®]
 4. Lecimulthin 150[®]
 - Lecitina de soja fluïda:
 1. Topcithin NGM[®]
 - Maltodextrina:
 3. Glucidex[®] 19D and 6D.
 4. Maltodextrina equivalent dextrosa: 16,5-19,5.
 - Chitosan:
 3. Grau de desacetilació > 85%, viscositat < 500 mPaS.
 4. Chito Clear[®]. Grau de desacetilació 95%, viscositat 80 mPaS.
 - Monooleat de sorbità (Span 85[®]).
 - Sorbat potàssic.
 - Sílice col·loïdal (Aerosil 200[®]).
 - Butilhidroxitoluè.
 - PLGA (poli(àcid làctic-co-glicòlic): (50:50; MW:60.000; Resòmer RG504).
 - PVA (acetat de polivinil): (MW, 30 000-70 000).
 - Sacs de diàlisi.
 - PVDF filtres (0,45 µm)
 - Quantum dots (QDs): CdSe/ZnS (nucli/coberta) QDs hidrofòbics en una barreja 80:20 de polietilenglicol funcionalitzats amb fosfolípids

Reactius

Totes les solucions es van preparar partint de productes químics de grau analític i només s'ha utilitzat aigua destil·lada o desionitzada.

Solució de glutaraldehid 25 % , àcid acètic glacial, àcid clorhídric 37 % , dimetilsulfòxid (DMSO), 1N NaOH, NaS.H₂O, àcid sulfúric àcid, clorur de potassi, 1% TRITON X-100, fosfat de p-nitrofenil , dihidrogenfosfat de potassi, colorant blau de tripà, colorant Giemsa.

Línies cel·lulars i productes pels cultius

- Soca de *L. infantum* MCAN/ES/92/BCN83 (BCN83).
- Medi Schneider. pH 7 amb 20 % sèrum boví fetal , 25 µg/ml solució gentamicina i 1 % de la solució penicil·lina (100 U/ml)-estreptomomicina (100 µg/ml).
- Cèl·lules macròfagues de peritoneu de ratolí (SWISS).
- RPMI-1640 suplementat amb 10 % de sèrum boví fetal.
- Cambra de comptatge.
- Plaques de microtitulació de 96 pous.
- Cambres de sembra de 8 pous LabTekII.
- MHA i RAW cells.
- Solució de Hanks Balanced Salt.
- Lipofectin[®].

Equips

Equips pel desenvolupament

- Liofilitzador Telstar Liolabor 3 .
- Balances: Precisa 600C , Sartorius BP211D.
- Agitador d'hèlix Heidolph[®].
- Agitador d'alta velocitat Janke & Kunkel, IKA[®].
- Agitador d'alta velocitat Powergen[®] 700 D.
- Homogeneïtzador a alta pressió Emulsiflex[®] -C3.
- Homogeneïtzador a alta pressió Microfluidizer[®].
- Atomitzador: Büchi[®] Mini Spray Dryer B-290 .
- Deshumidificador: Büchi[®] Dehumidifier B-296 .
- Atomitzador: Büchi[®] Mini Spray Dryer B-190 .

Equips per la caracterització de productes farmacèutics

- Riquesa d'antimoni: ICP-OES (Espectroscòpia d'emissió òptica acoblada a plasma d'inducció).

- Infraroigs: Espectrofotòmetre Perkin Elmer FT-IR.
- Raigs X: Difractòmetre PANalytical X'Pert PRO .
- Calorimetria diferencial d'escombratge: Aparell 822e Mettler Toledo.
- Mida de partícula: Beckman[®] Coulter model LS 13, 320, Accusizer[®] 780 A Autodiluter.
- pH metre Crison[®]
- Viscosímetre Brookfield RVT .
- Microscopi òptic JENA[®] 421021.
- Microscopi electrònic d'escombratge (SEM): Hitachi[®] 2300, Hitachi S-4100.
- Karl-Fisher 703 TiStand.
- Potencial Z: aparells Zetasizer Nano S, Zetaplus.
- Microscòpia confocal: Microscopi Leica SP2.
- Espectrofluorímetre SPEX Fluorolog 3.
- Aparell de dissolució: Turu Grau T-6.

Equips pel assaigs biològics

- Bany termostàtic SBS and P. Selecta precistern.
- Agitador OVAN vibra mix.
- Tittertek Multiscan Plus. 405nm
- Placa calefactora P. Selecta Mod.207 n° 141949, V220, W280.
- Placa calefactora Heraeus 6000, 5% CO₂, 37° C.
- Cambra climàtica 24-26° C.
- Campana de flux Telstar AV-30/70 (cultius de paràsits).
- Campana de flux Telstar Bio II-AR (cultius de macròfags).
- Microscopi Olympus CH-2.
- Microscopi invertit Leica.
- Balances Precisa 160M i Sartorius.

Softwares específics

- Statgraphics Plus 5.1.
- SPSS 12.0 for windows

- WinNonlin 4.1., Pharsight
- Image J 1.38x.

5.3. MÈTODES

5.3.1. Obtenció de l'antimoni de meglumina per liofilització

Es liofilitzen solucions de Glucantime® tant d'ús humà com veterinari.

Les condicions de liofilització:

- Congelació durant 3 h a -40 °C.
- Escalfament líquid a +30 °C durant 21 h.
- Assecament a + 40 °C durant 17 h.
- Buit a 100 µ columna de Hg.

5.3.2. Caracterització de l'antimoni de meglumina

Es comparen les característiques de l'antimoni de meglumina obtingut per liofilització amb el pur.

S'analitza la **riquesa d'antimoni** en ambdós casos mitjançant la tècnica del ICP-OES amb l'aparell PERKIN ELMER ELAN Optima 3200 en condicions estàndard i prèviament calibrat. La determinació es fa de l'antimoni total diluint la mostra cinc vegades amb una solució a l'1 % d'àcid nítric i 0,5 % d'àcid fluorhídric a dos longituds d'ones diferents (206,836 nm i 217,582 nm). Els valors d'antimoni declarats en el cas de Glucantime® d'humana és 28,3 % i no està declarat en el cas de veterinària. Pel que fa a la substància pura el contingut d'antimoni és del 27,1 % segons el proveïdor. La riquesa d'antimoni en aquest tipus de producte es considera necessària ja que estan descrits diferents casos de variabilitat entre lots del mateix producte el qual provoca efectes secundaris.

Es realitza la determinació per **espectroscòpia d'infraroig** mitjançant un espectrofotòmetre Perkin Elmer FT-IR, espectre en RX1, d'una alíquota del liofilitzat i de la substància pura. Es procedirà a verificar-ne la seva similitud i a comparar-ne l'espectre amb el disponible bibliogràficament dels injectables comercialitzats.

La bibliografia descriu l'antimoniato de meglumina com un sòlid amorf. Per a verificar-ho es sotmet una alíquota del liofilitzat i de la substància pura a **difracció de raigs X**. S'utilitza un difractòmetre PANalytical X'Pert PRO amb goniòmetre θ/θ de 240 mil·límetres de radi, òptica paral·lela amb monocromador híbrid i geometria de transmissió amb portamostres per capil·lars amb spinner.

La determinació de la mida de partícula es realitza amb un comptador Beckman Coulter LS 13 320 per difracció de làser dispersant la mostra en etanol.

L'AMG es defineix a la bibliografia com altament soluble en aigua per això tal i com diu la 5^a edició de la farmacopea europea es comprova que es necessitin de 1 a 10 ml per dissoldre un gram de producte.

Es verifica que el **pH** obtingut d'una solució al 5 % d'antimoniato de meglumina pur i del liofilitzat estigui dins dels límits permesos que especifica el Certificat d'anàlisi del laboratori proveïdor Aventis (5,0-8,0). Al mateix temps es verifica el pH obtingut d'una solució elaborada al 30 % d'antimoniato de meglumina i al 0,16 % de metabisulfít sòdic i la solució injectable Glucantime® utilitzada per obtenir el liofilitzat. Els límits permesos per la farmacopea brasilera són de 5,5 i 7,5.

5.3.3. Desenvolupament d'una nova formulació d'antimoniato de meglumina

Pel desenvolupament de la nova formulació s'han estudiats els possibles excipients a utilitzar i s'han seleccionat seguint els següents aspectes:

- compatibilitat teòrica entre els components.
- possible administració per via oral o parenteral.
- absència de toxicitat en les dosis planejades.
- inhibició de la glicoproteïna P intestinal i/o de *Leishmania*.
- promotor de l'absorció.

S'inicia el treball investigant l'elaboració de formulacions olioses com emulsions, autoemulsions i nanosuspensions. Tot i que normalment l'ús d'excipients lipídics en formes orals té com objectiu millorar la biodisponibilitat de fàrmacs lipòfils, en aquest cas es creu que també ens afavoriria l'absorció de l'antimoniato de meglumina ja que

s'estaria augmentant la permeabilitat de la membrana intestinal. Cal destacar però que centraran la investigació i desenvolupament les nano-microesferes obtingudes mitjançant l'atomització de solucions i emulsions.

5.3.3.1. Emulsions, autoemulsions i nanosuspensions

Degut a la hidrofília del principi actiu es considera adient formular una emulsió de fase externa oliosa per facilitar una millor absorció i protecció del principi actiu. Es preparen tres **emulsions** amb composició diferent (veure taula 10 de la memòria) seguint el procediment següent: es pesen els components directament en dos vasos de precipitats, un per cada fase de l'emulsió, els quals s'escalfen entre 70 i 80 °C. La fase aquosa s'addiciona sobre la fase oliosa sota agitació de 50 rpm i quan la temperatura es troba al voltant dels 25 °C, l'AMG (prèviament tamisat per un sedàs de 50 µm si prové del liofilitzat (emulsions 1 i 2)) s'addiciona i s'agita fins homogeneïtzació.

Els controls que es realitzen consisteixen en addicionar unes gotes de cada emulsió sobre una solució d'àcid clorhídric a pH 1,5 i unes altres en un vas ple de solució reguladora de fosfat (pH 8). S'observarà si apareix algun canvi de coloració i el comportament de les gotes fins baixar al fons del vas.

En quant a les **autoemulsions**, se'n preparen dos de diferents. La seva preparació consisteix en el següent: afegir l'AMG, prèviament tamisat per sedàs de 50 µm i pesat, en un morter i a continuació s'aniran afegint els excipients en ordre decreixent de quantitat i caldrà agitar manualment.

Els controls que es realitzen en són dos, el test de l'autoemulsió, el qual consisteix en addicionar 1 ml de la mostra en dos tubs d'assaigs, els quals contenen 9 ml d'aigua o d'una solució d'àcid clorhídric (pH 1,5) i agitar manualment; i la determinació de pH al 10 %.

L'elaboració de **nanosuspensions** pot ser interessant per a una millora de l'absorció del fàrmac a nivell intestinal degut a que les nanopartícules tenen tendència a adherir-se en les superfícies biològiques i per tant es perllonga el temps d'absorció. A més, també s'ha vist que són fàcilment recaptades pels macròfags. Les nanosuspensions es pretenen preparar mitjançant la tècnica de l'homogeneïtzació a alta pressió. Aquesta tècnica

consisteix en fer passar una “macro”-suspensió a través d’una obertura molt estreta de l’homogeneïtzador a alta pressió fent que s’augmenti molt la velocitat de la suspensió i disminueixi la pressió del fluid. Quan abandona l’aparell les forces que es produeixen fan que les partícules es trenquin en nanopartícules.

Les formules preparades es mostren en la taula 12 de la memòria. Un cop es pesen tots els components, els triglicèrids de cadena mitja s’escalfen en un bany a 90 °C. S’afegeix la sílice col·loïdal i s’agita durant 15 minuts. Quan la temperatura és de 70 °C, s’afegeix l’oli de ricí i s’agita durant 10 minuts, quan s’assoleixi la temperatura ambient s’addicionarà el principi actiu lentament i s’agitarà durant 30 minuts. Finalment s’afegeix la lecitina i s’agita 20 minuts. En el cas de la suspensió nº 2 el quitosà s’addiciona al final lentament i s’agita a 10000 rpm amb un agitador d’alta velocitat durant 20 minuts. Totes elles es passen a través d’un homogeneïtzador a alta pressió Emulsiflex C3 a 15000 psi (1470 mPa) durant 7 cicles i s’intentarà fer l’escalatge amb un homogeneïtzador a alta pressió Liquids Stansted fluid power LTD.

Es faran els següents controls: aspecte, mida de partícula amb microscopi òptic, viscositat i densitat.

5.3.3.2. Nano/microesferes obtingudes per atomització

L’atomització és àmpliament utilitzada per assecar solucions tant aquoses com orgàniques, emulsions, etc. en la indústria química, cosmètica i alimentaria. En la indústria farmacèutica, l’atomització té principalment tres aplicacions: a) l’atomització on el producte final és un material fi, amorf o cristal·lí (per exemple albúmina, plasma sanguini, pèptids, enzims, combinació de vacunes, hormones or suspensions cel·lulars), b) micronització o canvis estructurals i c) microencapsulació. En aquesta última aplicació la indústria farmacèutica ha trobat un gran nombre d’avantatges respecte altres mètodes de microencapsulació ja que l’atomització és una tècnica reproducible, ràpida, fàcilment escalable i compatible amb productes termolàbils com enzims i antibiòtics.

L’aparell utilitzat és un “mini spray drier B-290” connectat a un deshumidificador B-296 el qual permet definir exactament les condicions de secat i fer del procés reproducible. El procés complet d’atomització consisteix en la seqüència de quatre processos:

- a. Dispersió de la mostra en petites gotes a través d'una petita obertura a pressió.
- b. Barreja de la mostra amb el medi atomitzant i secant (aire) amb la corresponent transferència de calor i massa. El material s'atomitza en la mateixa direcció que el flux d'aire calent a través de l'aparell (flux concurrent). Les gotes líquides entren en contacte amb l'aire calent (escalfat elèctricament).
- c. Tant bon punt que les gotes atomitzades entren en contacte amb l'aire calent té lloc l'evaporació. Degut a l'alta superfície específica i el gradient de temperatura i humitat, una intensa transferència de calor i massa resulta amb un eficient assecat. L'evaporació comporta un refredament de la gota i per tant a una baixa càrrega tèrmica. El disseny de la cambra d'assecat i el flux d'aire permeten que temps de residència de la gota a la cambra d'assecat sigui mínim i per tant sigui compatible amb productes termolàbils.
- d. Gràcies a les forces d'inèrcia les partícules es separen del cicló i acaben dipositant-se en un recipient final (figura 36).

Els paràmetres regulables que condicionen el procés de l'atomització són: temperatura d'entrada d'aire, bomba d'alimentació, flux d'aire d'entrada i flux d'aspiració. De totes maneres, l'atomització és un procés en que els resultats depenen fortament de les propietats del material i junt amb els paràmetres del procés influenciaran en les propietats del producte (en la temperatura de càrrega, la humitat residual, mida de partícula i el rendiment).

L'encapsulació de fàrmacs mitjançant l'atomització utilitzant el quitosà com a polímer, ha estat força utilitzat en altres estudis. De totes maneres, cal destacar que les microesferes de quitosà s'inflen ràpidament en contacte amb aigua i per tant s'allibera el fàrmac immediatament. Per aconseguir una alliberació controlada del fàrmac caldrà utilitzar un assemblador que provoqui un enduriment de la pel·lícula de polímer (“cross-linking”). Hi ha un munt d'agents que es poden utilitzar com el glutaraldehyd, el formaldehyd, el Pluronic[®], la gelatina, el tripolifosfat pentasòdic (TPP), el D-L-gliceraldehyd i el glioxal. En aquest treball s'ha escollit el glutaraldehyd com agent assemblador.

5.3.3.2.1. Caracterització de les microesferes obtingudes per atomització

Per caracteritzar les microesferes obtingudes per atomització s'usaran diferents tècniques com la microscòpia electrònica d'escombratge (SEM), la difracció làser per la determinació de la mida de partícula, el mètode de Karl Fischer pel contingut d'humitat residual, l'ICP-OES per l'eficiència d'encapsulació, el potencial-Z i els assajos de dissolució amb bosses de diàlisis.

Per estudiar la morfologia de les microesferes per **SEM** s'han utilitzat els microscopis Hitachi 2300 i Hitachi S-4300. La mostra s'ha atomitzat sobre una cinta adhesiva conductora la que prèviament s'ha adherit a un porta d'alumini. La mostra que no s'ha adherit es retira amb un flux de nitrogen. A continuació la mostra és coberta per una capa d'or de 40 nm amb un polvoritzador Jeol JFC-1100 sota buit. Això fa que la mostra es torni conductora i es pugui veure sota SEM. Les mostres es miren sota 15 kV.

La tècnica utilitzada per la determinació d'**humitat** és el mètode de Karl Fischer. El principi fonamental està basat en la reacció de Bunsen entre molècules de iodur i diòxid de sofre en solució aquosa. Karl Fischer va descobrir que aquesta reacció podria ser modificada i ser utilitzada per la determinació d'aigua en sistemes no aquosos que continguessin un excés de diòxid de sofre. La determinació consisteix en la reacció entre el diòxid de sofre i l'alcohol on es forma una sal intermèdia d'alquilsulfit. Aquesta és oxidada pels iodurs formant la sal alquilsulfat i hi ha un consum d'aigua. La presència en excés de iodurs es detecta volumètricament per un elèctrode.

L'**eficiència d'encapsulació** es determina analitzant la quantitat d'antimoni dins les nano-microesferes mitjançant la tècnica del ICP-OES. Prèviament, és necessari estudiar el possible efecte dels excipients utilitzats en la quantificació de l'antimoni i per això es preparen dos rectes de calibratge, una recta externa i una per addició estàndard. Per la determinació es pesen 10 mg de nano-microesferes en una balança de precisió i s'afegeixen en un matràs de 50 ml. A continuació, es dissolen en una solució d'àcid clorhídric 0,1 N. La mostra es sonica durant 5 minuts fins una solució transparent i es fa passar per un filtre de 0,45 µm. Aquesta solució serà diluïda 5 vegades amb una solució d'àcid nítric a l'1 % i àcid fluorhídric al 0,5 %, i les lectures seran fetes a 206,836 nm i 217,582 nm.

L'eficiència d'encapsulació es calcularà segons l'equació:

$$EE (\%) = \frac{X \text{ g Sb/ml}}{(0,010 \text{ g microesferes} \times \% \text{ teòric d'AMG en microesferes} \times \text{puresa d'Sb/ 50 ml})} \times 100$$

El **potencial-Z** es determina utilitzant l'aparell Zetasizer Nano S o Zetaplus. Una alíquota de mostra es suspèn en una solució prèviament preparada de KCl a 1 mM. La màxima concentració tolerada és 0,01 mg/ml.

Es calcula el **rendiment** dividint el pes de la pólvora obtinguda amb l'atomització per el pes teòric dels sòlids continguts a la fórmula preparada.

S'ha seleccionat el mètode dels sacs de diàlisi pels **estudis de dissolució** de les microesferes. Els assajos d'alliberació s'han dut a terme durant 24 h utilitzant un aparell de dissolució amb pales (USP II) (Turu-Grau DT-6) a 37 ° C i 100 rpm. S'han preparat els sacs de diàlisi segons les instruccions del proveïdor i en ells s'hi ha addicionat 625 mg de microesferes. A continuació, es lliguen els sacs a l'extrem de les pales de l'aparell (figura 40). Els estudis de dissolució es realitzen en 250 ml de solució reguladora a pH 7,4 sota condicions "sink". En uns temps predeterminats (0,25, 0,5, 0,75, 1, 3, 6, 10 i 24 h) s'agafen alíquotes de mostra de 10 ml i es fan passar per un filtre de 0,45 µm. A continuació es retornen 10 ml de medi fresc a cada un dels vasos per mantenir el volum constant. Per determinar-ne l'antimoni, cada mostra es diluirà 5 vegades amb àcid nítric a l' 1 % i àcid fluorhídric al 0,5 % i s'analitzarà a dos longituds d'ones diferents per millorar la precisió 206,836 nm i 217,582 nm per ICP-OES. Els estudis de dissolució es realitzen per cada tipus de mostra tres vegades.

Els percentatges de fàrmac dissolt no només es representaran gràficament front el temps sinó que seran tractats estadísticament per estudiar-ne la cinètica. Es faran els ajustats de les dades experimentals en els models cinètics d'ordre zero, ordre 1, Higuchi, Weibull i Korsmeyer per regressió no lineal dels mínims quadrats mitjançant el programa WinNonlin[®]. Pel que fa a tots els valors estimats es calculen per regressió lineal utilitzant el programa Microsoft Excel 2003. S'usarà com a criteri discriminatori el paràmetre independent AIC. A més també seran calculats els paràmetres amodelístics

del temps mig de dissolució (MDT) i l'eficiència de dissolució (DE) amb el programa WinNonlin[®].

5.3.3.2.2. Preparació de nano-microesferes mitjançant l'atomització d'una emulsió O/A

A) Pre-formulació

Es creu adient l'elaboració d'una forma de dosificació sòlida amb composició similar a les primeres formulacions investigades (emulsions, autoemulsions i suspensions) ja que per una part, es mantindrien les avantatges que poguessin aportar els inhibidors de la GPA, i per una altra, si es continua utilitzant el quitosà es podria afavorir l'absorció oral i dirigir el fàrmac als macròfags. A més s'estaria obtenint un producte més estable a llarg temps.

Inicialment es prepara una bateria d'emulsions (taula 15) per ser atomitzades per l'aparell "Büchi 290 mini spray-drier" i s'estudia la viabilitat del procés segons la composició de les formulacions i les condicions d'atomització observant-ne les pèrdues durant el procés i la morfologia de les pólvores per SEM. D'aquesta fase de pre-formulació es selecciona la millor formulació (**A9**) i es segueix investigant.

El procés d'elaboració es pot resumir en els següents punts:

1. Pesada dels components.
2. Fase aquosa:
 - i. Dissoldre el quitosà en una solució d'àcid acètic 0,1 M i agitar durant 10 minuts.
 - ii. Addicionar la maltodextrina i agitar durant 20 minuts.
 - iii. Addicionar l'AMG i agitar durant 5 minuts.
 - iv. Afegir el glutaraldehyd i agitar 5 minuts.
3. Fase oliosa:
 - i. Barrejar manualment els components lipídics
4. Afegir la fase aquosa sobre l'oli.
5. Homogeneïtzació a alta velocitat a 24000 rpm durant 3 minuts.
6. Atomització per Buchi-290.

B) Influència de la concentració lipídica, temperatura d'aire d'entrada i mètode d'emulsificació

Per estudiar els efectes dels paràmetres de formulació i operacionals s'utilitza un disseny factorial 2^3 on les variables independents són: concentració lipídica (2 o 4 % p/v), temperatura d'aire d'entrada (130 °C o 180 °C) i mètode d'emulsificació (homogeneïtzació a alta pressió o no) (taula 16). La metodologia d'elaboració és la descrita anteriorment variant-ne les condicions. Les respostes considerades són la morfologia de les partícules, la mida de partícula i la polidispersió, el rendiment del procés, la humitat residual i l'eficàcia d'encapsulació. Els anàlisis estadístics es fan amb el programa Statgraphics plus 5.1. Els valors de P inferiors a 0,05 es consideren significants. La composició de les 8 formulacions (grup B) i els paràmetres tecnològics es poden veure a la taula 17.

C) Influència dels inhibidors de la glicoproteïna-P

Es prepara una bateria d'emulsions (taula 18) seguint la metodologia anterior amb l'objectiu d'estudiar la influència real dels presumptes inhibidors de la GPA (triglicèrids de cadena mitja i l'oli de ricí polioxil 40 hidrogenat) front *L.infantum*. Dues de les formulacions **C5** i **C6** no contenen components lipídics pel que l'elaboració es simplifica ja que només cal preparar una solució.

5.3.3.2.2. Preparació de nano-microesferes mitjançant l'atomització d'una solució

A) Pre-formulació

Es prepara una bateria de solucions (taula 19) amb l'objectiu de millorar la morfologia de les primeres microesferes obtingudes a partir d'una solució simple. Els canvis que es proven consisteixen en un increment del percentatge de maltodextrina (**D1**), del percentatge de glutaraldehyd (**D2** i **D3**) i de la concentració de quitosà (**D4**).

El procés d'elaboració es pot resumir en els següents punts:

1. Pesada dels components.
2. Dissoldre el quitosà en una solució d'àcid acètic 0,1 M i agitar durant 10 minuts.

3. Addicionar la maltodextrina i agitar durant 20 minuts.
4. Addicionar l'AMG i agitar durant 5 minuts.
5. Afegir el glutaraldehyd i agitar 5 minuts.
6. Homogeneïtzació a alta velocitat a 24000 rpm durant 3 minuts.
7. Homogeneïtzació a alta pressió a 15000 psi durant 2 cicles per Emulsiflex.
8. Atomització per Buchi-290.

B) Disseny experimental fraccionat 2^{5-1}

Amb aquest disseny es pretén obtenir una formulació definitiva a base de microesferes antileishmaniana. Amb ell s'estudiarà la influència dels paràmetres de formulació com concentració de glutaraldehyd i quitosà i els paràmetres tecnològics com bomba d'alimentació, flux i temperatura de l'aire d'entrada. També s'estudiarà la influència de les seves interaccions. Les respostes analitzades seran temperatura de sortida de l'aire, humitat residual, rendiment del procés, mida de partícula, potencial Z, eficiència d'encapsulació, morfologia, perfils de dissolució i efectivitat front *L.infantum*. L'anàlisi estadístic es realitzarà amb el programa Statgraphics plus 5.1. Els valors de P inferiors a 0,05 es consideren significants.

La metodologia emprada serà la descrita anteriorment (pre-formulació) i la composició i matrius experimentals es poden veure en les taules 20 i 21 de la memòria, respectivament.

5.3.4. Investigació de la influència de la superfície de microesferes en el procés de recaptació en macròfags utilitzant punts quàntics

L'objectiu és estudiar les característiques de superfície de microesferes de quitosà i de poli (làctic-co-glicòlic) (PLGA) i la seva influència a l'hora de ser recaptades pels macròfags. Per a realitzar el seguiment d'aquestes microesferes en les cèl·lules s'usen punts quàntics (QD: quantum dots), prèviament encapsulats a les microesferes.

Els QD de CdSe/ZnSe es troben envoltats en fosfolípids funcionalitzats amb polietilenglicol per incrementar-ne l'estabilitat i l'encapsulació dins les microcàpsules.

Aquesta investigació s'ha dut a terme al departament de "Pharmaceutical science" de la Universitat de Connecticut.

5.3.4.1. Caracterització de la solució de punts quàntics

Habitualment per determinar la **concentració** d'una solució s'usa l'absorció òptica i la llei de Lambert-Beer sempre que es conegui prèviament el coeficient molar d'extinció del que es vol mesurar. En aquest cas es desconeix i per això cal determinar-lo. Primer cal esbrinar el pic màxim d'absorció el qual es determina amb un espectrofotòmetre Perkin Elmer lambda 900 fent un escombratge entre 800 i 300 nm. Una vegada s'obté aquesta dada s'extrapolà a un gràfic (figura 101) establert a la bibliografia on es deduirà la mida de partícula dels punts quàntics i el coeficient d'extinció indirectament. Arribat aquest punt es podrà utilitzar l'equació de Lambert-Beer per trobar-ne la concentració.

L'espectre de **fotoluminescència d'emissió** s'obté per un espectrofluorímetre SPEX Fluorolog 3.

5.3.4.2. Encapsulació dels punts quàntics en microesferes

Les microesferes de quitosà es van preparar mitjançant atomització: 1) utilitzant una solució de quitosà a l'1 % p/v en 0,1 M d'àcid acètic; i 2) una emulsió O/A a base de triglicèrids de cadena mitja en una solució de quitosà a l'1 % p/v en 0,1 M d'àcid acètic. La composició de les microesferes es mostren en les taules 22 i 23. La metodologia utilitzada va ser la mateixa que l'exposada en apartats anteriors (atomització de solucions i d'emulsions) amb la diferència de la incorporació dels punts quàntics. En ambdós casos la solució de punts quàntics s'addiciona després de l'AMG i s'agita durant 5 minuts, en el primer cas formant part de la solució final i en el segon formant part de la solució que caldrà emulsificar.

Les microesferes de PLGA microspheres es van preparar pel mètode de la doble emulsió, el procés del qual es pot sintetitzar en els passos següents:

1. Dissoldre el PLGA en clorur de metilè, homogeneïtzar i afegir-hi els punts quàntics.
2. Addicionar lentament la solució 1 sobre 40 ml d'una solució de PVA a l'1 %.

3. Homogeneïtzar amb agitador d'alta velocitat a 10000 rpm durant 2,30 min.
4. Addicionar l'emulsió 3 en una solució de PVA al 0,1 % sota buit i agitant lentament a 600 rpm.
5. Deixar-ho al buit entre 3 i 5 h fins que s'elimini tot el clorur de metilè.
6. Deixar reposar les microesferes 1 h i filtrar-les sota buit (0,45 µm).
7. Rentar amb aigua destil·lada tres vegades.

5.3.4.2.1. Caracterització de microesferes

Per la caracterització de les microesferes es determina la distribució de mida de partícula utilitzant l'aparell Accusizer[®] 780 A Autodiluter, el potencial Z amb l'aparell Zetaplus[®], la morfologia per SEM utilitzant el microscopi LEO/Zeiss DSM 982 Gemini Field Emission i la correcta encapsulació dels punts quàntics per microscòpia confocal amb el microscopi Leica SP2.

5.3.4.2.2. Estudis de recaptació de les microesferes

S'han utilitzat dos tipus de cultius cel·lulars, la línia de cèl·lules MHS i les RAW 264.7. Ambdues són subministrades pel "Departament of Animal Science" del "Center of Excellence for vaccine Research" de la Universitat de Connecticut en vials congelats i s'ha procedit al subcultiu de totes dues (figura 49).

Es preparen suspensions de les diferents microesferes a assajar (taula 24) amb medi RPMI just en el moment abans de la transfecció. Es preparen concentracions de 50, 25, i 2,5 mg/ml de cada una.

Els estudis de recaptació s'inicien sembrant en plaques de 8 pous LabTeck II una concentració de $0,8 \times 10^5$ cèl·lules per pou. Una vegada les cèl·lules conflueixen entre un 70 i 80 % les cèl·lules es renten amb una solució salina (HBSS) i a continuació es pot procedir a la transfecció de les microesferes. S'hi addicionen 50 µl de cada mostra per pou i en el cas de la solució control de punts quàntics també s'hi afegeixen 50 µl de Lipofectamina 2000. En tots els pous s'hi afegeix medi RPMI fins a 200 µl. S'incuba durant 1 h, es retira el sobrenedant i es neteja amb una solució d'HBSS. Posteriorment ja es podrà observar i mesurar la fluorescència produïda pels punts quàntics internalitzats per les microesferes a les cèl·lules mitjançant el microscopi confocal.

5.3.5. Estudis parasitològics in vitro

5.3.5.1. Cultius de promastigots de *L.infantum*

S'ha utilitzat la soca de *Leishmania infantum* MCAN/ES/92/BCN83 (BCN83) aïllada de gos de la zona endèmica del Priorat. Els promastigots es cultiven a 26 ° C en medi Schneider, a pH 7 i amb 20 % de sèrum boví fetal inactivat, 25 µg/ml de solució de gentamicina i 1 % d'una solució de penicil·lina (100 U/ml)-estreptomycina (100 µg/ml).

5.3.5.2. Cultius d'amastigots de *L.infantum*

Primer cal obtenir els macròfags peritoneals de ratolí. Per fer-ho s'estimulen femelles de ratolí (Swiss) amb 3 ml de tioglicolat sòdic al 3 % i a les 48 h se'ls injecta intraperitonealment 4 ml de sèrum fisiològic a 4 °C. Després de 15 minuts es recull el líquid peritoneal i es centrifuga. Es preparen suspensions de 5×10^4 cèl·lules/ ml i se'n sembren 0,3 ml en una cambra de 8 pous i s'incuba a 37 °C durant 24 h en una atmosfera al 5 % de CO₂. Per obtenir les formes intracel·lulars amastigotes es retirarà el medi i s'afegiran 0,3 ml a cada pou d'un cultiu de promastigots amb una concentració de 5×10^6 en medi Schneider a pH 7. El cultiu s'incuba a 37 °C en una atmosfera al 5 % de CO₂ durant 24 h, es renta i s'eliminen els promastigots lliures.

5.3.5.3. Preparació de les mostres

Pel que fa als excipients, la lecitina es solubilitza en triglicèrids de cadena mitja, l'oli de ricí polioxil 40 hidrogenat amb etanol, el quitosà amb una solució d'àcid acètic 0,1 M i la resta amb aigua. Les microesferes es suspenen en aigua i s'agiten amb un agitador per vibració. Totes les mostres es dilueixen amb DMSO i les posteriors dilucions es realitzaran sota campana. Només aquelles dilucions amb un 2 % o menys de DMSO seran assajades.

5.3.5.4. Assajos en promastigots

Comptatge de promastigots de *L.infantum*

Per aquest assaig és necessari preparar una suspensió de promastigots en medi Schneider a una concentració de 10^6 cèl·lules/ml. Per fer-ho cal esbrinar la concentració de la suspensió de paràsits que es disposa (Y cèl·lules/ml). En un vial s'hi addiciona 100 µl de cultiu i 900 µl de formol per immobilitzar el paràsit. Una alíquota d'aquesta suspensió es diposita en un porta de comptatge. Z ml de la suspensió inicial seran necessaris per diluir-los fins a X ml per obtenir la concentració desitjada (figura 50).

Mètode fosfatases:

1. Es posen 100 µl de medi de cultiu als 96 cada pous d'una placa de microtitulació.
2. Partint de 200 µl d'una solució del nostre fàrmac o excipient es fan dilucions progressives deixant la última fila de pous sense fàrmac com a blanc.
3. A cada un del pous s'afegeixen 100 µl de la suspensió diluïda de promastigots.
4. Es deixa la placa a la cambra climàtica a 26 °C durant 48 h
5. Es transfereixen 40 µl del cultiu de cada un dels pous a una nova placa de microtitulació.
6. Es lisen les cèl·lules addicionant 100 µl/pou d'una tampó de citrat i 90 mM d'1 % de Tritó-100 a pH 4.8 a 37 °C.
7. Es mesura el creixement mitjançant l'activitat de la fosfatasa àcida (AP) amb l'addició de 10 mM de fosfat de p-nitrofenil (p-NPP). Després de 2 h es para la reacció enzimàtica amb 60 µL/pou de 0.1 M NaOH.
8. Es mesura la densitat òptica a 405 nm amb el Titterteck Multiscan.

9. La concentració de fàrmac que produeix la reducció del creixement en un 50 % es determina pel mètode de regressió lineal dels mínims quadrats del creixement front el logaritme de la concentració de fàrmac.

5.3.5.5. Assaig en amastigots intracel·lulars

1. S'addicionarà 0,3 ml a cada pou de les dilucions dels fàrmacs o excipients (realitzades a part) i s'incubarà a 37 °C en atmosfera al 5 % de CO₂ durant 48 h.
2. Es realitza el comptatge de les cèl·lules amb la tinció de Giemsa, de tal manera que es poden diferenciar les cèl·lules vives de les mortes.
3. L'activitat de cada un dels components s'avaluarà pel comptatge del nombre d'amastigots intracel·lulars i el nombre de cèl·lules infectades, examinant 300 macròfags en 3 espais diferents de l'àrea de l'objectiu (100 macròfags en cada una). Tots els experiments es realitzen per duplicat.

5.3.5.6. Assaig de citotoxicitat

S'usa un mètode similar a l'anterior:

1. S'obtenen macròfags peritoneals de ratolí i es preparen suspensions a una concentració de 5×10^4 cèl·lules/ml.
2. Es cultiven 0,3 ml en cada un dels 8 pous de les plaques LabTek chamber slide system a 37 °C durant 24 h a una atmosfera de 5 % de CO₂.
3. S'addicionarà 0,3 ml a cada pou de les dilucions dels fàrmacs o excipients (realitzades a part) i s'incubarà a 37 °C en atmosfera al 5 % de CO₂ durant 48 h.
4. Les cèl·lules infectades es tenyiran amb solució de blau de tripà.
5. La citotoxicitat de cada component s'avaluarà pel comptatge del nombre de macròfags per pou en 3 espais diferents de l'àrea de l'objectiu i es compararà

amb el control. Tots els experiments es realitzen per duplicat. Es calcularà l'índex de seguretat dividint la CC_{50} pels macròfags per la IC_{50} dels promastigots.

5.3.5.7. Anàlisi estadístic

S'ha utilitzat el programa SPSS 12.0 pe fer els estudis de comparació de les IC_{50} . Els valors de P inferiors a 0,05 es consideren significants.

5.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.4.1. Obtenció d'antimoniato de meglumine per liofilització

Després del procés de liofilització es dedueix que la temperatura crítica de l'AMG, sòlid amorf, es troba entre els -14 i -15 °C i que no hi ha substàncies de càrrega en les ampul·les de Glucantime[®] liofilitzades.

5.4.2. Caracterització d'AMG

S'ha caracteritzat tant l'AMG contingut en el liofilitzat de la solució comercial Glucantime[®] com en la substància pura. Les quantitats d'antimoni obtingudes per ICP-OES són similars a les declarades pel proveïdor en ambdós casos (veure taula 27 de la memòria).

En quant als assaigs d'IR, tant en el cas de la substància pura com en els liofilitzats s'obtenen gràfics com el de referència (figures 54 i 55).

Si s'observa el gràfic obtingut pel difractòmetre de raigs X (figura 56) es pot comprovar que ambdós mostres tenen una estructura amorfa ja que no apareixen pics destacats. On sí que es detecten diferències entre els dos productes comparats és en la distribució de mida de partícula ja que l'AMG pur és un 89,7 % inferior que el liofilitzat. Aquesta diferència es veu influenciada per la presència de metabisulfít potàssic i sulfít sòdic anhidre en les solucions de Glucantime[®].

Gràcies al DSC es determina la temperatura de fusió de l'AMG a 106 °C i es descarten possibles interaccions amb els excipients utilitzats ja que no apareixen senyals diferents a les seves pròpies de fusió.

Tant el Glucantime[®] liofilitzat com l'AMG es consideren fàcilment solubles en aigua ja que 1 g de producte és soluble en 1,2 ml d'aigua (833,3 mg/ml). Finalment, cal dir que totes les dissolucions preparades compleixen els límits permesos de pH establerts per la farmacopea brasilenya.

5.4.3. Desenvolupament d'una nova formulació d'antimoniat de meglumina

5.4.3.1. Emulsions, autoemulsions i nanosuspensions

Es van dissenyar tres emulsions d'AMG. Només les formulacions n° 1 i n° 2 van resultar ser viables obtenint unes emulsions fluides, de color àmbar i estables a les 48 h. En canvi en el moment que s'usa l'AMG pur (formulació n° 3) els resultats no són satisfactoris ja que en el moment que s'addiciona la fase aquosa sobre l'oliosa la fórmula esdevé una massa espessa i dura, impossible d'emulsionar. Es creu que la formulació n° 2 seria un bon candidat per una alliberació intestinal de l'AMG ja que dispersa millor en medi àlcali que en àcid.

Les dues autoemulsions elaborades emulsifiquen bé quan es barregen tant en aigua com en solucions àcides.

Les macrosuspensions destinades a ser altament homogeneïtzades s'elaboren sense problemes així com l'homogeneïtzació a petita escala, en canvi, resulta impossible practicar-ne l'escalatge pel que es descarta aquesta línia de formulacions.

En conseqüència als resultats anteriors, es creu adient continuar el desenvolupament de la nova formulació d'AMG produint formes sòlides mitjançant una tècnica escalable com és el cas de l'atomització, encapsulant el fàrmac. Els excipients que s'han estat utilitzat fins ara es continuaran tenint en compte.

5.4.3.2. Nano/microspheres obtingudes per atomització

5.4.3.2.1. Microspheres de quitosà obtingudes per l'atomització d'una emulsió O/A

A) Pre-formulació

Després d'estudiar la viabilitat del procés amb vuit formulacions sense principi actiu es dedueix que la utilització de lactosa produeix superfícies rugoses i alta polidispersió, l'absència d'oli de ricí produeix microesferes molt invaginades però menys adherència

en el cicló i que la utilització del quitosà és el que permet obtenir microesferes força esfèriques. Es dedueix que el fet de preparar les emulsions en calent pot conduir a una disminució de l'esfericitat. La formulació **A2** es selecciona per continuar amb l'estudi degut a les seves característiques morfològiques ja que permet obtenir microesferes més esfèriques i més petites, superfícies menys poroses i menys polidispersió (veure figura 63).

A continuació s'incorpora un 2 % w/v d'AMG a la formulació **A2** amb la finalitat d'encapsular-lo, s'obtenen les microesferes **A9**. De moment, es verifica la seva encapsulació comparant l'aspecte de l'AMG sol i les microesferes obtingudes mitjançant SEM (veure figura 68).

De les microesferes obtingudes es compara la morfologia de les microesferes recuperades del recipient al final de l'atomitzador i les del cicló. Es pot observar que les recuperades del cicló mostren una morfologia més irregular, estan deformades i són més grans que les del recipient final. Les mides de partícula són $5,221 \mu\text{m} \pm 5,635 \mu\text{m}$ i $4,666 \pm 5,132 \mu\text{m}$, respectivament.

El fet de substituir el tipus de maltodextrina, de la 19 D a la 6D (menys higroscòpica) podria reduir la humitat residual de les microesferes. Es troba que les microesferes obtingudes (A10) són morfològicament molt similars a les **A9** però tecnològicament no es considera una bona modificació ja que es disminueix el rendiment ja que es queda molta pols enganxada al cilindre de l'atomitzador.

La formulació **A9** és la seleccionada per continuar amb els estudis ja que l'AMG ha estat eficientment encapsulat, les microesferes són bastant regulars i la mida de partícula força adequada.

B) Influència de la concentració lipídica, temperatura d'entrada i mètode d'emulsificació.

Les característiques de les microesferes preparades per atomització segons un disseny experimental 2³ es resumeixen a la taula 32 de la memòria.

La **mida de partícula** mitja de totes les microesferes d'aquest disseny és $4,576 \mu\text{m} \pm 0,734 \mu\text{m}$ amb una polidispersió de $85,438 \% \pm 11,911 \%$, en tots els casos es segueix

una distribució normal. Cal a dir que hi ha mides de partícula de l'ordre nanomètric però per facilitar la lectura el terme utilitzat serà sempre de microesferes (veure taula 33 de la memòria). Els paràmetres de procés investigat tenen una major influència en les característiques morfològiques a comparació dels paràmetres relacionats amb la formulació. Per obtenir microesferes de quitosà a partir d'una emulsió O/A esfèriques, amb baixa polidispersió i superfícies relativament llises cal utilitzar l'homogeneïtzador a alta pressió i altes temperatures de l'aire d'entrada.

Pel que fa a l'**humitat residual**, el valor mig obtingut és $3,298 \% \pm 0,196 \%$ i cap factor dels estudiats influeix significativament en els resultats.

El fet d'utilitzar emulsions fa que el rendiment mig del procés sigui només del $35,973 \% \pm 6,820 \%$. Per obtenir-ne una optimització ($43,99 \%$) caldria treballar a un 4% de concentració lipídica, 180°C de temperatura d'aire d'entrada i sotmetre la mostra a homogeneïtzació a alta pressió.

L'**eficiència d'encapsulació** mitja analitzada per ICP-OES a $206,836 \text{ nm}$ és $96,42 \% \pm 3,28$. S'ha detectat que altes concentracions de lípids i altes temperatures comporten una lleugera reducció de l'eficiència d'encapsulació. En canvi la homogeneïtzació a alta pressió tendeix a incrementar-la lleugerament (veure figura 75).

D'aquest disseny experimental es seleccionen les condicions d'elaboració de la formulació **B8**, és a dir 4% de concentració lipídica, 180°C de temperatura d'aire d'entrada i homogeneïtzació a alta pressió, per obtenir microesferes de quitosà amb baixa polidispersió, superfície relativament llisa i el mínim contingut d'humitat residual. A més aquestes condicions tendeixen a maximitzar el rendiment del procés i alhora permet un alta eficiència d'encapsulació. Això fa que s'incorpori l'homogeneïtzació a alta pressió en els estudis següents.

C) Influència dels inhibidors de la glicoproteïna P.

S'ha elaborat una bateria de formulacions per estudiar la influència dels possibles inhibidor de la GPA en l'activitat antileishmania de les microesferes *in vitro*. En aquesta bateria s'han anat eliminant els triglicèrids de cadena mitja o l'oli de ricí de manera individual o conjunta veient que en el moment que s'eliminen els dos alhora s'obtenen microesferes amb una superfície més llisa i es millora el rendiment (veure taula 32). Aquesta bateria engloba microesferes sense components lipídics i per tant la mostra

atomitzada és una solució. Això fa que el rendiment del procés sigui molt més alt, d'un 58,16 %. És per això que es decideix estudiar en profunditat l'obtenció de microesferes a partir de simples solucions.

5.3.3.2.3. Optimització de l'obtenció de microesferes de quitosà atomitzant una solució

A) Pre-formulació

Es realitzen una sèrie de proves per intentar millorar la morfologia el·lipsada de les microesferes obtingudes a partir d'una solució en l'apartat anterior. S'augmenta la proporció de maltodextrina, el percentatge de glutaraldehyd i el percentatge de quitosà. Tot i que tots els canvis permeten una adequada atomització de la mostra, moltes de les microesferes obtingudes segueixen apareixen invaginades (figures 78-81). Per això es creu adient estudiar en profunditat mitjançant un disseny experimental fraccionat aquest tipus de formulacions. Dels factors estudiats en la pre-formulació només el percentatge de glutaraldehyd i el de quitosà es seguiran estudiant.

B) Disseny experimental fraccionat

Els resultats obtinguts de la caracterització morfològica de les 17 mostres diferents, les humitats residuals i els paràmetres operacional es mostren a la taula 40 de la memòria.

Pel que fa a la **temperatura de l'aire a la sortida** de l'atomitzador, els valors mitjos obtinguts quan la temperatura d'aire d'entrada era 130 °C i 180 °C són $85,375 \pm 6,854$ °C i $114,875 \pm 2,973$ °C respectivament. Els resultats obtingut per ANOVA indiquen que la bomba, el flux d'aire i la temperatura d'entrada influeixen significativament en la temperatura d'aire de sortida. Tal i com s'esperava, a majors temperatures d'entrada, majors temperatures de sortida. Quan s'incrementa la bomba, major quantitat de material a secar per tant la temperatura disminueix. Finalment, si el flux d'aire d'entrada és major, més petites són les gotes atomitzades, per tant més superfície específica per ser secada i farà que es disminueixi la temperatura de l'aire de sortida per un major intercanvi de calor.

El valor mig de l'**humitat residual** és 2,576 % major que l'obtingut en les microesferes que provenien d'una emulsió. Lògicament a altes temperatures l'humitat final

disminueix significativament. Tant la bomba, el flux com la concentració de quitosà influeixen augmentant significativament l'humitat residual (figura 83).

S'ha augmentat notablement el **rendiment del procés**, aconseguint valors mitjos del $62,979 \% \pm 6,524 \%$, un rendiment força elevat si es compara amb els que han estat descrits a la bibliografia anteriorment. L'únic paràmetre que influeix significativament reduint el rendiment és el quitosà, el qual utilitzat a altes concentracions produeix solucions força viscoses que comporten una pèrdua de producte durant el procés.

Per estudiar l'**eficàcia d'encapsulació** es descarta la possibilitat que la composició de les microesferes interferís en els resultats. Un cop descartat s'obtenen uns resultats molt satisfactoris (veure taula 46) on l'eficàcia mitja d'encapsulació és de $93,623 \% \pm 0,344 \%$.

En aquest disseny la concentració de quitosà incrementa significativament el percentatge d'encapsulació de l'AMG i la concentració de glutaraldehyd tendeix a disminuir-lo lleugerament. La bomba i el flux d'aire també influeixen significativament, en el primer cas augmentant l'eficàcia i en el segon disminuint-la.

La **mida de partícula** mitja obtinguda en aquest disseny és $7,125 \mu\text{m} \pm 0,371 \mu\text{m}$ i en tots els casos es segueix una distribució normal. Els resultats complets i individuals es poden veure en la taula 49 de la memòria. El factor que disminueix significativament la mida de partícula és el flux de l'aire. Quan el flux s'incrementa de 500 l/h a 700 l/h la mida de partícula es redueix de 8,485 a 5,950 μm

Les microesferes més grans i amb major polidispersió són aquelles que provenen d'una solució més concentrada de quitosà. Això és degut a la mida de les gotes formades per atomització és proporcional a la viscositat i tensió superficial del líquid atomitzat i indirectament s'afecta a la mida de partícula de les microesferes obtingudes.

En el present treball es detecta que alts percentatges de glutaraldehyd incrementen lleugerament la mida de partícula i incrementen significativament la polidispersió (CV). En canvi tant la bomba com la temperatura d'entrada tenen tendència a disminuir aquesta polidispersió. Cal recordar que l'ús d'altres temperatures també disminueixen la mida de partícula i la seva polidispersió quan les microesferes de quitosà provenien d'una emulsió.

Totes les microesferes preparades en aquest disseny estan carregades positivament amb un **potencial Z** mig de 52,043 +/- 0,458. En principi els paràmetres de fabricació no haurien d'influenciar significativament en el potencial Z, en canvi s'ha detectat que el flux d'aire ho fa incrementant-lo (figura 90). Cal esmentar també que la interacció entre els factors concentració de glutaralhid i quitosà tendeixen a reduir significativament el valor del potencial Z.

Totes les solucions atomitzades han donat lloc a nano-microesferes les quals s'han estudiat morfològicament per SEM. Les diferències òptiques de la **morfologia** de superfície i l'esfericitat han estat definides per un interval numèric. Valors entre 1 i 10 representen un interval que comprèn microesferes amb superfícies des de molt rugoses a molt llises i amb formes des de poc a molt esfèriques (veure taula 40) .

L'únic factor que influeix significativament en la **morfologia de la superfície** és la concentració de quitosà el qual tendeix a formar microesferes més rugoses quan s'utilitza a altes concentracions. L'optimització estadística del procés per l'obtenció de superfícies el màxim de llises possibles resulta en la utilització de: nivells baixos de glutaralhid, quitosà i flux d'aire i nivells alts de bomba i temperatura d'entrada.

En el cas de la influència dels factors en la **esfericitat** es detecta que més d'un factor principal i algunes interaccions influencien significativament (figura 92). Alts nivells de flux d'aire i temperatures d'entrada produeixen formes més esfèriques. Cal destacar la pèrdua d'esfericitat quan s'usen nivells elevats de glutaralhid i la no afectació de la concentració de quitosà (veure figures 91-94).

Estudis de dissolució

Percentages de fàrmac dissolt

Per calcular el percentatge de fàrmac dissolt s'ha tingut en compte el pes real de les microesferes col·locades a l'interior de les bosses de diàlisi i l'eficiència d'encapsulació obtinguda per cada una d'elles. Els percentatges mitjos i les seves desviacions estàndard es mostren a les taules 55 i 56 de la memòria i en la figura 95 es pot veure el

comportament *in vitro* d'alliberació de l'AMG formant part de les microesferes de quitosà. La desviació estàndard de cada punt mesurat per triplicat és inferior a 11,57 %.

Totes les microesferes van mostrar una alliberació de fàrmac durant les 24 h assajades. Les microesferes **E11** van ser les que van alliberar més quantitat de fàrmac a les 24 h, 91,62 % i la mínima quantitat alliberada, 69,27 % per part de les microesferes **E16**.

El tipus d'alliberació observat fou bifàsic caracteritzat per un pic inicial de fàrmac seguit per una alliberació molt més lenta i sostinguda. La concentració de quitosà té una influència remarcable durant tots els intervals estudiats ja que altes concentracions de polímer redueixen l'alliberació del fàrmac. Aquesta influència resulta significant entre les 10 i les 24 h. Curiosament, la influència del glutaraldehyd sobre el percentatge de fàrmac alliberat sembla canviar durant el període estudiat. Al principi, alts percentatges de l'agent assemblador redueixen l'alliberació de fàrmac però a les 3 h aquelles microesferes amb mateix percentatge de quitosà i més quantitat de glutaraldehyd comencen a alliberar-ne més quantitat (figura 96 memòria).

Mecanisme d'alliberació de fàrmac

Els coeficients de correlació i els valors AIC pels models cinètics d'ordre zero, primer ordre, Higuchi, Weibull i Korsmeier-Peppas es poden veure a la taula 57 de la memòria.

Els valors més petits d'AIC s'obtenen amb el model de Korsmeier-Peppas i per tant és el que descriu millor estadísticament el mecanisme d'alliberació del fàrmac en aquestes microesferes de quitosà. Aquest model porta a deduir que hi ha dos mecanismes diferents d'alliberació entre les 17 microesferes assajades. Per un costat les que segueixen la llei de Fick perquè els valors d' N són inferiors a 0,5 i un altre grup (**E11**, **E2**, **E6** i **E15**) on el valor N és superior a 0,5 i segueixen un transport anòmal. Curiosament, aquest últim grup coincideixen en tenir una proporció del 3 % p/p de glutaraldehyd i quitosà en la seva composició. Gràcies a un estudi d'ANOVA s'ha vist que aquests dos factors (concentració de glutaraldehyd i quitosà) influeixen significativament en els valors d' N .

Els valors de β de la funció de Weibull confirmen l'existència de dos mecanismes d'alliberació diferents coincidint amb les microesferes esmentades anteriorment. En

aquest cas, la concentració de glutaraldehyd també influeix significativament en els valor de β (taula 58) i existeix una clara correlació entre el % p/p de glutaraldehyd i quitosà amb els valors de β ($R^2= 0,915605$) (figura 97).

Les microesferes que formen part del grup amb un mecanisme anòmal (**E6**, **E11** i **E15**) també presenten alts índex d'alliberació de fàrmac a les 24 h 83,90 %, 91,62 % i 84,51 respectivament. Es descarta la presència de porus a la superfície de les microesferes mitjançant SEM amb un microscopi d'alta resolució Hitachi S-4300 (figura 98).

Mecanisme d'alliberació de fàrmac

Els valors de les constants dels diferents models cinètics ajustats es mostren a la taula 60 de la memòria. Després de la funció de Korsmeyer-Peppas, el model que millor ajusta les dades és el model de primer ordre tot i que, a més, s'obtenen força bones correlacions amb la funció de Higuchi.

Si s'ordenen els valors de les constants d'ordre zero (tot i ser el model que pitjor ajusta) es pot observar la influència del quitosà en la cinètica d'alliberació ja que aquelles mostres que contenen baixos percentatges de quitosà són les que obtenen constants més elevades (més ràpida alliberació). A més coincideix en que aquelles microesferes amb unes constants més elevades són les mateixes que presentaven un mecanisme d'alliberació diferent al fickià.

En quant a l'estudi de l'ANOVA dels factors front les constants K_k , K_1 , K_h es pot comprovar com els factors principals influeixen reduint la K_1 . Els mateixos factors a excepció de la bomba, redueixen significativament K_k . El fet que el percentatge de glutaraldehyd redueixi aquesta constant podria justificar l'alentiment d'alliberació del fàrmac durant les 3 primeres hores en aquelles formulacions amb alts percentatges (taula 62).

Es comprova com altes concentracions de polímer fan augmentar significativament els temps de dissolució. El temps mig de dissolució és de $5,861 \text{ h} \pm 1,997 \text{ h}$ i l'interval de valors oscil·la entre 2,661 h (**E2**) i 10,371 (**E16**) (veure taula 60).

Paràmetres amodelístics

Tot i que totes les dades obtingudes de les microesferes s'ajusten adequadament al mateix model cinètic (Korsmeyer), s'han calculat els paràmetres amodelístics del temps mig de dissolució (**MDT**) i l'eficàcia de dissolució (**DE**) (taula 63). Es troben microesferes amb MDT compresos entre les 3 i les 6 h amb un valor mig de $4,788 \text{ h} \pm 0,776$.

5.4.4. Investigació de la influència de la superfície de microesferes en el procés de recaptació en macròfags utilitzant punts quàntics.

5.4.4.1. Caracterització de la solució de punts quàntics

L'espectre d'UV-vis obtingut entre 300 to 800 nm mostra un punt d'inflexió als 576 nm (figura 100). A partir d'aquesta longitud d'ona es dedueix per extrapolació la mida de partícula dels punts quàntics (figura 101), 3,5 nm i el corresponent coeficient molar d'extinció, $1,5 \cdot 10^5 \text{ L/mol}_{\text{particle}} \cdot \text{cm}$. Utilitzant la llei de Lambert-Beer s'obté una **concentració** de $1,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$.

Si es sotmet la solució de punts quàntics a llum normal es pot observar com la solució emet una **fluorescència** taronja brillant (figura 102). L'espectre de fluorescència mostra un pic als 600 nm quan es sotmet la mostra a una constant excitació amb una làmpada de Xenó a 360 nm (figura 102)

5.4.4.2. Encapsulació dels punts quàntics en microesferes

5.4.4.2.1. Caracterització de microesferes

Després d'haver procedit a l'encapsulació dels punts quàntics mitjançant l'atomització o la tècnica d'evaporació del solvent, cal caracteritzar-ne les microesferes obtingudes. Totes elles tenen una **mida de partícula** similar (entre 2,0 i 5,0 μm) i el **potencial-Z** va des de valors fortament positius (microesferes de quitosà) a dèbilment negatius (PLGA). Les microesferes a l'1 % de quitosà sense lípids presenten una **superfície** llisa, en canvi les que provenen d'una emulsió són més arrugades i presenten una superfície més rugosa

(figura 103). La topografia d'aquestes últimes microesferes suggereixen la presència de lípids en la superfície (figura 104).

Les microesferes de PLGA presenten una superfície llisa i són força esfèriques (figura 105).

Mitjançant **microscòpia confocal** i estudis seccionals es pot assegurar que s'han internalitzat els punts quàntics en totes les microesferes preparades (figura 107-109). S'ha descartat que els components de les microesferes interferissin en la fluorescència i les senyals detectades es produïssin per punts quàntics localitzats a la superfície.

5.4.4.2.2. Estudis de recaptació de microesferes

Un cop comprovat que els punts quàntics es troben encapsulats en les microesferes i distribuïts uniformement es procedeix a l'estudi de recaptació de les mateixes per part de dos tipus diferents de cèl·lules les MHS i les RAW 264.7. Per començar, es descarta la possible fotoluminescència de les pròpies cèl·lules sota el microscopi confocal (figura 110). A continuació s'inicien les transfeccions de la solució control de punts quàntics i les de les microesferes. Si es superposen les imatges obtingudes del canal vermell del microscopi amb la imatge de transmissió es pot comprovar con totes les microesferes s'internalitzen en les cèl·lules (figures 112, 115) però en diferent magnitud.

En ambdós tipus de cèl·lules es pot comprovar que les microesferes de quitosà semblen ser millor recaptades que les de PLGA i entre les de quitosà, aquelles que no contenen lípids. És per això que és necessari utilitzar concentracions més elevades tant de PLGA com de microesferes de quitosà amb lípids per a detectar-ne fluorescència. Amb els estudis seccionals, a més, s'ha verificat que la fluorescència detectada no es deu a microesferes adherides a la superfície de la cèl·lula sinó que es troben en l'interior de la mateixa (figura 113).

5.4.5. Estudis parasitològics *in vitro*

Com s'ha pogut veure anteriorment el nou sistema d'alliberació d'AMG desenvolupat és perfectament fagocitat pels macròfags i mostra una alliberació perllongada del fàrmac. Durant el desenvolupament del mateix s'ha anat estudiant l'eficàcia i citotoxicitat dels excipients i de les microesferes preparades. Els resultats es poden dividir en els

obtinguts pels excipients i ens els obtinguts per les microesferes de quitosà (amb i sense lípids). En tots els casos l'activitat s'ha assajat front promastigots i en aquelles mostres que haguessin mostrat activitat i s'haguessin seleccionat tecnològicament, s'han assajat després front el paràsit intracel·lular (amastigots).

Excipients

Sorprenentment, entre tot els excipients assajats, el quitosà produeix significants valors d'IC₅₀ tant en l'assaig front promastigots com en amastigots (112,64 ± 0,53 µg chitosan/ml i 100,81 ± 26,45 µg chitosan/ml, respectivament). Cap dels excipients assajats mostra citotoxicitat front macròfags (taula 65).

Tot i el munt de propietats que se li han atribuït al quitosà, les dades actuals obtingudes, mostren per primera vegada una nova activitat *in vitro* del quitosà front *L. infantum* i sense citotoxicitat en els assajos amb macròfags a les concentracions assajades. És per aquest motiu que s'ha protegit la troballa sota patent (PATENEP P200700968).

Microesferes d'antimoni de meglumina

Per a calcular les IC₅₀ de les microesferes es tenen en compte els pesos reals que s'han utilitzat per preparar les suspensions però cal destacar que aquesta activitat bé determinada per dos components de la microesfera; l'AMG i el quitosà. Per això cal considerar els percentatges pes/pes dels components de les microesferes per calcular els valors de IC₅₀Sb^V and IC₅₀quitosà.

Microesferes que provenen de l'atomització d'una emulsió

Les primeres microesferes assajades varen ser les **A3**, **A4**, **A6**, **A9** i **A10** (dels estudis de pre-formulació), les seves activitats i citotoxicitats obtingudes juntament amb les dels compostos de referència es mostren a la taula 67. Les microesferes **A3**, **A4**, **A9** i **A10** van mostrar activitat front promastigots de *Leishmania* en diferents intensitats, en canvi la microesfera **A6** no en va mostrar cap. A més cal destacar, que les microesferes **A3** tot i no contenir AMG, produeixen una inhibició parcial del creixement tant en promastigots com en amastigots i per tant confirma la sensibilitat de *L. infantum* front el quitosà.

Les microesferes **A9** i **A10** donen uns valors d' IC₅₀ (µg Sb^V/ml) inferior a aquelles obtingudes amb la solució de Glucantime[®] front promastigots i amastigots de *Leishmania*. Cal destacar que les microesferes **A9** a part de ser la millor mostra tecnològicament parlant, mostra els valors més baixos entre el primer grup de microesferes assajat i un índex de seguretat major a 1 ((214 en els assaigs amb promastigots i 19 en assaigs amb amastigotes).

Els estudis parasitològics es continuen amb la mostra **B8** (igual que **A9** però afegint l'homogeneïtzació a alta pressió), tal i com es preveia, aquesta mostra continua sent activa tot i que no apareixen diferències significatives entre els valors d' IC₅₀ (µg Sb^V/ml) respecte la formulació **A9**.

El grup de microesferes dissenyat per estudiar la influència dels components lipídics inhibidors de la glicoproteïna-P (**C1-C6**) mostren un alt nivell d'inhibició del creixement de la *Leishmania* amb valors d' IC₅₀ d'antimoni entre 3,80 i 9,53 i IC₅₀ de quitosà entre 5,15 i 10,81 (taula 68). Cal tornar a destacar que la mostra C6 la qual no conté components lipídics tampoc conté principi actiu i segueix mostrant-se activa, és a dir es ratifica l'activitat del quitosà front *L.infantum*.

Si s'agrupen les microesferes segons els percentatges de cada un dels components lipídics se'n podrà estudiar la seva influència quan es calculin els valors d' IC₅₀ i se'n estudiï l'ANOVA. S'ha vist que els diferents percentatges dels triglicèrids de cadena mitja, de l'oli de ricí i de la lecitina (taula 66) no afecten a l'activitat *in vitro* de l'antimoni pentavalent. Per tant es pot deduir que l'addició dels dos inhibidors de la GPA, com excipients de microesferes no produeixen cap millora en l'activitat front promastigots quan es comparen amb les microesferes sense components lipídics les quals també resulten actives contra *L.infantum*.

Microesferes que provenen de l'atomització d'una solució

A partir del disseny experimental fraccionat es pretén estudiar la influència dels factors tecnològics i les seves interaccions en l'efectivitat de les microesferes d'antimoni de meglumina contra *L.infantum*. Els valors obtinguts d' IC₅₀ de les suspensions de les microesferes, de l' Sb^V i del quitosà es mostren a la taula 69 de la memòria.

La mostra que presenta més activitat és la **E2**. Observant els resultats es pot apreciar una aparent influència de la composició de les microesferes en l'activitat. Per estudiar-ho

acuradament s'han comparat els resultats de les variàncies (taula 71). És llavors quan es confirma la influència significativa del quitosà en els valors d' $IC_{50}Sb^V$ en un interval de confiança del 95 %. A més es detecta que la concentració de glutaraldehyd redueix lleugerament els valors d' $IC_{50}Sb^V$.

S'ha estudiat quina seria la millor combinació dels factors tecnològics per obtenir unes microesferes més actives i s'ha vist que l'ideal és treballar a un 1 % de concentració de quitosà, al 3 % de concentració de glutaraldehyd i a temperatures de 130 °C. Si es mantenen fixes aquests factors la bomba pot ser utilitzada entre el 10 i el 20 % i el flux d'aire per sota de 580 l/h (figures 119 i 120).

El fet que altes concentracions de quitosà comporti un increment dels valors d' $IC_{50}Sb^V$ fa que es cregui necessari relacionar els resultats d'efectivitat amb els assajos de dissolució.

Es troba que hi ha una correlació lineal significativa entre els valors d' IC_{50} de les microsferes, $IC_{50}Sb^V$ i $IC_{50quitosà}$ amb les quantitats de fàrmac alliberat a les 24 h (taula 76). Com s'ha vist anteriorment, aquelles microesferes que contien altes concentracions de quitosà alliberaven quantitats inferiors de fàrmac a les 24 h, probablement degut a l'augment de viscositat.

Es calculen els valors mitjos d' IC_{50} de cada un dels grups de microesferes diferenciats pel mecanisme d'acció i es veu que els valors del grup amb mecanisme d'alliberació no-fickià ($N > 0,5$) eren inferiors als obtinguts del grup amb alliberació fickiana ($N < 0,5$) i per tant resultaven ser més actives (figura 121). El mecanisme addicional d'alliberació del primer grup influeix en la quantitat final de fàrmac alliberat, sent 85,08 % en el primer cas i 77,35 % en el segon, així doncs les diferències d'activitat quedarien justificades.

S'intenta correlacionar les activitats front les constants cinètiques d'alliberació i només en el cas de la constant de Korsmeyer existeix correlació en un interval de confiança del 90 %.

Resumint, el grup de microesferes amb una alliberació d'antimoni no fickiana (**E11**, **E2**, **E6** i **E15**) es troben entre les microesferes més actives front *L.infantum*. Inclús la mostra **E2** és la que resulta ser més activa tot i no ser la que allibera més fàrmac a les 24 h.

Totes les microesferes d'AMG mostren un perfil d'alliberació caracteritzat per un pic inicial d'antimoni seguit per una alliberació més lenta al llarg de 24 h. Per això es considera que aquesta nova formulació és una bona alternativa pel tractament de la leishmaniosis. Alguns autors creuen que l'èxit d'una teràpia antileishmania depèn de mantenir les concentracions d'antimoni al llarg del temps. Els primers estudis utilitzant estibogluconat sòdic en hámsters suggerien que per eradicar els paràsits *in vivo*, el pic de concentracions d'antimoni era més important que l'àrea sota la corba (AUC). En canvi, això es contradia pel fet que una curta exposició de fàrmac no estaria assegurant l'eliminació del paràsit en la mateixa extensió que si una alta i suficient concentració fos mantinguda al llarg d'un període de temps.

5.5. CONCLUSIONS

1. S'ha desenvolupat adequadament un nou sistema d'alliberació d'antimoni de meglumina pel tractament de la leishmaniosis mitjançant la tècnica de l'atomització.
2. Les tècniques de SEM i ICP-OES confirmen que l'antimoni de meglumina ha estat eficientment encapsulat dins de microesferes de quitosà mitjançant l'atomització tant d'una emulsió O/A o d'una solució.
3. Utilitzant el mètode d'encapsulació de l'antimoni de meglumina desenvolupat, és possible aconseguir eficiències d'encapsulació majors al 90 % amb uns rendiments superiors al 60 %.
4. Els dissenys experimentals utilitzats han permès l'optimització de les microesferes de quitosà i l'estudi de la influència de la formulació i els paràmetres tecnològics sobre les propietats de les microesferes.
5. Tots els valors de IC_{50} d'antimoni obtinguts de l'antimoni de meglumina encapsulat en microesferes de quitosà assajades front promastigots i amastigots, són considerablement inferiors als valors de les IC_{50} obtingudes de la solució de Glucantime[®] i proporcionen un Índex de Seguretat superior a 1.
6. Per primera vegada es descriu una nova activitat *in vitro* del quitosà front *L.infantum* amb una baixa citotoxicitat en assaigs amb macròfags (PATENEPP200700968).
7. Els probables inhibidors de la GPA, els triglicèrids de cadena mitja i l'oli de ricí hidrogenat de polioxil 40, quan es troben formant part de les microesferes com excipients, no produeixen cap millora en l'activitat front promastigots de *L.infantum* si es compara amb les microesferes que no contenen lípids.
8. S'ha aconseguit encapsular satisfactòriament punts quàntics en microesferes de quitosà i PLGA mitjançant atomització i la tècnica d'evaporació de solvent.

9. S'ha demostrat la vehiculització de les microesferes de quitosà als macròfags mitjançant els estudis de recaptació utilitzant punts quàntics. Aquests estudis confirmen la millor idoneïtat del quitosà com a polímer per la vehiculització de fàrmacs antileishmania a macròfags comparat amb el PLGA.
10. L'alt contingut de quitosà redueix el rendiment de l'atomització, produeix microesferes més grans i arrugades però, en canvi, fa augmentar l'eficiència d'encapsulació.
11. S'ha desenvolupat satisfactòriament un mètode per estudiar el perfil d'alliberació de l'antimoni de meglumina contingut en microesferes de quitosà.
12. Les microesferes de quitosà presenten una alliberació bifàsica durant 24 h, caracteritzada per una alta alliberació inicial seguida d'una alliberació lenta. Alts percentatges de polímer redueixen l'alliberació del fàrmac durant tot l'estudi.
13. El model de Korsmeyer-Peppas és el que, estadísticament, descriu millor el mecanisme d'alliberació de l'antimoni de meglumina en microesferes de quitosà. S'han trobat dos mecanismes d'alliberació diferents entre les microesferes de quitosà assajades: alliberació Fickiana i no Fickiana.
14. Alts percentatges de glutaralhid en les microesferes de quitosà tendeixen a incrementar significativament la presència d'un mecanisme d'alliberació no-fickià. Aquestes microesferes mostren l'alliberació més lenta durant les 3 primeres hores però, en canvi, un percentatge d'alliberació de fàrmac més alt a les 24 h. A més, aquestes microesferes es troben entre les més actives front *L.infantum*.
15. El valor més petit d' IC_{50} d'antimoni obtingut, prové de les microesferes de quitosà obtingudes utilitzant alts percentatges de glutaralhid, baixos percentatges de quitosà i baixes temperatures d'entrada.

16. Aquest nou sistema d'alliberació podria oferir una nova eina farmacològica pel tractament de la leishmaniosis que reduiria la dosis necessària, disminuint els efectes secundaris provocats per l'antimoniato de meglumina.