

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

“SÍNTESIS DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES DE POLI (D, L-LACTIDA Y L-LACTIDA) PARA EMPLEARLOS COMO DISPOSITIVOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE CICLOPIROX SOBRE LA VIABILIDAD DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*”

Tutores:

Dr. Carlos Chinaa

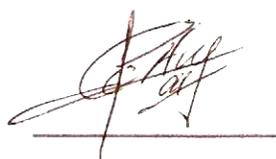
Dr. Xenón Serrano-Martín

*Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela por la **Br. Anyoli Nazareth Taly Tovar**, para optar al título de Licenciado en Química.*

Caracas, mayo 2018

ACTA DE APROBACIÓN

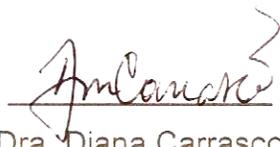
Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“SÍNTESIS DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES DE POLI (D, L-LACTIDA Y L-LACTIDA) PARA EMPLEARLOS COMO DISPOSITIVOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE CICLOPIROX SOBRE LA VIABILIDAD DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*”**. Presentado por la Br. Anyoli Taly, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al Título de Licenciado en Química.



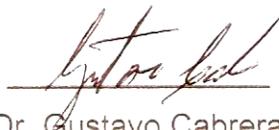
Dr. Carlos China
(Tutor)



Dr. Xenón Serrano-Martín
(Tutor)



Dra. Diana Carrasco
(Jurado)



Dr. Gustavo Cabrera
(Jurado)

Yo Profesor, Dr. Carlos Chinae, Investigador del Laboratorio de Polímeros de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y el Dr. Xenón Serrano-Martín Investigador del Laboratorio de Biología y Quimioterapia de Parasitosis Tropicales, Área de Salud, de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“SÍNTESIS DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES DE POLI (D, L-LACTIDA Y L-LACTIDA) PARA EMPLEARLOS COMO DISPOSITIVOS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE CICLOPIROX SOBRE LA VIABILIDAD DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*”

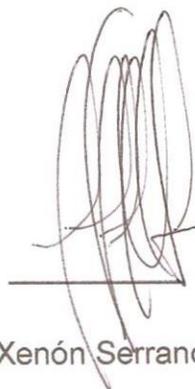
Que presenta la Br. Anyoli Taly, para aspirar al Título de Licenciado en Química, ha sido realizado en estos laboratorios de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y del IDEA, bajo nuestra dirección, durante los años 2017 y 2018, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 23 de mayo de 2018.



Dr. Carlos Chinae

Tutor



Dr. Xenón Serrano-Martín

Tutor

AGRADECIMIENTOS

A mi único y suficiente salvador, mi Señor Jesús, al Padre y a la Persona del Espíritu Santo a quién doy toda la gloria, honra y alabanza (las palabras no alcanzan para exaltarte Dios), por darme vida y gracia para poder culminar este humilde trabajo con éxito y con un gran aprendizaje.

A mi madre Lolimar Tovar a quien debo el cuidado, la formación, el apoyo incondicional y su paciencia por estos años de estudio y proceso de tesis que me mantuvo, en gran manera, ocupada. Este logro también es tuyo por el esfuerzo de criarme y luchar cual heroína para que yo pudiera llegar hasta aquí, gracias, te amo. A Christopher Maita, mi hermanito, eres un regalo para mí, Dios te mandó tal y como se lo pedí, te quiero. A Leudys Maita, quien fungió de padre para guiarme y darme el afecto necesario para crecer; agradezco tus consejos y la manera en que muchas veces me enseñaste a ver la ciencia en la vida cotidiana (siempre diré que eres bueno para la ciencia). También de manera especial agradezco a mi abuelo Juan Ramón Tovar, que aunque no esté físicamente conmigo, fue un hombre de palabras motivadoras y amorosas que me infundieron aliento para seguir este camino. A mi abuela Auristela Tovar, por sus cuidados y consejos valiosos. A mis tíos Eudomar, Juan Carlos, Robinson, Orlando, Yelitza, Carolina, Amanda, Yanellis y Virginia, porque de alguna manera aportaron física y emocionalmente ayuda para poder lograr mis objetivos académicos, de verdad muchas gracias.

A mis tutores el Dr. y profesor Carlos Chinaa por brindarme la oportunidad de formar parte de este trabajo en su laboratorio, por su valiosa ayuda y guía. Muchas gracias por su confianza. Al Dr. Xenón Serrano por su apoyo incondicional, palabras motivadoras y disposición para ayudarme y atenderme siempre que lo necesitaba. A mis jurados, Dra. Diana Carrasco y Dr. Gustavo Cabrera por sus aportes valiosos sobre este trabajo. A quiénes aportaron todo lo necesario para poder llevar a cabo mis procedimientos

experimentales: Prof. Jairo Bermúdez, por prestarme el liofilizador. Prof. Juan Álvarez y los chicos del laboratorio 152 Química del C1 por facilitarme el agitador mecánico y ultrasonido. Prof. José Daniel Martínez por prestarme el espectrofotómetro UV-Visible. Prof. Jorge Peñuela por facilitarme agua destilada. Prof. Rafael Golding por su orientación en la teoría de la técnica de espectrometría UV-visible. Prof. Lola De Lima y prof. Jaime Charris por ayudarme a preparar y a obtener las muestras para los ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, respectivamente (sumamente agradecida). Prof. María Ranaudo por facilitarme hielo, y por estar siempre atenta. Al sr. Jorge Terán por facilitarme nitrógeno líquido. Prof. Jimmy Castillo por su ayuda y por permitirme usar su microscopio óptico. Profesores Caribay Urbina y Luis Errico del Centro de Microscopia Electrónica, por su apoyo y amable disposición para ayudarme a obtener las micrografías de las microcápsulas. A los integrantes del laboratorio de Polímeros (los quiero mucho): Prof. Dilitiana Capitillo, gracias por tus palabras de ánimo, preocupación y aportes para la realización de mi trabajo; eres lo máximo. María Gabriela, gracias por ayudarme a preparar las muestras para el DSC, por tu excelente compañía e interés en saber siempre cómo me encontraba. Daniela, eres genial, gracias por ayudarme con el tema de elucidación de mis espectros, y por tu amable trato. Elvin, Eric, Anthony y Marbelys gracias por su apoyo en los requerimientos que necesité durante la parte experimental. También agradezco al Lic. Luis Pesquera por sus valiosos aportes, orientación, palabras de ánimo y disposición que tuvo en todo momento mientras solicité su ayuda. Al Lic. Ricardo Higuera por tener siempre la disposición de prestarme su ayuda. A los integrantes del laboratorio de Biología y Quimioterapia de Parasitosis Tropicales (BYQPAT) del IDEA (con quienes estoy demasiado agradecida): Luis Piña, gracias por el apoyo incondicional brindado para poder realizar mi trabajo con la mayor comodidad posible (aprecio que hayas siempre dispuesto de tu tiempo para ayudarme). Sr. Jorge Núñez, gracias por su orientación y ayuda para la realización de la curva de crecimiento y además por su amable atención, es un excelente compañero. Alí Mijoba, gracias por tu colaboración en facilitar información sobre la teoría asociada a este trabajo. Yael García, gracias por tus valiosas orientaciones en los momentos donde la confusión

llegó a abrumarme. Del edificio de agricultura ASA del IDEA, agradezco a la Investigadora Josnell Maury Moret, el sr José Vezga y el Investigador José Rosales por prestarme el espectrofotómetro de lector de placas; igualmente del área de salud agradezco a las Investigadoras Eucaris Jiménez y Aurora Álvarez, por tener siempre la disposición de prestarme su espectrofotómetro de lector de placas y por sus orientaciones.

A mi amiga Yudimar Torrealba, por su perseverante amistad y por esa oración que hiciste cuando me sentía desmotivada, que estoy segura, cambió todo el panorama del avance que a posteriori tendría este trabajo. A mi líder y amiga, Corina Martínez por su cuidado incondicional y comprensión durante los momentos ocupados que tenía durante el desarrollo de la parte experimental. A mis amigas Liesa, Fabi y Mafer por sus palabras de ánimo y confianza. A Krisbel, Ambar y Francis, por los momentos de apoyo que recibí de su parte desde el comienzo de este trabajo y durante los últimos semestres de la carrera, su amistad ha sido de bendición para mí.

Gracias a todos aquellos que Dios usó de alguna manera para bendecir el desarrollo y culminación de este trabajo.

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto parasiticida de ciclopirox olamina dispensado desde microcápsulas de poli (D,L y L-lactida) (polímeros biodegradables y biocompatibles ampliamente usados en el campo biomédico) en ensayos *in vitro* sobre la viabilidad del parásito *Leishmania braziliensis*, el cual es causante de la enfermedad Leishmaniasis, específicamente la manifestación Leishmaniasis cutánea, que en Venezuela representa el cuadro clínico más abundante sobre la población que padece esta enfermedad, que es catalogada como endémica, y cuyo parásito es el principal causante con respecto a las otras especies que generan la leishmaniasis cutánea. Debido a la ineficacia de los tratamientos empleados para esta enfermedad, los cuales son altamente tóxicos, costosos y traumáticos, se realizó este estudio como paso preliminar para reemplazar a futuro la gran cantidad de dosificaciones dolorosas que reciben los pacientes, por dispositivos de liberación controlada biocompatibles, efectivos e indoloros

Para la construcción de estos dispositivos, se sintetizaron dos homopolímeros de poli (D, L-lactida y L-lactida) a partir de D, L-lactida y L-lactida por el método de polimerización por apertura de anillo (ROP, por sus siglas en inglés). Mediante la caracterización por Resonancia Magnética Nuclear, se hallaron tacticidades diferentes que permitieron comprender el arreglo cristalino de ambos, y cómo esto afectó de manera significativa la construcción y comportamiento en solución de los dispositivos de liberación controlada.

Para la elaboración de las microcápsulas, se empleó el método de emulsión simple por evaporación de solvente para generar microesferas sin fármaco, las cuales serían expuestas a condiciones cercanas a las fisiológicas humanas para estudiar su cambio morfológico por degradación hidrolítica, encontrándose que poli (D,L- lactida) se degradó más rápido que poli (L-lactida); y el método de doble emulsión por evaporación de solvente se empleó para encapsular ciclopirox olamina.

Luego, se procedió a evaluar los perfiles de liberación controlada del fármaco en solución buffer de fosfato a 37°C y en medio de cultivo LIT a 29°C. Por último, se evaluó el efecto parasiticida de ciclopirox olamina dispensado desde las microcápsulas sobre la viabilidad de los parásitos *L. braziliensis* mediante una curva de crecimiento. Este último ensayo, mostró que los dispositivos liberaron controladamente el medicamento, garantizando un efecto parasiticida constante con respecto al efecto del medicamento aplicado directamente. Se comprobó, en efecto, que este desarrollo biotecnológico es viable para comenzar a evaluar su comportamiento sobre sistemas *in vivo* y su aplicación farmacológica.

Palabras claves: Polilactida, Ciclopirox, microcápsulas, liberación controlada, *Leishmaniasis*.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	v
I-INTRODUCCIÓN	1
II-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
II.1-Leishmaniasis	4
II.1.1-Manifestaciones de esta enfermedad en el ser humano	4
II.1.2-Proceso de transmisión	7
II.1.3-La leishmaniasis en Venezuela	9
II.1.4-Tratamiento para la leishmaniasis	11
II.1.5-Ciclopirox olamina (CX)	13
II.2-Polímeros biodegradables	16
II.2.1-Polímeros biodegradables en el campo biomédico	16
II.2.2-Requerimientos que deben tener los biomateriales para ser implantados	17
II.2.3-Poliácido láctico (polilactida)	19
II.2.4-Estructura física de los polímeros: Estado amorfo y estado cristalino. Tacticidad	21
II.2.5-Síntesis de PLA. Tipos de polimerización	22
II.2.6-Polimerización por apertura de anillo en masa	26
II.3-Sistema de liberación controlada de fármacos con polímeros biodegradables	27
II.3.1-Sistemas terapéuticos farmacéuticos y dispositivos biomédicos	30

II.3.2-Tipos de sistemas de liberación de fármacos	31
II.4-Modelos matemáticos que describen la cinética de liberación de fármacos desde dispositivos de liberación controlada	34
II.5-Microencapsulación	36
II.5.1-Preparación de microesferas por el método de evaporación de solvente	38
II.5.1.1-Encapsulación por emulsión (W/O/W) seguida por evaporación de solvente	38
II.5.1.2-Eficiencia de encapsulación del fármaco.....	39
II.6-Biodegradación del polímero en la liberación de fármacos	42
II.7-Ensayos biológicos <i>in vitro</i> de liberación de fármacos con biomateriales	45
III-ANTECEDENTES	46
IV-OBJETIVOS	60
IV.1-Objetivo general	60
IV.2-Objetivos específicos.....	60
V-METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	62
V.1-Síntesis de poli (D,L-lactida) y poli (L-lactida) por apertura de anillo en masa	63
V.1.2-Characterización por Resonancia Magnética Nuclear (¹ H-RMN y ¹³ C-RMN) de PL y PDL	65
V.1.3-Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Análisis térmico	65
V.1.4-Determinación del peso molecular de PL por viscosimetría	65
V.2-Microencapsulación de los polímeros (sin contenido de CX) por el método de emulsión simple por evaporación de solvente.....	66
V.2.1-Estudio de la degradación de las microcápsulas sin contenido de CX. Ensayo <i>in vitro</i> en condiciones fisiológicas humanas	67
V.3-Microencapsulación de los polímeros cargados con CX por el método de doble emulsión por evaporación de solvente	68

V.3.1-Caracterización de microcápsulas PL y PDL con y sin contenido de CX por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	69
V.3.2-Eficiencia de encapsulación de CX en las microcápsulas	69
V.3.3-Perfil de liberación de CX por degradación de las microcápsulas. Ensayo <i>in vitro</i> en PBS	70
V.3.4-Perfil de liberación de CX por degradación de las microcápsulas. Ensayo <i>in vitro</i> en medio LIT	71
V.3.5-Determinación de la viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en presencia de microcápsulas cargadas con CX mediante conteos directos. Curva de crecimiento	71
VI-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
VI.1-Síntesis de poli (D,L-lactida) y poli (L-lactida) por apertura de anillo en masa	73
VI.1.2-Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear (¹ H-RMN y ¹³ C-RMN) de PL y PDL	73
VI.1.3-Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Análisis térmico	85
VI.1.4-Determinación del peso molecular de PL por viscosimetría	86
VI.2 Microencapsulación de los polímeros (con y sin contenido de CX) por el método de emulsión simple y doble emulsión por evaporación de solvente	86
VI.2.1-Estudio de la degradación de las microcápsulas sin contenido de CX. Ensayo <i>in vitro</i> en condiciones fisiológicas humanas	86
VI.2.2-Caracterización de microcápsulas PL y PDL con y sin contenido de CX por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	94
VI.2.2.1-Caracterización por MEB de microcápsulas sin contenido de CX generadas por el método de emulsión simple por evaporación de solvente	94
VI.2.2.2-Caracterización por MEB de microcápsulas con contenido de CX generadas por el método de doble emulsión por evaporación de solvente	98
VI.2.3-Eficiencia de encapsulación de CX en las microcápsulas	102

VI.2.4-Perfil de liberación de CX por degradación de las microcápsulas. Ensayo <i>in vitro</i> en PBS	103
VI.2.5-Perfil de liberación de CX por degradación de las microcápsulas. Ensayo <i>in vitro</i> en medio LIT	108
VI.2.6-Determinación de la viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en presencia de microcápsulas cargadas con CX mediante conteos directos. Curva de crecimiento	111
VII-CONCLUSIÓN	115
VIII-RECOMENDACIONES	116
IX-BIBLIOGRAFÍA	117
X-APÉNDICE	125
XI-ANEXOS	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parásitos Leishmania.....	5
Figura 2. Leishmaniasis cutánea	6
Figura 3. Leishmaniasis mucocutánea	6
Figura 4. Leishmaniasis visceral.....	7
Figura 5. Ciclo de transmisión de la leishmaniasis	8
Figura 6. Etapas de desarrollo del parásito Leishmania	9
Figura 7. Flebótomo transmisor del parásito Leishmania	9
Figura 8. Medicamentos empleados en el tratamiento de la leishmaniasis	13
Figura 9. Estructura química de Ciclopirox olamina	14
Figura 10. Estructuras químicas de PLA y ácido láctico	19
Figura 11. Sistema: a) amorfo, b) semicristalino y c) cristalino.....	21
Figura 12. Estereosecuencia sindiotáctica, isotáctica y atáctica	22
Figura 13. Formación de lactida. Ciclo de vida del PLA.....	24
Figura 14. Tres diastereoisómeros de lactida	25
Figura 15. Mecanismo de polimerización por apertura de anillo para PLA.....	26
Figura 16. Comparación de un sistema de liberación controlada vs una dosificación por inyección.....	29
Figura 17. Suministro de medicamento de un sistema ideal de liberación controlada de distribución.....	29
Figura 18. Sistema terapéutico farmacéutico	30
Figura 19. Esquema de un sistema por difusión.....	32
Figura 20. Esquema de una bomba osmótica.....	33

Figura 21. Diagrama esquemático de la formación de las microesferas	37
Figura 22. Diagrama esquemático de los métodos basados en una emulsión doble para la preparación de micropartículas de polímeros	39
Figura 23. Biodegradación de polímeros de lactida/glicolida.....	43
Figura 24. Montaje del sistema empleado para el llenado y manipulación de las ampollas (síntesis de los homopolímeros).....	64
Figura 25. Viscosímetro de Ostwald.....	66
Figura 26. Montaje experimental a emplear en la elaboración de las microcápsulas.....	67
Figura 27. Montaje experimental a emplear en la elaboración de las microcápsulas con CX.....	69
Figura 28. Espectro ^1H -RMN de PDL.....	74-75
Figura 29. Espectro ^1H -RMN de PL.....	76-77
Figura 30. Espectro ^{13}C -RMN de PDL.....	79-80
Figura 31. Espectro ^{13}C -RMN de PL.....	81-82
Figura 32. Espectro ^{13}C -RMN con señales particulares ampliadas para de PL.....	84
Figura 33. Espectro ^{13}C -RMN con señales particulares ampliadas para de PDL.....	85
Figura 34. Micrografías de a) PDL y b) PL a 1 hora de exposición en PBS a 37°C	87
Figura 35. Micrografías de a) PDL y b) PL a 7 horas de exposición en PBS a 37°C	88
Figura 36. Micrografías de a) PDL y b) PL a 30 horas de exposición en PBS a 37°C ...	88
Figura 37. Micrografías de a) PDL y b) PL a 72 horas de exposición en PBS a 37°C ...	89
Figura 38. Micrografías de a) PDL y b) PL a 7 días de exposición en PBS a 37°C	89
Figura 39. Micrografías de a) PDL y b) PL a 14 días de exposición en PBS a 37°C	90
Figura 40. Micrografías de a) PDL y b) PL a 30 días de exposición en PBS a 37°C	90
Figura 41. Micrografías de a) PDL y b) PL a 49 días de exposición en PBS a 37°C	91

Figura 42. Micrografías de a) PDL y b) PL a 79 días de exposición en PBS a 37°C	91
Figura 43. Micrografías de a) PDL y b) PL a 103 días de exposición en PBS a 37°C ...	92
Figura 44. Micrografías de la morfología externa de las microcápsulas sin cx. a) y b) PL, c) y d) PDL	94
Figura 45. Micrografías de la morfología interna de las microcápsulas sin cx. a) y b) PL, c) y d) PDL	95
Figura 46. Micrografías de la morfología externa de las microcápsulas con cx. a) y b) PL, c) y d) PDL	98
Figura 47. Micrografías de la morfología interna de las microcápsulas con cx. a) y b) PL, c) y d) PDL	99
Figura 48. Micrografías de microcápsulas, estructura interna, perfil de liberación de PDL y ajuste lineal del modelo de Higuchi para homo D,L-lactida	107
Figura 49. Concentración liberada por las microcápsulas en el primer día de exposición en PBS a 37°C. Concentración liberada por las microcápsulas en el primer día de exposición en medio LIT a 29°C	110-111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimientos de reacción. Síntesis de Poli (L-lactida) y Poli (D,L-lactida) en masa	73
Tabla 2. Desplazamientos químicos de los protones correspondientes a los grupos metilo y metino	78
Tabla 3. Desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a los grupos metilo, metino y carbonilo	83
Tabla 4. Eficiencia de encapsulación del fármaco, porcentaje de rendimiento y contenido de droga de microcápsulas PDL y PL	102

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución de tamaño para microcápsulas de PDL sin CX	96
Gráfico 2. Distribución de tamaño para microcápsulas de PL sin CX	96
Gráfico 3. Distribución de tamaño para microcápsulas de PDL con CX.....	100
Gráfico 4. Distribución de tamaño para microcápsulas de PL con CX.....	101
Gráfico 5. Perfil de liberación de CX desde 2 mg de microcápsulas de PDL en PBS a 37° C.....	104
Gráfico 6. Perfil de liberación de CX desde 2 mg de microcápsulas de PL en PBS a 37° C.....	104
Gráfico 7. Perfil de liberación de CX desde 1,68 mg de microcápsulas de PDL y 2,8 mg de microcápsulas de PL en medio LIT a 29° C.....	109
Gráfico 8. Curva de crecimiento de <i>L. braziliensis</i> en presencia de microcápsulas con CX	112

INTRODUCCIÓN

Durante más de dos décadas el suministro de agentes bioactivos, los cuales cumplen funciones en el cuerpo para promover la buena salud y que la mayoría se extraen de plantas y ciertos alimentos, se han mejorado con el uso de materiales poliméricos biodegradables, que han traído considerable atención a los investigadores en toda la comunidad científica; químicos de polímeros, ingenieros químicos, farmacéuticos y entomólogos están entre los que tratan de diseñar sistemas de liberación controlada de agentes bioactivos que van de insulina a rodenticidas^[1].

Debido a que la degradación de estos polímeros es por hidrólisis formando el monómero de partida que es biocompatible, y que por vías metabólicas se desechan los productos de descomposición^[2], la tendencia en la tecnología de administración de fármacos se ha orientado hacia el uso de materiales biodegradables que no requieren la extirpación quirúrgica una vez que el suministro de medicamentos se agota, evitando costo y trauma al paciente^[1]. Uno de los materiales más utilizados es el poliácido láctico, el cual cuenta con amplias aplicaciones en campos biomédicos, incluyendo la sutura, material de fijación de hueso, microesferas de administración de fármacos, y en ingeniería de tejidos^[2].

El poliácido láctico (PLA) es un polímero biodegradable que se ha estudiado extensamente durante los últimos 15 años, el cual se obtiene a partir de la polimerización del ácido láctico^[3] o el dímero cíclico lactida. El PLA puede ser sintetizado por dos mecanismos de reacción: Polimerización por apertura de anillo (ROP, *en inglés*) del intermediario lactida o por policondensación. Hoy en día, ROP es el método más usado, implementado en una larga escala de producción por la compañía Cargill Dow LLC en los Estados Unidos de Norte América. Este es un

proceso efectivo y complejo que requiere de pasos rigurosos de purificación de la lactida. El método más reciente permite obtener PLA a partir del monómero, ácido láctico. Sin embargo, para producir polímeros de alto peso molecular es necesario asegurarse de que el agua formada sea removida ^[4]. Es por ello, que deben emplearse métodos más eficientes para la síntesis de este polímero a partir de ácido láctico. Por lo tanto, el método ROP es más apropiado, a pesar de su costo, y hace que la formación del polímero sea más factible, ya que se evita la formación de agua que impide que el producto tenga un alto peso molecular.

Este polímero ha mostrado gran versatilidad como agente de liberación de fármaco, lo que favorece su uso en el tratamiento de enfermedades que requieren de métodos terapéuticos que son incómodos para el paciente, de alta toxicidad y a veces inefectivos sobre la zona afectada. En el caso de enfermedades tropicales como la Leishmaniasis (la cual fue de interés para este trabajo), es un recurso factible implementar un polímero biodegradable con liberación controlada del medicamento para que el tratamiento sea más específico sobre las lesiones y genere menos traumas médicos, asegurando también una dosificación continua.

La Leishmaniasis es causada por un parásito diminuto de nombre Protozoo Leishmania ^[5]. La Leishmaniasis tegumentaria es una enfermedad polimorfa de la piel y de las membranas mucosas. Comienza con una pápula que se agranda y típicamente se transforma en úlcera indolora. Las lesiones pueden ser únicas o múltiples y, ocasionalmente, no ulceradas y difusas. Pueden cicatrizar espontáneamente en término de semanas o meses o persistir durante un año o más. Es poco probable que un solo medicamento sea efectivo para todas las formas clínicas de la Leishmaniasis. Para seleccionar el tratamiento hay que considerar: La farmacocinética variable del medicamento en las formas visceral y cutánea, la variación intrínseca en la sensibilidad

de las más de 20 especies que infectan a humanos y la resistencia adquirida a los antimoniales.

En este proyecto se usa el fármaco Ciclopirox, el cual es un antifúngico clínicamente aprobado, como alternativa para nuevos tratamientos de la leishmaniasis. El efecto parasiticida de este fármaco (el cual ha sido comprobado en proyectos anteriores ^[6] se evalúa sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis*, debido a que este parásito es el causante principal de Leishmaniasis cutánea, con respecto a las demás especies que causan esta manifestación en particular, y porque esta enfermedad representa la forma clínica más frecuente en nuestro país, es por ello el interés particular de evaluar nuevas vías de tratamiento con este medicamento sobre esta especie.

Debido a la intención de mejorar la forma en la cual se suministra el tratamiento de la leishmaniasis, empleando dispositivos de liberación controlada, se requiere sintetizar polilactida partiendo de lactida como monómero por el método ROP por su ya mencionada efectividad como método de síntesis y obtención del mismo. Una vez obtenido el polímero, se generan microcápsulas con fármaco por el método de doble emulsión por evaporación de solvente, cuyo perfil de liberación y efecto parasiticida es estudiado mediante ensayos *in vitro*, para así encontrar un vehículo adecuado de dosificación controlada que cure la enfermedad, no genere efectos tóxicos, genere bajos costos y evite traumas médicos en los pacientes.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Leishmaniasis

La Leishmaniasis (o Leishmaniosis) es una enfermedad zoonótica, es decir, que proviene de animales que están enfermos y es transmitida al hombre por contagio directo con el animal, a través de algún fluido corporal como orina o saliva, o mediante la presencia de algún intermediario como pueden ser los mosquitos u otros insectos ^[7], razón por la cual, la leishmaniasis es también una enfermedad antroponótica. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad van desde úlceras cutáneas que cicatrizan espontáneamente, hasta formas fatales en las cuales se presenta inflamación grave del hígado y del bazo ^[7].

La transmisión de la Leishmaniasis se realiza a través de insectos muy pequeños del género phlebotomus (insectos chupadores de sangre), siendo la hembra la única que interviene, ya que el macho no es hematófago ^[8]. En Colombia, en ciertas regiones, este tipo de insectos es más conocido como palomilla. En las zonas tropicales de Ecuador se lo conoce como "arenillas" ^[7], y en Venezuela se le llama puri-puri ^[9].

II.1.1 Manifestaciones de esta enfermedad en el ser humano

Realmente la Leishmaniasis representa un conjunto de enfermedades producidas por diferentes especies del parásito Leishmania, las cuales divididas desde el punto de vista médico se pueden definir como leishmaniasis superficiales que afectan principalmente piel y mucosas, y Leishmaniasis profundas que dañan órganos internos

(hígado, bazo, médula ósea), ésta última también conocida como kala-azar la cual si no es tratada a tiempo puede causar la muerte ^[10].

Se han descrito tres tipos de leishmaniasis: leishmaniasis cutánea, transmitida por especies como *Leishmania (L.) major* (**figura 1A**), *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (V.) braziliensis* (**figura 1B**) y *Leishmania (V.) panamensis*; leishmaniasis mucocutánea, transmitida por especies como *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) panamensis*; y leishmaniasis visceral o kala-azar, transmitida por especies como *Leishmania (L.) infantum* (**figura 1C**) y *Leishmania (L.) donovani* (**figura 1D**). Cada una de estas manifestaciones de la enfermedad tiene diferentes inmunopatologías, así como grados de morbilidad y mortalidad ^[11].

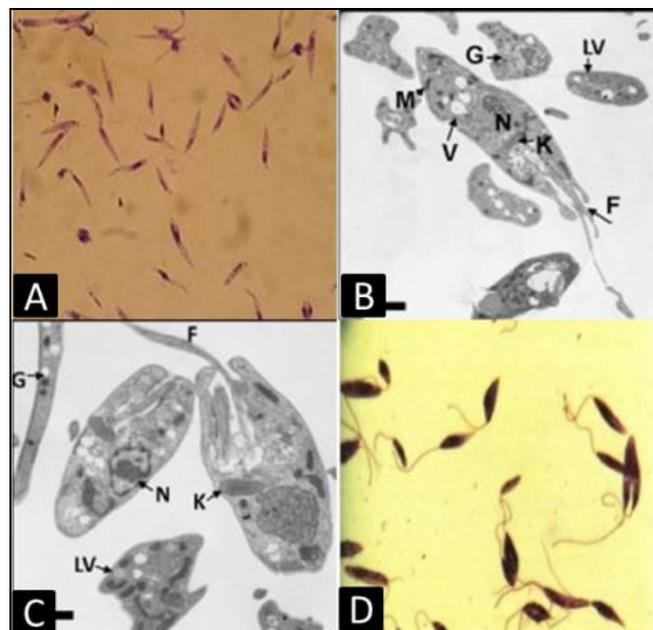


Figura 1. A) *Leishmania (L.) major*^[12]. B) *Leishmania (V.) braziliensis*^[13]. C) *Leishmania (L.) infantum*^[13]. D) *Leishmania (L.) donovani* (promastigote)^[14].

Las Leishmaniasis se pueden dividir en tres grupos ^[10]:

- *Leishmaniasis Cutánea (LC)*: Se presenta en forma de nódulos en la superficie de la piel donde fue inoculado el parásito.



Figura 2. Leishmaniasis cutánea^[15].

- *Leishmaniasis Mucocutánea (LMC)*: Se presenta con ulceración y erosión del tejido blando y cartílago en el área afectada.



Figura 3. Leishmaniasis mucocutánea^[16].

- *Leishmaniasis Visceral (LV)*: Se presenta con invasión de órganos internos por parte del parásito.



Figura 4. Leishmaniasis visceral ^[17].

II.1.2 Proceso de transmisión

La *Leishmania* spp. incluye un conjunto de parásitos protozoarios. Se trata de organismos esféricos u ovals, con un solo núcleo en el citoplasma y un tamaño aproximado de 1,5-2,5 x 3-6 micras. Son parásitos intracelulares obligados (dependen estrictamente del hospedador para llevar a cabo todos los ciclos vitales) de muchos mamíferos, se alimentan por difusión del contenido del citoplasma de la célula hospedadora y se reproducen por fisión binaria ^[18,19].

En la transmisión de la Leishmaniasis participan mosquitos hematófagos donde al menos 70 especies conocidas son capaces de transmitir la enfermedad ^[20].

Su ciclo vital (**figura 5**) comienza cuando la hembra de la mosca de la arena (mosquito), que actúa como vector, inocula la forma infectiva del parásito (promastigote metacíclico, **figura 6A**) al picar a un animal mamífero. Dentro de los macrófagos (células del sistema inmunitario) del mamífero infectado, el parásito se transforma en amastigote (de morfología redondeada u ovalada, sin flagelo, **figura 6B**), se multiplica activamente, se

libera por lisis del macrófago (ruptura de la membrana celular) e infecta nuevos macrófagos. El ciclo continúa cuando un nuevo mosquito pica al animal infectado; en el tubo digestivo del mosquito el parásito se transforma en promastigote (de morfología alargada y con un flagelo apical), se multiplica activamente y, tras un período de 6 a 8 días, migra hacia la faringe y la cabeza del mosquito, donde se transforma en la forma infectiva (promastigote metacíclico) cerrándose el ciclo [18].

Los mosquitos anatómicamente se describen de tórax arqueado, alas lanceoladas, cuerpo piloso, patas largas y delicadas, abdomen largo y tubular. Estos insectos son pequeños, miden entre 1,5 a 3 mm, son de color amarillento y ojos oscuros (**figura 7**) [21].

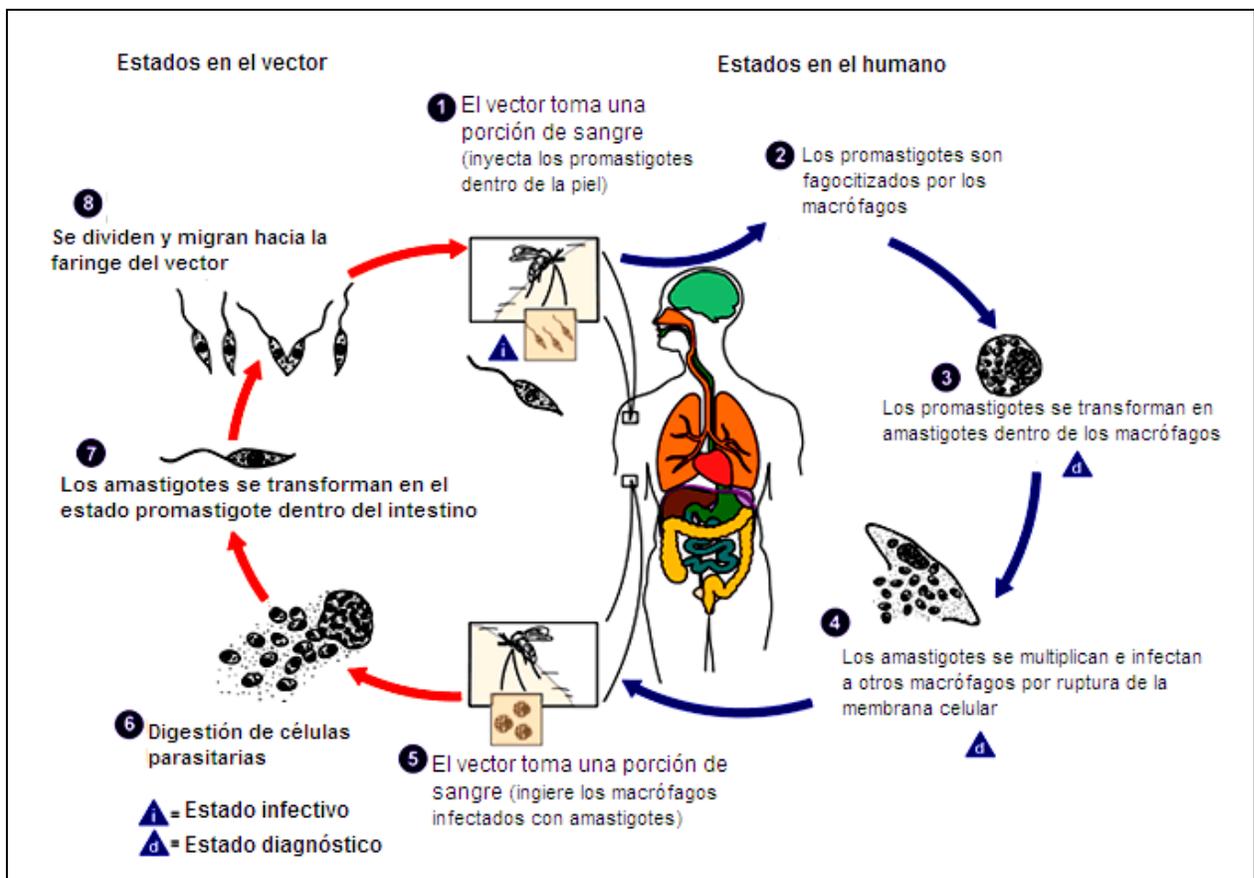


Figura 5. Ciclo de transmisión de la Leishmaniasis.

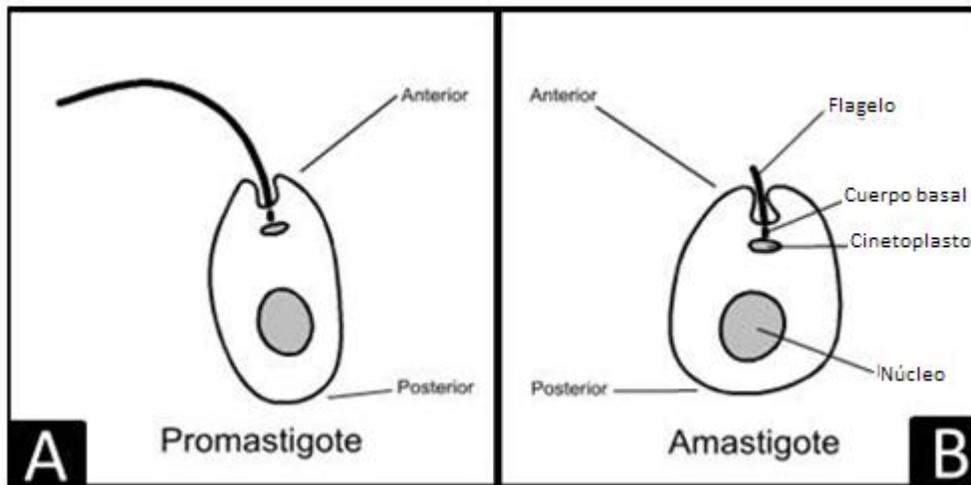


Figura 6. Etapas de desarrollo del parásito Leishmania.



Figura 7. Flebótomo transmisor del parásito Leishmania.

II.1.3 La Leishmaniasis en Venezuela

En Venezuela la enfermedad la comprobaron por primera vez ITURBE y GONZALEZ (1917) y posteriormente la estudiaron TEJERA (1917) PIFANO (1941), SANCHEZ COVIZA y GUERRERO (1940) JAFFE (1944) y otros [8].

Venezuela presenta una alta ocurrencia de parasitosis tropicales. Más aún, en Venezuela la leishmaniasis es un serio problema de salud pública; así, durante el período 1970 – 2004 se ha observado un incremento continuo inter-anual de nuevos casos ^[21]. Entre 1955 y 2002, el Ministerio de Salud registró cerca de 5°.000 casos de leishmaniasis cutánea y más de dos mil casos de leishmaniasis visceral ^[11]. Las manifestaciones más frecuentes son la Leishmaniasis cutánea y la mucocutánea. La incidencia de Leishmaniasis cutánea es de 10 casos por cada 100.000 habitantes; la leishmaniasis cutánea localizada representa el 98,8% de los casos positivos, con la aparición de una sola lesión en 69% de ellos. La Leishmaniasis visceral es menos frecuente en Venezuela; sin embargo, se han identificado casos en las zonas rurales y en los terrenos aluvionales por debajo de 7 metros del nivel del mar ^[21]. Los vectores más frecuentes observados para esta fecha fueron *Lutzomyia (Lu.) ovallesi*, *Lu. gomezi* y *Lu. panamensis*. Tanto *Leishmania (L.) chagasi* como *L. infantum* fueron identificados como agentes causales de leishmaniasis visceral, que utilizaron como vectores *Lu. longipalpis* y *Lu. evansi* y como reservorio, perros. Por otra parte, los agentes causales de leishmaniasis cutánea en el país fueron *L. mexicana* y *L. braziliensis*, y su principal reservorio, varias especies de ratones salvajes. Las estadísticas más actuales de casos de muerte por leishmaniasis en Venezuela son del año 2006. Cifras ofrecidas por el Ministerio del Poder Popular para la Salud, Instituto de Biomedicina, departamento de Informática, reflejaron una tasa de casos de leishmaniasis de 9,97 por cada 100.000 habitantes. Durante ese año, la enfermedad se encontraba distribuida a lo largo de todo el territorio nacional, con más frecuencia en regiones montañosas: Los Andes y la Serranía de la Costa ^[11].

El Instituto de Biomedicina en su área de atención al paciente, atiende casos a nivel nacional. Los datos recolectados por su Departamento de Informática indican que el número total de casos a nivel nacional, en el año 2004, fue de 2489. El sexo masculino

es más afectado que el femenino (60,7 % y 39,3%) y los casos se presentan a partir de los 3 años de edad ^[21].

II.1.4 Tratamiento para la Leishmaniasis

Desde 1940, los medicamentos tales como los derivados del antimonio pentavalente Glucantime y Pentostam®, así como las diaminas (por ejemplo, pentamidina) se utilizan contra la leishmaniasis. Más tarde, antifúngicos como la anfotericina-B (como desoxicolato o en forma liposomal), ketoconazol, antibióticos paromomicina y dapsona se incorporaron, y más recientemente, la miltefosina, el primer fármaco para uso oral en la Leishmaniasis, fue aprobado para ser utilizado. Toxicidad hepática y renal es exhibido por la mayoría de estos compuestos, y el costo del tratamiento por muchos de ellos ha impulsado la búsqueda de fármacos alternativos que cumplan las siguientes condiciones: La administración oral, menos efectos secundarios, menor toxicidad y menor precio ^[20].

A largo plazo, el tratamiento intravenoso con antimoniales produce efectos adversos graves, como dolor en el sitio de inyección, arritmias cardíacas, erupciones, etc. A menudo efectos secundarios conducen al abandono (parcial o total) del tratamiento por parte del paciente, un escenario que favorece la selección de parásitos resistentes a las drogas y el desarrollo de resistencia a los medicamentos ^[20]. En el año 2010 **Serrano et al.** afirmaron que el glucantime era la droga que se usaba en el tratamiento de cualquier tipo de Leishmaniasis en Venezuela, a pesar de producir graves efectos tóxicos en los pacientes que la recibían ^[11].

La anfotericina-B es un antibiótico de polieno que se administra como un desoxicolato intravenosa y desde 1997 en liposomas (AmBisome®). La anfotericina-B es selectiva frente a Leishmania. Sin embargo, su uso en regiones endémicas está limitado por el

costo del tratamiento, las dificultades de la administración y de la toxicidad. Como una alternativa de tratamiento de segunda línea, pentamidina y paromomicina se utilizan desde 1987, y más recientemente, la dapsona y ketoconazol se han introducido. La pentamidina es un compuesto diamino con un espectro relativamente amplio y es eficaz en la leishmaniasis visceral y la tripanosomiasis. Los ensayos clínicos de aminosidina (paromomicina) están en curso, y el uso de este fármaco contra la leishmaniasis visceral puede ser generalizado. La pentamidina y paromomicina son buenas alternativas utilizadas para el tratamiento oral o tópico en los casos de leishmaniasis cutánea ^[20].

En 2002, la miltefosina fue aprobada como el primer fármaco activo por vía oral contra la leishmaniasis visceral en la India, y en 2005, se aprobó para su uso contra la leishmaniasis cutánea en Colombia. La Miltefosina no solo provoca vómitos y diarrea en hasta un 60% de los pacientes; sino que también provoca aumentos reversibles de las transaminasas y creatinina en sangre ^[20].

Otro fármaco oral, sitamaquina, se encuentra actualmente en fase de desarrollo. Desafortunadamente, la selección de clones resistentes a sitamaquina de *Leishmania (L.) donovani* y los efectos adversos descritos en los ensayos clínicos de fase II deben estar considerado para una decisión ulterior desarrollo ^[20].

En resumen, la farmacopea contra la Leishmaniasis casi consta de los mismos medicamentos utilizados desde principios del siglo XX, a excepción de la miltefosina. Las drogas son altamente tóxicas, algunos pacientes no responden al tratamiento o presentan recaídas o el fracaso terapéutico, y los pacientes con leishmaniasis cutánea difusa no responden a ningún tipo de quimioterapia. En la India, hay áreas (por ejemplo, Bihar), donde el 30-65% de los casos tratados por la leishmaniasis visceral son resistentes a Glucantime, con la consiguiente aparición de cepas de *Leishmania*

donovani resistentes a los compuestos de antimonio ^[20]. A continuación en la **figura 8** se muestran las estructuras químicas de algunos medicamentos mencionados:

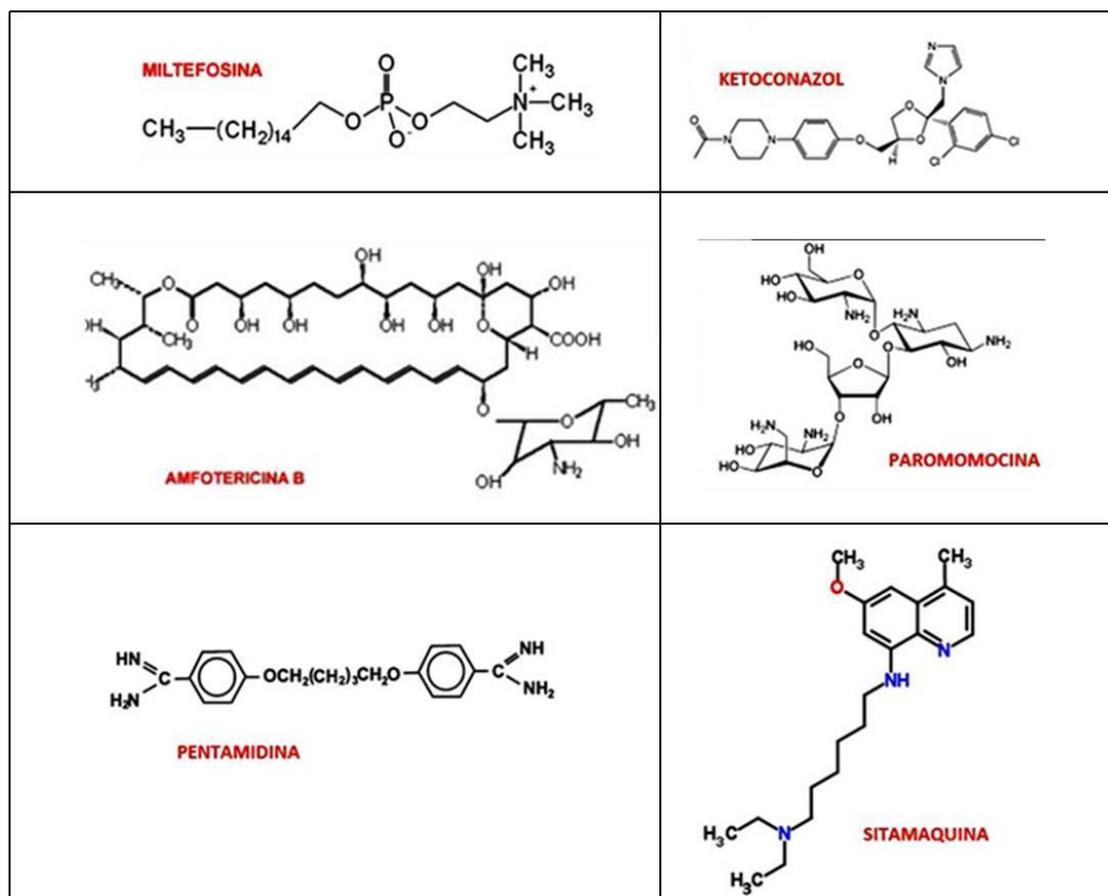


Figura 8. Medicamentos empleados en el tratamiento de la Leishmaniasis.

II.1.5 Ciclopirox olamina (CX)

Otro medicamento que se está estudiando actualmente para emplearlo en el futuro tratamiento de esta enfermedad es el ciclopirox olamina (nombre IUPAC 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridona) (**figura 9**). Es un sólido blanco, de olor aminado irritante. Soluble en agua, etanol, cloroformo, diclorometano y éter. Su valor de pH en solución acuosa al 1% es 8-9. Tiene un punto de fusión de 110-130 °C ^[22]. Este medicamento es

un agente antimicótico perteneciente al grupo de las hidroxipiridonas que posee un mecanismo de acción único y complejo que proporciona un amplio espectro de acción antimicrobiana, con actividad frente a dermatofitos, hongos levaduriformes, mohos y algunas bacterias grampositivas (resisten la decoloración y permanecen teñidas de color azul oscuro-negro ^[23], tinción de Gram) y gramnegativas (son rápida y completamente decoloradas ^[23]), y un bajo potencial de desarrollo de resistencia fúngica. La eficacia y seguridad de este agente frente a infecciones por dermatofitos o levaduras en adultos es ampliamente conocida ^[24].

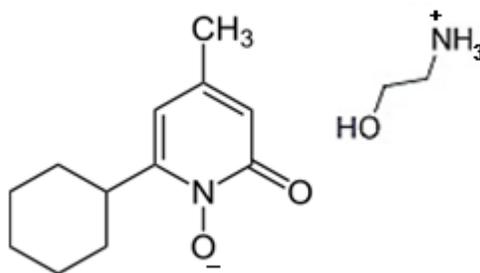


Figura 9. Estructura química de ciclopirox olamina.

El ciclopirox olamina comprende, además de su actividad fungicida, potencial antibacterial y hasta antiinflamatorio ^[25]. Aunado a ello, este medicamento ha demostrado también efecto parasiticida sobre una especie *Leishmania*: en la literatura ^[25] se reporta la inhibición de enzimas que sintetizan aminoácidos específicos en *L. donovani* en presencia de CX en solitario o asociado sinérgicamente a otras drogas. El mecanismo de acción de CX es diferente al de otros fármacos antimicóticos tópicos, que generalmente actúan a través de la inhibición de ergosterol ^[26] (componente de las membranas celulares de las plantas, que cumple la misma función que el colesterol realiza en las células animales. La presencia de ergosterol en las membranas de las células de las plantas, junto con su ausencia en las membranas de las células animales

convierte a esta sustancia en un objetivo útil para las drogas antifúngicas. El ergosterol también está presente en las membranas celulares de algunos protistas, como los tripanosomas) [26]. La alta afinidad del ciclopirox por cationes metálicos trivalentes (Fe^{3+} y Al^{3+}), que da como resultado la inhibición de las enzimas dependientes del metal (cofactores de las enzimas) que son responsables de la degradación de los peróxidos dentro de la célula fúngica, parece ser el principal determinante de su actividad antimicrobiana. Este mecanismo único y multinivel de acción, proporciona un potencial muy bajo para el desarrollo de resistencia en hongos patógenos, con casos de resistencia raramente informados. Ciclopirox también muestra efectos antiinflamatorios leves en modelos bioquímicos y farmacológicos; estos efectos también se muestran en pequeños estudios clínicos [27].

El Cx presenta una eficiencia clínica en un rango de entre 77 y 91%, además de un alto perfil de seguridad, visualizándose efectos secundarios indeseados de baja o moderada intensidad en una pequeña tasa de ocurrencia que suelen desaparecer con la suspensión de la aplicación del producto [28]. En trabajos anteriores similares a este proyecto, se demostró un efecto parasiticida del CX sobre *L. braziliensis*, se reportó un EC_{50} del medicamento de 29,73 μM (EC_{50} , siglas correspondientes a effective concentration (concentración efectivas), el cual es un parámetro que expresa la concentración necesaria de droga para producir la muerte del 50% de la población de especies respecto a controles que no han sido expuestos al fármaco). Este valor demostró que este fármaco tiene un efecto leishmanicida, siendo competitivo con respecto a otros medicamentos que actualmente se usan en el tratamiento. Aunado a ello, también se demostró un efecto citotóxico sobre macrófagos en concentraciones de 100 μM o más [6].

II.2 Polímeros biodegradables

A continuación se ahondará en información con respecto a los polímeros que conforman las microcápsulas con contenido de fármaco, las cuales fueron empleadas en los ensayos *in vitro* de este trabajo, y el proceso de construcción de las mismas.

Los polímeros biodegradables son aquellos capaces de ser degradados por el medio ambiente. Representan materiales capaces de reducir significativamente el impacto ambiental en términos de consumo de energía y generación de residuos después de su utilización ^[29].

II.2.1 Polímeros biodegradables en el campo biomédico

Los polímeros biodegradables se han usado ampliamente y han promovido en gran medida el desarrollo de campos biomédicos debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Estos pueden clasificarse como polímeros naturales o sintéticos de acuerdo con la fuente. Los polímeros biodegradables sintéticos han encontrado aplicaciones biomédicas más versátiles y diversas debido a sus diseños adaptables o modificables ^[30].

Un biomaterial se puede definir como un material destinado a interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Muchos implantes, tales como materiales de sustitución ósea, algunos materiales de la fijación de hueso, y los materiales dentales, deben poseer un rendimiento estable a largo plazo en el cuerpo. En los últimos años, los avances en la ingeniería de tejidos, la medicina regenerativa, la terapia génica, y la entrega controlada de fármacos han promovido la necesidad de nuevas propiedades de biomateriales con

biodegradabilidad. Los polisacáridos y proteínas son biopolímeros típicos de origen biológico, mientras que los poliésteres alifáticos y polifosfoésteres (PPE) son polímeros biodegradables sintéticos típicos ^[30].

Hoy en día, los polímeros biodegradables sintéticos se han convertido en alternativas atractivas para aplicaciones biomédicas por las siguientes razones: (1) Aunque los polímeros biodegradables más biológicamente derivados poseen una buena biocompatibilidad, algunos pueden desencadenar una respuesta inmune en el cuerpo humano, posiblemente uno que podrían evitarse mediante el uso de un biopolímero sintético apropiado; (2) Las modificaciones químicas en polímeros biodegradables de origen biológico son difíciles; (3) Las modificaciones químicas probablemente causan la alteración de las propiedades en masa de polímeros biodegradables de origen biológico. Una variedad de propiedades pueden ser obtenidas y otras modificaciones son posibles con polímeros biodegradables sintéticos diseñados adecuadamente sin alterar las propiedades en gran cantidad ^[30].

II.2.2 Requerimientos que deben tener los biomateriales para ser implantados

Los biomateriales son utilizados en la medicina con el objetivo fundamental de reestablecer ciertas estructuras o funciones del organismo vivo y forman parte del desarrollo de nuevas tecnologías. Todos ellos interactúan con el entorno en que se encuentra, por lo que puede ocurrir que el implante modifique sus propiedades en contacto con el medio biológico y también este último puede verse afectado cuando el material se degrada ^[31].

En los últimos años, ha habido un creciente desarrollo de las acciones normativas en los requerimientos de los ensayos de biocompatibilidad de los biomateriales implantables, ya que necesitan, previo a su introducción a la práctica médica, una evaluación biológica sustentada sobre bases científicas, éticas y regulatorias ^[31].

Las interacciones que ocurren entre el ambiente biológico y el implante, así como los mecanismos que se desarrollan en el rechazo del mismo, no siempre son bien conocidos. La respuesta inflamatoria, la corrosión, degradación y hasta desprendimiento del material implantado, así como posibles efectos tóxicos de sus componentes y la alteración en sus propiedades mecánicas, están entre los retos a resolver en este campo ^[31].

Los polímeros biodegradables sintéticos han atraído una atención considerable para aplicaciones en dispositivos médicos, y jugarán un papel importante en el diseño y funcionamiento de dispositivos médicos. Los criterios generales de los materiales poliméricos utilizados para dispositivos médicos incluyen propiedades mecánicas y el tiempo de degradación adecuada para el propósito médico. Además, los materiales no deben provocar respuestas inmunes o tóxicas, y deben ser metabolizados en el cuerpo después de cumplir con sus tareas. De acuerdo con estos requisitos, varios polímeros biodegradables sintetizados se han diseñado y utilizado ^[30].

En general, bien sea para implantes permanentes (prótesis) o temporales (sistema de liberación de fármacos), el biopolímero o polímero a usar debe ser biocompatible, esterilizable, libre de bacterias y cumplir con propiedades físicas y químicas adecuadas para la función que deben ejercer.

II.2.3 Poliacido láctico (polilactida)

Uno de los polímeros biodegradables que se ha usado en las últimas décadas en el campo biomédico es el poliacido láctico (PLA) que consiste en enlaces de ésteres alifáticos, que son propensos a la hidrólisis química y enzimática. El PLA se hidroliza por muchas enzimas tales como proteasa, proteinasa K, bromelaína, esterasa y tripsina. Sin embargo, estos enlaces de éster comienzan a hidrolizarse sólo cuando entran en contacto con el agua y en ciertas condiciones específicas de pH y temperatura. La fase de degradación primaria es puramente hidrolítica, donde no hay microorganismos que están involucrados. Sólo después de que el peso molecular medio en peso cae por debajo de aproximadamente 10.000, los microorganismos comienzan a digerir los oligómeros de poliacido láctico de peso molecular inferior, produciendo dióxido de carbono y agua ^[4]. A continuación en la **figura 10** se muestran las estructuras químicas del PLA y poliacido láctico:

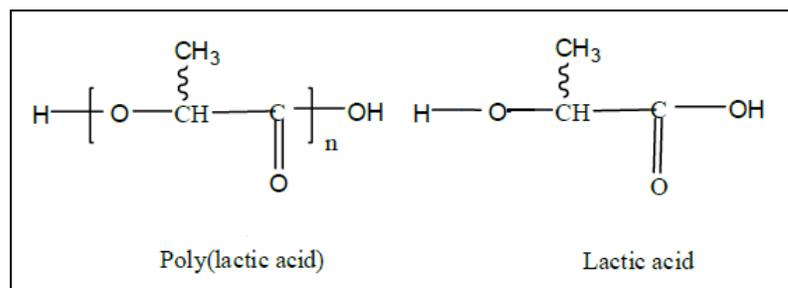


Figura 10. Estructuras químicas del PLA y ácido láctico ^[4].

Este mecanismo de dos etapas de la degradación es una clara ventaja del PLA sobre otros polímeros biodegradables, que normalmente se degradan por un proceso de una sola etapa que implica el ataque bacteriano en el dispositivo polimérico. Este es un atributo útil, en particular para el almacenamiento de productos y en aplicaciones que requieren el contacto con alimentos. El PLA se degrada rápidamente en el ambiente de

compostaje de alta humedad y temperatura (55 a 70 °C). Pero, a temperaturas más bajas y / o menor humedad, la estabilidad de almacenamiento de los productos de PLA es considerablemente alto ^[4].

Para amplias aplicaciones en la liberación controlada de fármacos, es imperativo que un rango de velocidades y la duración de la liberación del fármaco sean alcanzables. Un amplio espectro de características de rendimiento con el PLA se puede obtener mediante una cuidadosa manipulación de cuatro variables principales: Estereoquímica del monómero, la relación de comonómero (en caso de usar copolímeros), la linealidad de la cadena de polímero, y el peso molecular del polímero. Debido a que el mecanismo de la biodegradación es simple, la hidrólisis de los enlaces éster, es evidente como cada uno de estos factores juega un papel importante en el rendimiento *in vivo* de los materiales de lactida / glicolida. La cristalinidad y la absorción de agua son factores clave en la determinación de las velocidades de degradación *in vivo* ^[1].

El PLA puede ser amorfo o semicristalino, dependiendo de la composición de los estereoisómeros D-LA, L-LA y D, L-LA. La presencia de carbonos asimétricos da lugar a que existan tres estereoisómeros que son el L, D y el meso (D, L) a partir de la lactida o ácido láctico, todos ellos con propiedades diferentes (siendo el D y L enantiómeros y el D, L diastereoisómero de ellos). El poli (L-ácido láctico o L-lactida) PLLA es semicristalino y tiene un punto de fusión de alrededor de 173-178 °C, tiene una Tg cercana de 60-65 °C y es más hidrofóbico que el PGA haciendo que su degradación se más lenta (2 años mientras que el PGA dura 2-3 meses). El PDLLA es amorfo y se degrada más rápido (12-16 meses) en relación a la polilactida en sus formas puras D o L que son semicristalinas (2 años), mientras que los polímeros derivados de la mezcla racémica D, L-lactida son de naturaleza amorfa ^[1, 32].

La poli (L-lactida) es biocompatible y cuando es implantado en el organismo vivo se empieza a producir su degradación hidrolítica a ácido láctico el cual es un intermediario natural en el metabolismo de los carbohidratos ^[33].

II.2.4 Estructura física de los polímeros: Estado amorfo y estado cristalino. Tacticidad

Los términos cristalino y amorfo se utilizan normalmente para indicar las regiones ordenadas y desordenadas de los polímeros, respectivamente. La **Figura 11** muestra un esquema de un sistema amorfo, uno semicristalino y otro cristalino. En estado sólido algunos polímeros son completamente amorfos, otros son semicristalinos y, dependiendo de las condiciones de cristalización, un polímero con capacidad de cristalizar puede ser amorfo o semicristalino. Con frecuencia se utiliza el término cristalino en lugar de semicristalino, aunque ningún polímero es completamente cristalino ^[34].

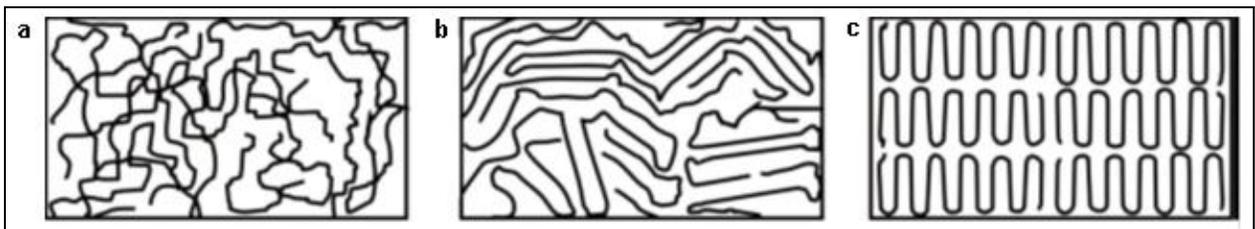


Figura 11. Sistema: a) amorfo, b) semicristalino y c) cristalino

Los polímeros con capacidad de cristalizar son aquellos cuyas moléculas son química y geoméricamente regulares en su estructura. Las irregularidades ocasionales, tales como las ramificaciones de la cadena, o la copolimerización de una pequeña cantidad de otro monómero limitan el alcance de la cristalización, pero no evitan que ocurra. Por

el contrario, los polímeros no cristalinos típicos son aquellos en los que existe una clara irregularidad en la estructura ^[34].

Tacticidad: La estructura regular de una cadena polimérica con un átomo de carbono asimétrico, proporciona una configuración particular de acuerdo a la posición de los sustituyentes sobre el plano de la cadena principal (**figura 12**). Cuando estos sustituyentes están por encima del plano de la cadena se genera una estereosecuencia isotáctica; si los sustituyentes quedan alternativamente por encima y por debajo la estereosecuencia es sindiotáctica, mientras que la secuencia de posiciones al azar genera una estereosecuencia atáctica ^[29].

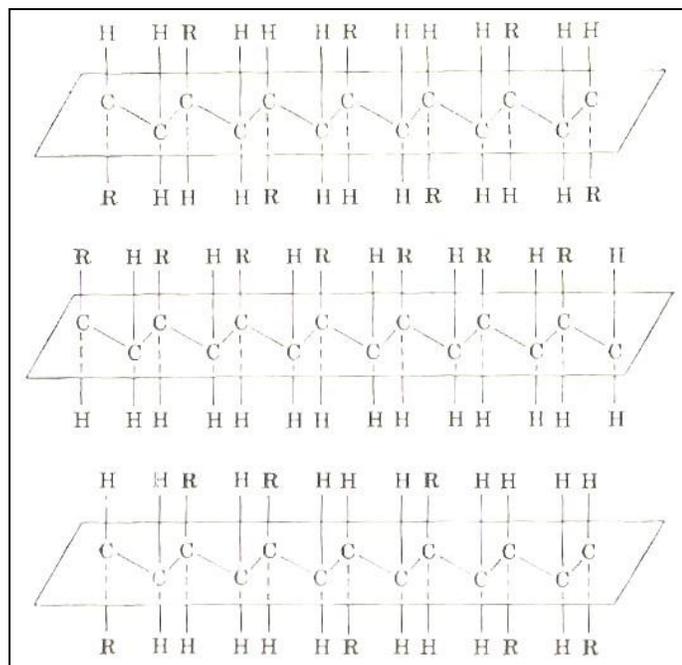


Figura 12. Estereosecuencia sindiotáctica (arriba) e isotáctica (centro) e irregular atáctica (abajo).

II.2.5 Síntesis de PLA. Tipos de polimerización

La polimerización del ácido láctico para producir polilactatos puede seguir tres rutas diferentes:

- *Polimerización por condensación directa.* El ácido láctico es polimerizado en grandes cantidades para producir moléculas de PLA de bajo peso molecular, de apariencia vidriosa y frágil (T_g alta). Este oligómero tiene aplicaciones reducidas, a menos que agentes de acoplamiento externo sean adicionados para aumentar su peso molecular, por ejemplo agentes adyuvantes y agentes de extensión, que son compuestos bifuncionales de bajo peso molecular que aumentan el peso molecular del polímero con reacciones rápidas ^[35].
- La segunda ruta es la *polimerización por destilación azeotrópica* donde el monómero se destila a presión reducida para remover la mayor cantidad de agua que se forma en la condensación durante 2 a 3 horas a 130 °C y posteriormente se añade un solvente y un catalizador que luego se lleva a reflujo durante 30 o 40 horas más a esa misma temperatura ^[35].
- La tercera ruta comprende la purificación, apertura y polimerización del anillo de lactida(ROP) para obtener un polímero de alto peso molecular ^[35].

La existencia de dos grupos funcionales en el ácido láctico posibilita convertirlo directamente en poliéster vía reacción de policondensación. Sin embargo la reacción de policondensación convencional no genera productos de alto peso molecular ^[35].

El poliácido láctico se puede obtener por la ruta de polimerización por apertura de anillo (ROP) de la dilactona cíclica del ácido láctico, llamada también dilactida o lactida, en presencia de un iniciador (también llamado catalizador) ^[4]. La lactida se obtiene mediante la despolimerización de PLA de bajo peso molecular a presión reducida para dar una mezcla de L-lactida, D-lactida, o meso-lactida (**figura 13**). Los diferentes porcentajes de los isómeros de lactida formados dependen del isómero de ácido láctico de partida, temperatura y catalizador. Los enantiómeros D-lactida y L-lactida pueden

formar una mezcla racémica 1: 1 (D, L- lactida ópticamente inactiva), que funde a 126-127 ° C ^[35].

La lactida es una molécula con dos centros de carbono quirales, lo que da lugar a tres estereoisómeros (**figura 14**) de configuraciones respectivamente LL, DD (enantiómeros ópticamente activos) y LD (meso ópticamente inactivo).

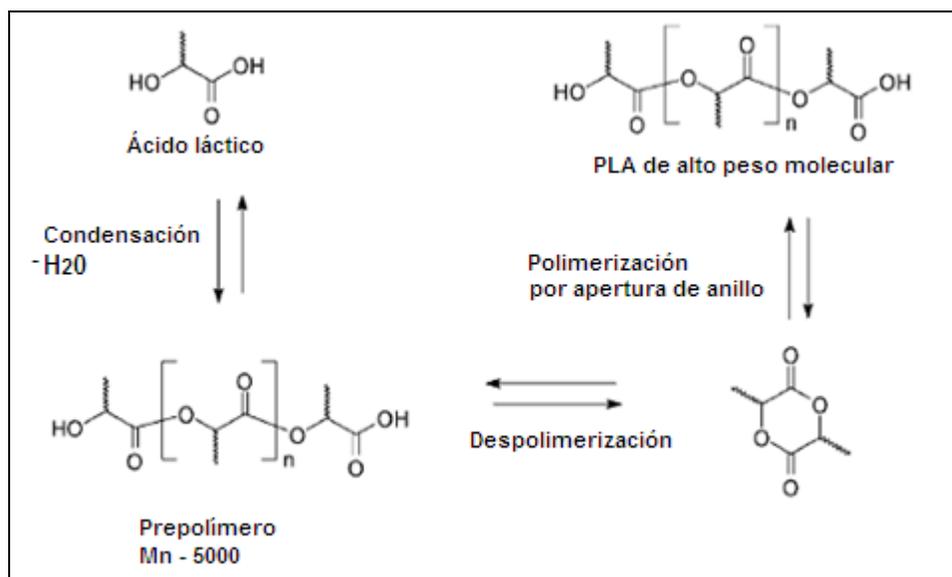


Figura 13. Formación de lactida. Ciclo de vida del PLA ^[36].

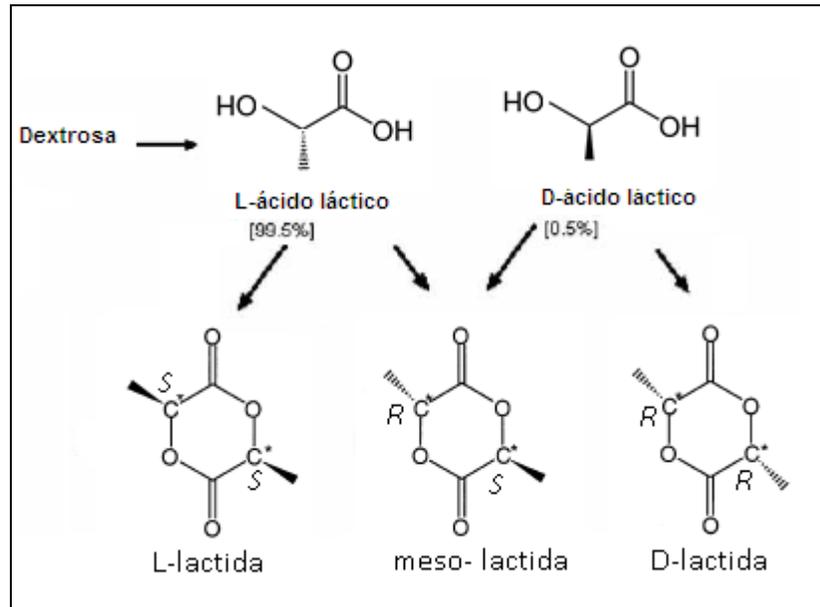


Figura 14. Tres diastereoisómeros de lactida.

El ciclo de vida de PLA se muestra en la **figura 13**. Después de la formación de oligómeros de PLA, ácido láctico por eliminación de agua, la despolimerización de oligómeros se lleva a cabo para dar un lactida termodinámicamente favorecida. Este monómero se polimeriza fácilmente bajo destilación al vacío. Se utiliza para producir PLA de alto peso molecular por polimerización de apertura de anillo. El PLA de alto peso molecular puede degradarse a ácido láctico en presencia de agua ^[37].

La polimerización por apertura de anillo de lactida puede llevarse a cabo en masa fundida, a granel, o en solución y por mecanismos de polimerización catiónica, aniónica, y de coordinación-inserción dependiendo del catalizador. La elección del sistema iniciador, co-iniciador como agente de control de la cadena, la concentración de catalizador, la relación de monómero a iniciador, y temperatura de polimerización y el tiempo afectan significativamente a las propiedades del polímero. Estas propiedades, tales como el peso molecular, el grado de cristalinidad y contenido de monómero

residual, a su vez afectan a las propiedades físico-mecánicas y el rango de temperatura para el uso de la polilactida y sus copolímeros. El papel de la racemización y el grado de transesterificación en la polimerización y el proceso de copolimerización también son decisivos para la pureza y la microestructura de la cadena enantiomérica del polímero resultante ^[37].

II.2.6 Polimerización por apertura de anillo en masa.

La polimerización de PLA por apertura de anillo (ROP) en masa (mecanismo mostrado en la **figura 15**) se lleva a cabo por una reacción en calor en presencia de un iniciador conveniente pero en ausencia de solvente. Se usa un catalizador como cloruro de estaño dihidratado y/o 1-dodecanol como iniciador, este actúa como un agente de transferencia de cadena e incrementa el grado de reacción proporcionalmente a su concentración en el medio ^[38].

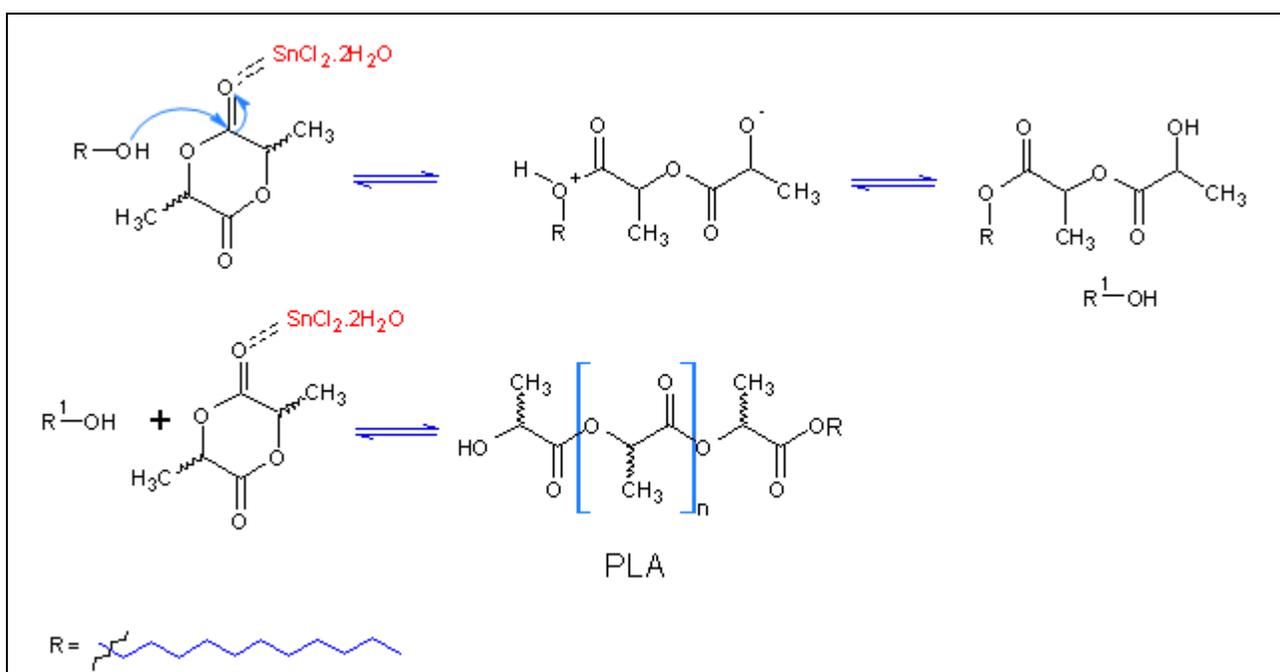


Figura 15. Mecanismo de polimerización por apertura de anillo para PLA.

Es importante mencionar que a pesar de ser una reacción de transesterificación, sigue las rutas de una polimerización por adición en cadena, cuyas etapas son iniciación, propagación y terminación. El primer paso de la reacción donde ocurre la apertura del primer anillo, es un proceso lento (iniciación), luego de que el iniciador ataca nucleofílicamente el carbono carbonílico, comienza la apertura de los demás anillos de lactida de manera consecutiva (propagación), siendo este un proceso rápido en la reacción. La terminación de la polimerización puede darse por transferencia protónica del iniciador alcohólico al polímero viviente con carga negativa.

De acuerdo al tipo de polimerización empleado y a la variación en las concentraciones del catalizador e iniciador, se pueden obtener polímeros con diferentes pesos moleculares, que influyen directamente en sus propiedades físicas y químicas.

II.3 Sistema de liberación controlada de fármacos con polímeros biodegradables

En el control temporal, los sistemas de suministro de fármacos tienen como objetivo administrar el fármaco a través de una duración prolongada o en un momento específico durante el tratamiento. La liberación controlada durante una duración prolongada es muy beneficiosa para los fármacos que se metabolizan rápidamente y se elimina del cuerpo después de la administración. Un ejemplo de este beneficio se muestra esquemáticamente en la **figura 16** en la que se compara la concentración de fármaco en el sitio de la actividad dentro del cuerpo después de la liberación inmediata de 4 inyecciones administradas a los 6 intervalos de una hora y después de liberación prolongada de un sistema de liberación controlada. Las concentraciones de fármaco pueden fluctuar ampliamente durante el período de 24 horas cuando el fármaco se administra a través de una inyección de bolo, y solo para una parte del período de tratamiento es la concentración de fármaco en la ventana terapéutica (es decir, la

concentración de fármaco que produce efectos beneficiosos sin efectos secundarios perjudiciales). Con el sistema de liberación controlada, la velocidad de liberación del fármaco coincide con la velocidad de eliminación del fármaco y, por lo tanto, la concentración del fármaco se encuentra dentro de la ventana terapéutica para la gran mayoría del período de 24 horas ^[39].

El beneficio de este tipo de control se muestra esquemáticamente en la **figura 17** en la que se comparan las concentraciones de fármaco en el sitio de la actividad y la producción de efecto secundario. Hay dos situaciones principales en las que el control de la distribución puede ser beneficioso. La primera es cuando la distribución natural hace que las moléculas de la droga se encuentren con los tejidos y causa efectos secundarios importantes que prohíben el tratamiento adicional ^[39].

La segunda situación es cuando la distribución natural de la droga no permite que las moléculas del fármaco puedan alcanzar su sitio de acción molecular. Por ejemplo, una molécula de fármaco que actúa sobre un receptor en el cerebro no estará activa si se distribuye por el sistema arterial del paciente, pero no puede cruzar la barrera sangre-cerebro ^[39].

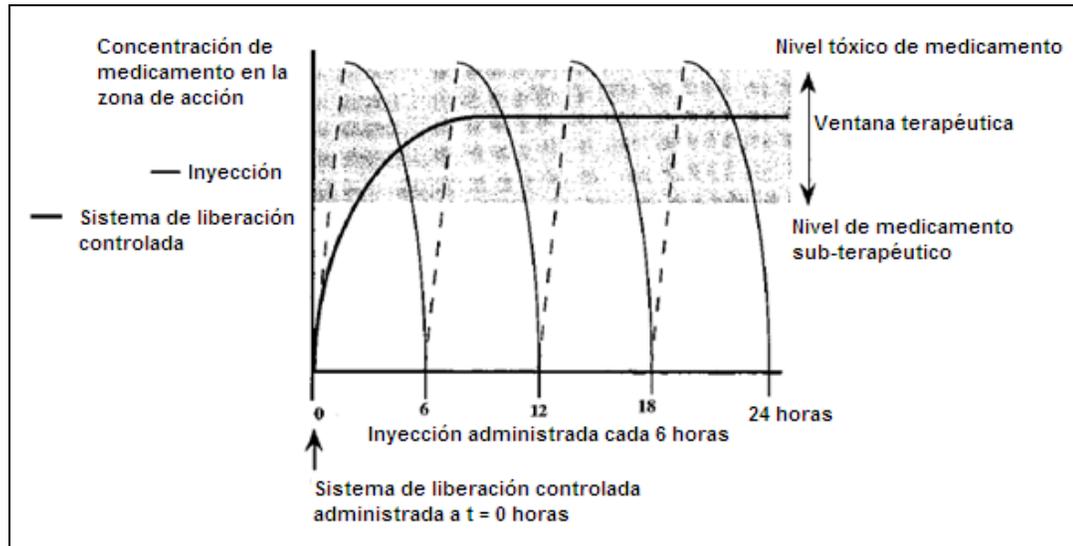


Figura 16. Concentraciones del medicamento en la zona de acción terapéutica después de la liberación con una inyección convencional (línea fina) y con un sistema de liberación controlada temporal (línea gruesa) ^[39].

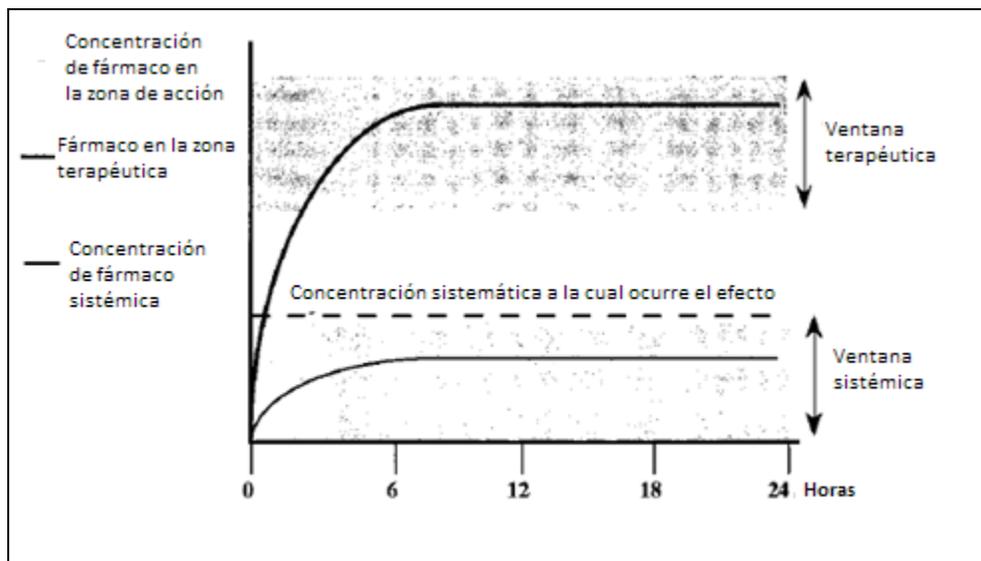


Figura 17. Suministro de medicamentos de un sistema ideal de liberación controlada de distribución. Línea en negra: Las concentraciones de fármaco en el sitio de la acción terapéutica. Línea delgada: niveles sistémicos en el cual se producen efectos secundarios ^[39].

II.3.1 Sistemas terapéuticos farmacéuticos y dispositivos biomédicos

Un sistema terapéutico farmacéutico (STF) consta fundamentalmente de un módulo de liberación, un programa terapéutico, un soporte o medio de transporte y uno o varios fármacos o principios activos (**figura 18**)^[40].

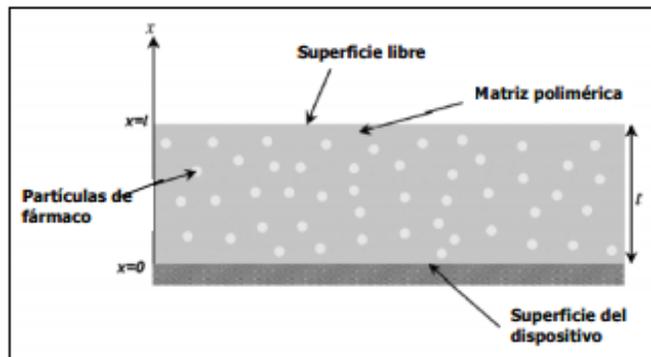


Figura 18. Sistema terapéutico farmacéutico^[40].

El módulo de liberación es la parte del sistema que garantiza la entrega del fármaco o sustancia activa de acuerdo con un programa terapéutico, establecido en el diseño. Allí puede encontrarse una cámara simple o múltiple que almacena el principio activo, el reservorio; la vía o puerta de salida, que puede ser la superficie entera del dispositivo, uno o varios orificios o una cánula; los elementos que generan el potencial químico o mecánico para la liberación, que pueden ser gradientes de concentración, desplazamiento de émbolos, imanes o campos^[40].

El programa terapéutico incluye aquellos elementos que definen velocidad y tiempo de liberación, tratando de seguir ritmos fisiológicos internos. De esta forma se puede programar el perfil fármaco-cinético según las necesidades terapéuticas, se disminuyen efectos secundarios y se reduce el incumplimiento por parte del paciente^[40].

El soporte o medio de transporte integra todos los elementos y entra en contacto con el biosistema; requiere adaptación completa al lugar anatómico de emplazamiento final y ha de ser inerte en relación al fármaco y al medio ^[40].

Los STF pueden ser clasificados como sistemas pasivos en los cuales se encuentra un elemento del tipo membrana semipermeable, o una cubierta cuya capacidad para liberar el fármaco queda plenamente establecida en el momento de la elaboración. También se encuentran los sistemas activos en los cuales la forma farmacéutica tiene un control que se activa por una señal externa, con el fin de modular la liberación del fármaco ^[40].

II.3.2 Tipos de sistemas de liberación de fármacos

Sistemas de liberación controlada por difusión: La difusión del fármaco es regulada por el biopolímero desde el sistema terapéutico hacia su exterior formando una membrana que rodea el fármaco, creando un reservorio. Esta forma de liberación se presenta en implantes, sistemas transdérmicos y dispositivos de administración oral, como sistemas matriciales (**figura 19**). Con este mecanismo se han conseguido tiempos de liberación prolongados, como en el caso de cápsulas a base de polidimetilsiloxano o copolímeros de etilen-acetato de vinilo (EVA), implantadas subdérmicamente en la parte superior del brazo para la liberación controlada de levonorgestrel, un anticonceptivo, por períodos de hasta siete años ^[40].

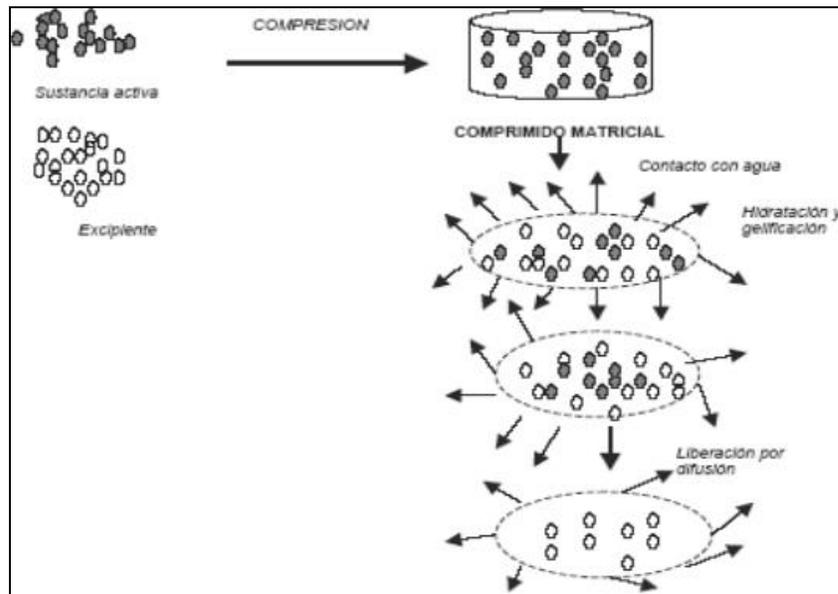


Figura 19. Esquema de un sistema por difusión [40].

Sistemas de liberación controlada por activación de solvente: En estos dispositivos la velocidad de liberación del fármaco es controlada por la velocidad de difusión del agua hacia su interior. El sistema polimérico puede hincharse, generando canales o poros para la salida del fármaco, o en otros casos impulsarlo por un sistema osmótico, como el caso de la bomba osmótica, que emplea membranas rígidas semipermeables a base de acetato de celulosa (**figura 20**). El sistema ha sido empleado en la administración de fármacos como ibuprofeno, pseudoefedrina y nifedipino, entre otros [40].

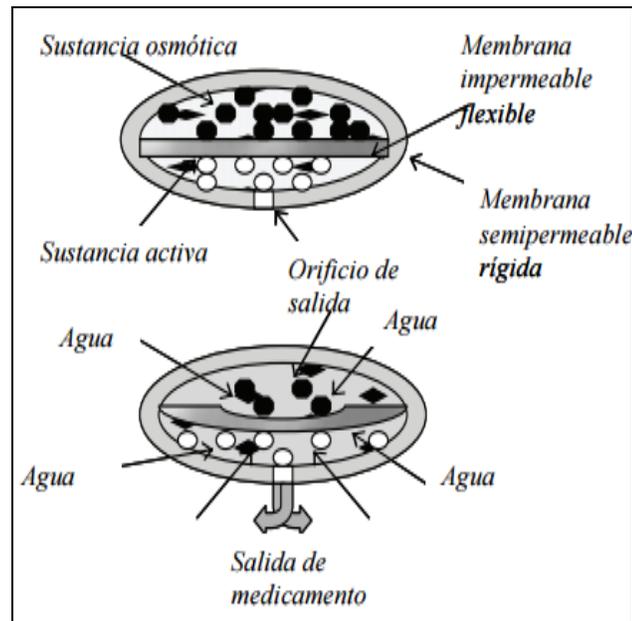


Figura 20. Esquema de una bomba osmótica^[40].

Sistemas de liberación controlada por reacción química o enzimática: La liberación del fármaco está determinada por una reacción química de tipo hidrolítico o enzimático, en este caso los polímeros biodegradables están constituidos principalmente por monómeros biocompatibles, que se eliminan del organismo por rutas fisiológicas convencionales sin generar alteraciones homeostáticas de este ^[40].

Sistemas de liberación controlada por el ambiente fisiológico: Algunos polímeros han recibido la denominación de “inteligentes” por responder súbitamente a modificaciones de las condiciones físicas o químicas en el ambiente con cambios pronunciados en sus propiedades. Los estímulos a los que responden los polímeros pueden ser: (i) físicos, como la temperatura, la fuerza iónica, los solventes, radiaciones, campos eléctricos, estrés mecánico, presión, radiaciones sónicas y campos

magnéticos; (ii) químicos, como el pH, iones específicos y agentes químicos; y (iii) bioquímicos, como sustratos de enzimas, ligandos afines y otros agentes biológicos ^[40].

Sistemas de liberación particulados: El tamaño de la partícula es determinante en la velocidad de disolución, mientras menor sea su tamaño, mayor será el área superficial disponible para la disolución. En el diseño de los novedosos sistemas de liberación modificada se cuenta con: (i) microcápsulas, similares a sistemas tipo reservorio, (ii) microesferas, similares a sistemas monolíticos, (iii) conjugados de biopolímeros-proteínas o biopolímeros-fármacos, para localizar y proteger los principios activos, (iv) micelas poliméricas, para transportar fármacos poco solubles y (v) liposomas. Las microcápsulas se han empleado para liberación de orden cero de fármacos por periodos de tiempo prolongados, sin embargo sus procesos de manufactura son costosos y existe posibilidad de ruptura de la membrana que contiene el fármaco. Las microesferas son preparadas por métodos como separación de fases, liofilización o técnicas de reducción de tamaño (molienda o micronizado) ^[40].

El empleo de las nanopartículas cobra importancia en los estudios de liberación de fármacos, por la capacidad que presentan para transportar una gran variedad de sustancias a distintas zonas del organismo, manteniendo un efecto sostenido en el tiempo; los biopolímeros más empleados han sido poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) ^[40].

II.4 Modelos matemáticos que describen la cinética de liberación de fármacos desde dispositivos de liberación controlada

El comportamiento de las formas farmacéuticas de liberación controlada se suele ensayar *in vitro* según normas preestablecidas, a fin de obtener resultados que permitan postular un modelo que los justifique; modelo que se cuantifica mediante una ecuación matemática que describe la cinética del modelo de liberación de la especie química retenida desde la fase sólida a la fase líquida en contacto con ella [38].

Hoy en día, son muchos los modelos matemáticos utilizados. La mayoría de ellos se pueden considerar empíricos, si bien hay algunos con base matemático-estadística, e incluso unos pocos, que utilizan de manera ortodoxa las Leyes de difusión y de la cinética formal [38].

Modelo de Higuchi

Este modelo ha tenido mayor aceptación, debido que se ajusta mejor al comportamiento de liberación de un dispositivo. En este modelo se estudia la liberación de drogas solubles y de baja solubilidad incorporada en matrices semi-sólidas o matrices sólidas. Estas expresiones matemáticas fueron obtenidas para estudiar el comportamiento de difusión en el medio de partículas de droga dispersadas en una matriz uniforme. La expresión del modelo de Higuchi viene expresada de la siguiente manera:

$$Q = K_H t^{1/2}$$

Donde Q es la cantidad de droga liberada y K_H es la constante de disolución de Higuchi. Higuchi describe la liberación de la droga como un proceso de difusión basada en la Ley de Fick que depende de la raíz cuadrada del tiempo [38].

Higuchi planteó el empleo de su ecuación a la liberación desde matrices homogéneas y granulares. Cuando se trata de matrices no porosas (homogénea) en las que el fármaco se encuentra uniformemente disperso, se asume que este se disuelve en el seno de la matriz y posteriormente difunde a través de esta hasta la superficie. Conforme el

fármaco se va liberando la distancia de difusión se hace mayor, de manera que la variación de concentración de fármaco liberado va progresando ^[41].

En cambio, si la matriz presenta poros, primero debe entrar el medio de disolución través de estos, por lo que resulta necesario introducir otro factor en la ecuación. Presuponiendo que la concentración de fármaco en la matriz es menor que su solubilidad y que la liberación del fármaco tiene lugar por una disolución lenta y posterior difusión a través de los poros formados en la matriz por el disolvente ^[41].

II.5 Microencapsulación

Este método consiste en formar microesferas del polímero biodegradable mediante una emulsificación. En este proceso se encapsula un medicamento dentro de la matriz de la microesfera y luego se evalúa la liberación del fármaco a través del tiempo. Existen varios métodos de microencapsulación, entre ellos están el *método de evaporación del solvente* en el cual el polímero se disuelve en un solvente adecuado que sea inmiscible en agua, y el medicamento es dispersado o disuelto en la solución polimérica. La solución resultante o dispersión es luego emulsificada en una fase acuosa continua para formar gotas discretas. El orden para formar las microesferas es, el solvente orgánico debe primero difundirse en la fase acuosa y luego ser evaporado en la interfase agua/aire. Mientras ocurre la evaporación se van formando las microesferas (**figura 21**) que pueden ser obtenidas después de un secado y filtrado adecuado. Esta formación se debe a que el polímero (más el medicamento) disuelto en el solvente orgánico cristaliza durante la evaporación y como está en forma de gotitas dentro de la fase continua adquiere la forma esférica que se requiere para la preparación de microesferas ^[42].

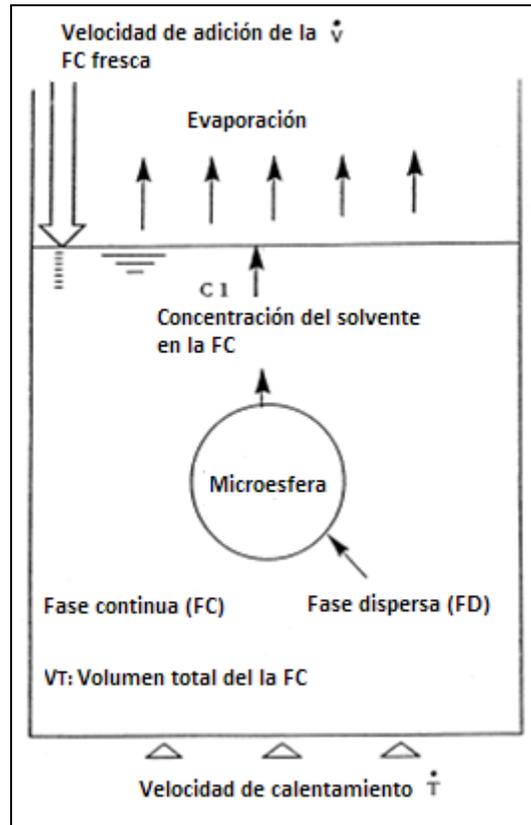


Figura 21. Diagrama esquemático de la formación de las microesferas ^[42]

Este método ha sido usado extensivamente para preparar microesferas de PLA y PLGA que contienen diferentes medicamentos. Algunas variables han sido identificadas las cuales influyen en las propiedades de las microesferas, tales como solubilidad del medicamento, morfología interna, tipo de solvente, velocidad de difusión, temperatura, composición del polímero y viscosidad, y carga del medicamento. La eficacia del método de evaporación del disolvente para producir microesferas depende del éxito en el atrapamiento del agente activo dentro de las partículas, y por lo tanto, este proceso es más exitoso con fármacos que son insolubles o poco solubles en el medio acuoso que comprende la fase continua. Existen muchos tipos de fármacos con diferentes propiedades físicas y químicas que se han empleado en los sistemas poliméricos,

incluidos fármacos contra el cáncer, agentes narcóticos, anestésicos locales, esteroides y agentes de control de la fertilidad ^[42].

Los recientes avances en la técnica de evaporación de disolvente han permitido un atrapamiento exitoso de fármacos altamente solubles en agua, compuestos reactivos, tales como medicamentos a base de aminos, proteínas, péptidos, y vacunas ^[42], es por ello que a continuación se habla del proceso de encapsulamiento de fármaco empleando un método de doble emulsión, debido a que esto mejora la eficiencia de la carga del medicamento, cuando éste es soluble en agua.

II.5.1 Preparación de microesferas por el método de evaporación de solvente

II.5.1.1 Encapsulación por emulsión múltiple (W/O/W) seguida por evaporación de solvente

En este proceso, un medicamento activo soluble en agua (W_1), se disuelve primero en una solución acuosa, el cual es luego emulsificado en un solvente orgánico (O) que contiene el polímero biodegradable para hacer la emulsión primaria W_1/O (siglas en inglés w, water y o, oil). Posteriormente, esta emulsión primaria es añadida a una solución acuosa (W_2) que contiene un emulsificante para formar una doble emulsión $W_1/O/W_2$. Después que el solvente orgánico es removido, las microesferas sólidas se dejan en una fase acuosa continua y pueden ser lavadas, centrifugadas y liofilizadas ^[43].

Sin embargo, en el proceso convencional, la doble emulsión es generalmente preparada por la agitación mecánica, la homogeneización o método de ultrasonidos, la distribución del tamaño de las microcápsulas obtenidas es muy amplia, lo que no es favorable a la absorción eficiente *in vivo* ^[43].

La estabilidad de la emulsión primaria es un requisito previo para el éxito de la encapsulación de las emulsiones múltiples. La influencia de la estabilidad de la emulsión sobre la morfología y porosidad de microcápsulas preparadas por la doble emulsión W/O/W por el método de evaporación usando 2 L-polilactidas semicristalinas de diferentes pesos moleculares fue estudiada por Schugens et al. ^[42].

A continuación en la **figura 22** se observa un diagrama esquemático de dos procesos de doble emulsión para preparar microcápsulas de polímeros cargadas con fármaco:

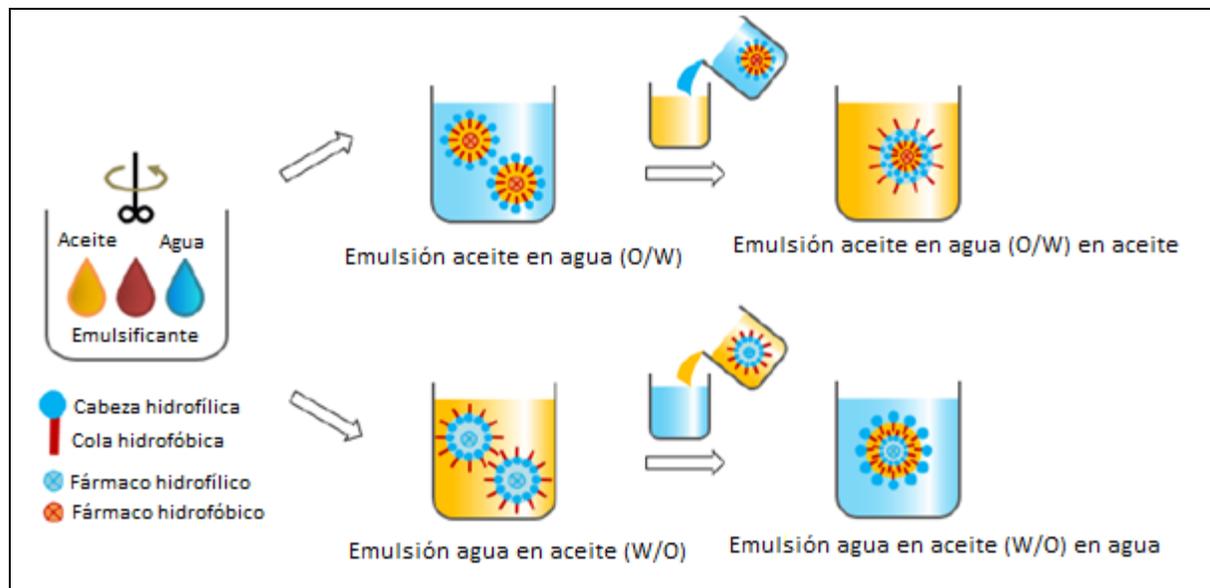


Figura 22. Diagrama esquemático de los métodos basados en una emulsión doble para la preparación de micropartículas de polímeros (imagen superior emulsión O/W/O, imagen inferior W/O/W ^[44]).

II.5.1.2 Eficiencia de encapsulación del fármaco:

En el proceso de formulaciones con polímeros biodegradables, es importante que la mayor parte del fármaco empleado para generar los dispositivos sea encapsulado, y más cuando el medicamento es soluble en agua. No obstante, a pesar del método empleado por doble emulsión, tener una alta eficiencia de encapsulamiento parece ser

un inconveniente a la hora de hacer formulaciones. Seguidamente se plantean algunos factores que influyen en este proceso:

Volumen de fase orgánica y solubilidad del polímero en la misma: Si inicialmente el polímero y el fármaco se encuentran solubilizados en la fase orgánica (o el fármaco se encuentra disperso en ella), conforme el volumen de ésta sea mayor, aumentará la eficiencia de encapsulamiento. Esto es debido a que, si el coeficiente de partición de la droga es constante, una mayor existencia de solvente orgánico tenderá a mantenerla solubilizada, y se limitará su difusión hacia la fase acuosa antes de ser cubierta por el polímero. Respecto a la solubilidad del polímero en la fase orgánica, se prefiere polímeros no demasiado solubles en ella, pues esto favorecerá su precipitación sobre el fármaco antes de que apreciables cantidades de éste puedan difundir a la fase acuosa. La solubilidad de los polímeros dependerá en gran medida del tipo de monómeros (o la relación entre varios tipos de monómeros) que le den forma y de si los grupos iniciales y/o finales de las cadenas tienen o no características hidrófilas (polímeros no cargados serán más solubles en solvente orgánico) ^[6].

pH de la fase acuosa y solubilidad de la fase orgánica en la primera emulsión: La eficiencia de encapsulación tiene considerable relación con el coeficiente de partición de la droga. Si la droga posee grupos susceptibles a cambios de pH, se debe ajustar el mismo para evitar desplazar el equilibrio hacia la especie iónica. Por ejemplo, la doxorubicina, que contiene grupos amino e hidroxilo, difundirá hacia la fase acuosa rápidamente si ésta supera o se encuentra por debajo de valores de $\text{pH}=7$ (por debajo de este valor, el grupo amino estará protonado, y por encima, se desprotonarán los grupos hidroxilo) ^[31]. En cuanto a la solubilidad de la fase orgánica en la fase acuosa, si bien siempre será limitada, mayores afinidades entre ambas fases implicarán más altas tasas de transferencias de masa entre ellas; conociendo que los polímeros solubilizados en la fase orgánica serán insolubles en la fase acuosa, esta transferencia

de masa inducirá una precipitación más veloz del polímero, y una mayor eficiencia de encapsulación ^[6].

Interacciones entre el fármaco y el recubrimiento polimérico: Si la sustancia encapsulada es capaz de establecer relaciones iónicas, mayores atracciones se darán entre ella y un polímero cuyos grupos iniciales y/o finales estén cargados eléctricamente. Por el contrario, si las interacciones son de tipo “hidrófobas”, grupos finales y/o iniciales no cargados mejorarán el encapsulamiento con el fármaco; este comportamiento es especialmente apreciable al encapsular péptidos. Es importante señalar que si las interacciones polímero-fármaco son muy intensas, la ulterior liberación de éste podría verse prolongada en más o menos medida ^[6].

Tasa de remoción de solvente: Por lo general, es aceptado que una rápida remoción de solvente conlleva a precipitaciones del polímero más veloces, aumentando la eficiencia de encapsulamiento. Sin embargo, se ha observado que para algunas sustancias (sobre todo aquellos compuestos que presenten cierta solubilidad en medio acuoso, como péptidos), cuando el solvente es retirado mediante aumentos de temperatura, también se ve incrementada la difusividad de dichas sustancias en el medio acuoso, de modo que el efecto de rápida precipitación de los polímeros es contrarrestado en casos como este ^[6].

Peso molecular del polímero: Conforme el polímero posea menores masas molares, la eficiencia del encapsulamiento se verá drásticamente aumentada. Al parecer, este efecto tiene que ver con decrecientes afinidades o “solubilidades” entre el polímero y la sustancia a encapsular cuanto mayor sea el peso molecular de éste, mayoritariamente por la interacción entre sus grupos funcionales (a mayores pesos moleculares, los grupos funcionales del polímero serán de más difícil acceso para las moléculas de sustancia a encapsular) ^[6].

Concentración de surfactante: Como los surfactantes tienden a disminuir la tensión interfacial entre dos fases insolubles, aumentos en la concentración del surfactante tenderá a aumentar la solubilidad del fármaco en la fase acuosa, disminuyendo la eficiencia de encapsulamiento ^[6].

Estabilidad de la primera emulsión W/O: Un incremento sustancial en el peso molecular de una poli (L-lactida) requiere una dilución de la solución polimérica para prevenir un excesivo aumento de la viscosidad, dejando así una emulsión primaria menos estable. La cristalinidad de las polilactidas afecta la eficiencia de encapsulación ^[42], esto conlleva a que no haya una buena dispersión de las gotas de la fase acuosa con fármaco sobre la fase orgánica, disminuyendo así la eficiencia de encapsulación. Una buena homogenización de la primera emulsión también garantiza una mejora en la eficiencia.

II.6 Biodegradación del polímero en la liberación de fármacos

La biodegradación de los poliésteres alifáticos se produce por la erosión en volumen. Las cadenas de polímeros se rompen por hidrólisis para formar los ácidos monoméricos y estos a su vez son eliminados del cuerpo a través del ciclo de Krebs, principalmente como dióxido de carbono y en la orina. Debido a que la velocidad de hidrólisis de la cadena del polímero sólo depende de cambios significativos en la temperatura y el pH o la presencia de un catalizador, se observa muy poca diferencia en la velocidad de degradación en diferentes sitios del cuerpo. Esto es obviamente una ventaja en lo que se refiere a formulaciones de administración de fármacos ^[1]. En la **figura 23** se observa la biodegradación de los polímeros de lactida y copolímeros de lactida-glicolida.

Figura 23. Biodegradación de polímeros de lactida/glicolida^[1].

Polímero	Tiempo aproximado de degradación (meses)
Poli (L-lactida)	18-24
Poli (DL-lactida)	12-16
Poli (glicolida)	2-4
50:50 (DL-lactida-co-glicolida)	2
85:15 (DL-lactida-co-glicolida)	5
90:10 (DL-lactida-co-caprolactona)	2

Los desarrolladores de formulaciones de liberación controlada han empleado polímeros producidos por L-lactida y D,L-lactida. En cuanto a la clínica de estudios, sin embargo, parece que tal vez las formulaciones D,L-lactida han sido un tanto más exitosas.

No está claro si esto es debido a que los materiales D,L-lactida son menos cristalinos y más permeables a la mayoría de las drogas o tal vez a técnicas más sofisticadas y enfoques seguidos con aquellos polímeros, o simplemente a la mayor disponibilidad de los polímeros DL-lactida.

En la mayoría de polímeros biodegradables, la hidrólisis es el mecanismo de degradación más importante, el tipo de enlace químico, el pH, la composición del polímero y el más importante: La higroscopicidad. Los cambios físicos y químicos que ocurren durante la degradación de los polímeros biodegradables, así como la cristalización de los oligómeros y los monómeros o los cambios de pH también pueden repercutir en la velocidad del proceso. El peso molecular es el parámetro más ampliamente aceptado para evaluar la degradación. La velocidad de degradación de los polímeros biodegradables depende de su hidrofiliidad y de la accesibilidad de sus enlaces hidrolíticamente inestables a los fluidos corporales. También dependerá del acceso que tengan las enzimas u otras moléculas capaces de romper estos enlaces

químicos. Por lo tanto, la higroscopicidad del material, su morfología, cristalinidad y peso molecular serán parámetros clave en la cinética de degradación del polímero en la pérdida de sus propiedades mecánicas y de peso ^[44].

En dispositivos de liberación controlada se ha evidenciado que en el proceso de degradación, la liberación del fármaco ocurre en varias etapas o fases; la más común es en tres fases las cuales son:

Primera fase: Se conoce como fase “burst” o de rápida liberación. En este punto, moléculas de fármaco adsorbidas directamente sobre la superficie externa y/o interna de las cápsulas son expulsadas en abundancia y en un corto lapso temporal, dependiendo la extensión de tal liberación de la solubilidad del fármaco en el medio acuoso externo y de la capacidad de penetración inicial de este medio a través de la matriz polimérica. En esta etapa, comienzan a hidrolizarse algunos enlaces tipo éster, el polímero va sufriendo reducciones en su temperatura de transición vítrea y descensos en el peso molecular se van registrando, mas no son observables caídas en la masa del dispositivo ni liberación de oligómeros y/o monómeros ^[6].

Segunda fase: Se produce una liberación lenta desde la matriz polimérica hacia el exterior, fundamentalmente producto de procesos difusivos a través de las porosidades que el flujo de medio externo va creando en la cápsula. En esta etapa, rupturas hidrolíticas se siguen produciendo y la erosión comienza a ser partícipe de la cinética de liberación al empezar a aparecer pérdidas de masa de la matriz polimérica ^[6].

Tercera fase: Una ruptura masiva de los enlaces tipo éster toman lugar, con pérdidas constantes de masa, liberación de especies oligoméricas y/o monoméricas y distorsión general de la integridad morfológica de las cápsulas. La liberación en esta fase se ha descrito como rápida (comparable con el efecto “burst” de la primera fase). Una vez

concluida la tercera fase, se esperaría que la completa liberación de la sustancia encapsulada hubiera tenido lugar ^[6].

II.7 Ensayos biológicos *in vitro* de liberación de fármacos con biomateriales

Cuando un biomaterial es implantado en el organismo, rápidamente es cubierto por proteínas. Éste es un proceso dinámico, que implica procesos de adsorción-desorción. Mediante ensayos *in vitro*, es posible analizar por separado los diferentes pasos cronológicos del comportamiento celular frente a un biomaterial. También es posible evaluar la biocompatibilidad por la toxicidad *in vitro*, que se define como un parámetro negativo o el deterioro de un agente en las funciones bioquímicas celulares normales, estos efectos negativos pueden manifestarse de diferentes modos, originando una variedad de posibilidades en la evaluación de la citotoxicidad. Dicha evaluación se realiza después de un apropiado tiempo de exposición, normalmente de 24 a 72 horas, mediante observación morfológica cualitativa, medidas cuantitativas de muerte celular, inhibición del crecimiento celular, proliferación celular, acumulación de proteínas, o liberación de una o más enzimas u otras entidades medibles ^[45].

III. ANTECEDENTES

Internacionales

No es una idea novedosa usar partículas en el campo biomédico. Ya en la década de 1980, las partículas se han usado para la formulación farmacéutica. La compañía francesa Ipsen desarrolló el primer sistema comercializado de partículas cargadas con acetato de triptorelina para la liberación del fármaco a largo plazo, cuyo nombre comercial es Decapetyl. La triptorelina de etilo es un péptido soluble en agua e inestable in vivo, que tiende a ser eliminado del cuerpo rápidamente. Después de ser encapsulado en un polímero biodegradable de poli (lactida-co-glicolida) (PLGA), el fármaco se libera constantemente durante un mes, y borra en gran medida el dolor de los pacientes. En la actualidad, Ipsen ha desarrollado varias formulaciones comercializadas de Decapetyl incluyendo formulaciones para todo el día, un mes, tres meses y seis meses.

Desde el éxito de Decapetyl, se reportaron otros sistemas de liberación de fármacos de eficaces basados en partículas y con licencia para la aplicación clínica, incluyendo la leuprorelina, calcitonina, octreotida y busserelinac. Por otra parte, además del sistema de liberación sostenida, con el desarrollo de materiales y productos farmacéuticos, las partículas se han investigado y aplicado con mayor intensidad, tal como administración local de fármacos, como objetivo de administración de fármaco y el adyuvante de la vacuna. Para todos estos sistemas, la elección de composiciones de partículas, los métodos de preparación y la estructura son importantes. Muchas literaturas estudiaron y examinaron el efecto de estos factores ^[46].

Polard et al. (Francia, 1995) hicieron una evaluación *in vitro* e *in vivo* de microesferas de polilactida y polilactida-co-glicolida cargadas con morfina para la liberación específica local de este fármaco. Estas microesferas fueron preparadas por el método de emulsión simple seguido por evaporación del solvente. Prepararon varios lotes de microesferas con una cantidad similar (500 mg) de polímeros PLA o PLGA y con diferentes relaciones $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH}$ (por lo tanto, diferentes cantidades de base de morfina). MLMs (microesferas cargadas con morfina, siglas en inglés) preparados con PLA mol. Peso. 2000 (PLA1) y una cantidad de base de morfina inicial de 200 mg disueltos en la fase orgánica ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH}$, relación de 5: 5) para la administración *in vivo*.

Las microesferas fueron observadas por un microscopio óptico con luz transmitida. Las características de la morfología y superficie fueron determinadas por microscopía electrónica de escaneo (SEM). El contenido de medicamento fue determinado por HPLC. El ensayo *in vitro* de la liberación de morfina se llevó a cabo a 37° C en condiciones de inmersión en una solución acuosa de NaCl 0,2%, ajustada a pH 2,0 con HCl. La concentración de morfina se midió de forma continua a 213 nm y se registró cada 5 minutos durante un período de 24 h utilizando un espectrofotómetro.

El tamaño de las microesferas osciló entre 1-30 μm . La técnica de SEM mostró partículas de forma esférica con una superficie lisa y un recubrimiento de una matriz porosa para microesferas preparadas con la morfina como una solución (MSOLM), las que fueron preparadas con la morfina como una suspensión (MSULM) tenían un aspecto particular: Eran menos regulares y los cristales de morfina fueron incorporados en el polímero. Los datos de contenido de fármaco mostraron que el atrapamiento de la morfina fue diferente dentro de las microesferas de polilactida y polilactida-co-glicolida de acuerdo con el peso molecular del polímero y de acuerdo con el estado físico de morfina en la fase orgánica. Se obtuvo la más alta carga de fármaco para MSULM

(11,1%). Para los lotes preparados con una mezcla orgánica $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH}$ (MSOLM), se obtuvo la encapsulación de más éxito de la morfina con PLA (PM 2000 (PLA1) y variada de acuerdo a la cantidad inicial de morfina (6.9 a 9.5%). Sin embargo, la morfina no estaba atrapada dentro de microesferas hechas con PLA con un PM de 9000 (PLA2) y los valores de contenido de fármaco de las microesferas de PLGA fueron inferiores a los de PLA1 (1.2 a 1.7% de PLGA 9000 y 1.2 a 1.4% de PLGA 12000). En la cinética de liberación *in vitro* de las microesferas de PLA y PLGA mostraron diferencias significativas en función del tipo de polímero y del estado de la base de morfina en las microesferas. Con MSULM, la liberación de morfina alcanzó aproximadamente 80% de la liberación acumulada de 24 h en unos pocos minutos. La liberación del fármaco acumulado de los diferentes lotes de microesferas PLA 1 parecía estar influenciada por la carga inicial de la droga (es decir, cantidad de base de morfina en la mezcla orgánica). De hecho, el porcentaje de liberación obtenido con la formulación hecha con la más alta carga de fármaco era mucho más alto (38,5% liberado a las 24 h) que los medidos para las otras tres formulaciones cuya liberación por ciento a 24 h osciló desde 23,3 hasta 26,1%. Determinaron que una liberación controlada de morfina evitó altos niveles plasmáticos, además que hubo una liberación prolongada de morfina^[47].

Panyam et al. (USA, 2003) estudiaron cómo afecta el tamaño de las nano y micropartículas del copolímero poli (D, L-lactida-co-glicolida) (50:50 PLGA) en la degradación del mismo y la liberación de proteínas encapsuladas. Determinaron que el tamaño de la partícula influye en la degradación del polímero así como la liberación de la proteína encapsulada. La proteína modelo fue suero bovino de albúmina, la cual se encapsuló usando la técnica de evaporación de solvente en una emulsión múltiple W/O/W. Estas partículas se incubaron a 37 °C en una solución tampón de fosfato (pH 7,4; 154 mM) y se caracterizaron a varios tiempos en los cambios del peso molecular del polímero, en el contenido asociado a la superficie de alcohol de polivinilo (PVA), y

en la topología de la superficie de la partícula mediante microscopía electrónica de barrido. En los sobrenadantes de dicho estudio se analizó la proteína liberada y el contenido de PVA.

Demostraron que las nanopartículas de 0,1 μm tienen una captación intracelular aproximadamente 10 veces superior en un modelo de cultivo celular *in vitro* en comparación con las micropartículas de tamaño 10 μm . La degradación fue rápida en nanopartículas y micropartículas de PLGA, esta degradación rápida inicial ocurrió durante los primeros 20-30 días, seguido de una fase de degradación mucho más lenta. Las nanopartículas de 0,1 μm demostraron una degradación del polímero relativamente más rápido durante la fase inicial a diferencia de las micropartículas de mayor tamaño. Todas las partículas mantuvieron su integridad estructural durante la fase de degradación rápida pero fueron seguidos por la formación de poros, la deformación y la fusión de las partículas durante la fase de lenta degradación. Todas las partículas de diferentes tamaños demostraron la agregación de la proteína liberada, con micropartículas de 0,1 y 1 μm demostrando mayor fracción de proteína no agregada liberada en micropartículas de 10 μm . También intuyeron que el PVA asociado a la superficie en lugar del tamaño de partícula juega un papel dominante en el control de la degradación de nano y micropartículas ^[48].

Porjazoska et al. (Macedonia, 2004) estudiaron la preparación y caracterización de micropartículas de poli (DL-lactida-co-glicolida) y poli (L-lactida-co-glicolida) como sistemas de liberación controlada de proteínas. Estos polímeros fueron sintetizados por polimerización por apertura de anillo (ROP) usando diferentes masas molares en una relación lactida / glicolida constante para preparar micropartículas, cargadas con suero de albúmina bovino (BSA), por el método de doble emulsión W/O/W. Además, estudiaron la influencia de la masa molar y la composición de copolímero en el perfil de la morfología de micropartículas, tamaño, rendimiento, velocidad de degradación por por

ensayos *in vitro* en una solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7.4, 37 °C), la eficiencia de carga de BSA y la liberación de la misma también por ensayos *in vitro* en una solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH = 7.4, 37 °C) simulando las condiciones *in vivo*. Para micropartículas preparadas a partir de copolímeros de PDLLGA y PLLGA, se encontró que las que no contenían BSA eran esféricas y no porosas, mientras que las que estaban cargadas con BSA eran porosas, sin embargo la diferencia en el tamaño de ambas situaciones no fue significativa. El rendimiento de micropartículas fue similar para todas las series de micropartículas de PLGA y casi el 50% de la masa total inicial. Sin embargo, con respecto a la captura del fármaco, se observó una mayor eficiencia de carga en la serie con mayor peso molecular y un mayor contenido de fármaco.

La degradación de los polímeros con bajo peso molecular fue más rápida que los de alto peso molecular, también aquellos con alto contenido de glicolida se degradaron con mayor rapidez. Los perfiles de liberación de BSA, con diferentes procesos de degradación para micropartículas de PLLGA y PDLLGA, se correlacionaron con la morfología de las micropartículas, el tamaño y porosidad, así como con las propiedades hidrófobas / hidrófilas y masas molares de los copolímeros y sus velocidades de degradación (pérdida de masa y de reducción de la masa molar) ^[49].

Anugraha et al. (India, 2015) estudiaron la liberación controlada de la vacuna filaria en ratas usando microcápsulas de poli (L-lactida) como sustituto del adyuvante de alumbre en este tipo de vacunas antigénicas por el problema que se presenta en usar varias dosis de estas vacunas, por no ser tan eficiente el uso del alumbre. Para ello usaron el método de microencapsulación de doble emulsión $W_1/O/W_2$ seguido por evaporación del solvente, el cual consistió en disolver las proteínas recombinantes TV (Tiorredoxina y Venom) y FEP (proteínas epítipo filarial) en una solución acuosa (W_1) de PVA al 10%

(p/v).El tamaño y la morfología superficial de las partículas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Para estimar el contenido de proteína en las micropartículas (eficiencia de encapsulación), se pesaron con precisión las microcápsulas y se disolvieron en acetonitrilo para solubilizar el polímero. La suspensión se centrifugó durante 10 minutos y el sedimento resultante se secó a 37 ° C. Después de la adición y la incubación (1 hora a 37°C) de 100 µL de tampón de PBS al sedimento, la mezcla de reacción se centrifugó durante 10 min y se recogió el sobrenadante. El contenido de proteína del sobrenadante se estimó por el ensayo con BCA (ácido bicinconínico; **Smith et al., 1985**) que es un ensayo más sensible para esta estimación. 10 µL de muestra de proteína se añadieron a 190 µL de reactivo de BCA (**Pierce, Rockford, EE.UU.**) y se incubó a 37 °C, en una habitación oscura durante 30 min, y la absorbancia se midió a 540-590 nm. La eficiencia de encapsulación se calculó como el porcentaje en peso de antígeno por unidad de peso de polímero (g /antígeno mg de partículas de PLA).

El estudio de la liberación de proteínas a partir de micropartículas fue determinada por incubación de las partículas pesadas con precisión (aproximadamente 10mg) un tampón de PBS a 37 °C en agitación continua. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se retiró para su análisis. A intervalos semanales se añadió tampón de PBS fresco al sedimento bajo agitación para seguir obteniendo un sobrenadante. Este proceso se repitió varias veces durante 3 meses. La liberación de proteínas de las muestras fue estimada por el método de BCA.

Los resultados mostraron por MEB que las microcápsulas de PLA con el antígeno filarial encapsulado tenían forma esférica y eran de superficies lisas. El tamaño de las partículas de PLA con el antígeno atrapado era de $1,67 \pm 0,06 \mu\text{m}$ y $7,78 \pm 0,13 \mu\text{m}$. El

porcentaje de eficiencia de encapsulación de antígenos de TV y FEP fueron 81,36% y 78%, respectivamente. Los estudios de la liberación *in vitro* demostraron que había una liberación lenta de las proteínas TV y FEP a partir de las micropartículas encapsuladas en los días iniciales tras el contacto con soluciones acuosas tales como PBS. Se encontró que entre el 30% y el 60% del antígeno encapsulado fue liberado en el día número 56 seguido de ninguna liberación detectable *in vitro* para los siguientes 30 días. Esto sugirió que había proteínas encapsuladas asociadas a la superficie de las partículas que se liberaron rápidamente al entrar en contacto con el PBS pero las micropartículas en sí eran estables en PBS y se conservó el antígeno atrapado durante al menos un mes.

Los resultados mostraron que las formulaciones de PLA se encuentran para ser más inmunogénico y adecuado para los antígenos de filarias para generar la respuesta inmune de larga duración en la inmunización de un solo punto. Las respuestas proliferativas celulares inducidos por las proteínas PLA encapsuladas fueron mucho más altas que la de alumbre adsorbido en TV/FEP y la dosis única de TV/FEP probablemente debido a la larga inmunidad duradera que desencadena la formación de células de memoria T^[50].

Dalmolin, Khalil y Mainardes (Brasil, 2016) estudiaron la liberación de vainillina contenida en nanocápsulas de poli (ácido láctico) tomando en cuenta el desarrollo, caracterización y evaluación *in vitro* de su actividad antioxidante. Estas nanocápsulas, con vainillina en su contenido, fueron preparadas usando el método de emulsión simple aceite/agua (O/W) seguido por evaporación del solvente. Prepararon nanocápsulas blanco sin vainillina bajo el mismo método. Posteriormente determinaron el porcentaje de eficiencia de encapsulación de la vainillina en las nanocápsulas de PLA aplicando una relación de la cantidad inicial de vainillina añadida menos la cantidad de vainillina no

encapsulada (la cual se cuantificó en el sobrenadante después de una centrifugación) entre la cantidad de vainillina inicial por 100%.

Las mediciones del tamaño de las partículas, la distribución del tamaño y el índice de polidispersidad fueron determinadas por dispersión de luz dinámica (DLS). La morfología fue estudiada por microscopía electrónica de barrido (MEB).

La estabilidad de las nanocápsulas de PLA que contenían vainillina fue analizada por la observación de posibles cambios en el tamaño medio de partícula medio, índice de polidispersidad y el contenido del fármaco durante el almacenamiento.

El perfil de liberación *in vitro* de la vainillina a partir de nanopartículas de PLA se determinó por disolución seguido por ultracentrifugación. Una cantidad de nanopartículas en suspensión que contenían 1 mg de vainillina se dispersó en un tampón de fosfato de sodio (PBS, 0,01 M, pH 7,4) que contenía PVA 1% (w / v). El ensayo de actividad antioxidante *in vitro* se realizó con la vainillina libre, las nanocápsulas de PLA cargadas con vainillina y las nanocápsulas blanco evaluando mediante la medida colorimétrica del radical catión 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS • +). Determinaron el porcentaje de inhibición del ABTS con una relación de la diferencia entre la absorbancia de control y la absorbancia de la muestra entre la absorbancia de control por 100%. La concentración de vainillina que resultó en una inhibición del 50% de ABTS (IC50) fue calculada mediante la regresión lineal de la concentración de la vainillina frente al porcentaje de las curvas de inhibición de ABTS.

Los resultados mostraron nanocápsulas de PLA que tenían una estructura amorfa característica, tamaños en el rango de 240 nm con alta homogeneidad en la distribución de tamaño. La eficiencia de encapsulación de vainillina fue de 41%. El estudio de la liberación *in vitro* mostró una liberación lenta y sostenida de vainillina gobernado por difusión. Las nanocápsulas fueron estables durante un período de tres meses.

La capacidad antioxidante de las nanocápsulas de PLA cargadas con vainillina en el escaneodel radical ABTS fue inferior para liberar la vainillina y debido a su liberación prolongada mostró un perfil que era en ambos casos dependiente del tiempo y la concentración, mientras que la vainillina libre mostró una actividad dependiente de la concentración. El IC50 obtenido con vainillina libre fue constante en el tiempo. El IC50 de las nanocápsulas cargadas con vainillina fue disminuyendo con el tiempo, debido a la liberación secuencial de fármaco a partir de nanocápsulas. Sin embargo, la vainillina libre mostró IC50 menor que la vainillina en nanocápsulas, lo que indica la actividad *in vitro* superior en antioxidantes. Este resultado puede ser debido a la liberación prolongada de vainillina en PLA.

El estudio concluyó en que las nanocápsulas de PLA podrían ser un enfoque útil para mejorar las propiedades biofarmacéuticas, farmacocinéticas y farmacodinámicas de la vainillina, y permitir su uso en productos farmacéuticos, alimenticios o de salud ^[51].

Nacionales

Román y China (Caracas, 2005) estudiaron la velocidad de liberación controlada del colorante rodamina 640 (soluble en agua y con propiedades fluorescentes), *in vitro*, encapsulado en los polímeros biodegradables de D,L- lactida, L-lactida-co-glicolida, y D,

L-lactida-co-glicolida. Además de eso caracterizaron la morfología de estos sistemas poliméricos biodegradables usando las técnicas de UV y fluorescencia láser confocal. La polimerización se llevó a cabo por el método de ROP. Para la microencapsulación emplearon el método de doble emulsión $W_1/O/W_2$ y evaporación de solvente, cuyo método es bueno para encapsular compuestos solubles en agua. También optimizaron el tamaño de estas microcápsulas para obtener una distribución estrecha, cambiando las variables para la microencapsulación. Se estudió la morfología por MEB. Con la MC hicieron un seguimiento de los cambios morfológicos ocurridos en las microcápsulas incubadas en un buffer de fosfato a pH 7 para simular el comportamiento que tendrían las microcápsulas en el medio fisiológico. El proceso de liberación de la sustancia fluorescente fue seguido por Espectroscopia UV y fluorescencia, para ello se incubaron las microcápsulas en un buffer de fosfato pH 7 y se realizó el estudio a diferentes temperaturas, con el fin de obtener la constante de velocidad de liberación a la temperatura corporal. En los resultados de la polimerización encontraron un mayor rendimiento en los polímeros con mayor cantidad de monómero de lactida para los copolímeros (90/10). El rendimiento de la microencapsulación para el copolímero Glicolida-D,L-lactida (37/63) fue 23,2%, (8/92) fue 13,4%. Debido a estos resultados, cambiaron las condiciones de microencapsulación, manteniendo la rapidez de agitación constante durante todo el proceso a 750 rev/min, eliminaron el baño frío de la solución acuosa de PVA, esto llevó a que los rendimientos se incrementaran, 8/92 69,7%, 37/63, 56,5%. Luego aumentaron las concentraciones de los materiales a usar (PVA, polímero y agar+rodamina), y los resultados fueron los siguientes 17/83 79,5%, 17/83, 67,8%. Debido a esta optimización en el proceso de microencapsulación pudieron encapsular con los demás polímeros. Para el homopolímero D,L lactida el rendimiento fue 69,1%. En cuanto al tamaño de las microcápsulas tomaron en cuenta la rapidez de agitación a 250 rev/min y 750 rev/min, dando como resultado a 250 rev/min microcápsulas de gran tamaño entre 9-15 μm que representó un 40% del total de microcápsulas, mientras que a 750 rev/min un 70% representó el tamaño de las microcápsulas entre 0-5 μm , por lo tanto a mayor fuerza de agitación la segunda emulsión se rompió en pequeñas gotas.

En la morfología de las microcápsulas observaron que estas eran de superficie lisa y apariencia suave sin importar los cambios en la metodología de la microencapsulación. En el ensayo de degradación por MC la degradación total del polímero fue en 12 días. Las microcápsulas mantuvieron su integridad durante el primer día, ya en el día 2 y 3, comenzaron a coalescer, al cuarto día se perdió completamente la geometría de las microcápsulas, durante los siguientes días las microcápsulas formaron una masa amorfa y pegajosa, hasta que continuó la fusión de estos dispositivos a medida que el polímero se fue degradando hasta convertirse solo en CO₂ y agua. El estudio de la velocidad de liberación *in vitro*, mostró que en la primera semana no se liberó rodamina, por lo tanto el estudio se llevó a temperaturas más altas (60 C, 70°C y 80°C) para poder determinar la constante de liberación a la temperatura corporal. Encontraron que al observar la cinética durante días u horas la intensidad de la señal de fluorescencia y absorbancia disminuía faltando aun microcápsulas por liberar. La eficiencia de encapsulación del principio activo fue de 26,2%. Las microcápsulas preparadas con el copolímero L-lacida/glicolida (68/32) presentaron mayor constante de velocidad de liberación de rodamina a las temperaturas de estudio. La velocidad de liberación de las microcápsulas preparadas a diferentes composiciones poliméricas ocurre la degradación del polímero ^[38].

Serrano et al. (Caracas, 2005) estudiaron la resistencia de glibenclamida sobre la *Leishmania sp in vitro e in vivo*, haciendo estudios genéticos y moleculares de nuevos blancos. En estudios anteriores realizados por ellos mismos, han observado la susceptibilidad diferencial de glibenclamida de distintas especies de *Leishmania*, como por ejemplo *L. (L.) mexicana* y *L. (V.) braziliensis*. En el caso particular de *L. (L.) major*, la droga afectó la entrada y establecimiento de la infección en el macrófago por parte de promastigotes al igual que la sobrevivencia del amastigote una vez establecida la infección; la droga no mostró ningún efecto sobre la viabilidad y funcionamiento del macrófago. Determinaron en este estudio que la glibenclamida afecta la viabilidad de

Leishmania sp., siendo el estado amastigote más susceptible que el promastigote. El efecto de la droga es dosis dependiente tanto *in vivo* como *in vitro*. En términos terapéuticos, la glibenclamida resultó ser más eficaz que el glucantime en ratones BALb/C infectados con *L. (L.) mexicana* [52].

Morgado y Chinea (Caracas, 2006) estudiaron la inhibición de la enzima monoamino oxidasa (MAO-B) en la enfermedad de Parkinson, usando polímeros biodegradables de PLA y PLGA como agentes de liberación del medicamento L-deprenilo, formando microcápsulas de estos polímeros cargados del fármaco en cuestión, por el método de microencapsulación de doble emulsión $W_1/O/W_2$ seguido por evaporación del solvente. La síntesis de estos biopolímeros se llevó a cabo por el método de ROP. El porcentaje de rendimiento de producción del homopolímero fue de 80% y del copolímero 62%. La eficiencia de encapsulación fue para el homopolímero 12,4% y el copolímero 17,8%. Determinaron por microscopía láser de barrido que la morfología de las microcápsulas era esférica regular con superficie lisa y el tamaño promedio de estas (determinado por microscopía láser confocal), para ambos polímeros, fue de 7,4 μm y el de mayor frecuencia fue de 5 a 6 μm . En el ensayo *in vitro* de la actividad enzimática con MAO, encontraron que la concentración liberada del medicamento fue cercano a su IC50 (50% de su capacidad inhibitoria de la actividad enzimática), siendo exitoso con poca aplicación de microcápsulas durante 30 minutos, a pH cercano al fisiológico y a temperatura ambiente [53].

Pesquera, Chinea y Serrano (Caracas, 2017) estudiaron el perfil de liberación controlada de ciclopirox olamina contenido en microcápsulas de poli lactida-co-glicolida sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, como sistema terapéutico para emplearlo como tratamiento en la leishmaniasis. Estos polímeros biodegradables fueron sintetizados por el método ROP a diferentes composiciones másicas de glicolida y D,L lactida. El método de encapsulación de fármaco empleado

fue el de doble emulsión seguido por evaporación de solvente. Las microcápsulas fueron caracterizadas por MEB. Los ensayos *in vitro* para determinar el perfil de liberación del fármaco fueron llevados a cabo en buffer PBS a 29°C y medio de cultivo lit (medio que proporciona las condiciones necesaria para el hábitat de los parásitos) también a 29°C. Posteriormente procedieron a realizar una curva de crecimiento de los parásitos frente a las microcápsulas con fármaco, medicamento puro (presión positiva), microcápsulas vacías (las cuales fueron preparadas por una emulsión simple por evaporación de solvente), y los parásitos sin presión positiva (sin nada que contuviera CX. Por último, evaluaron la citotoxicidad del medicamento sobre macrófagos BMDM y el EC₅₀.

Como resultados, obtuvieron los polímeros por esta síntesis en composiciones de 99:1, 98:2 y 95:5, demostrando experimentalmente los resultados con los espectros RMN-¹H (porcentaje de glicolida y lactida). Las micrografías de MEB mostraron cápsulas con fármaco con superficie lisa y con una estructura interna tipo panal o reservorio, estando el tamaño entre 20-45 µm en su mayoría. La eficiencia de encapsulación estuvo entre 4-5 % para las composiciones 1 y 3, respectivamente. Los perfiles de liberación en PBS mostraron una expulsión rápida del medicamento para ambas composiciones de microcápsulas poliméricas en los primeros 3 días de ensayo (efecto burst), seguidamente de una liberación prolongada (pero no tan lenta), siendo así una liberación bifásica. Sin embargo, para la composición 1 se liberó un 62% del fármaco en los primeros 3 días y para la tercera composición se liberó casi el 90%, por lo cual encontraron que este último dispositivo no funcionaba como sistema de liberación controlada, por lo cual la primera composición fue la empleada en los posteriores ensayos. La liberación en medio lit fue más rápida que en PBS para ambas composiciones, pero demostraron que era debido a desgastes de las microcápsulas lo cual produjo una expulsión hacia la superficie del constructo, y no por acción de las sustancia que conformaban el medio en sí. En cuanto a la curva de crecimiento, encontraron un efecto parasiticida del medicamento dispensado de las microcápsulas,

además de un efecto leishmanicida (mínimo pero detectable) de las microcápsulas vacías sobre los parásitos. Los ensayos de citotoxicidad mostraron que el CX es letal para los macrófagos a concentraciones de 100 μM o superiores. El EC_{50} obtenido fue de 29,73 μM ^[6].

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Sintetizar un polímero biodegradable a base de L-lactida y D, L-lactida, que sirva de base para la elaboración de un dispositivo de liberación controlada del fármaco ciclopirox, para con ello determinar su efecto biológico sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis*.

IV.2. Objetivos específicos

- Sintetizar los polímeros biodegradables de DLPLA y LPLA por el método ROP usando D,L-lactida y L-lactida como monómeros de partida, respectivamente.
- Caracterizar los polímeros por resonancia magnética nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN), por análisis térmico (DSC) y por determinación del peso molecular promedio viscoso.
- Emplear el método de doble emulsión W/O/W seguido por evaporación de solvente para generar las microcápsulas de polímero cargados con CX
- Determinar el rendimiento de producción y eficiencia de encapsulación del CX en las microcápsulas.
- Caracterizar por Microscopía Electrónica de Barrido la morfología superficial y estructura interna de las microcápsulas

- Estudiar la degradación del polímero sin contenido de CX en condiciones fisiológicas
- Determinar el perfil de liberación del fármaco CX incluido en microcápsulas, en solución buffer de fosfato y medio de cultivo de parásitos
- Determinar el efecto del fármaco CX incluido en microcápsulas, sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis*

V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Materiales, reactivos y equipos usados.

Equipos

- Baño termostático (marca HER ZOG, modelo THERMOSTAT T 7V, Inc., Germany)
- Ultrasonido (5210 BRANSON, modelo 52100RDTH, Inc. EUA)
- Espectrofotómetro de UV-Visible (marca HEWLETT PACKARD, modelo 8453)
- Espectrofotómetro de lector de placas, ELISA (marca Tecan Trading AG, modelo INFINITE M200, Suiza)
- Incubadora microbiológica con agitación (modelo 311DS. Labnet International, Inc., EUA).
- Incubadora microbiológica con flujo de CO₂ (modelo AutoFlow 8500. NuAire, Inc., EUA).
- Microscopio Electrónico de Barrido (marca Quanta, modelo 250 FEG. FEI Company, EUA)
- Agitador (VORTEX MIXER, modelo LE-335, Alemania L&M)
- Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (marca Bruker, 300 MHz)
- Calorímetro Diferencial de Barrido (marca Perkin Elmer, modelo DSC 7)
- Microscopio óptico (marca ERNST LEITZ WETZLAR, Alemania)
- Microscopio óptico (marca OLIMPUS, modelo CX31, Japón)
- Cámara de Neubauer (marca BOECO, brighth-line, Alemania)
- Viscosímetro capilar (marca Jena Er Glas Werk Schott Land Gen. Mainz)

Reactivos

- Solventes: Metanol (Fisher Scientific International Inc., EUA), diclorometano (EMSURE ACS, ISO, REAG.), acetato de etilo (IQE, Venezuela), cloroformo

(Fisher Scientific International Inc., EUA), 1-dodecanol (BDH Chemicals, Ltd., Gran Bretaña)

- Monómeros: D,L-Lactida y L-lactida (Polysciences, Inc., EUA).
- Catalizador: Cloruro de estaño dihidratado (Allied Signal-Riedel-de Häen, Alemania)
- Surfactantes: Polivinilalcohol (PVA) (85.000-146.000 uma promedio) (Aldrich Chemical Company, Inc., EUA) y Agar-agar (Aldrich Chemical Company, Inc., EUA).
- Medicamento: Ciclopirox olamina (Sigma-Aldrich Corporation, EUA).
- Buffer de fosfato (pH = 7) (Anachemia Ltd., Canadá).
- Paraformaldehído (Sigma-Aldrich Corporation, EUA).
- Medio de cultivo LIT (pH = 7,2) preparado por el laboratorio de Biología y Quimioterapia de Parasitosis Tropicales (KCl, NaCl, triptosa, hemina, extracto de hígado, extracto de levadura, glucosa, difosfato ácido de sodio, suero bovino fetal)
- Parásitos *L. braziliensis* (cepa MHOM/CO/87/UA301, proporcionado por Carlos Muscus, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Colombia)

V.1 Síntesis de poli (D, L-lactida) y poli (L- lactida) por apertura de anillo en masa

Antes de realizar la síntesis, se secaron los monómeros por liofilización y luego fueron purificados por recristalización en acetato de etilo.

Se disolvió 1 g de los monómeros (DL- lactida y L- lactida) en diclorometano (el cual fue secado con una amalgama de sodio/potasio y benzofenona), para luego ser transferidos a las ampollas de vidrio, las cuales fueron curadas previamente en atmósfera inerte. Posteriormente se añadieron, a cada ampolla, 2,5 mL de una suspensión de cloruro de estaño (II) dihidratado (catalizador), y 2,5 mL de una solución

de 1-dodecanol (iniciador) (todas éstas preparadas en diclorometano); estas porciones de catalizador e iniciador representaron un 0,2% y 0,05% de la masa total de los monómeros, respectivamente. Una vez transferidos todos los reactivos, se homogeneizó la mezcla y se procedió a retirar todo el solvente haciendo vacío, seguidamente se sellaron las ampollas (manteniendo el vacío) y se sumergieron en un baño térmico a 160 °C (temperatura de fusión del monómero) durante 8 horas continuas. Una vez culminado el proceso de síntesis, se guardaron las ampollas en el refrigerador para detener la reacción. Los productos se recolectaron rompiendo las ampollas, y para aislar los polímeros, se disolvió todo en diclorometano, y luego estos se precipitaron con un exceso de metanol. Finalmente, se recolectaron los polímeros, poli (DL-lactida) (PDL) y poli (L-lactida) (PL) por centrifugación, se secaron al vacío, y se almacenaron en atmósfera inerte para su posterior caracterización por Resonancia Magnética Nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN).

A continuación en la **figura 24** se muestra una imagen del montaje empleado para llevar a cabo la síntesis de los polímeros:

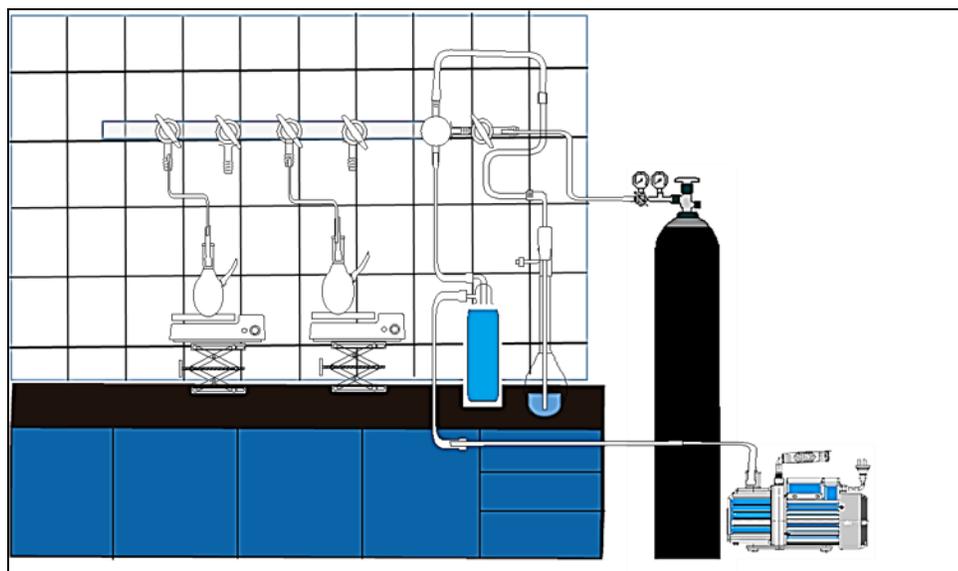


Figura 24. Montaje del sistema empleado para el llenado y manipulación de las ampollas (síntesis de los homopolímeros)

V.1.2 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) de PL y PDL

Las muestras se prepararon tomando entre 4-5 mg de polímero, disolviéndolos en cloroformo deuterado para su posterior análisis en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear.

V.1.3 Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Análisis térmico

Este análisis se llevó a cabo en el equipo DSC 7 Perkin Elmer, donde se determinó la temperatura de transición vítrea (T_g) de PL, añadiendo 5,1 mg de polímero en un porta-muestra de aluminio, el cual se sometió a un calentamiento gradual de temperatura entre 25°C y 200°C a una velocidad de 20°C/min en atmósfera inerte de nitrógeno y enfriamiento posterior hasta la temperatura de partida con igualdad de condiciones y gradiente.

V.1.4 Determinación del peso molecular promedio de PL por viscosimetría

Para determinar el peso molecular de poli (L-lactida) por viscosimetría, se preparó una solución madre del mismo (0,2 %p/v) en cloroformo y se hicieron 2 diluciones cuyas concentraciones fueron 0,05 y 0,12 %p/v también en cloroformo. Como primer paso se determinó la viscosidad específica a 25° C (n_{esp} , ver en **apéndice 1**), evaluando el tiempo de recorrido en el cual el solvente puro alcanzaba el aforo del segundo bulbo del viscosímetro de Ostwald (t_0) (iniciando la medición desde el primer aforo, ver **figura 25**), y seguidamente se determinó el tiempo de recorrido de las soluciones poliméricas (t_n). Una vez obtenido estos parámetros se determinó la viscosidad intrínseca ($n_i = \frac{n_{\text{esp}}}{c}$) graficando n_{esp} vs c (g/mL) (**ver en apéndice 1**). Posteriormente se relacionó esta

viscosidad con los parámetros de Mark-Houwink-Sakurada reportados en la bibliografía [54] para este polímero en cloroformo y a 25°C (donde $k = 2,48 \times 10^{-3}$ y $a = 0,77$), con la siguiente expresión:

$$\eta_i = kM_v^a \quad (1)$$

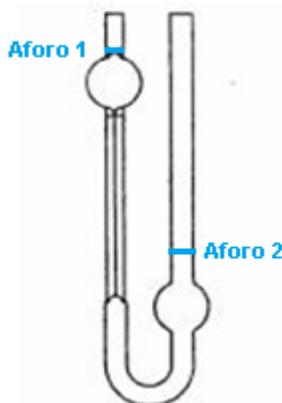


Figura 25. Viscosímetro de Ostwald

Es importante mencionar que no se determinó el peso molecular del poli (D,L-lactida) debido a que no se contaba con polímero disponible para este ensayo en particular.

V.2 Microencapsulación de los polímeros (sin contenido de CX) por el método de emulsión simple por evaporación de solvente

Para realizar las microcápsulas se preparó una solución entre 70-100 mg de polímero en 6 mL de diclorometano la cual representó la fase orgánica o fase dispersa, y la fase acuosa o fase continua, era una solución de PVA al 1% p/v. Ambas soluciones se mantuvieron en refrigeración. Luego, para generar la emulsión, se procedió a comenzar la agitación de 25 mL de la solución de PVA a 700 rpm, y seguidamente se añadieron

los 6 mL de la solución polimérica. Se mantuvo la agitación a esa velocidad durante 30 minutos con las soluciones aun en frío, y luego se continuó agitando cuatro horas y media a temperatura ambiente. Una vez finalizado el proceso, se recolectaron las microcápsulas por centrifugación, se lavaron cuidadosamente con agua destilada tibia, se secaron al vacío y se guardaron en atmósfera inerte para su posterior caracterización por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y realización de ensayos *in vitro*. A continuación, en la **figura 26** se muestra el montaje empleado:



Figura 26. Montaje experimental a emplear en la elaboración de las microcápsulas

V.2.1 Estudio de la degradación de las microcápsulas sin contenido de CX. Ensayo *in vitro* en condiciones fisiológicas humanas

Se tomaron entre 3-5 mg de cada microcápsulas vacías y se añadieron a 1 mL de solución buffer de fosfato (PBS, por su siglas en inglés phosphate buffer solution a pH =7) dispuestos en tubos de ensayo, los cuales fueron sumergidos en un baño térmico a una temperatura constante de 37 ° C durante un período de tiempo que permitiera estudiar la degradación de las microcápsulas, hasta que perdieran su morfología esférica. Para estudiar estos cambios en la morfología de los dispositivos, se tomaron alícuotas cada cierto tiempo y se observaron en el microscopio óptico.

V.3 Microencapsulación de los polímeros cargados con CX por el método de doble emulsión por evaporación de solvente

Se prepararon 2 formulaciones de los polímeros obtenidos, PL y PDL. Para preparar la primera emulsión, se dispuso en un embudo de adición 1 mL de una solución de agar-agar al 0,2% p/v donde había disuelto 8 mg de cliclopirox olamina. Esta fase dispersa fue añadida gota a gota sobre 6 mL de una solución polimérica al 1,7% p/v (fase continua) la cual se encontraba en agitación ultrasónica y a una temperatura entre 12-15 °C. Una vez culminada la adición de la fase dispersa, se continuó la agitación durante 10 minutos aproximadamente. Posteriormente, esta primera emulsión se añadió a 25 mL de una solución de PVA al 1% p/v la cual estaba en agitación mecánica a 800 rpm y en un baño de hielo a 4-6°C. Durante 30 minutos se mantuvo la agitación y la temperatura anterior; luego se retiró el baño de hielo y se dejó agitando la doble emulsión a la misma velocidad durante 4 horas y media a temperatura ambiente.

Una vez culminado el proceso de encapsulación, se recolectaron las microcápsulas por centrifugación y se lavaron con agua tibia para retirar el exceso de PVA y agar-agar. Posteriormente fueron secadas al vacío y guardadas en atmósfera inerte para su posterior caracterización por MEB y realización de ensayos *in vitro*.

A continuación, en la **figura 27** se muestra el montaje empleado:



Figura 27. Montaje experimental a emplear en la elaboración de las microcápsulas con CX.

V.2.2 Caracterización de microcápsulas PL y PDL con y sin contenido de CX por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Las microcápsulas fueron añadidas sobre un adhesivo de fibra de carbono y fueron cubiertas con oro para hacerlas semiconductoras y así poder capturar las micrografías en el Microscopio Electrónico de Barrido.

V.3.2 Eficiencia de encapsulación de CX en las microcápsulas

Para determinar la cantidad de CX contenido en las microcápsulas de cada formulación, se procedió a disolver entre 4-6 mg de las mismas en 10 mL diclorometano por duplicado, para asegurar la liberación total del medicamento en la solución. Luego la concentración del fármaco en estas soluciones (no fue necesario realizar diluciones) fue determinada por espectrofotometría UV-Visible a una longitud de onda de 306 nm usando una curva de calibración de CX en diclorometano la cual fue realizada

previamente (**ver anexo 1**). También muestras de polímero fueron disueltas en el solvente mencionado y se determinó que a esta longitud de onda de trabajo no absorbe.

La eficiencia de encapsulación del fármaco (E.E) se calculó con la **ecuación 2**, y además se expresó también como de rendimiento de producción de cápsulas (R), y contenido de droga en las microcápsulas (C.D) ^[6,55]. A continuación se expresan las ecuaciones:

$$\% E.E = \frac{\text{Masa de fármaco encapsulada (en la masa neta de microcápsulas)}}{\text{Masa de fármaco inicial}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\% R = \frac{\text{Masa neta de microcápsulas}}{\text{Masa total de polímero + droga usada en formulación}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% C.D = \frac{\text{Masa de fármaco encapsulada}}{\text{Masa de microcápsulas}} \times 100 \quad (4)$$

V.3.3 Perfil de liberación de CX por degradación de las microcápsulas. Ensayo *in vitro* en PBS

En una placa microtituladora de 24 pozos, fue añadido 1 mL de solución de buffer de fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) en 6 pozos, realizando las mediciones por duplicado. En cada pozo, se añadió 2 mg de microcápsulas con CX de cada formulación muestras por duplicado), además de cápsulas sin fármaco que actuaron como blanco. Seguidamente, se procedió a incubar durante 1 hora a 37°C y cámara húmeda, con la finalidad de mantener la saturación y así evitar la evaporación de PBS contenido en los pozos. Pasada una hora de exposición en el primer día, se procedió a

tomar 2 alícuotas de 200 μ L por cada pozo (medidas por duplicados). Al quinto día de medición y en adelante se tomaron alícuotas de 100 μ L (con la finalidad de disminuir la pérdida de PBS con el CX dispensado) para luego transferir a una placa de 96 pozos, a la cual se le incidió radiación ultravioleta en un espectrofotómetro de Elisa (lector de placas) a una longitud de onda de 306 nm. Lo anterior, con la finalidad de determinar las absorbancias y así hallar la concentración de CX liberado mediante una curva de calibración, la cual fue previamente realizada (**ver en anexo 2**). Una vez culminado el proceso de medición, las alícuotas fueron re-agregadas a los pozos de origen para evitar modificar la cantidad de CX dispensado.

V.3.4 Perfil de liberación de CX por degradación de las microcápsulas. Ensayo *in vitro* en medio LIT

Con la finalidad de realizar el perfil de liberación mencionado, fueron dispuestas 3 fioles con 5 mL de medio LIT, a las cuales se añadieron las siguientes condiciones, respectivamente: a.- 1,65 mg de microcápsulas de PDL cargadas con Cx; b.- 2,8 mg microcápsulas de PL cargadas con CX; c.- 1 mg de microcápsulas de PL sin fármaco. Seguidamente, cada condición fue incubada a 29 ° C, en agitación constante, por un espacio de 4 horas. Transcurrido este período de tiempo, se procedió a tomar 2 alícuotas de 100 μ L por cada fiola (medidas por duplicados), las cuales fueron dispuestas en una placa de 96 pozos. Seguidamente se realizaron mediciones a una longitud de onda de 306 nm, durante 8 días continuos. Finalmente, fue determinada la concentración de CX liberado por las microcápsulas, mediante una curva de calibración realizada previamente en medio LIT (**ver anexo 3**).

V.3.5 Determinación de la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en presencia de microcápsulas cargadas con CX mediante conteos directos. Curva de crecimiento

Con la finalidad de realizar esta determinación, fueron dispuestas 18 fioles, a las cuales se les agregó 1×10^6 parásitos/mL, en 5 mL de medio LIT. Se realizaron series por triplicado. Las condiciones añadidas bajo esterilidad fueron las siguientes: Condición A: parásitos sin presión selectiva; condición B: parásitos expuestos a $30 \mu\text{M}$ CX, (concentración del EC_{50} determinado en la TEG de Luis Pesquera ^[6]); condición C: parásitos expuestos a 1,68 mg de PDL con CX; condición D: parásitos expuestos a 2,8 mg de microcápsulas de PL cargadas con CX (cuya concentración teórica liberada por ambos dispositivos, de acuerdo a estos pesos, es $30 \mu\text{M}$); condición E: parásitos expuestos a 1 mg de microcápsulas de PL sin CX; condición G: parásitos expuestos a 1 mg de microcápsulas de PDL sin CX. Cada condición, se mantuvo a 29°C , tomándose alícuotas de todas las condiciones cada 24 horas para efectuar conteos directos de proliferación parasitaria en la cámara de Neubauer por un total de 8 días continuos. Una vez obtenido el contaje, se calculó la cantidad de parásitos mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Parásitos/mL} = \frac{\# \text{ total de parásitos}}{\# \text{ de cuadrante}} \times \text{factor de dilución} \times 10^4 \quad (5)$$

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Síntesis de poli (D, L-lactida) y poli (L- lactida) por apertura de anillo en masa

Se obtuvieron polímeros sólidos, siendo PDL color blanco brillante, de aspecto espumoso, y PL color blanco, de aspecto cristalino. Es importante mencionar que durante la síntesis parte de la ampolla de PDL no estaba totalmente sumergida y el monómero adherido a las paredes no reaccionó de manera eficiente, durante las 8 horas, lo cual contribuyó a una disminución del rendimiento de reacción, al igual que la ampolla con PL restos de monómeros quedaron adheridos al vidrio, sin embargo, no fue tanto como en el caso de PDL, dando un rendimiento bastante aceptable. En trabajos anteriores ^[53] se reportó un rendimiento para PDL de 80%. A continuación se muestra en la **tabla 1** los rendimientos de reacción:

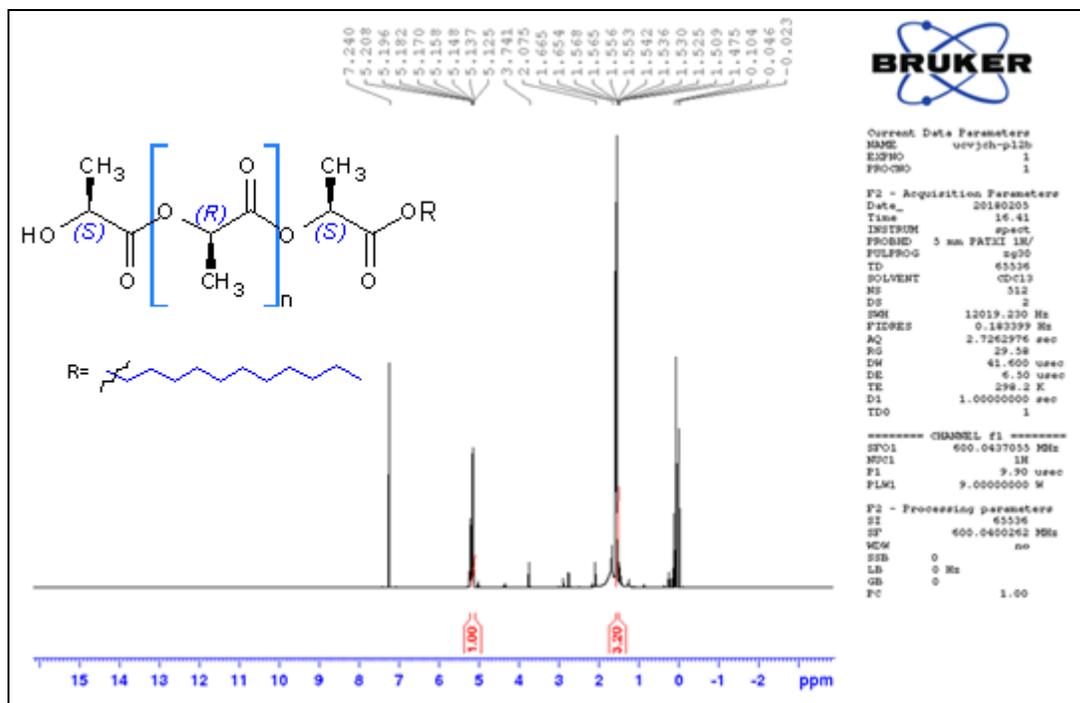
Tabla 1. Rendimientos de reacción. Síntesis de Poli (L-lactida) y Poli (D,L-lactida) en masa

Polímero	Peso _{inicial} (g)	Peso _{final} (g)	%Rendimiento
PDL	1,0360	0,1450	14,00
PL	1,3750	0,8070	58,70

VI.1.2 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de Protones y Carbono (¹H-RMN y ¹³C-RMN) de PL y PDL

En los siguientes espectros se comprobó la formación de estos polímeros, identificando los protones metílicos y metínicos de la lactida (D,L y L) por espectroscopía de ¹H-RMN y los carbonos carbonílicos, metílicos y metínicos por ¹³C-RMN. Además de ello, mediante esta caracterización, se pudo determinar la tacticidad (estéreosecuencia asociada) que está relacionado con la cristalinidad de ambos polímeros de acuerdo a

sus respectivos monómeros de partida, los cuales confieren estas características. A continuación en las **figuras 28 y 29** se observan los espectros $^1\text{H-RMN}$:



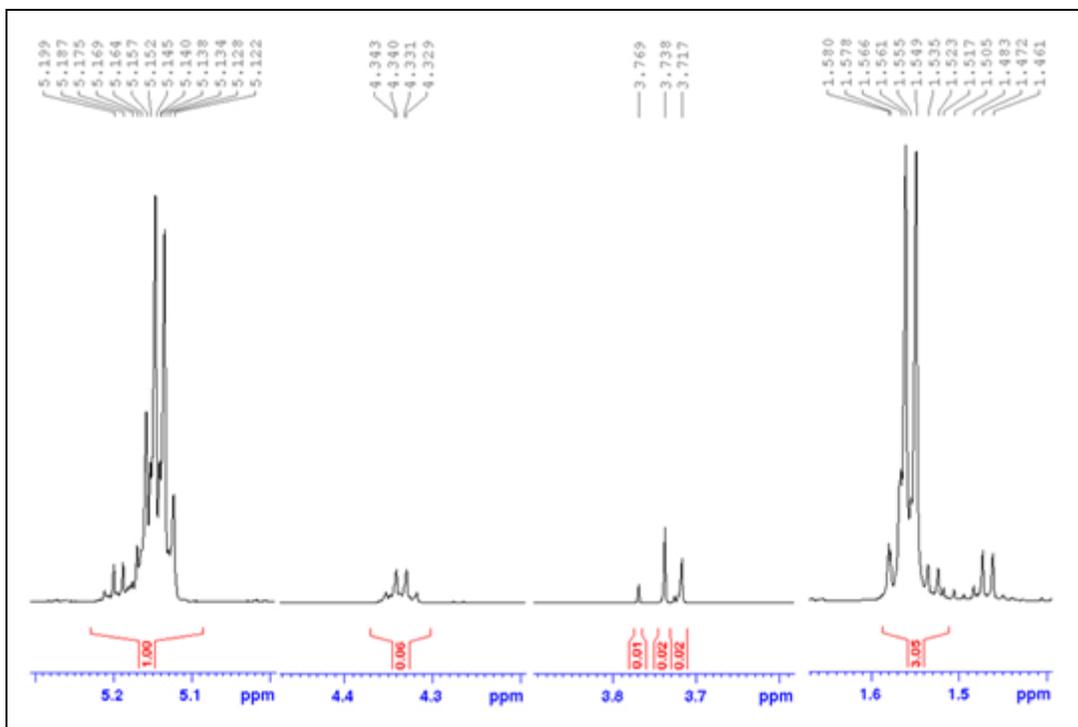
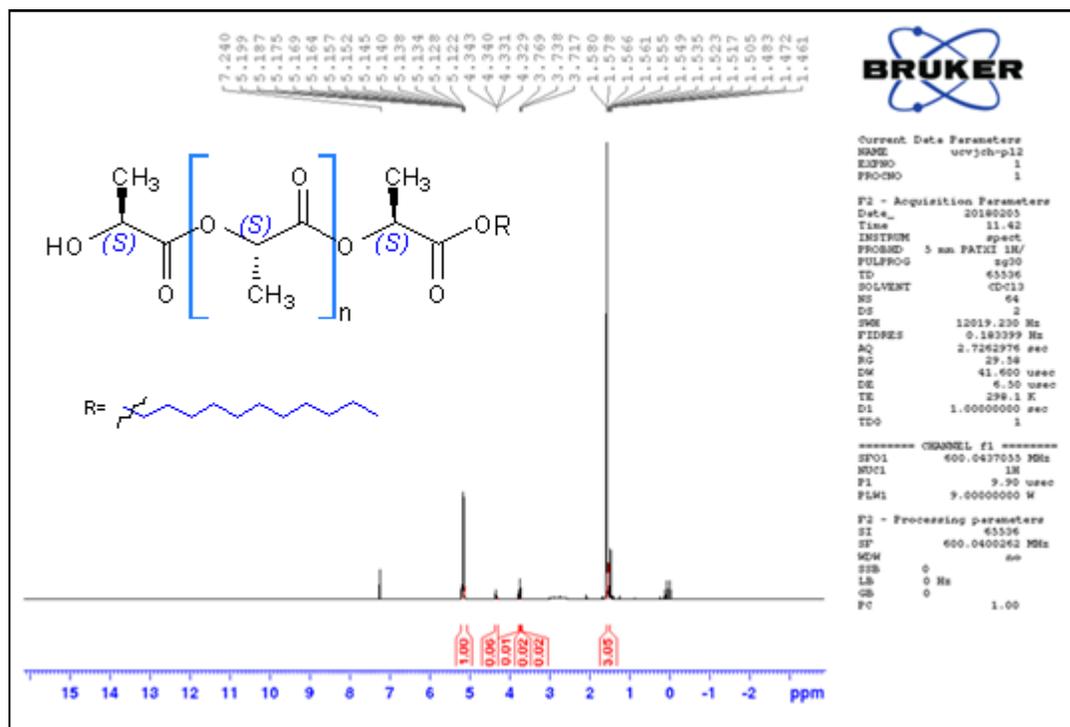


Figura 28. Superior: Espectro ^1H -RMN de PDL. Inferior: Señales ampliadas de los protones metílicos y metínicos.



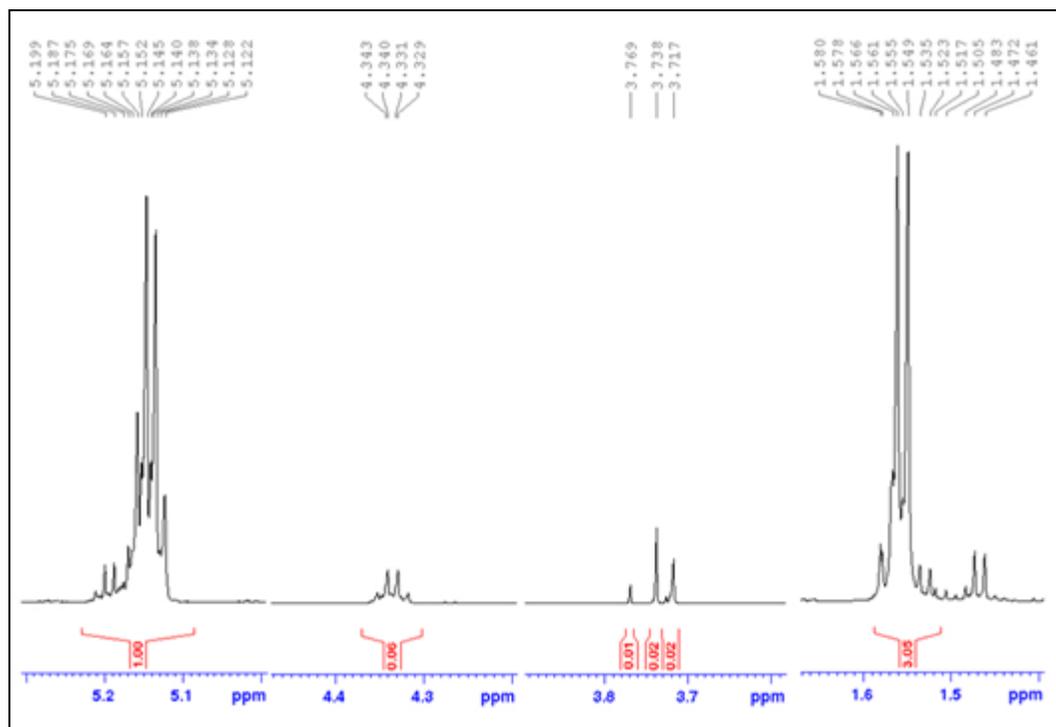


Figura 29. Superior: Espectro $^1\text{H-RMN}$ de PL. Inferior: Señales ampliadas de los protones metílicos y metínicos.

En los espectros $^1\text{H-RMN}$ para ambos polímeros, aparecen dos señales características de mayor intensidad entre 1,5-1,6 ppm y 5,1-5,3 ppm que corresponden a los 3 protones metílicos y 1 protón metínico, respectivamente. Además de ello, se observan señales de muy baja intensidad entre 0-1 ppm y 3-4 ppm (con dos señales diferenciadas en este último rango) que corresponden a los protones metílicos y metilénicos, respectivamente, del iniciador 1-dodecanol que forma el grupo -OR del éster al inicio de la cadena polimérica; la baja intensidad se debe a que este representa una pequeña parte de la cadena polimérica. En las señales correspondientes a los protones metílicos y metínicos, se nota una diferencia significativa en el acoplamiento de los mismos; en el caso de PDL se observan multipletes en la señales de los protones metínicos y metílicos y en PL se observa la multiplicidad esperada de acuerdo al acoplamiento de estos protones (doblete en protones metílicos y cuadruplete en protones metínicos). La

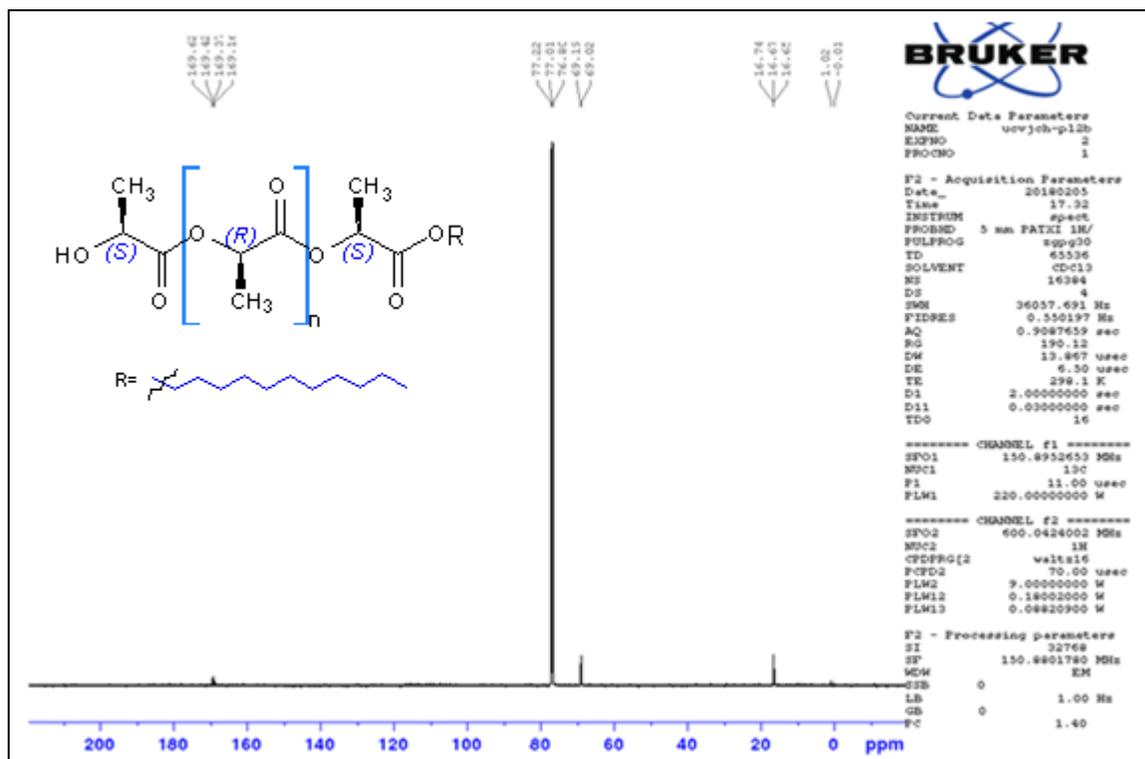
justificación para este fenómeno, es debido a que PDL posee una alternabilidad en su estereoquímica (estéresecuencia heterotáctica), lo que hace que fragmentos del polímero tengan una configuración *s* y otras *R*; esto modifica el ambiente químico del protón metínico y metílico haciendo que las señales se solapen, de tal manera que se observen multipletes en lugar de un doblete y un cuadruplete. Por otro lado, PL posee una sola configuración *R* o *S* en la mayor parte de su estructura (estéresecuencia isotáctica), lo que permite un acoplamiento de protones con una sola contribución de acuerdo a su configuración (hecho justificado con los espectros de ^{13}C -RMN).

En la **tabla 2** se muestran las asignaciones respectivas de las señales para cada protón con sus desplazamientos químicos (δ):

Tabla 2. Desplazamientos químicos de los protones correspondientes a los grupos metilo y metino.

Polímero	Protones	Multiplicidad	δ_{exp} (ppm)	$\delta_{\text{reportado}}$ (ppm) ^[56]
PDL	$\text{CH}_3\text{-CHR}_1\text{R}_2$ (R_1 =COO-; R_2 = -COO)	Multiplete	1,54-1,59	1,57
	$\text{CHR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ (R_1 =CH ₃ ; R_2 =COO-; R_3 =- COO)	Multiplete	5,13-5,21	5,13
PL	$\text{CH}_3\text{-CHR}_1\text{R}_2$ (R_1 =COO-; R_2 = -COO)	Duplete	1,55-1,57	1,57
	$\text{CHR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ (R_1 =CH ₃ ; R_2 =COO-; R_3 =- COO)	Cuadruplete	5,14-5,17	5,13

A continuación en las **figuras 30 y 31** se muestran los espectros de ^{13}C -RMN:



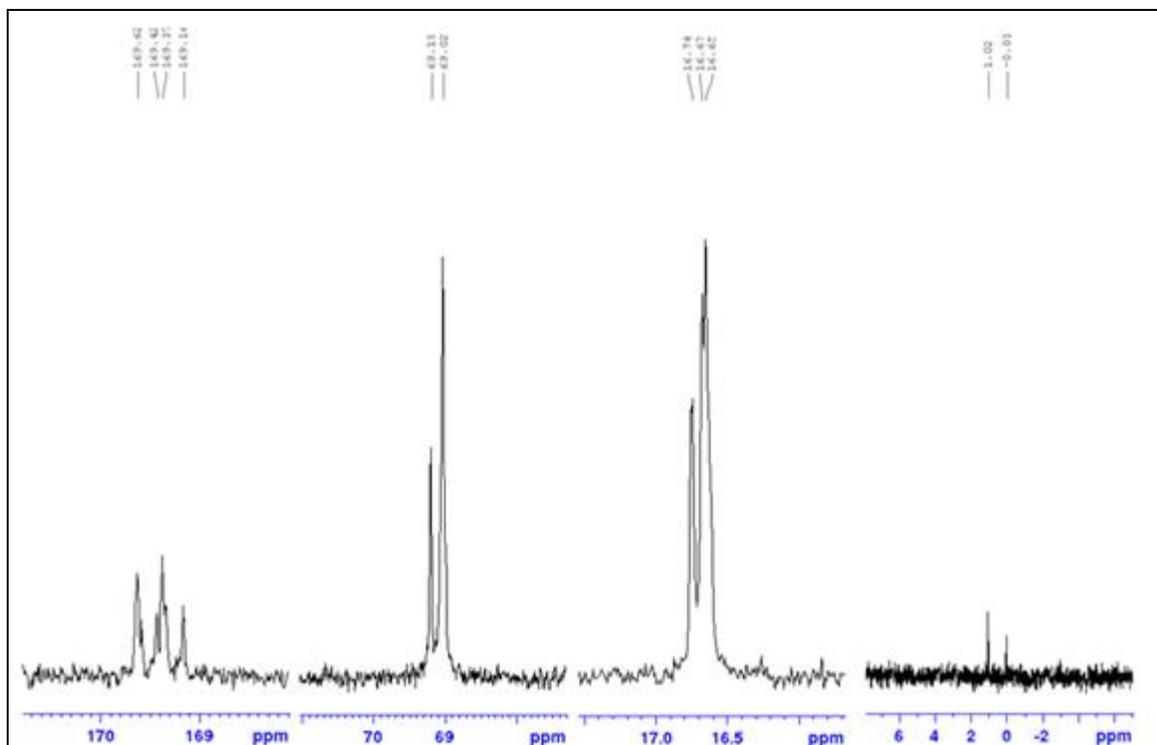
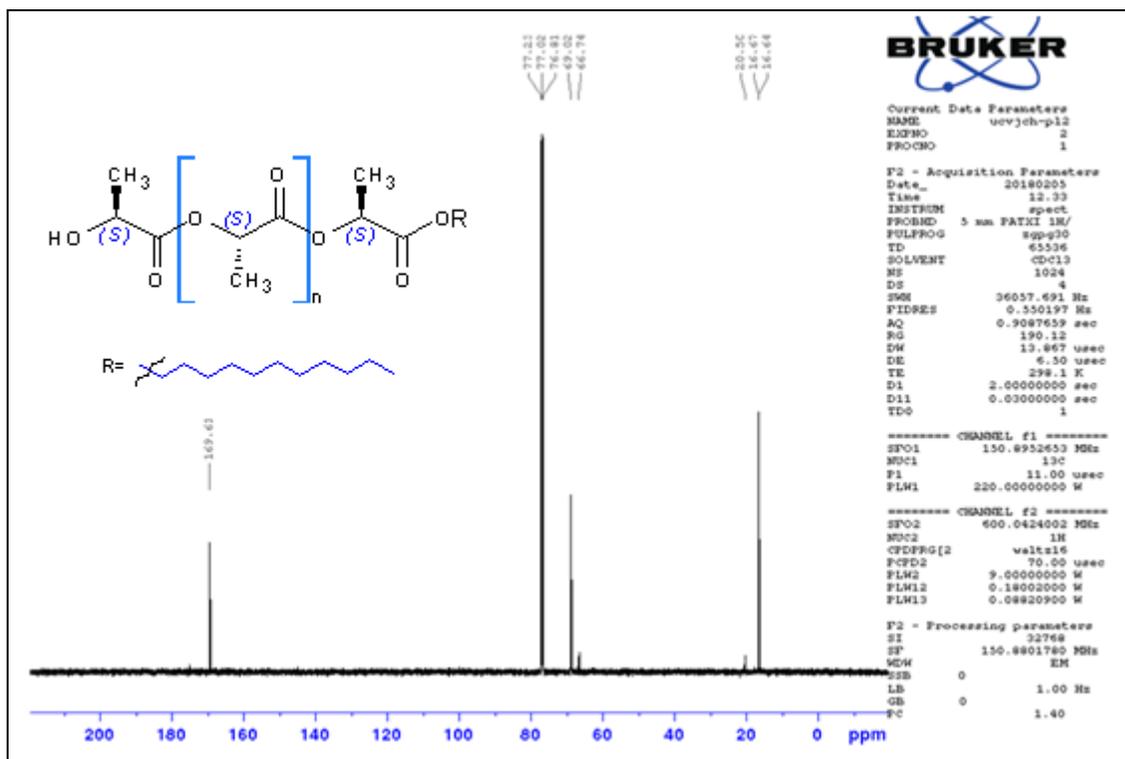


Figura 30. Superior: Espectro ^{13}C -RMN de PDL. Inferior: Señales ampliadas de los carbonos metílicos, metínicos y carbonílicos.



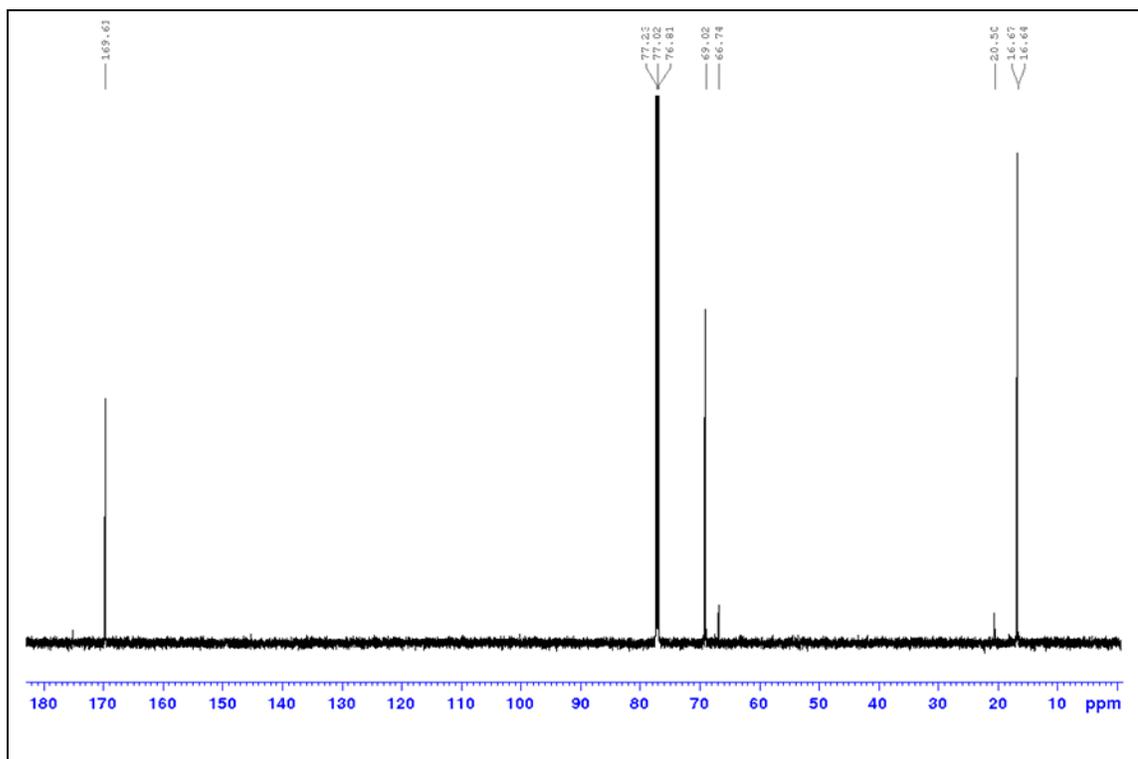


Figura 31. Superior: Espectro ^{13}C -RMN de PL. Inferior: Señales ampliadas de los carbonos metílicos, metínicos y carbonílicos.

Se observa para ambos polímeros, tres señales características entre 15-18 ppm, 60-70 ppm y 160-180 ppm que corresponden a los carbonos metílicos, metínicos y carbonílicos (del éster), respectivamente. Para el espectro de PL, se observa una señal de muy baja intensidad en 20 ppm aproximadamente ^[57], lo que corresponde a carbonos metilénicos.

En la **tabla 3** se muestran las asignaciones respectivas de las señales para cada carbono con sus desplazamientos químicos (δ):

Tabla 3. Desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a los grupos metilo, metino y carbonilo.

Polímero	Carbono	δ_{exp} (ppm)	$\delta_{\text{reportado}}$ (ppm) ^[56]
PDL	$\text{CH}_3\text{-CHR}_1\text{R}_2$ (R_1 =COO-; R_2 = -COO)	16,65-16,74	16,8
	$\text{CHR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ (R_1 =CH ₃ ; R_2 =COO-; R_3 =- COO)	69,02-69,15	76,2
	$\text{R}_1\text{R}_2\text{CH-COO-}$ (R_1 =CH ₃ ; R_2 =COO-)	169,14-169,62	176
PL	$\text{CH}_3\text{-CHR}_1\text{R}_2$ (R_1 =COO-; R_2 = -COO)	16,64-16,67	16,8
	$\text{CHR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ (R_1 =CH ₃ ; R_2 =COO-; R_3 =- COO)	69,02	76,2
	$\text{R}_1\text{R}_2\text{CH-COO-}$ (R_1 =CH ₃ ; R_2 =COO-)	169,61	176

Los desplazamientos de los carbonos metínicos y carbonílicos son más altos que los reportados en la literatura; esto se atribuye a que es una cadena polimérica donde se tiene la contribución de muchos carbonos, haciendo que el cálculo de los desplazamientos no coincida con tanta exactitud para los experimentales.

En una ampliación del espectro ^{13}C -RMN para PL (**figura 32**) se observa una única señal en la región de 170 ppm (correspondiente al carbono carbonílico), que nos permite decir que la estérosecuencia microestructural del polímero es isotáctica. En el caso de PDL (**figura 33**) se observa estérosecuencias de hexadas (secuencia

configuracional en la cadena de polímero) en la región comprendida entre (169,8-169 ppm) reportadas por **Bero y col (1990)** [58], donde se encuentran tres bandas anchas producto del solapamiento de la señal de carbono carbonílico. En la banda que se encuentra entre 169,5-169,8 ppm incluye las hexadas siiis, iiiis, iiii y siiii; la segunda banda (169,3-169,5 ppm) incluye las hexadas iisii, isiii, iisii, sisii, iisis y sisis y la tercera banda (169,1-169,2 ppm) incluye las hexadas isisi. Estos desdoblamiento de las señales indican que el polímero presenta una estéresecuencia aleatoria (polímero heterotáctico).

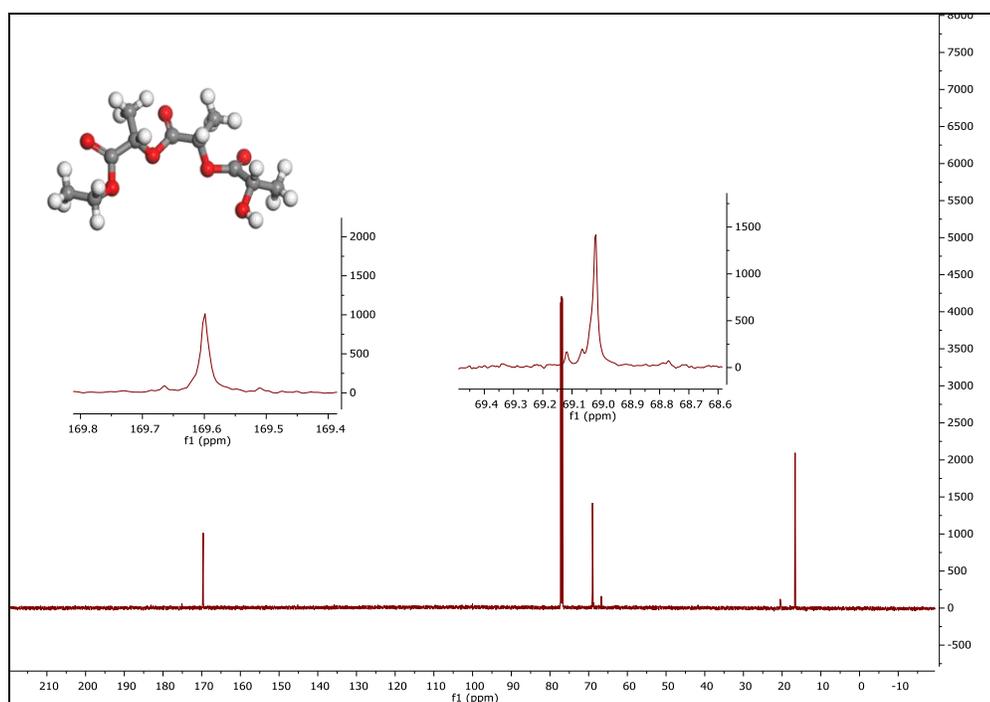


Figura 32. Espectro ^{13}C -RMN con señales particulares ampliadas para PL.

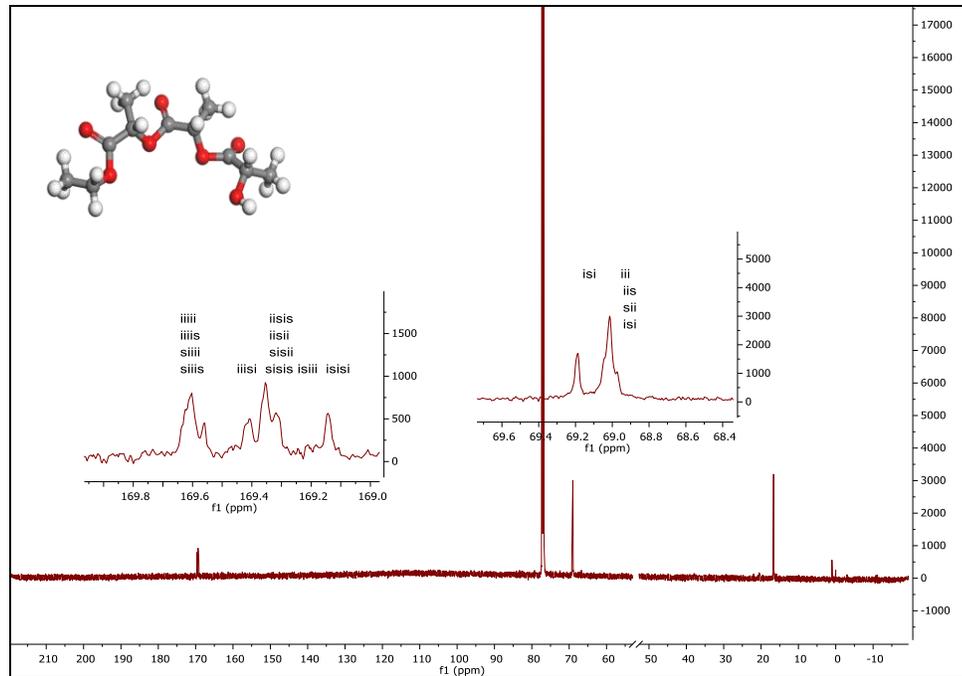


Figura 33. Espectro ^{13}C -RMN con señales particulares ampliadas para PDL.

Estas estereosecuencias particulares, muestran que en el proceso de polimerización la configuración del carbono metínico se mantiene, debido a que el ataque nucleofílico se da sobre otro carbono, que no posee configuración (carbono carbonílico). Aunado a ello, estas tacticidades confieren un arreglo más ordenado en el caso de PL (isotáctico), que lo hace semicristalino, mientras que PDL por ser heterotáctico posee un arreglo amorfo.

VI.1.3 Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Análisis térmico

El análisis térmico por DSC fue realizado solo para PL debido a que no se contaba con polímero PDL disponible. La temperatura de transición vítrea determinada fue $51,54\text{ }^{\circ}\text{C}$

(ver termograma en **anexo 4**). En la literatura se reporta un Tg para este polímero entre 53-64 °C ^[54]. El punto de fusión no se registró por la velocidad de enfriamiento empleado en el análisis, la cual no permitió un proceso de cristalización eficiente.

VI.1.4 Determinación del peso molecular promedio de PL por viscosimetría

El peso molecular promedio viscoso para PL fue 1348,40 g/mol, para una viscosidad intrínseca determinada a 25 °C, en cloroformo, de 0,6374 mL/g.

Este valor indica que el polímero en efecto tiene un peso molecular lo suficientemente alto para que tenga una estereorregularidad semicristalina y sea sólido. Además, para las condiciones empleadas en la síntesis, es posible que el tiempo de reacción no fuera lo suficientemente largo para generar un polímero con un mayor peso molecular; el tipo de catalizador e iniciador y sus concentraciones, también afectan de manera importante el peso molecular de los polímeros.

VI.2 Microencapsulación de los polímeros (con y sin contenido de CX) por el método de emulsión simple y doble emulsión por evaporación de solvente

VI.2.1 Estudio de la degradación de las microcápsulas sin contenido de CX. Ensayo *in vitro* en condiciones fisiológicas humanas

Los cambios morfológicos de las microcápsulas de PL y PDL fueron evaluados por la degradación hidrolítica en una solución de PBS a pH = 7 a 37° C, en función del tiempo. Es importante mencionar, que aunque las condiciones fueron semejantes a las del cuerpo humano, no significa que el comportamiento evaluado en este ensayo *in vitro* corresponda al que se observaría en el medio fisiológico, debido a que en

sistemas *in vivo* hay factores, además del pH y temperatura, que pueden influir fuertemente en la degradación hidrolítica de estos polímeros biodegradables, como las enzimas (como algunas hidrolasas en el cuerpo humano, que tienen preferencia por hidrolizar las zonas amorfas de los polímeros biodegradables ^[59]). La intención de este ensayo, fue ver cómo la degradación de un polímero amorfo (PDL) y semicristalino (PL) de polilactida, afecta el cambio morfológico de las microcápsulas de maneras diferentes, a unas condiciones lo más cercanas a las del sistema fisiológico humano, para tener un parámetro de degradación, ya que la temperatura y el pH afectan directamente este proceso mediante la hidrólisis de estos poliésteres.

A continuación se muestran las micrografías de los cambios morfológicos desde la **figura 34 a la 43**:

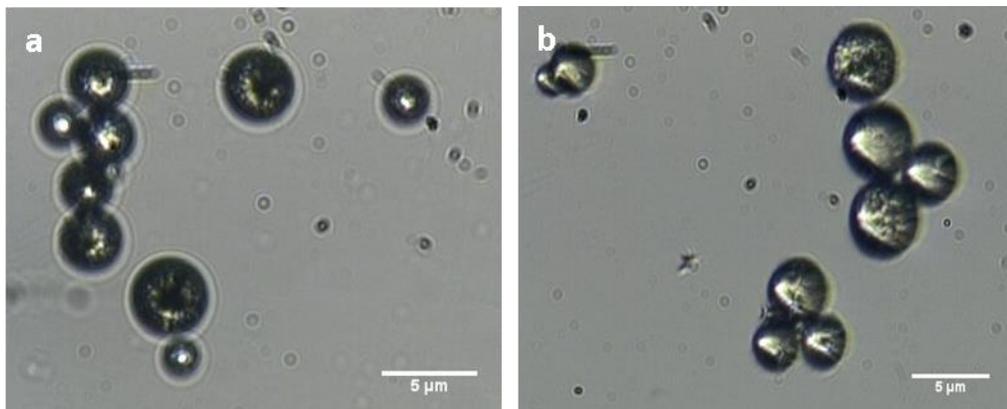


Figura 34. Micrografías de a) PDL y b) PL a 1 hora de exposición en PBS a 37°C.

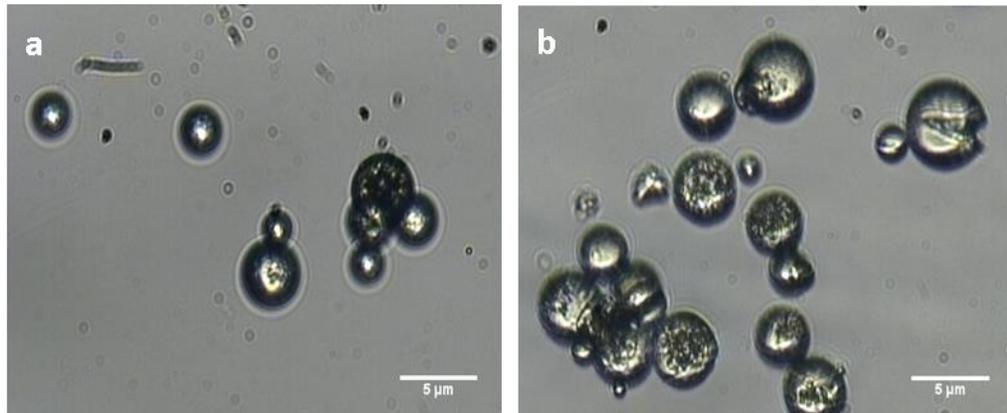


Figura 35. Micrografías de a) PDL y b) PL a 7 horas de exposición en PBS a 37°C.

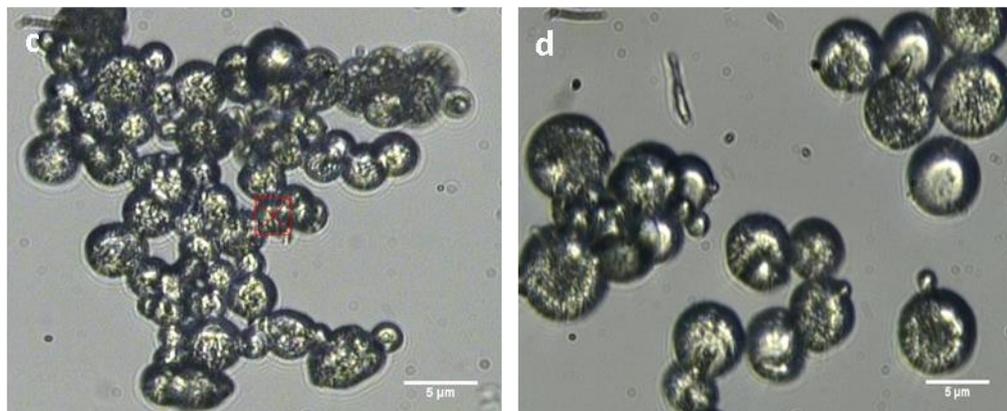


Figura 36. Micrografías de a) PDL y b) PL a 30 horas de exposición en PBS a 37°C.

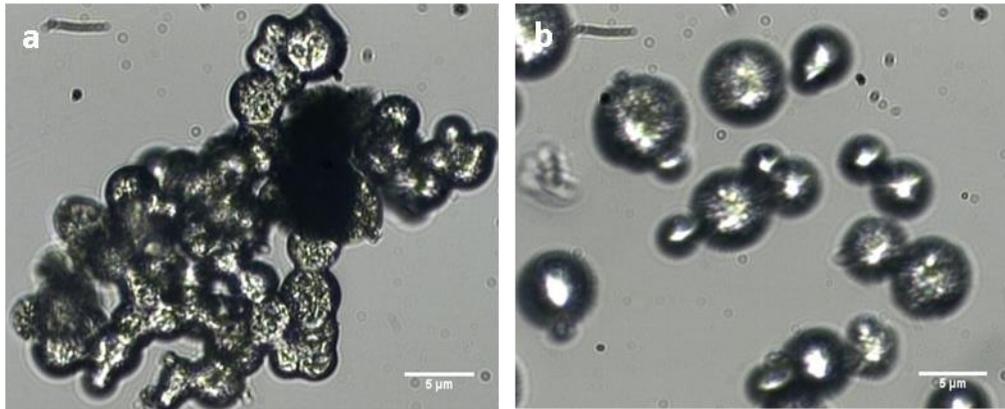


Figura 37. Micrografías de a) PDL y b) PL a 72 horas de exposición en PBS a 37°C.

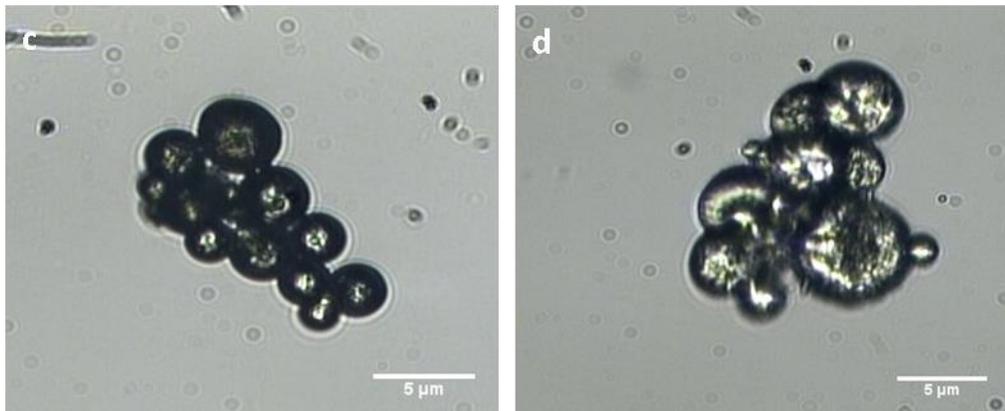


Figura 38. Micrografías de a) PDL y b) PL a 7 días de exposición en PBS a 37°C.

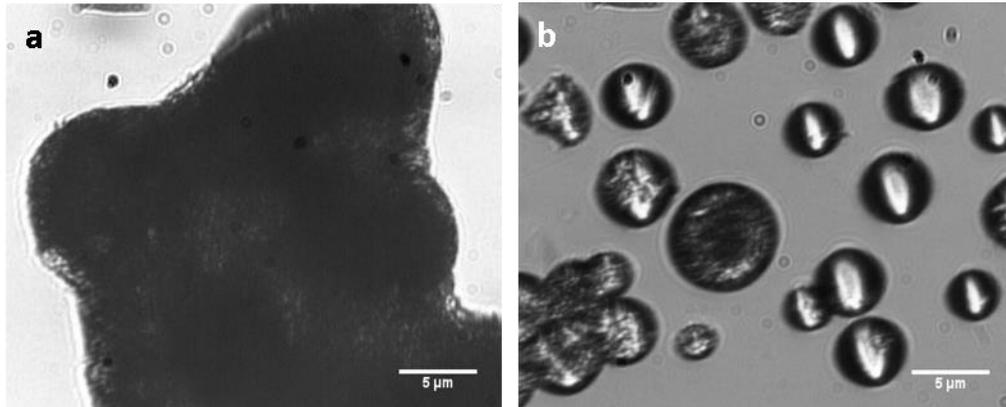


Figura 39. Micrografías de a) PDL y b) PL a 14 días de exposición en PBS a 37°C.

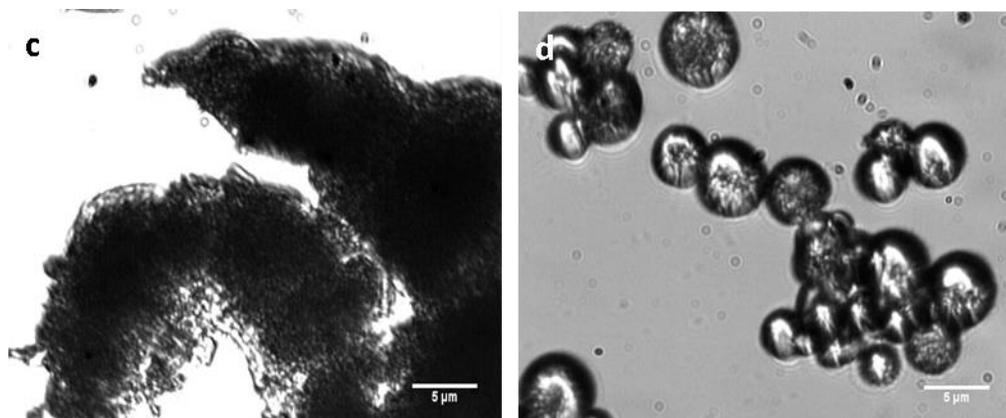


Figura 40. Micrografías de a) PDL y b) PL a 30 días de exposición en PBS a 37°C.

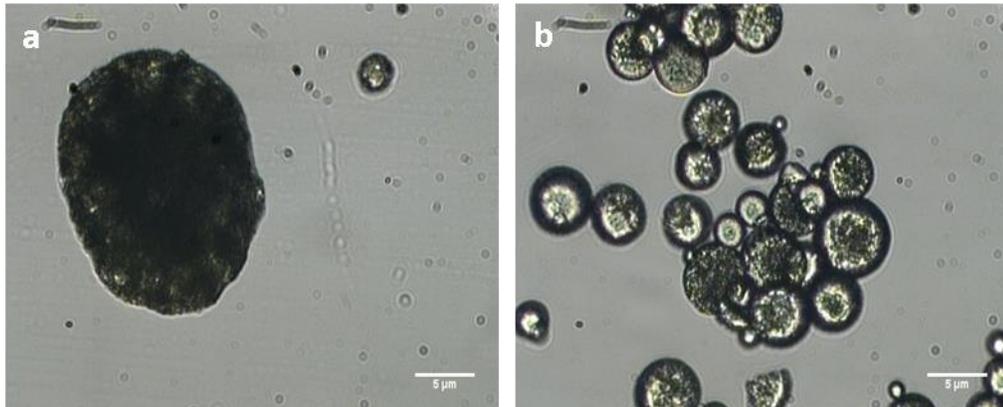


Figura 41. Micrografías de a) PDL y b) PL a 49 días de exposición en PBS a 37°C.

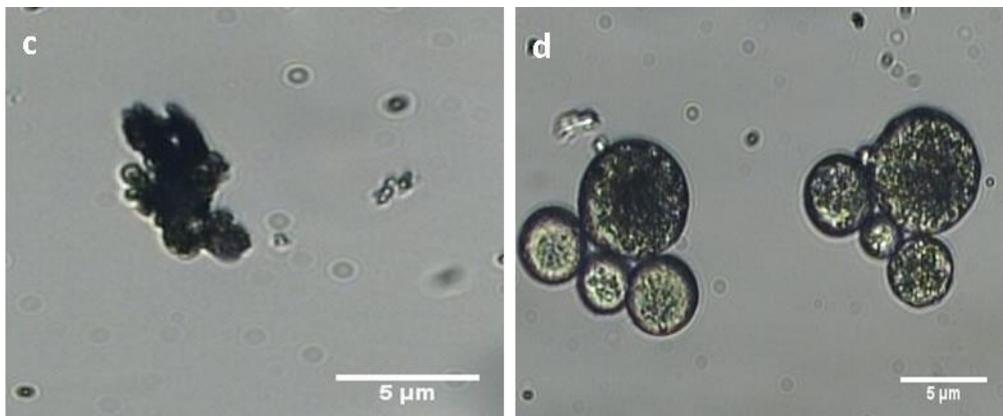


Figura 42. Micrografías de a) PDL y b) PL a 79 días de exposición en PBS a 37°C.

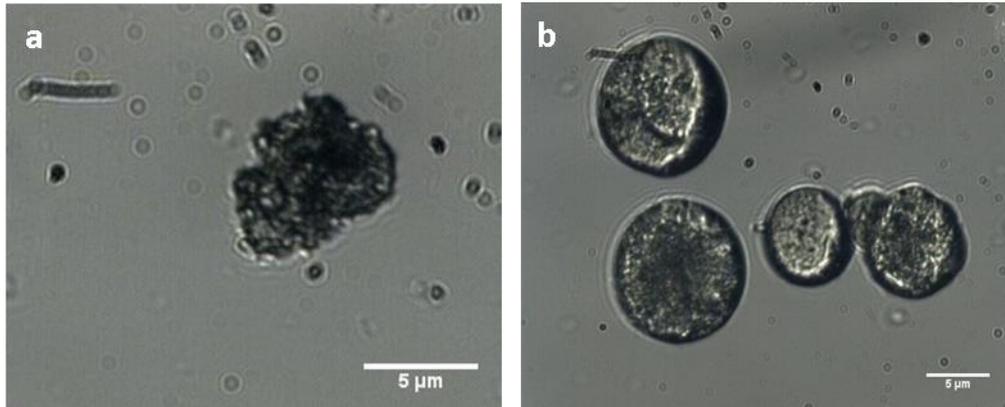


Figura 43. Micrografías de a) PDL y b) PL a 103 días de exposición en PBS a 37°C.

Se puede observar que a la primera hora y a las 7 horas de exposición en el medio, las microcápsulas aun conservaban su morfología, y algunas poseían pequeñas erosiones superficiales. Pasado un día de exposición (30 horas) se notó una aglomeración de las microcápsulas de PDL con algunas que mostraron una pérdida de morfología esférica; en el caso de las microcápsulas de PL se notó poca aglomeración con algunas erosiones visibles en la superficie, pero estas mantenían aún su morfología esférica. Ya a los 3 días de exposición (72 horas), la pérdida en la morfología de PDL fue evidente, mientras que PL aún mantuvo su morfología esférica. Al día 7 se observaron algunas microcápsulas de PDL que mantenía aun su morfología esférica, mientras que las de PL estaban aglomeradas con erosiones más intensas en su superficie. Seguidamente, a los 14 días de exposición, ya las microcápsulas de PDL perdieron totalmente su morfología esférica, encontrándose como una masa amorfa; en el caso de las microcápsulas de PL todavía poseían una morfología esférica. Posteriormente, al mes de exposición (30 días), se notó una disgregación de la masa amorfa en las microcápsulas de PDL, mientras que PL permaneció en su forma esférica con erosiones en su superficie. Al transcurrir los 49, 79 y 103 días (casi 3 meses y medio), se mantuvo la masa amorfa de PDL (es menos cantidad), pero las microcápsulas de PL siguieron manteniendo su morfología esférica, pero con grandes erosiones en su superficie,

apreciándose específicamente en la **figura 43b** pérdida parcial de la morfología de algunas microcápsulas.

La diferencia en la degradación fue significativa. Aun y cuando se trata de polilactida o poliácido láctico, la estereoquímica asociada al carbono metínico de la lactida o ácido láctico, confiere propiedades estructurales diferentes en cuanto al arreglo cristalino (como se verificó en la caracterización por ^{13}C -RMN), dando como resultado un polímero amorfo de PDL y semicristalino de PL, lo cual conlleva a que estos materiales presenten diferencias en su degradación hidrolítica. En la bibliografía se ha reportado, que el polímero PDL es amorfo y el PL es semicristalino ^[60,61], y esto produce, en cuanto a la hidrólisis, que el PDL sea más fácil de degradar debido a que el ataque nucleofílico del agua sobre el carbono carbonílico del éster está más favorecido, mientras que PL por tener un arreglo semicristalino (zonas del polímero donde hay cadenas más ordenadas, ya que también hay zonas amorfas), presenta menos disponibilidad del carbono carbonílico del éster para que sea atacado nucleofílicamente por el agua, haciendo que sea más resistente a la hidrólisis, y que el ataque se dé principalmente en las zonas amorfas. En general, los materiales poliméricos con estructuras semicristalinas son más resistentes a la hidrólisis que los que tienen estructuras amorfas ^[61]. Es importante mencionar, que el peso molecular también influye en la degradación hidrolítica de estos polímeros ^[55], por lo cual sería pertinente comparar este factor con microcápsulas de PDL y PL con diferentes pesos moleculares.

Dispositivos de liberación controlada de PDL y PL, presentarán una degradación hidrolítica distinta en un medio acuoso, lo cual conferirá diferentes formas de dispensar el fármaco desde su matriz en dicho medio (incluyendo también la influencia de la estructura interna de estas microcápsulas que reservan el fármaco con diferentes formas de encapsulamientos), lo cual se mostrará posteriormente en los ensayos de perfiles de liberación en PBS a 37 °C y medio de cultivo LIT a 29 °C.

VI.2.2 Caracterización de microcápsulas PL y PDL con y sin contenido de CX por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

VI.2.2.1 Caracterización por MEB de microcápsulas sin contenido de CX generadas por el método de emulsión simple por evaporación de solvente

A continuación en las **figuras 44 y 45** se muestran las micrografías de las microcápsulas sin fármaco obtenidas por el microscopio electrónico de barrido:

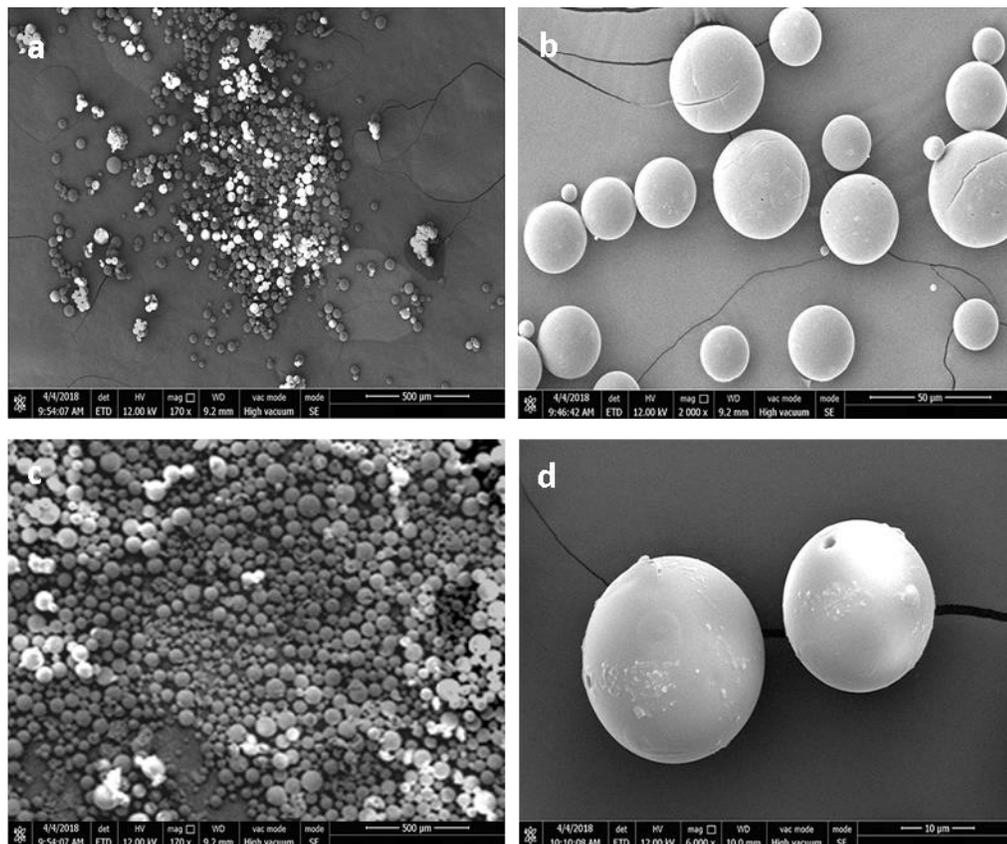


Figura 44. Micrografías de la morfología externa de las microcápsulas sin cx. a) y b) PL, c) y d) PDL.

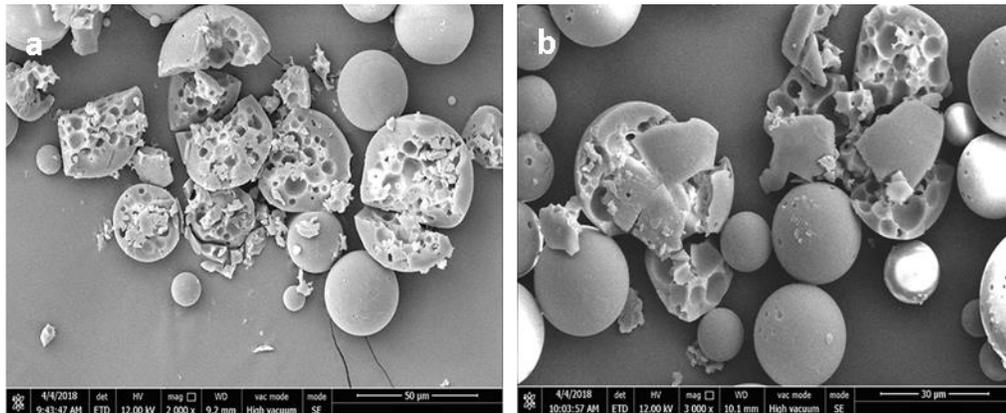


Figura 45. Micrografías de la morfología interna de las microcápsulas sin fármaco. a) PL y b) PDL.

Para estas microcápsulas sin fármaco, se observó una morfología esférica con superficie suave para ambos polímeros (visualizando unas grietas en PL y dos poros en PDL, pero no para generalizar). La estructura interna de ambos polímeros fue tipo panal o reservorio, donde se observan pequeños agujeros, producto de la difusión de la fase continua (acuosa) dentro de la matriz orgánica representada por la fase dispersa, donde quedaron gotitas de agua atrapadas. A continuación se muestra en los **gráficos 1 y 2** la distribución de tamaño para una población de 60 microcápsulas de PDL y 54 microcápsulas de PL, la cual fue determinada usando el software *Image J*:

Distribución de tamaño de microcápsulas de PDL sin CX

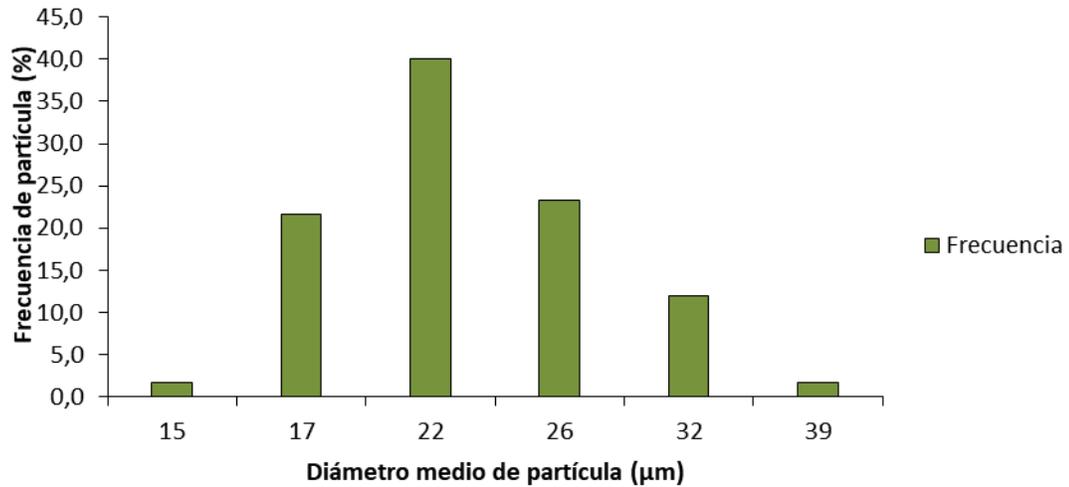


Gráfico 1. Distribución de tamaño para microcápsulas de PDL sin CX.

Distribución de tamaño de microcápsulas de PL sin CX

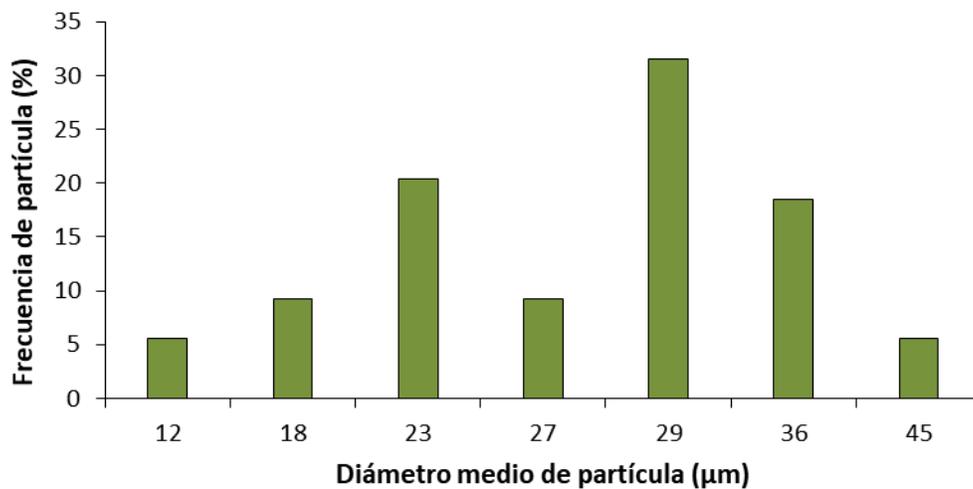


Gráfico 2. Distribución de tamaño para microcápsulas de PL sin CX.

La distribución de tamaño para las microcápsulas de PDL muestra que estadísticamente, un 40% de ellas posee un diámetro medio de $22 \pm 2 \mu\text{m}$, y el otro

60% se distribuye en tamaños entre $26 \pm 4 \mu\text{m}$ (23,3%), $17 \pm 2 \mu\text{m}$ (21,7%), $32 \pm 1 \mu\text{m}$ (12%), $39 \mu\text{m}$ (1,7%) y $15 \mu\text{m}$ (1,7%). En el caso de las microcápsulas de PL, un 31% de las microcápsulas posee un diámetro medio de $29 \pm 7 \mu\text{m}$, y el otro 69% se distribuye en tamaños entre $23 \pm 1 \mu\text{m}$ (20%), $36 \pm 1 \mu\text{m}$ (19%), 18 ± 1 (9%) y 27 ± 1 (9%), $12 \pm 1 \mu\text{m}$ (6%), $45 \pm 1 \mu\text{m}$ (6%). Las microcápsulas de PL son más grandes según su diámetro medio en el porcentaje de frecuencia más alto, que las microcápsulas de PDL, sin embargo el error o rango es muy amplio, lo cual abarca también diámetros donde se alcanza el mismo valor que PDL.

Se observa, además, una baja polidispersidad de PDL con respecto a PL, ya que este último muestra una tendencia más bien bimodal. Estas variaciones en el tamaño de las microcápsulas para ambos polímeros, se adjudica a problemas presentados en la agitación, donde el agitador tuvo inconvenientes para mantener su eje fijo, y por el contrario tendía a ladearse durante el proceso de agitación, además, las paletas del agitador no fueron las más idóneas para garantizar tamaños más homogéneos de las microcápsulas, ya que posiblemente las gotas más alejadas del centro no pudieron romperse de la misma manera que lo hacían las que sí estaban en esta zona del reactor. Este resultado, muestra que el sistema no proporcionó las mismas condiciones durante los procesos de microencapsulación. No obstante, **Martins y col (2014)** ^[62] y **Vyslouzil y col (2014)** ^[55], emplearon condiciones semejantes para una microencapsulación con una emulsión simple, obteniendo una distribución de tamaño monodispersa de 10,3-12,7 μm (5200 rpm) y 284,3 μm (600 rpm) 173,5 μm (1000 rpm), respectivamente, lo cual nos permite decir que es posible tener distribuciones de tamaño estrechas si se mantiene una agitación eficiente.

VI.2.2.2 Caracterización por MEB de microcápsulas con contenido de CX generadas por el método de doble emulsión por evaporación de solvente

En las **figuras 46 y 47** se muestran las micrografías de las microcápsulas con fármaco obtenidas por el microscopio electrónico de barrido:

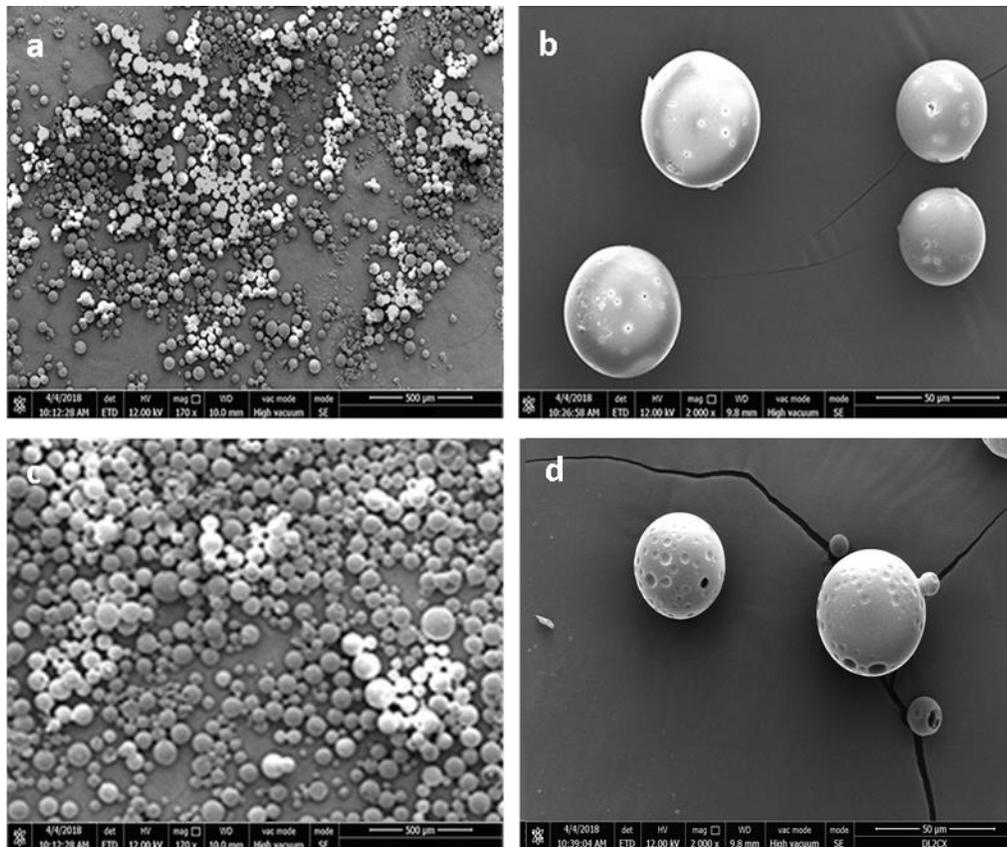


Figura 46. Micrografías de la morfología externa de las microcápsulas con CX. a) y b) PL, c) y d) PDL.

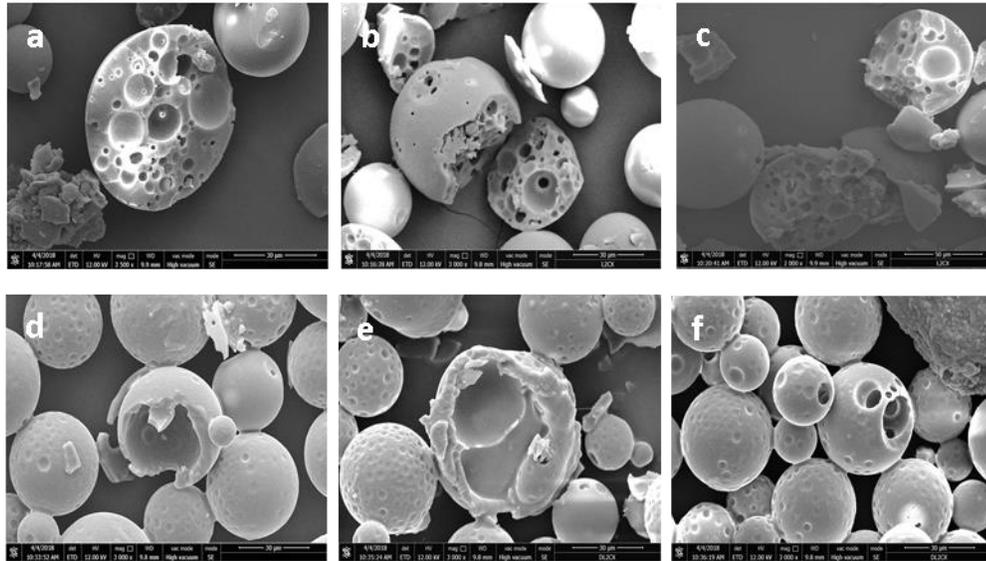


Figura 47. Micrografías de la morfología interna de las microcápsulas con CX. a), b) y c) PL; d), e), y f) PDL.

La morfología externa de las microcápsulas de PL con CX, muestran una superficie suave con pequeños agujeros, son esféricas, y poseen una estructura interna tipo panal o reservorio, atribuida también a gotas de la solución de fármaco atrapadas dentro de las microcápsulas. En el caso de PDL, son partículas esféricas, con superficie externa rugosa. La estructura interna es un tanto diversa mostrando una morfología tipo cáscara y reservorio (específicamente en la **figura 47f** donde se visualizan poros internos), con grandes agujeros a diferencia de la estructura interna de PL. Esta diferencia en la estructura interna, se puede deber a una coalescencia de las gotas de la fase acuosa del fármaco de la primera emulsión en las microcápsulas de PDL, las cuales se concentraron en la matriz polimérica, en algunas microcápsulas, mientras que probablemente en la mayoría de ellas y en PL, la coalescencia de las gotas no fue completa y quedaron incrustadas en la matriz una vez que se evaporó el solvente para formar las microesferas.

En los **gráficos 3 y 4** se muestra la distribución de tamaño para una población de 67 microcápsulas de PDL con CX y 53 microcápsulas de PL con CX:

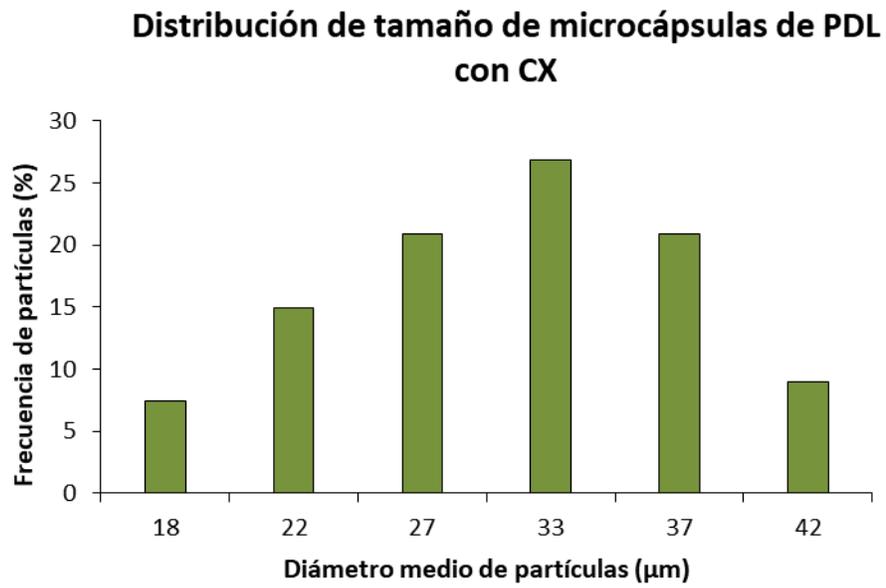


Gráfico 3. Distribución de tamaño para microcápsulas de PDL con CX.

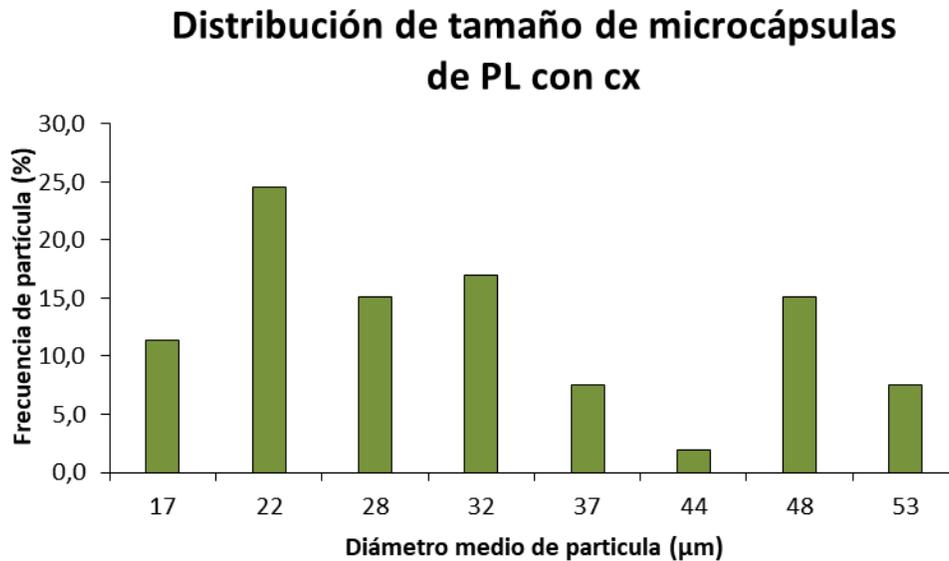


Gráfico 4. Distribución de tamaño para microcápsulas de PL con CX.

En la distribución de tamaño para las microcápsulas de PDL, se observa que la mayoría de las microcápsulas (69%) tienen diámetros medio que van de $27 \pm 1 \mu\text{m}$ a $37 \pm 1 \mu\text{m}$, estadísticamente. El otro 31% se distribuye en diámetros medio de $22 \pm 1 \mu\text{m}$ (15%), $42 \pm 2 \mu\text{m}$ (9%) y $18 \pm 2 \mu\text{m}$ (7%). En el caso de las microcápsulas de PL, un 25% de las microcápsulas posee un diámetro medio de $22 \pm 1 \mu\text{m}$, y el otro 75% se distribuye en tamaños entre $32 \pm 2 \mu\text{m}$ (17%), $48 \pm 1 \mu\text{m}$ (15%), 28 ± 2 (15%), 17 ± 4 (11%), $37 \pm 1 \mu\text{m}$ (7,5%), $53 \pm 1 \mu\text{m}$ (7,5%) y 44 (2%).

La polidispersidad e incremento de tamaño para ambos polímeros, se atribuye a la misma justificación planteada para las microcápsulas sin fármacos generadas en el método de emulsión simple por evaporación de solvente. **Jyotsana y col (2013)** ^[63] y **Román y China (2005)** ^[38], emplearon condiciones semejantes para una microencapsulación con una doble emulsión, obteniendo una distribución de tamaño monodispersa de $17,8 \mu\text{m}$ (8000 rpm) y $0-5 \mu\text{m}$ (750 rpm), respectivamente, lo cual

también nos permite decir que es posible tener distribuciones de tamaño estrechas si se mantiene una agitación eficiente.

El interés por tener un tamaño más pequeño de partícula es debido a que al ser más pequeñas, se promueve una mayor hidrólisis en el medio acuoso, ya que hay mayor superficie de contacto entre el agua y las microcápsulas.

VI.2.3 Eficiencia de encapsulación de CX en las microcápsulas

En la **tabla 4** se muestra un resumen de los valores obtenidos por espectroscopia UV-Visible usando la curva de calibración de CX en diclorometano (**anexo 2**):

Tabla 4. Eficiencia de encapsulación del fármaco, porcentaje de rendimiento y contenido de droga de microcápsulas PDL y PL.

Polímero	E.E (%)	R (%)	C.D (%)
PDL	18 ± 2	77,02	3,1 ± 0,4
PL	26 ± 1	91,00	1,4 ± 0,1

La eficiencia de encapsulación para ambas formulaciones se encuentra en los rangos reportados en la literatura, como en el caso de **Román y China (2005)** cuya E.E fue 26,2%^[38], **Morgado y China (2006)**^[53] 12,4% (para el homopolímero), y **Jyotsana y col (2013)**^[63] que reportaron eficiencias de encapsulación en un rango de 26-57%, de acuerdo a las condiciones empleadas para cada microencapsulación. Esto nos permite decir que los valores obtenidos son aceptables, ya que existen muchos factores en el proceso de microencapsulación que influyen en la eficiencia de encapsulación, tal como la solubilidad que posee el fármaco en la solución acuosa, que impide de entrada, la encapsulación completa debido a que este se difunde a través de la fase orgánica hacia

la segunda fase acuosa, disminuyendo así la cantidad de fármaco disponible, en la primera emulsión, para encapsular.

El contenido de droga es bajo, pero también es un buen resultado debido a que hay que considerar lo riguroso de encapsular en pequeños microporos cierta cantidad de fármaco.

En cuanto al rendimiento de producción de cápsulas, se observa que en el proceso de producción de microcápsulas no hubo muchas pérdidas al momento de recolectar el producto con respecto a PL, mientras que en PDL hubo más pérdidas, posiblemente a microcápsulas adheridas a las paletas del agitador, que no fueron removidas eficientemente.

VI.2.4 Perfil de liberación de CX por degradación de las microcápsulas. Ensayo *in vitro* en PBS

En los **gráficos 5 y 6** se muestra el perfil de liberación de CX en solución acuosa de PBS a 37 °C de cada homopolímero:

Perfil de liberación de CX desde PDL en PBS

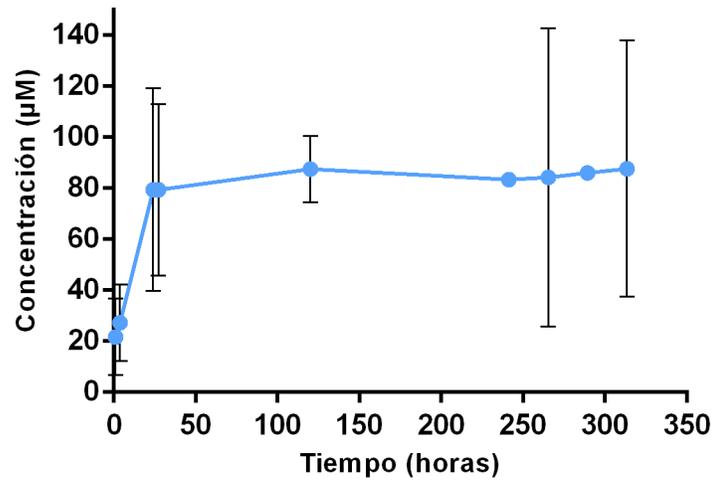


Gráfico 5. Perfil de liberación de CX desde 2 mg de microcápsulas de PDL en PBS a 37°.

Perfil de liberación de CX de PL en PBS

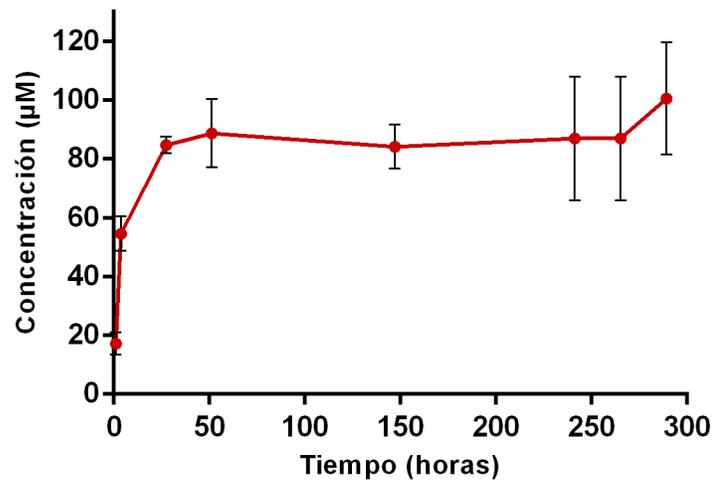


Gráfico 6. Perfil de liberación de CX desde 2 mg de microcápsulas de PL en PBS a 37°.

Para ambos perfiles, se observó una liberación de fármaco bifásica, lo cual implica una primera fase con un aumento de concentración de medicamento en el primer día para PDL, y PL. Este proceso se conoce como efecto burst o de estallido inicial, el cual se atribuye a la cantidad de fármaco que queda adherido a la superficie externa de la microcápsula y al que se encuentra internamente más cerca de la superficie, que es expulsado con mayor rapidez al entrar en contacto con un medio acuoso; una vez que se generan las primeras erosiones, comienza una estabilización en las curvas, segunda fase, donde la concentración de fármaco se libera de manera más controlada desde la matriz; en esta fase ya la expulsión del medicamento es por difusión a través de las porosidades de la microcápsula.

Se observó, además, en modo general, para ambos polímeros un perfil de liberación bastante similar. Durante el efecto burst (primer día) la concentración liberada promedio para PDL fue $79,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ representando casi el 90,8 % del fármaco total dispensado (tomando en cuenta el error asociado de las concentraciones). A partir del segundo día en adelante, en la segunda fase de liberación, ya esta concentración es más controlada a pesar de los ascensos y descensos moderados que posee. En el caso de las microcápsulas de PL, durante su efecto burst (primer día) la concentración promedio de CX liberada fue $85 \pm 3 \mu\text{M}$ lo cual representa un 85 % del fármaco dispensado con respecto a la cantidad máxima liberada por el dispositivo. Comparando estos porcentajes se puede atribuir que la mayor cantidad de fármaco liberado por PDL se debe a su fácil degradación con el medio acuoso con respecto a PL.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las micrografías de las microcápsulas con fármaco por MEB, se puede explicar el modo de dispensación del fármaco en un medio acuoso, en este caso buffer de fosfato a 37°C , conforme a la construcción interna y externa de los dispositivos que reservan el CX. La distribución del fármaco en cada dispositivo permite describir el comportamiento de la liberación en solución, mediante las siguientes hipótesis: Evaluando las microcápsulas tipo cáscara, se puede decir que una vez que ocurre la erosión de la superficie comienza a difundirse el fármaco a través

de los poros (que también fueron observados con la superficie rugosa), asumiendo que la mayor concentración se encontraba reservada en el centro del dispositivo; no obstante, es posible que en estos poros haya habido fármaco encapsulado y al estar más expuestos a la superficie se produjo también una expulsión de medicamento contribuyendo al efecto burst observado en el perfil de liberación. Este tipo de difusión sería mucho más rápida en contraste con los dispositivos con estructura interna tipo panel, donde se produce una liberación gradual; a medida que se erosiona un poro se libera el contenido de droga reservado y luego cuando se erosiona el otro poro comienza a liberarse más fármaco. Esto permite una liberación sostenida más moderada y prolongada, pero si se toma en cuenta que el tamaño de estos poros no es homogéneo (según las micrografías observadas), se infiere que la concentración es variable, lo cual se adjudica a las pequeñas variaciones mostradas en las curvas del perfil de liberación. Debido a que el perfil de liberación para ambos polímeros es similar, se infiere que estadísticamente la mayoría de las cápsulas PDL poseen una estructura interna tipo reservorio, de acuerdo al comportamiento mostrado, ya que los estudios realizados por **Román y China en 2005** ^[38] (**figura 48**), muestran un perfil de liberación bifásico de este tipo para microcápsulas tipo reservorio, cuyo modelo matemático de Higuchi, permitió corroborar esta hipótesis (de acuerdo al factor de correlación, R^2).

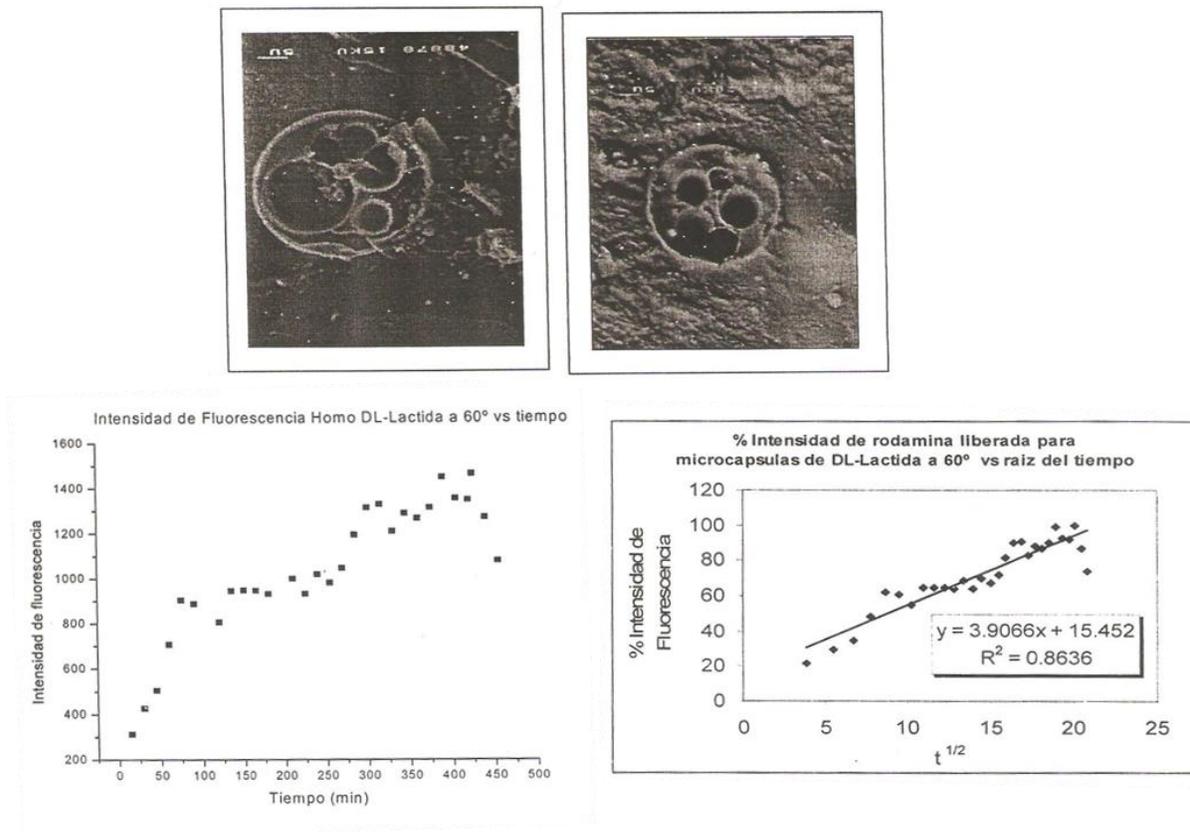


Figura 48. Micrografías de microcápsulas, estructura interna (superior). Perfil de liberación de PDL (izquierda). Ajuste lineal del modelo de Higuchi (derecha) ^[38].

A grosso modo, ambas construcciones de microcápsulas permitieron una difusión del medicamento de forma sostenida y moderada. A pesar, de que PL tiene una degradación más lenta, no impide que los dispositivos contruidos por este polímero tengan perfiles de liberación controlados, y sea un buen candidato para emplearlo en tratamientos en humanos, sin embargo, debe tomarse en cuenta el tiempo en que duraría en el medio fisiológico, ya que posiblemente una vez que libera todo el medicamento lo ideal es que se deseche lo más rápido posible del organismo, claro está que esto depende de los requerimientos clínicos; por otro lado microcápsulas de PDL tienen características de un dispositivo ideal con liberación controlada y rápida

degradación (para efectos clínicos), no obstante, es importante mencionar que estos comportamientos observados fueron en condiciones *in vitro*. Al realizar ensayos *in vivo* el comportamiento podría cambiar.

VI.2.5 Perfil de liberación de CX por degradación de las microcápsulas. Ensayo *in vitro* en medio LIT

El perfil de liberación en medio LIT fue evaluado, debido a que este es el medio de cultivo donde se estudiaría el efecto parasiticida del CX contenido en las microcápsulas, por lo cual este ensayo permitiría verificar el comportamiento de liberación de fármaco en el mismo medio (añadiendo los parásitos) a 29 °C y pH 7.2 (semejante a la temperatura interna del insecto vector transmisor de Leishmaniasis). A continuación, el **gráfico 7** muestra el perfil de liberación en medio de cultivo a las condiciones ya mencionadas:

Perfiles de liberación de CX desde microcápsulas de PDL y PL en medio LIT

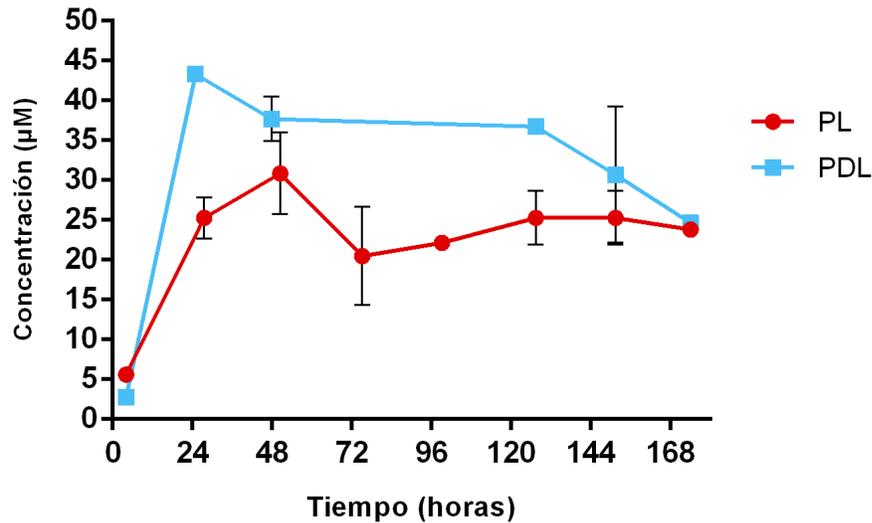
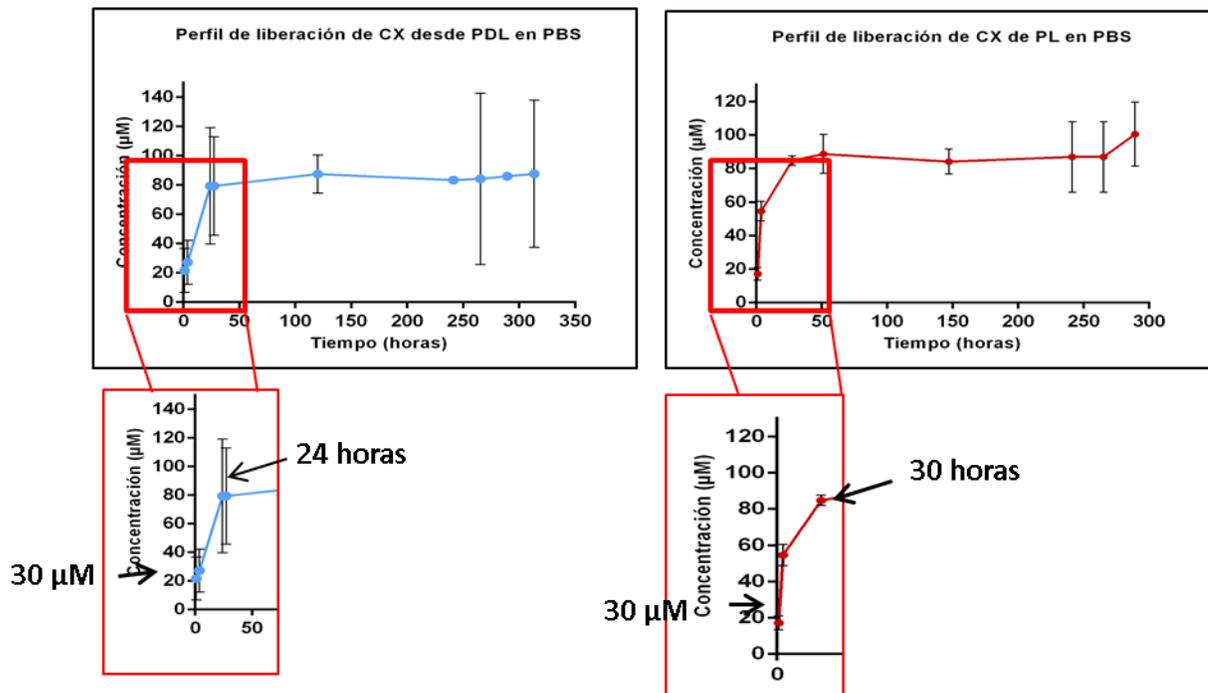


Gráfico 7. Perfil de liberación de CX desde 1,68 mg de microcápsulas de PDL y 2,8 mg de microcápsulas de PL en medio LIT a 29° C.

En ambos perfiles de liberación se nota un patrón similar al observado en los ensayos en PBS a 37°C (liberación bifásica), comportándose, ambos resultados de los dos ensayos, con el perfil deseado que debe tener un dispositivo de liberación controlada. Se observa que, la liberación de CX los primeros días fue un tanto más controlada para las microcápsulas de PL mientras que en el caso de PDL, el efecto burst siguió siendo más significativo. La concentración alcanzada por los dispositivos de PL los 2 primeros días fue $30 \pm 5 \mu\text{M}$, concentración usada como control en el ensayo de la curva de crecimiento, esto demuestra además que efectivamente el dispositivo es capaz de liberar una concentración deseada de acuerdo al sistema de trabajo (y a una cantidad de microcápsulas). Sin embargo, se observan ascensos y descensos moderados de la concentración, atribuidos a errores operacionales propiamente de las mediciones, ya que la tendencia de la curva es una segunda fase de liberación más controlada. En el

caso de PDL la concentración de CX liberada durante los primeros 2 días alcanzó una liberación de CX de casi $43 \pm 14 \mu\text{M}$, mientras que luego hubo un descenso de la concentración, que puede atribuirse también al error asociado con las medidas; la mayor concentración liberada por este dispositivo se adjudica también a que su degradación hidrolítica es mayor que la de PL.

En modo general, la liberación parece ser más controlada con respecto al ensayo en PBS a 37°C , esto se adjudica a la temperatura a la cual se evaluó el ensayo, ya que este parámetro es importante (degradación más lenta), y al hecho de que este estudio se realizó en condiciones diferentes. En los perfiles a 37°C en PBS se observa que en menos de 24 horas ambos dispositivos liberaron aproximadamente los $30 \mu\text{M}$, mientras que a 29°C en medio LIT se liberó esta concentración a 48 horas de exposición en el medio para PL y a las 24 horas para PDL. A continuación se muestra en la **figura 50** una comparación gráfica:



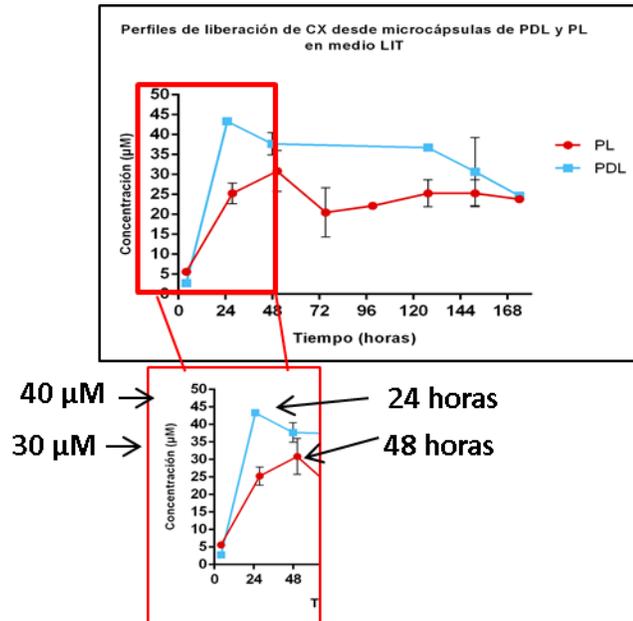


Figura 49. Concentración liberada por las microcápsulas en el primer día de exposición en PBS a 37°C (superior).
Concentración liberada por las microcápsulas en el primer día de exposición en medio LIT a 29°C (inferior).

VI.2.6 Determinación de la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en presencia de microcápsulas cargadas con CX mediante conteos directos. Curva de crecimiento

De acuerdo al perfil de liberación en medio LIT mostrado por las microcápsulas, se procedió a evaluar el efecto parasiticida del CX dispensado por las mismas sobre promastigotes de *L. braziliensis*. A continuación en el **gráfico 8** se muestra el resultado de los conteos realizados para este ensayo:

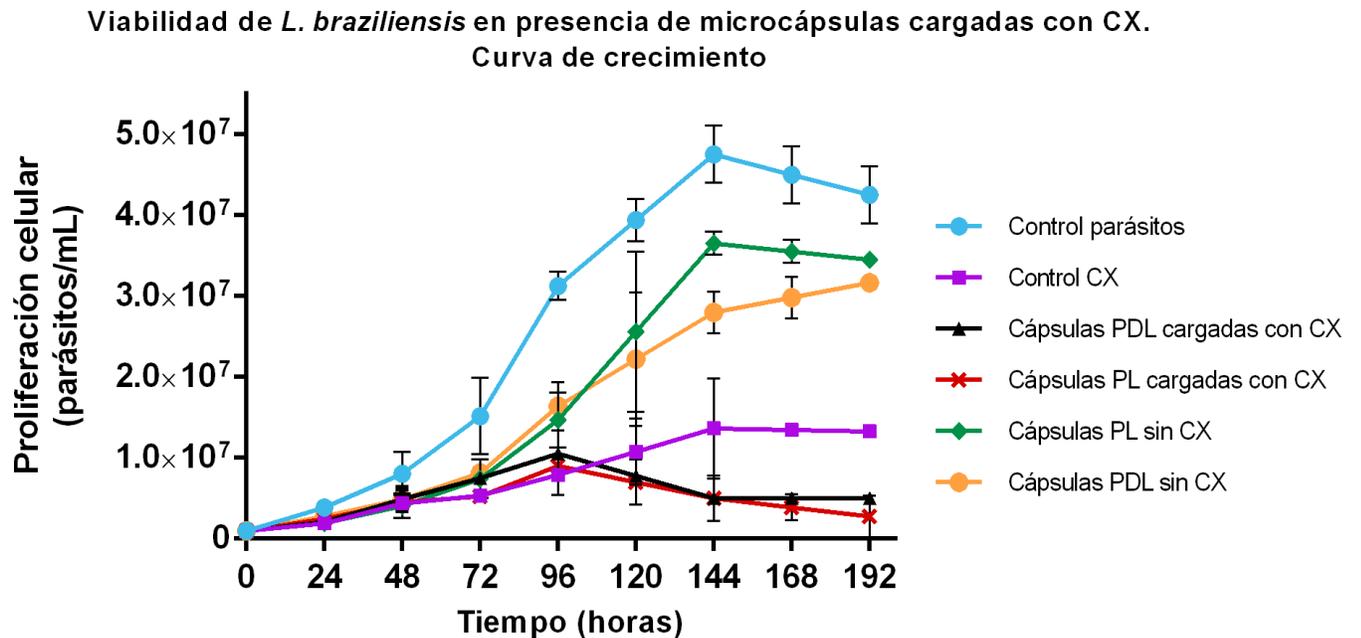


Gráfico 8. Curva de crecimiento de *L. braziliensis* en presencia de microcápsulas con CX.

Se visualiza en la curva de control de parásitos (sin presión selectiva), un crecimiento en fase exponencial durante 7 días, lo cual en comparación con la curva de control de CX y de las microcápsulas con fármaco, muestra que los parásitos se encontraban en óptimas condiciones biológicas para replicarse naturalmente. Transcurrido este tiempo, observamos una fase estacionaria propia de sistemas con baja disponibilidad de nutrientes. Las curvas de control de CX y de microcápsulas con fármaco, mostraron un efecto parasiticida (momentáneo en el caso del control CX), lo cual ejerció una presión selectiva sobre los parásitos causando su muerte durante las primeras etapas del ensayo. Sin embargo en el control CX a los 6 días de experimento se observa un crecimiento moderado de los parásitos, en respuesta a una supervivencia de los mismos que los llevó a sobreponerse de la presión ejercida por el fármaco. Esto se aprecia justo a las 120 horas de ensayo donde los parásitos expuestos a CX proliferan, mientras que aquellos expuestos a microcápsulas con fármaco, disminuyen su

proliferación de manera notable. Una posible justificación para esta diferencia en ambas condiciones es la siguiente: El crecimiento de los parásitos que ocurre después de un tiempo determinado con la dosis de fármaco directa, puede deberse a un consumo del medicamento en presencia de los parásitos, aunque no se siguieron los cambios de concentración de CX a través de espectrofotometría UV-Visible, se podría justificar este consumo debido a la inhibición de enzimas en microorganismos que poseen cofactores metálicos tales como hierro +3 que son quelados por el ciclopirox, ya que como se mencionó en el apartado II.1.5. Se ha reportado que este fármaco posee características de agente quelante ^[27]. En la literatura se demostró que el ciclopirox inhibió una enzima llamada DOHH (desoxihipusina hidroxilasa) sobre parásitos *L. donovani*, la cual culmina la biosíntesis de hipusina (un aminoácido presente en las células eucariotas). El mecanismo de acción que justificó este efecto, fue considerando al CX como agente quelante, ya que esta enzima posee un metal de hierro 2+ en su centro ^[25]. Aunado a ello también se ha alegado que el hierro es vital para todos los parásitos tripanosomátidos (lo cual incluye el género *Leishmania*) y juega un papel significativo en la patogénesis y el control inmune de estos organismos. En este sentido, el agotamiento de este nutriente esencial en los tripanosomátidos disminuye rápidamente la tasa de síntesis de ADN, impidiendo la formación de sustancias vitales en el protozoo, lo que al final lleva consigo la muerte de los mismos ^[64]. Debido a esta justificación, se infiere que añadir una concentración de CX, en este caso de 30 μM , afecta la proliferación parasitaria durante un período temporal, donde luego este efecto se ve disminuido, ya que progresivamente se va consumiendo el medicamento y esto genera más bien un efecto parasitostático, es decir, se inhibe la rápida proliferación de parásitos., logrando así que estos se recuperen lentamente de la presión selectiva. Ahora, en el caso de las microcápsulas con fármaco, se nota un significativo efecto parasiticida. Aun cuando se libera aproximadamente la misma concentración de 30 μM , se consume el fármaco, pero a su vez el dispositivo lo dispensa de manera sostenida, afectando constantemente la viabilidad de los parásitos que se van replicando; esto

demuestra que usar un dispositivo de liberación controlada, es más efectivo que añadir una única dosificación del fármaco directa (todo esto en función de los ensayos *in vitro*).

En cuanto a las microcápsulas sin fármaco, se notó un efecto ligeramente parasiticida. Este mismo efecto fue reportado en el trabajo de **Pesquera, China y Serrano (2017)**^[6] con copolímeros de poli (lactida-co-glicolida), donde infirieron que este efecto se debe a microclimas ácidos o μpH ácidos, localizados en los poros que se generan en las cápsulas, donde están disueltas las especies oligoméricas provenientes de la degradación del polímero^[65], que posiblemente produjo la baja proliferación parasitaria, sin embargo, al medir el pH de los medios en estudio con papel tornasol, no registraron un descenso del pH. Teniendo en consideración esta hipótesis, se podría inferir que una pequeña población de parásitos quedó inmersa en estos poros con estos microclimas ácidos, lo que afectó la viabilidad de los mismos. No obstante, sería pertinente realizar ensayos más específicos que permitan justificar este resultado.

Por otro lado, los productos formados por la hidrólisis que genera la degradación de las microcápsulas, que en este caso son especies oligoméricas o de bajo peso molecular, han mostrado efectos antibacterianos^[66]; a pesar de que se trata de parásitos se infiere que estos productos posiblemente hayan ejercido una presión selectiva sobre ellos, afectando moderadamente su viabilidad.

VII. CONCLUSIÓN

La síntesis por ROP permitió obtener homopolímeros de poli (D,L y L) lactida, con arreglos cristalinos y tacticidades diferentes de acuerdo a la estereoquímica asociada al carbono metínico de los monómeros de lactida, que confirió una estructura y comportamiento diferente de ambos polímeros en los ensayos *in vitro*. También fue posible encapsular el CX con el método de doble emulsión por evaporación de solvente, logrando que los dispositivos lo dispensaran de manera controlada sobre ensayos en medios acuosos a una temperatura determinada. Las microcápsulas lograron dispensar de manera controlada el CX sobre *L. braziliensis*, mostrando un efecto parasiticida efectivo con respecto al CX añadido directamente.

Esto permite ser una alternativa viable para desarrollar ensayos *in vivo* que ayuden a diseñar la forma en que se aplicará el tratamiento sobre las zonas afectadas con estos dispositivos de liberación controlada.

VIII. RECOMENDACIONES

- Se sugiere sintetizar homopolímeros y copolímeros biodegradables con diferentes pesos moleculares modificando las condiciones de reacción por ROP para estudiar sus propiedades físicas y químicas como polímeros y como dispositivos de liberación controlada.
- Se recomienda caracterizar por análisis térmico la cristalinidad de poli (L-lactila) determinando el punto de fusión con un flujo de temperatura menor para garantizar su cristalización. Aunado a ello se sugiere determinar el peso molecular promedio de estos polímeros por Cromatografía de Permeación en Gel.
- Con respecto a la microencapsulación, se recomienda mejorar el proceso de agitación para así poder generar cápsulas con diámetros más pequeños (posiblemente llegar a nanopartículas) y tener una baja polidispersidad.
- Se recomienda evaluar el efecto parasitocida de ciclopirox olamina, y otros fármacos que ya han sido evaluados, integrándolos en microcápsulas de homopolímeros y copolímeros biodegradables sobre el estallido amastigote de *L.braziliensis* en sistemas *in vivo* para poder diseñar la futura aplicación farmacológica sobre pacientes.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Chasin M., Langer R. 1990. Biodegradable polymers as drug delivery systems. Volumen 45. Drug and the pharmaceutical sciences.
- [2] Lopes M., Jardim A., Filho R. 2014. Synthesis and Characterizations of Poly (Lactic Acid) by Ring-Opening Polymerization for Biomedical Applications. *Chem Eng Tra.* **38**: 331-336.
- [3] Mehta R., Kumar V., Bhunia H., Upadhy Ay S. 2005. Synthesis of Poly (Lactic Acid): A Review. *J.M.S. Part C: Polymer Reviews.* **45**: 325-349.
- [4] Asutosh Kumar, P. 2013. Recent advancements of biodegradable polylactic acid/ polylactide: A review on synthesis, characterization and applications. *Adv Mat Let.* Page
- [5] Dr. Tango, Inc. *Leishmaniasis* [en línea]. Medline Plus Información de salud para usted. U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda, Washington, USA. 2016. [Consulta: 25 junio de 2016]. Disponible en: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001386.htm>
- [6] Pesquera, L. 2017. Síntesis y caracterización de microcápsulas de ácido poli-(láctico-co-glicólico). Evaluación de sus propiedades como agente de liberación controlada en la quimioterapia contra la leishmaniasis. Tesis de licenciatura en química, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- [7] *Leishmaniasis* [en línea]. 03/10/2016, modificado. [Consulta: 08-07-2016]. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Leishmaniasis>
- [8] Ungría, C. Parasitología Venezolana. 1960. Volumen 1.
- [9] Díaz Carlos. *Pedro Navarro: Se propaga la leishmaniasis* [en línea]. 6/04/2015. [Consulta: 19/10/2016]. Disponible en: <http://www.larazon.net/2015/04/06/pedro-navarro-se-propaga-la-leishmaniasis/>

- [10] Fundación Jacinto Convit. *Leishmaniasis* [en línea]. [Consulta: 9-10-2016]. Disponible en: <http://www.jacintoconvit.org/es/antecedentes/leishmaniasis/>
- [11] Serrano, M. 2010. Quimioterapia contra la leishmaniasis: estado del arte, retos y nuevas propuestas desde Venezuela. *RET*. **2**: 69-75.
- [12] *Leishmania major* [en línea]. 18/06/2016. [Consulta: 19/10/2016]. Disponible en: https://en.wikipedia.org/wiki/Leishmania_major
- [13] Ramírez, I. et al. 2012. In vitro evaluation of new terpenoid derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **107**. **13**
- [14] Sanjay Negi. *Kala Agar Leishmaniasis* [en línea]. Diapositiva 23. 30/01/2014. [Consulta: 19/10/2016]. Disponible en: <http://www.slideshare.net/SanjayNegi4/dr-sanjay-s-negi-leishmaniasis>
- [15] García AlmagroDomingo. *Leishmaniasis cutánea* [en línea]. [Consulta: 28/09/2016]. Disponible en: <http://www.actasdermo.org/es/leishmaniasis-cutanea/articulo/13071104/>
- [16] *Control de enfermedades transmitidas por vectores* [en línea]. [Consulta: 28/09/2016]. Disponible en: http://instituciones.msp.gob.ec/dps/pastaza/index.php?option=com_content&view=article&id=17&Itemid=99
- [17] Robles Ivana. *Leishmaniasis visceral* [en línea]. [Consulta: 19/10/2016]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos109/la-leishmaniasis-visceral/la-leishmaniasis-visceral.shtml>
- [18] *Leishmania spp* [en línea]. [Consulta: 11/11/2016]. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Databio. 23-09-2012.DB-P-L.spp-12. Disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Parasitos/Ficha%20Leishmania%20spp.pdf>

- [19] Jiménez Mariló. *Parásitos intracelulares estrictos: genoma y estructura* [en línea]. [Consulta: 11/11/2016]. 03-03-2016. Disponible en: <http://microbiologiaudg1516.blogspot.com/2016/03/parasitos-intracelulares-estrictos.html>
- [20] Ponte, A., Díaz, E., Padrón, M. 2013. Drug Resistance in Leishmania Parasites. Springer, Caracas, Venezuela.
- [21] Academia Biomédica Digital. *Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio resistencia en Leishmania* [en línea]. [Consulta: 10/05/2018]. Enero-Marzo 2016. Disponible en: http://vitae.ucv.ve/index_pdf.php?module=articulo_pdf&n=1165&rv=39
- [22] Ciclopirox olamina. Ficha de Datos de Seguridad. Acofarma. [en línea]. Disponible en: <http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/1544-6c9332809962cdc3a09182d32ae4b9d0fbbe05aa/main/files/Ciclopiroxolamina.pdf>
- [23] Stanier, R. 1992. Microbiología. Pág. 155. Editorial Reverté, Segunda edición, España
- [24] Gómez-Moyano, E. et al. 2015. Estudio fase III de la seguridad y la eficacia de ciclopirox olamina crema en niños afectados de dermatomicosis. Rev. Iberoam. Micol. 32: 164-169.
- [25] Chawla B. et al. 2012. A Unique Modification of the Eukaryotic Initiation Factor 5A Shows the Presence of the Complete Hypusine Pathway in Leishmania donovani. **Plos One. 7(3):** 1-12.
- [26] Roberts C., et al. 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa». *Mol. Biochem. Parasitol.* **126 (2):** 129-42.

- [27] Subissi A., et al. 2010. Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. *US Nat Lib of Med Nat Ins. of He.* **70(16)**:2133-52
- [28] Ferrer Internacional S.A. *Safety Study of Ciclopirox Olamine Cream for Dermatomycoses in Children.* [en línea]. [Consulta: 25/02/2018]. 20/07/2012. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01646580>
- [29] Billmeyer F. 2004. *Ciencia de los polímeros.* Editorial Reverté
- [30] Tian, H., et al. 2012. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Prog. Poly. Sci.***37**: 237-280
- [31] Cepero J., Ríos M. 2004. *Bioética en la introducción de los biomateriales implantables a la práctica médica.* Bioética
- [32] *PLGA-PEG Block Copolymers for Drug Formulations* [en línea]. 27/03/2008. [Consulta: 11/10/2016]. Disponible en: <http://www.drug-dev.com/Main/Back-Issues/PLGAPEG-Block-Copolymers-for-Drug-Formulations-406.aspx>
- [33] Escobar, J. 2008. *Síntesis, caracterización y aplicaciones biomédicas de redes de copolímeros basados en poliésteres.* Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- [34] Armas, A. 2014. *Síntesis de poliésteres biodegradables derivados del ácido tereftálico y ácido adípico con 1,4-butanodiol.* Tesis de licenciatura en química, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- [35] Garlotta, R. 2002. A literature review of poly (lactic acid). *Jour. Of Poly. And the env.* **9**: 63-84.
- [36] *Polimerización del ácido láctico* [en línea]. [Consulta: 9/11/2016]. Disponible en: <http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/monica/Polimerizacion.htm>

[37] Mehta, R. 2005. Synthesis of poly (lactic acid): A review. *Jour. Of Macro. Sci.* 45: 325-349.

[38] Román, M. 2005. Estudio de la velocidad de liberación de sustancias encapsuladas y caracterización morfológica de sistemas poliméricos biodegradables utilizando técnicas de UV y fluorescencia laser confocal. Tesis de licenciatura en química, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

[39] Uhrich, K. 1999. Polymeric systems controlled drug release. *Chem. Rev.* **99**:3181-3198.

[40] Rojas M., Vallejo B., Perilla J. 2008. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. *Rev. Ing. Inv.* 28: 57-71

[41] Iborra, M. 2008. Desarrollo galénico de preparados obtenidos por interacción del ácido 5-amino salicílico. Tesis doctoral en química, Universidad de Granada, Granada, España

[42] O'Donnell, P., McGinity, J. 1997. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adva. Drug. Deli. Rev.* **28**: 25-42.

[43] Liu, R. et al. 2005. Influence of process parameters on the size distribution of PLA microcapsules prepared by combining membrane emulsification technique and double emulsion-solvent evaporation method. *Collo. And Surf. B: Bioint.***45**: 144-153.

[44] Lee, B., Yun, Y., Park, K. 2016. PLA micro- and nano-particles. *Advan. Drug Deli. Rev.* Pág.: 9.

[45] Martínez Palau. *Ensayos de biocompatibilidad in vitro* [en línea]. Pág. 7. [Consulta: 19/10/2016]. Disponible en:

http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6467/02_martinezPalau_capitol_1.pdf;sequence=2

- [46] Wu, J. et al. 2014. Uniform-sized particles in biomedical field prepared by membrane emulsification technique. *Chem. Eng. Sci.* Pág.: 1-13.
- [47] Polard, E. et al. 1996. In vitro and in vivo evaluation of polylactide and polylactide-co-glicolide microspheres of morphine for site-specific delivery. *Int. Jour. Pharm.* **134**: 37-46.
- [48] Panyam, J. et al. 2003. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly (D, L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *Jour. Contr. Rele.* **92**: 173-187.
- [49] Porjazoska, A. 2004. Poly (lactide-co-glicolide) microparticles as systems for controlled release of proteins- Preparation and characterization. *Acta pharm.* **54**: 215-229.
- [50] Anugraha, G. et al. 2015. Biodegradable poly-L-lactide based microparticles as controlled release delivery system for filarial vaccine candidate antigens. *Euro. Jour. Pharm.***747**: 174-180.
- [51] Dalmolin, L. et al. 2016. Delivery of vanillin by poly (lactic-acid) nanoparticles: Development, characterization and in vitro evaluation of antioxidant activity. *Mat. Sci. Eng. C.***62**: 1-8.
- [52] Serrano, X. et al. 2005. Evaluación de drogas en *Leishmania* sp. : Estudios genéticos y moleculares de nuevos blancos. Estudios in vitro en in vivo de la resistencia a drogas. *Mem. Inst. Bio. Exp.* **4**: 117-120.

- [53] Morgado, M. 2006. Estudio de la inhibición de (MAO) por deprenilo mediante el uso de polímeros biodegradables como agentes de liberación controlada. Tesis de licenciatura en química, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- [54] Polymer Data Handbook. 1999. Oxford University Press, inc. Pag.: 629
- [55] Vyslouzil, J. et al. 2014. Influence of different formulations and process parameters during the preparation of drug-loaded PLGA microspheres evaluated by multivariate data analysis. *Org. Resech. Pap.* **64**:403-417
- [56] Pretsch E. 2009. Structure Determination of Organic Compounds. 4ta Edición
- [57] Espectro RMN-¹³C de 1-dodecanol [en línea]. Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. AIST. [consulta: 21-04-2018]. Disponible en: sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top_cgji
- [58] Bero M., et al. 1990. Coordination polymerization of lactides, 1, structure determination of obtained polymers. *Makromol Chem.* **191**:2287-2296
- [59] Azevedo H., Reis R. 2005. Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation. *CRC Press LLC.* 178-202.
- [60] Hideto, T., Yoshito E. 1998. Blends of Crystalline and Amorphous Poly(lactide). III. Hydrolysis of Solution-cast Blend Films. *Jour App Poly Sci.* **63**:855-863 58
- [61] Hyon S., et. al. 1997. Effects of Residual Monomer on the Degradation of DL-Lactide Polymer. *Poly Int.* **46**: 196-202
- [62] Martins K. et al. 2014. Preparation and Characterization of Paclitaxel-loaded PLDLA Microspheres. *Mat Resech.*

[63] Jyotsana R. et al. 2013. Formulation and evaluation of microspheres containing ropinirole hydrochloride using biodegradable polymers. *Asian Jour Pharm.*

[64] Santos A., et al. 2012. Antimicrobial Action of Chelating Agents: Repercussions on the Microorganism. *Curr Med Chem.* **19**: 1-23.

[65] Ding A., et al. 2006. Prediction of microclimate pH in poly(lactic-co-glycolic acid) films. *J Am Chem Soc.* **128**: 5384-5390

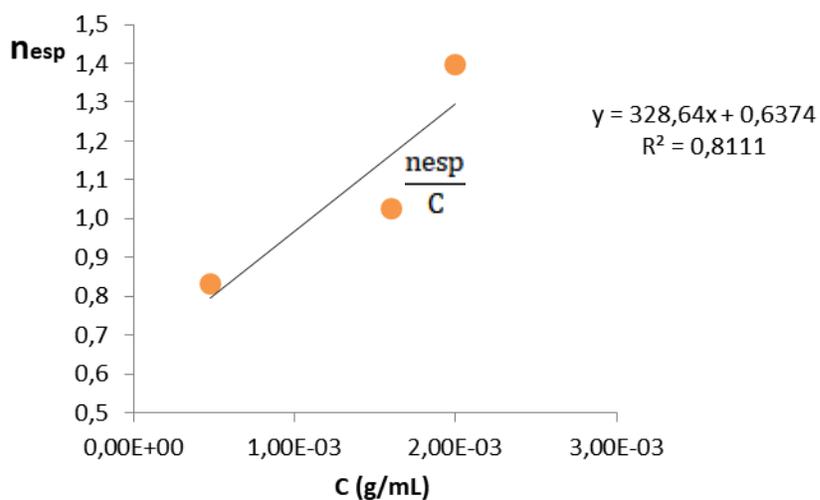
[66] Batcheller G., et al. 2007. Use of oligomers of lactic acid in the treatment of gynaecological disorders. *Google Patents.*

X. APÉNDICE

1- Viscosidad intrínseca de poli (L-lactida) en cloroformo a 25 °C

$$\eta_{\text{esp}} = \frac{t_n - t_0}{t_0}$$

Viscosidad intrínseca de PL en cloroformo



Cálculo de Mv:

$$\eta_i = 0,6374 \text{ mL/g}$$

$$\eta_i = kMv^a$$

$$\text{Log}(\eta_i) = \text{Log}(k) + a\text{Log}(Mv)$$

$$\text{Log}\left(\frac{\eta_i}{k}\right) = a\text{Log}(Mv)$$

$$\text{Log}\left(\frac{0,6374}{0,00248}\right) = 0,77\text{Log}(Mv)$$

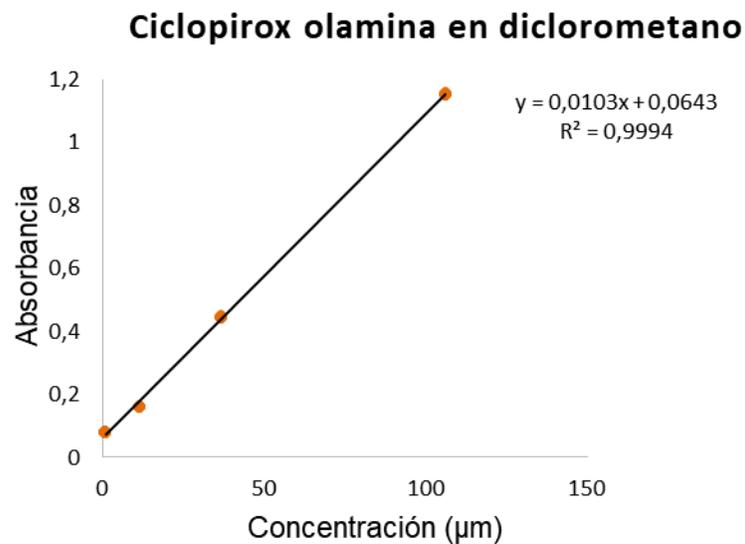
$$\frac{2,41}{0,77} = \text{Log}(Mv)$$

$$Mv = 10^{3,13}$$

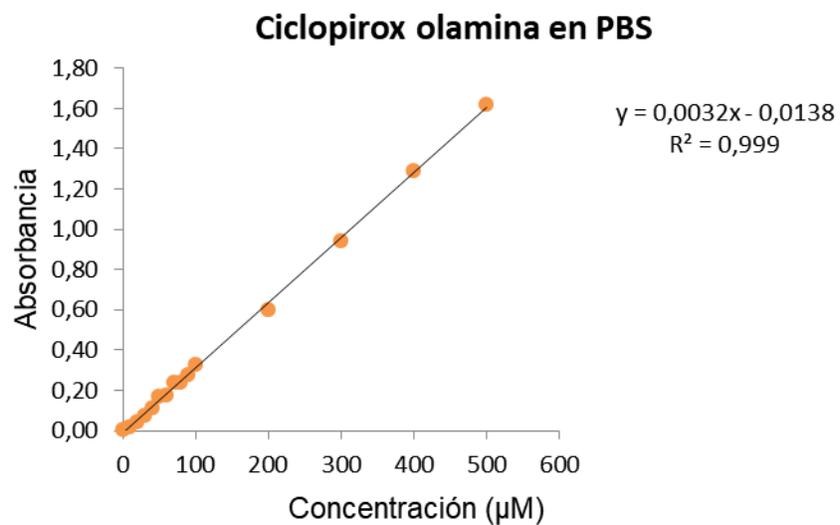
$$Mv = 1348,40 \text{ g/mol}$$

XI. ANEXOS

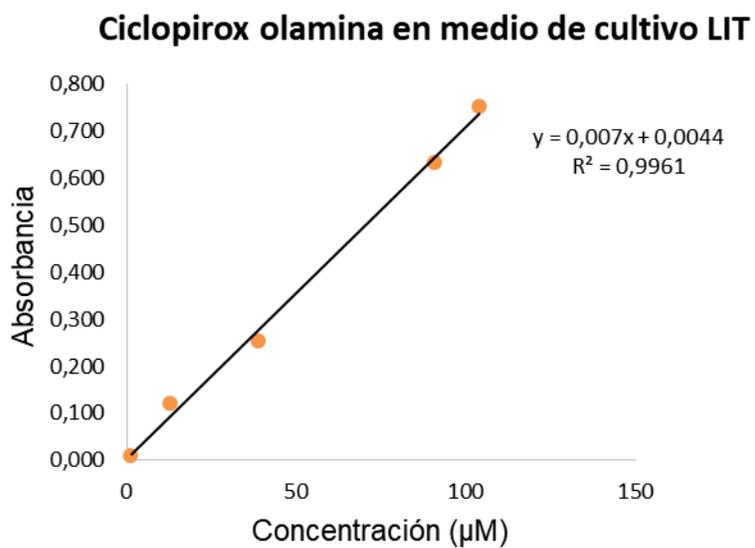
1- Curva de calibración de ciclopirox olamina en diclorometano



2- Curva de calibración de ciclopirox olamina en buffer de fosfato (PBS)



3- Curva de calibración de ciclopirox olamina en medio de cultivo LIT



4- Termograma de DSC de poli (L-lactida)

