

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

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.

*Trabajo Especial de Grado presentado
ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela por el **Br. Luis Antonio
Pesquera Lorenzo**, para optar al título
de Licenciado en Química.*

Tutores:

Dr. Carlos Chinaa

Dr. Xenón Serrano-Martín

Caracas, abril de 2017

**DEL EXAMEN PÚBLICO DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL
BACHILLER LUIS ANTONIO PESQUERA LORENZO**

Los abajo firmantes, designados por la Universidad Central de Venezuela como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“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”** presentado por el Br. Luis Antonio Pesquera Lorenzo, C.I: 20.801.574, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por el título de Licenciado en Química.



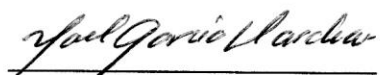
Dr. Carlos China
Tutor



Dr. Xenón Serrano-Martín
Tutor



Dra. María Rodríguez
Jurado



Dra. Yael García
Jurado

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, artífice de todas las bendiciones de mi vida, a quien agradezco me haya puesto este retador y maravilloso proyecto enfrente, y me haya dado las herramientas para confrontarlo y, más que eso, amarlo.

En materia familiar: a mi madre, Maribel Lorenzo, a quien debo, además de la vida misma, un compendio de valores que desde la más tierna niñez me inculcó, valores que incluyen la perseverancia, sin la que jamás habría podido transitar (y concluir) esta senda. A mi padre, Juan Carlos Pesquera, pilar fundamental que, de la mano con mi madre, es mucho más que un mero artífice de mi vida; dedicarles estas líneas me recuerda lo inusitadamente afortunado que soy de que justo ellos me hayan tocado como padres. A la memoria de mi abuelo, Antolín Pesquera, cuyo espíritu emprendedor e infatigable mística en todo lo que hizo en su vida tiene mucho que ver con lo que soy hoy en día, y me gusta pensar que, de haber heredado apenas un cuarto de sus arrestos, tendré un gran futuro por delante. A mi abuela, Consuelo Fernández, a quien admiro profundamente por su inteligencia, reciedumbre, fortaleza y tesón; estoy muy agradecido con la vida por haberme permitido tener a mi viejita conmigo en este sublime momento. A mi hermano, Juan Carlos Pesquera, así como al resto de mi familia residente tanto en el país como en el extranjero; sé que se alegran tanto o incluso más que yo por este cierre de ciclo en mi vida.

En materia académica: a mis tutores: el Dr. Carlos Chinaea, por haberme permitido participar de este proyecto, su guía constante, su paciencia ante mis errores (y horrores) y su confianza. El Dr. Xenón Serrano-Martín, por no reparar jamás en criticar la más mínima carencia de excelencia, pero honrar lo que honor merece con la misma elocuencia. A mis jurados: la Dra. María Rodríguez, a la cual le agradezco el empuje que me infundió a través de aquellos discursos motivacionales en sus clases, y

la Dra. Yael García, quien en muchos momentos fungió prácticamente como una tutora más. Es imperativo, además, mencionar y agradecer a quienes me ayudaron en la obtención y, en algunos casos, análisis de resultados: el prof. Pierre Embaid y el TSU Jorge Terán por facilitarme nitrógeno líquido, la prof. María Rodríguez y el Lic. Elvis Ramos por proveerme éter dietílico, el prof. Juan Álvarez por prestarme su agitador mecánico, el prof. Daniel Martínez por permitirme emplear su agitador ultrasónico y su espectrofotómetro UV-Visible, la prof. Lola De Lima por realizarme las caracterizaciones de FT-IR y ^1H RMN de los polímeros, el prof. Jimmy Castillo por permitirme utilizar su microscopio de luz blanca, a varios integrantes del Centro de Microscopía Electrónica (las investigadoras Natalia Ortega y Nayarik Herrera, y muy especialmente al prof. Luis Errico y a la prof. Caribay Urbina) por ayudarme en la caracterización morfológica de las microcápsulas, a los integrantes del grupo ByQPAT de la Fundación IDEA (los investigadores Alí Mijoba, Samuel Alfonso, Jacques Leañez y Jorge Núñez) por brindarme su exhaustiva ayuda en un campo hasta ese momento completamente desconocido para mí como es el trabajo en parasitología, a las investigadoras Josnell Moret y Eucaris Jiménez por permitirme utilizar sus lectores de ELISA y, finalmente, a Luis Piña, por su invaluable ayuda con los gráficos MTT. Debo, además, agradecer a mis jefes del Instituto de Ciencias de la Tierra, los profesores Santiago Marrero, Williams Meléndez y Ramón Montero, por su paciencia y comprensión con mis ausencias laborales en el transcurso de la parte experimental.

Hago extensivo mi agradecimiento a todos los amigos y compañeros, tanto de la carrera como externos, que me acompañaron en esta senda, y a los profesores que en mis estudios de primaria y bachillerato me inculcaron método de estudio y ganas de progresar. A todos ustedes, Dios les bendiga.

Por último ¿por qué no? Quiero mencionar a mis gatitas Sofy, Perla y Terra, esos pequeños seres que me alegran hasta el más gris de los días sin siquiera tener noción de ello (que nosotros sepamos).

RESUMEN

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad parasitaria tropical caracterizada mayoritariamente por el surgimiento de lesiones dérmicas como foco de la infección. Siendo una enfermedad notablemente insidiosa en Venezuela, y aceptando que el campo de las vacunas leishmanicidas es, aun hoy, de escaso desarrollo, la estrategia para hacer frente al problema debe recaer en la quimioterapia; sin embargo, la baja eficacia de las drogas leishmanicidas actuales y su tradicional administración vía parenteral obligan al suministros de múltiples dosis de las mismas, contribuyendo a su ya naturalmente alta toxicidad. Lo recién expuesto deja claro la imperiosa demanda tanto de nuevas y mejores drogas leishmanicidas como de mejoramiento de su método de administración.

En función al problema descrito, esta investigación plantea la incorporación de la tecnología de dispositivos de liberación controlada de sustancias para coadyuvar al aumento de la especificidad de acción y la disminución de la cantidad y frecuencia de dosificación del fármaco mediante la administración localizada y constante de éste de manera tópica, comprendiendo además la experimentación con ciclopirox olamina, un antifúngico comercial de demostrada acción parasitocida y baja toxicidad. El dispositivo de liberación controlada consistió en microcápsulas preparadas a partir de ácido poli (láctico-co-glicólico), un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico que, gracias a sus características biocompatibles, biodegradables y de vulnerabilidad en ambientes acuosos (y, por ende, fisiológicos), ha sido objeto de estudio en estas aplicaciones desde hace más de 50 años.

La primera fase experimental comprendió la síntesis por policondensación directa del copolímero a partir de mezclas del racemato de ácido d,l-láctico y ácido glicólico en proporción másica de 90:10, aunque finalmente se debió operar bajo la estrategia de síntesis por apertura de anillos de d,l-lactida y glicolida (dímeros cíclicos del ácido

láctico y el ácido glicólico, respectivamente) en masa, modificando también las proporciones másicas de las especies de partida entre 99:1 y 95:5, respectivamente. Obtenidos y caracterizados los copolímeros, se elaboraron las cápsulas de liberación controlada para cada composición polimérica bajo la metodología de doble emulsión y evaporación de solvente, sometiendo, primeramente, cápsulas vacías a condiciones fisiológicas emuladas y avistando que, tras 50 días, su destrucción hidrolítica se había completado; por otro lado, las micropartículas en cuyo interior había sido encapsulado el ciclopirox olamina se incubaron en buffer de fosfato y en medio LIT (medio para el desarrollo de parásitos *in vitro*) para determinar el patrón de liberación de la droga en tales medios, eligiendo el dispositivo que demostró mejores prestaciones de cara a la evaluación del efecto tanto parasiticida y citotóxico (para células inmunológicas conocidas como macrófagos) del medicamento expelido en condiciones *in vitro*. Como resultado de estos ensayos, una afectación notable de la población parasitaria se evidenció de 20 μM en adelante, mientras que, para los macrófagos, se verificó destrucción celular en todas las concentraciones ensayadas, las cuales, atendiendo al planteamiento de evaluar el comportamiento de las células ante concentraciones elevadas de ciclopirox (condiciones de sobredosis respecto a la necesaria para afectar a los parásitos), se encontraron en todo momento por encima de 100 μM .

Palabras claves: polímeros biocompatibles, leishmaniasis, ácido láctico, ácido glicólico, ciclopirox olamina.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|------------|
| LISTA DE TABLAS..... | I |
| LISTA DE GRÁFICOS..... | II |
| LISTA DE FIGURAS..... | III-VI |
| 1.- INTRODUCCIÓN..... | 1-3 |
| 2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | |
| 2.1.-Leishmaniasis..... | 4-9 |
| 2.2.- Ciclopirox olamina..... | 9-11 |
| 2.3.- Breve introducción a los polímeros biocompatibles, la tecnología de microencapsulación y las microcápsulas..... | 11-14 |
| 2.4.- Métodos de preparación de polímeros..... | 14-23 |
| 2.5.- Métodos de preparación de microcápsulas..... | 23-25 |
| 2.6.- Características de las microcápsulas..... | 25-30 |
| 2.7.- Microcápsulas de ácido poli (láctico-co-glicólico)..... | 30-34 |
| 2.8.- Modelos matemáticos..... | 34-35 |
| 3.- OBJETIVOS | |
| 3.1.- Objetivo general..... | 36 |
| 3.2.- Objetivos específicos..... | 36 |
| 4.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL | |
| 4.1.- Reactivos, medios y/o solventes y equipos..... | 37-39 |
| 4.2.- Secado de solventes empleados en las síntesis del tetrabutóxido de titanio y de los PLGA. | |
| 4.2.1.- Secado del <i>m</i> -xileno y el éter dietílico..... | 39 |
| 4.2.2.- Secado del n-butanol..... | 39 |

| | |
|---|--------------|
| 4.3.- Síntesis y caracterización del tetrabutóxido de titanio y de los PLGA. | |
| 4.3.1.- Síntesis del tetrabutóxido de titanio de los PLGA..... | 40-41 |
| 4.3.2.- Síntesis de PLGA por policondensación directa en solución..... | 41-42 |
| 4.3.3.- Síntesis de PLGA por polimerización por apertura de anillo en masa..... | 43-44 |
| 4.4.- Elaboración y caracterización de microcápsulas. | |
| 4.4.1.- Elaboración de microcápsulas vacías..... | 45-46 |
| 4.4.2.- Elaboración de microcápsulas en con fármaco..... | 46-47 |
| 4.4.3.- Evaluación del tiempo de descomposición de las microcápsulas en condiciones fisiológicas emuladas..... | 48 |
| 4.4.4.- Determinación de la cantidad de fármaco asociado en las microcápsulas..... | 48-49 |
| 4.5.- Determinación de la cinética de liberación del ciclopirox desde las cápsulas. | |
| 4.5.1.- Cinética preliminar de liberación del ciclopirox en buffer de fosfato..... | 50-51 |
| 4.5.2.- Cinética de liberación del ciclopirox en medio LIT..... | 51 |
| 4.6.- Determinación de viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i>. | |
| 4.6.1.- Viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en presencia de fármaco Cx mediante ensayo colorimétrico..... | 52-53 |
| 4.6.2.- Viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en presencia de microcápsulas con ciclopirox olamina mediante conteos directos..... | 54 |
| 4.7.- Estudio de la citotoxicidad del ciclopirox olamina en macrófagos BMDM..... | 54-56 |
| | |
| 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN | |
| 5.1.- Síntesis y caracterización de los PLGA..... | 57-58 |
| 5.1.1.- Síntesis y caracterización de PLGA por policondensación directa en solución..... | 59-64 |

| | |
|--|---------|
| 5.1.2.- Síntesis y caracterización de PLGA por apertura de anillo en masa..... | 64-73 |
| 5.2.- Elaboración y caracterización de microcápsulas en ausencia y presencia de fármaco. | |
| 5.2.1.- Microcápsulas en ausencia de fármaco. | |
| 5.2.1.1.- Caracterización morfológica..... | 74-75 |
| 5.2.1.2.- Distribución de tamaño..... | 75-76 |
| 5.2.1.3.- Evaluación del tiempo de descomposición de las microcápsulas en condiciones fisiológicas emuladas..... | 76-81 |
| 5.2.2.- Microcápsulas en presencia de fármaco. | |
| 5.2.2.1.- Caracterización morfológica..... | 81-83 |
| 5.2.2.2.- Distribución de tamaño..... | 83-85 |
| 5.2.2.3.- Fármaco asociado a las microcápsulas..... | 86-87 |
| 5.3.- Evaluación de la cinética de liberación del ciclopirox olamina desde las microcápsulas. | |
| 5.3.1.- Cinética preliminar de liberación en buffer de fosfato..... | 87-90 |
| 5.3.2.- Cinética de liberación en medio LIT..... | 90-92 |
| 5.4.- Estudio de la viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en presencia de ciclopirox olamina. | |
| 5.4.1- Determinación del EC ₅₀ de ciclopirox olamina para los promastigotes mediante ensayo colorimétrico..... | 92-99 |
| 5.4.2- Efecto parasiticida del ciclopirox olamina liberado desde las microcápsulas..... | 99-104 |
| 5.5.- Estudio de la citotoxicidad del ciclopirox olamina en macrófagos BMDM..... | 104-109 |
| | |
| 6.- CONCLUSIONES | |
| 6.1.- Síntesis poliméricas..... | 110 |
| 6.2.- Elaboración y caracterización de microcápsulas..... | 110-111 |

| | |
|---|----------------|
| 6.3.- Cinética de liberación de ciclopirox olamina desde las microcápsulas..... | 111 |
| 6.4.- Viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> en presencia de ciclopirox olamina libre y expelido desde las cápsulas..... | 112 |
| 6.5.- Viabilidad de macrófagos BMDM en presencia de ciclopirox olamina..... | 112 |
| 6.6.-Conclusiones generales..... | 112-113 |
| 7.- RECOMENDACIONES..... | 114 |
| 8.- BIBLIOGRAFÍA..... | 115-123 |
| 9.- ANEXOS..... | 124-125 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Señales FT-IR y asignaciones de enlaces..... | 58 |
| Tabla 2. Condiciones de síntesis de los PLGA por policondensación directa en solución..... | 59 |
| Tabla 3. Señales FT-IR y asignaciones de enlaces involucrados de la Figura 24 | 63 |
| Tabla 4. Desplazamientos químicos de los protones de los monómeros de d,l-lactida y glicolida..... | 69 |
| Tabla 5. Desplazamientos químicos de los protones de los polímeros sintetizados..... | 69 |
| Tabla 6. Composición de alimentación (teórica) y real (experimental) de los polímeros sintetizados..... | 71 |
| Tabla 7. Posibles secuencias de inserción de los monómeros en el polímero final..... | 72 |
| Tabla 8. Porcentaje de rendimiento, eficiencia de encapsulación y contenido de droga de microcápsulas de A ₁ y A ₃ | 86 |
| Tabla 9. Cantidades porcentuales de droga liberada los primeros tres días de experimentación..... | 90 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|-----|
| Gráfico 1. Distribución de tamaño de microcápsulas vacías de A ₁ generadas por emulsión simple y evaporación de solvente..... | 76 |
| Gráfico 2. Distribución de tamaño de microcápsulas de A ₁ con fármaco asociado, generadas por doble emulsión y evaporación de solvente..... | 83 |
| Gráfico 3. Distribución de tamaño de microcápsulas de A ₃ con fármaco asociado, generadas por doble emulsión y evaporación de solvente..... | 85 |
| Gráfico 4. Perfil general de liberación del fármaco desde 0,5 mg de cápsulas en PBS..... | 87 |
| Gráfico 5. Perfil general de liberación del fármaco desde aproximadamente 0,5 mg de cápsulas en PBS los tres primeros días de experimentación..... | 89 |
| Gráfico 6. Perfil general de liberación del fármaco desde aproximadamente 0,5 mg de cápsulas en medio LIT..... | 91 |
| Gráfico 7. Perfil general de liberación del fármaco desde aproximadamente 0,5 mg de cápsulas en medio LIT los primeros tres días de experimentación..... | 91 |
| Gráfico 8. Valores de absorbancia para cada condición evaluada en el MTT de parásitos ($\lambda= 570$ nm)..... | 95 |
| Gráfico 9. Porcentaje de proliferación de los promastigotes para cada condición experimental evaluada en el ensayo de MTT de parásitos..... | 96 |
| Gráfico 10. Efecto de diversas condiciones de presión selectiva sobre viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania braziliensis</i> | 100 |
| Gráfico 11. Énfasis en el comportamiento de los parásitos sometidos a cápsulas de A ₁ con fármaco y Control +..... | 100 |
| Gráfico 12. Porcentaje de proliferación de los macrófagos para cada condición experimental evaluada..... | 105 |

*Los gráficos aquí mostrados son exclusivamente los realizados como parte del trabajo de investigación. Gráficos obtenidos de la literatura son contabilizados en la Lista de Figuras.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Molécula de ciclopirox olamina..... | 10 |
| Figura 2. Concentración de la droga en sangre través del tiempo de liberación..... | 12 |
| Figura 3. Reacción general del ácido láctico y el ácido glicólico por policondensación directa..... | 16 |
| Figura 4. Mecanismo de la reacción de “ <i>back-biting</i> ”..... | 17 |
| Figura 5. Reacción general de la lactida y la glicolida por apertura de anillo..... | 20 |
| Figura 6. Variación de la cristalinidad del PLGA en función de su contenido en glicolida..... | 21 |
| Figura 7. Molécula de ácido poli (láctico-co-glicólico)..... | 32 |
| Figura 8. Montaje experimental asociado a la síntesis del tetrabutóxido de titanio..... | 40 |
| Figura 9. Montaje de deshidratación por destilación de la solución de d,l-lactida y glicolida en <i>m</i> -xileno..... | 42 |
| Figura 10. Sistema de reflujo a presión reducida..... | 42 |
| Figura 11. Montaje experimental empleado en la síntesis vía ROP en masa..... | 43 |
| Figura 12. Ampollas selladas con monómeros en su interior, sumergidas en baño térmico en el proceso de calentamiento. | 44 |
| Figura 13. Montaje de elaboración de microcápsulas en ausencia de fármaco..... | 45 |
| Figura 14. Montaje general de la preparación de las microcápsulas en presencia de fármaco Cx..... | 47 |
| Figura 15. Esquema de muestreo de las microcápsulas con fármaco..... | 49 |
| Figura 16. Disposición de las cápsulas en los pozos de la placa de 24 pozos..... | 50 |
| Figura 17. Disposición de las soluciones en la placa microtituladora de 96 pozos..... | 53 |
| Figura 18. Triplicados de pozos por cada condición de trabajo con macrófagos BMDM..... | 55 |

| | |
|---|----|
| Figura 19. Aspecto de placa cubreobjetos donde se sembraron células tras adicionarle solución de azul de tripano..... | 56 |
| Figura 20. Espectro FT-IR del tetrabutóxido de titanio en butanol, sintetizado en el laboratorio..... | 57 |
| Figura 21. Mecanismo de condensación de una molécula de ácido láctico y otra de ácido glicólico, catalizada por el tetrabutóxido de titanio..... | 58 |
| Figura 22. Polímero en bloque de PLGA con polietilenglicol (PLGA-PEG-PLGA), de consistencia y apariencia muy similar a los productos obtenidos por policondensación directa en solución..... | 60 |
| Figura 23. Mecanismo de formación de PLGA por policondensación con cloruro de estaño (II) dihidratado..... | 61 |
| Figura 24. Espectro FT-IR del producto PLGA 1 | 62 |
| Figura 25. Mecanismo de síntesis de PLGA por coordinación-inserción usando cloruro de estaño (II) dihidratado y un iniciador alcohólico..... | 65 |
| Figura 26. Espectro FT-IR del producto A₁ | 66 |
| Figura 27. Espectro FT-IR del producto A₂ | 66 |
| Figura 28. Espectro FT-IR del producto A₃ | 67 |
| Figura 29. Espectro ¹ H RMN para A₁ | 68 |
| Figura 30. Espectro ¹ H RMN para A₂ | 68 |
| Figura 31. Espectro ¹ H RMN para A₃ | 61 |
| Figura 32. Ampliación de la zona de la señal de la glicolida para A₁ mediante manipulación del espectro a través del software <i>MasterReNova</i> | 71 |
| Figura 33. Multiplete de señales ubicadas en el área de los protones metilénicos, de donde se extrajo información de la Tabla 7 | 73 |
| Figura 34. Micrografías de microcápsulas vacías de A₁ | 74 |
| Figura 35. Micrografías de secciones transversales de microcápsulas vacías de A₁ | 75 |
| Figura 36. Microcápsulas de a) A₁ b) A₂ c) A₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de 1 hora | 77 |

| | |
|--|-----|
| Figura 37. Microcápsulas de a) A ₁ b) A ₂ c) A ₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de 6 horas | 77 |
| Figura 38. Microcápsulas de a) A ₁ b) A ₂ c) A ₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de 12 horas | 78 |
| Figura 39. Microcápsulas de a) A ₁ b) A ₂ c) A ₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de 24 horas | 78 |
| Figura 40. Microcápsulas de a) A ₁ b) A ₂ c) A ₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de 36 horas | 79 |
| Figura 41. Microcápsulas de a) A ₁ b) A ₂ c) A ₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de 84 horas | 79 |
| Figura 42. Microcápsulas de a) A ₁ b) A ₂ c) A ₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de 7 días | 79 |
| Figura 43. Microcápsulas de a) A ₁ b) A ₂ c) A ₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de 12 días | 80 |
| Figura 44. Microcápsulas de a) A ₁ b) A ₂ c) A ₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de 40 días | 80 |
| Figura 45. Microcápsulas de a) A ₁ b) A ₂ c) A ₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de 50 días | 80 |
| Figura 46. Micrografías de las cápsulas de A ₁ con fármaco..... | 81 |
| Figura 47. Micrografías de las cápsulas de A ₃ con fármaco..... | 82 |
| Figura 48. Micrografía de la morfología interior de una microcápsula contenedora de fármaco fracturada..... | 82 |
| Figura 49. Representación de la reducción intracelular del MTT a formazán..... | 93 |
| Figura 50. Resultado cualitativo (visual) del MTT de promastigotes..... | 94 |
| Figura 51. Representación gráfica del modelo de interpolación lineal para el cálculo del EC ₅₀ | 98 |
| Figura 52. Aspecto del medio LIT contenedor de parásitos sin presión selectiva externa (Control -)..... | 102 |

| | |
|---|-----|
| Figura 53. Aspecto del medio LIT contenedor de parásitos en presencia de cápsulas de A ₁ con fármaco..... | 102 |
| Figura 54. Aspecto del medio LIT contenedor de parásitos en presencia de 150 µM de ciclopirox libre (Control +)..... | 102 |
| Figura 55. Inspección visual del estado de las células expuestas a: a) 1000 µM b) 500 µM de ciclopirox..... | 106 |
| Figura 56. Inspección visual del estado de las células expuestas a: a) 300 µM b) 100 µM de ciclopirox..... | 106 |
| Figura 57. Inspección visual del estado de las células expuestas sin presión selectiva externa (Control -)..... | 107 |
| Figura 58. Inspección visual del estado de las células expuestas al Control + (20 µM de miltefosina)..... | 108 |

1.- INTRODUCCIÓN.

La leishmaniasis (conocida también como leishmaniosis) es una enfermedad típicamente endémica de zonas tropicales y/o países en vías de desarrollo. Esta surge como consecuencia de infecciones de varias especies de parásitos protozoarios del género *Leishmania spp.* De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniasis figura entre las seis parasitosis con los mayores índices de mortalidad y morbilidad en el planeta ^[1], estimándose en 12 millones la cantidad de humanos afectados en un total de 88 países, y un número aproximado de 350 millones de personas en riesgo ^[2]. Del mismo modo, los cerca de 2 millones de nuevos casos que se registran anualmente ^[3] hacen que se deba reconocer su carácter persistente entre las poblaciones afectadas. Todos los datos anteriormente expuestos, demuestran unívocamente que la leishmaniasis es un problema de salud pública de alerta global.

A pesar de que existe investigación orientada al desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis, los avances en este aspecto han sido lentos y arduos, de modo que la quimioterapia aún debe constituir un elemento crucial y de primera línea en las políticas de combate y control de esta enfermedad. En lo referente a dicha quimioterapia, actualmente la disponibilidad de fármacos es baja y la mayoría de ellos se administra por vía parenteral, lo que se traduce en falta de especificidad de acción terapéutica y aumento de posibilidad de efectos adversos. Adicionalmente, ha sido ampliamente reportada la notable toxicidad asociada a estos fármacos, así como el surgimiento de fenómenos de resistencia por parte de los parásitos causantes de la enfermedad ^[3]. En tanto lo anterior, se hace imperiosa la necesidad de desarrollar, además de nuevos fármacos de acción mejorada, sistemas de administración que sean capaces de focalizar y concentrar la acción terapéutica de los medicamentos correspondientes en órganos o tejidos particulares, para así reducir las dosis necesarias, el tiempo de tratamiento, su ineficacia y el impacto negativo del fármaco en el paciente. Ante esta demanda, una posible alternativa reside en el diseño y producción de microcápsulas de

liberación controlada en cuyo interior sea insertada una cantidad específica del fármaco a administrar, que sean capaces de focalizar y regular su dosificación según se desee y que no representen un factor de toxicidad adicional para el paciente. En función a esto, los polímeros biocompatibles parecen ser una opción plausible en cuanto a material de fabricación.

Los polímeros biocompatibles son llamados de este modo tomando en consideración su carácter biodegradable, su capacidad para no generar respuestas inmunológicas en el paciente ^[4] y el hecho de que sus productos de degradación puedan ser metabolizados o excretados por vías fisiológicas normales del organismo ^[5]. En este sentido, algunos biopolímeros han captado especial atención en aplicaciones de diseño de microcápsulas, entre los cuales figura el copolímero ácido poli (láctico–co-glicólico), dada la posibilidad que ofrece este material de variar la prolongación de liberación del fármaco encapsulado desde semanas hasta meses ^[5]. El área de sistemas de liberación controlada de fármacos a través de coberturas de polímeros biocompatibles ha atraído la atención de los científicos desde hace más de 50 años ^[4].

La escogencia de la especie *Leishmania braziliensis* como blanco de estudio y pruebas de acción del ciclopirox olamina, un conocido antifúngico de amplio espectro que se pone a prueba en esta investigación, viene motivada a la notable persistencia de tal especie en Venezuela y a su profusa responsabilidad en los casos clínicos que se han registrado en el país (según datos del Ministerio del Poder Popular para la Salud, un 98% de los casos de leishmaniasis a nivel nacional son de manifestación cutánea, y un 80% de estos casos son producidos únicamente por *Leishmania braziliensis* ^[3]). La reducida eficacia de los medicamentos leishmanicidas actuales y la dificultad que supone al paciente el tener que trasladarse continuamente a centros especializados para recibir el tratamiento (normalmente por vía intravenosa o parenteral), hace que la implementación de dispositivos de liberación controlada biocompatibles y de aplicación cutánea tengan ventajas desde el punto de vista de aumento de la efectividad de los

tratamientos, la reducción de las dosis necesarias y la ausencia de necesidad de acudir a los mencionados centros especializados para continuas administraciones del fármaco.

Ante la existencia de un problema de salud pública mundial como lo es la leishmaniasis, y el continuo desarrollo tecnológico en aplicaciones de polímeros biodegradables en el área biomédica, la propuesta de trabajar en la adaptación de estas tecnologías en el tratamiento de dicha enfermedad se hace justificable y pertinente. Teniendo en cuenta tal motivación, el presente proyecto busca sintetizar microcápsulas de ácido poli (láctico-co-glicólico) con características particulares asociadas a su composición (esto es, las cantidades relativas de sus monómeros constitutivos), microestructura y morfología que permitan la administración prolongada y controlada de fármacos leishmanicidas, así como comprobar su efecto leishmanicida en cultivos axénicos de parásitos. El primer bloque experimental planteado se ocupará de la síntesis y caracterización del ácido poli (láctico-co-glicólico), las microcápsulas y la determinación de la cinética de liberación del fármaco desde el dispositivo, mientras que un segundo bloque tratará de la cinética de liberación del fármaco desde las cápsulas y el comportamiento *in vitro* de cultivos de parásitos del género *Leishmania* y de modelos celulares del sistema inmunológico de mamíferos en presencia del sistema de liberación polimérico.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1.- Leishmaniasis.

La leishmaniasis, conocida también como leishmaniosis, es una enfermedad endémica de países tropicales y/o en vías de desarrollo. Se han identificado al menos una veintena de especies de parásitos protozoarios del género *Leishmania spp.* como los agentes etiológicos de la patología ^[3], encontrándose que, para cada tipo de manifestación clínica de la enfermedad, existe un grupo particular de especies de protozoarios responsables (aunque también la respuesta inmunológica del individuo infectado puede contribuir a la prevalencia de alguna de las mencionadas manifestaciones ^[6]). En función a esto, la leishmaniasis se presenta comúnmente de tres maneras generales: leishmaniasis cutánea, causada habitualmente por las especies *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania panamensi*, leishmaniasis mucocutánea, transmitida por parásitos como *Leishmania braziliensis* y *Leishmania panamensis*, y leishmaniasis visceral, cuyos agentes etiológicos son *Leishmania infantum* y *Leishmania donovani* ^[3]. Se conoce que las manifestaciones cutáneas y mucocutáneas son las que presentan mayor grado de morbilidad, con un aproximado de 1,5 de los 2 millones de casos nuevos registrados anualmente a nivel mundial; la manifestación visceral, por su parte, comprende los más altos índices de mortalidad, con 59.000 fallecimientos estimados cada año (sólo superada por la malaria en términos de mortalidad para parasitosis ^[7]).

Algunas bibliografías coinciden en que el reservorio principal del parásito *Leishmania spp.* ha sido históricamente poblaciones de roedores ^{[6], [7]}, mientras que el hombre y algunos animales domésticos se han insertado en el ciclo vital del protozoario de manera más o menos accidental. Por otro lado, los vectores del protozoario son

típicamente flebótomos (conocidos en Sudamérica por apelativos como “jején”, entre otros), pequeños insectos voladores cuya hembra es hematófaga. A pesar de las aproximadamente 500 especies de flebótomos que existen, muy pocas son vectores de *Leishmania spp.*, y a cada especie de parásito le corresponde una o sólo un puñado de especies de flebótomos capaces de mantener su ciclo vital ^[6]. En Europa, Asia y África, los principales vectores del protozooario causante de la leishmaniasis son los flebótomos del género *Phlebotomus*, mientras que, en América, son aquéllos pertenecientes al género *Lutzomyia* ^[2].

Los parásitos del género *Leishmania spp.* presentan dos morfotipos bien establecidos a lo largo de su ciclo de vida, observables según el hospedador en el que el parásito se encuentre (el ciclo de vida de éste es digénico, pues se alterna entre dos hospedadores, uno vertebrado y otro invertebrado). El primer morfotipo es conocido como promastigote, forma flagelada del parásito cuyo desarrollo se efectúa en el sistema digestivo del hospedador invertebrado (en el ciclo de vida del parásito, estos hospedadores participan como vectores). El segundo morfotipo se denomina amastigote, y se genera como consecuencia de una transformación que sufre la forma promastigote al ser fagocitada por los macrófagos (un tipo de célula perteneciente al sistema inmunológico) del hospedador vertebrado ^[3].

La cadena epidemiológica de los parásitos del género *Leishmania spp.* comprende tres elementos fundamentales: un reservorio, un vector y un sujeto susceptible (mamífero) ^[3]. En un primer paso, los parásitos pasarán al vector cuando éste ejerza una “picadura” a un mamífero infectado, tratando de alimentarse de su sangre. Los amastigotes ingeridos se alojan en el tracto digestivo del vector, donde las nuevas condiciones fisiológicas desencadenarán su transformación en la forma promastigote. En esta etapa, los promastigotes se reproducen presumiblemente de manera sexual ^[7], y algunos de ellos ascienden hasta la probóscide del insecto, donde estarán disponibles para ser inoculados en un próximo hospedador vertebrado, tras una

nueva ingesta de sangre. Al ser infectado este nuevo sujeto, muchos promastigotes serán destruidos por su sistema inmunológico, pero algunos serán fagocitados por los macrófagos, y una vez dentro de éstos, los parásitos crearán un recubrimiento denominado “vacuola parasitófora” ^[3], dentro de la cual podrán transformarse en amastigotes, desarrollarse y multiplicarse vía fisión binaria ^[7]. La multiplicación de los parásitos amastigotes culmina por la distensión y ruptura (lisis) del macrófago hospedador ^[6], lo que genera parásitos libres que invadirán otros macrófagos. El ciclo se cierra cuando otro insecto, al alimentarse de la sangre del mamífero infectado, ingiere macrófagos de éste. El período de incubación del parásito en mamífero luego de la picadura es de 2 a 6 meses en promedio, aunque se han registrado tiempos de hasta varios años ^[6].

En el caso particular de Venezuela, desde 1955 hasta el 2002 se reportaron cerca de 50.000 casos de leishmaniasis cutánea y unos 2.000 casos de leishmaniasis visceral; los vectores más frecuentes registrados para la leishmaniasis cutánea fueron *Lutzomyia ovallesi*, *Lutzomyia gomezi* y *Lutzomyia panamensis*, mientras que entre los agentes causales se identificaron a las especies *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana*, siendo los principales reservorios varias especies de ratones salvajes. Tanto *Leishmania chagasi* como *Leishmania infantum* fueron identificados como agentes causales de leishmaniasis visceral, utilizando como vectores principales a los flebótomos *Lutzomyia longipalpis* y *Lutzomyia evansi*, y a perros como reservorio fundamental ^[1]. En el año 2006, se informó que un 98% de los casos de leishmaniasis en Venezuela responden a la variante cutánea, de la cual, a su vez, casi el 98% de los casos se presenta como la sub-forma cutánea localizada. También se conoció que el 80% de los casos tuvo un único parásito causante: la especie *Leishmania braziliensis* ^[3]. Ya para los años 2008-2009, un total de 4.640 casos de leishmaniasis cutánea fueron diagnosticados en el país, con una media de 2.320 casos por año; el predominio de la leishmaniasis cutánea localizada se mantuvo respecto al 2006, con 97,84% de los casos de ésta, de nuevo generada primordialmente por *Leishmania braziliensis*. La

leishmaniasis está presente en todo el territorio nacional salvo en el estado Nueva Esparta, de acuerdo con datos del bienio 2008-2009 ^[1].

En la actualidad, los fármacos de primera línea en la quimioterapia contra la leishmaniasis forman parte de la familia de los antimoniales pentavalentes: Glucantime[®] (antimoniato de meglumina) y Pentostan[®] (estibogluconato de sodio) ^[3]. Estos antimoniales también se han administrado en conjunto con otros fármacos que actúan como coadyuvantes de acción sinérgica, tales como AmBisome[®] (anfotericina B) o Nizoral[®] (ketoconazol) ^[2]. En el año 2002, se aprobó el uso de la miltefosina, un alquil-lisofosfolípido que constituyó el primer fármaco oral disponible en la quimioterapia contra la leishmaniasis (los tratamientos convencionales mencionados se administran todos por vía parenteral). Este nuevo medicamento se enmarca dentro de los avances más recientes en la lucha contra la mencionada parasitosis; no obstante, su alta teratogenicidad y generación de cepas naturalmente resistentes han mermado en gran medida su uso clínico extensivo. ^[1].

La leishmaniasis es una enfermedad que tradicionalmente ha estado relacionada con poblaciones de situaciones socioeconómicas desfavorecidas, por lo cual, la industria farmacéutica internacional no parece contar con demasiados estímulos de rentabilidad para el desarrollo y comercialización de fármacos para tratarla ^{[8], [9]}. Es posible que, por esta razón, los medicamentos actuales de primera línea sean básicamente los mismos que a principios y mediados del siglo XX (con excepciones como la miltefosina), aun cuando es ampliamente conocida su alta toxicidad y marcados efectos secundarios. Aún así, es digno mencionar que, particularmente en Venezuela, una interesante investigación en torno al tema de generación de nuevos medicamentos contra la leishmaniasis se está llevando a cabo: se ha demostrado la eficiencia de fármacos como Glibenclamida (una droga de la familia de las sulfonilureas tradicionalmente empleada en el tratamiento de la diabetes tipo 2) en el tratamiento de ratones experimentales infectados con *Leishmania mexicana*, especialmente al ser

administrados en conjunto a los medicamento a base de antimoniales ^{[10]. [11]}. Del mismo modo, se demostró un efecto curativo importante en ratones infectados a través de la administración combinada de miltefosina con amiodarona, un agente antiarrítmico utilizado actualmente en humanos ^[12]. En otro estudio, se ensayó con algunos derivados de benzimidazoles tricíclicos, que ya habían presentado eficacia en el tratamiento de la malaria, obteniendo que de los 14 derivados sintetizados, uno de ellos (identificado por los investigadores como JC25) mostró notable actividad antiparasitaria comparada con la de Glucantime y miltefosina ^[1]. El mismo trabajo realizado para los benzimidazoles se llevó a cabo con derivados de tetrahydroquinolinas C-2 sustituidas, obteniendo potentes efectos antiparasitarios del derivado denominado CM100 e, incluso, al trabajar con tetrahydroquinolinas libres, 6 de 9 derivados sintetizados fueron más activos que la miltefosina en su actividad leishmanicida, destacándose el derivado JS87 ^[8].

Anteriormente se mostró, a partir de datos arrojados por el Ministerio del Poder Popular para la Salud, que un 80% de la manifestación cutánea de la leishmaniasis en Venezuela (que *per se* ya representa casi el 98% de todas las manifestaciones clínicas de leishmaniasis en el país) es producido por la especie *Leishmania braziliensis*. Considerando la proliferación de la mencionada especie en Venezuela, la baja eficacia y alta toxicidad de los fármacos hasta ahora aprobados para hacer frente a la enfermedad y la dificultad que supone a los pacientes dirigirse continuamente a centros especializados para obtener los tratamientos ^[1] (que, como se mencionó con anterioridad, mayoritariamente son de administración parenteral o intravenosa en dosis diferenciadas), se hace conveniente, además de la búsqueda de drogas más eficientes y menos tóxicas, el diseño de un sistema de liberación controlada de los fármacos biocompatible-biodegradable que admita su unción tópica directamente sobre la lesión generada por la especie descrita, logrando así una aplicación prácticamente *in situ* del medicamento y asegurando un efecto prolongado del mismo. Se esperaría, pues, que esto permitiese una amplificación en el efecto leishmanicida de la droga, disminución de

las dosis recetadas y efectos secundarios concomitantes (tanto de los medicamentos ya existentes como de eventuales nuevos fármacos), y tiempo de tratamiento ^[13], así como la supresión de la necesidad de dirigirse continuamente a centros especializados, dada la capacidad del organismo del paciente para metabolizar y excretar de manera segura el dispositivo de liberación controlada una vez haya concluido su utilidad.

Expresada ya la ventaja de dispositivos biocompatibles y biodegradables de liberación controlada como alternativa en la administración de fármacos leishmanicidas frente a las clásicas vías parenterales e intravenosas, se hará a continuación un recuento muy somero e introductorio acerca del ciclopirox olamina (que será la droga a evaluar en este trabajo) y de los polímeros biocompatibles, la tecnología de microencapsulamiento y las microcápsulas.

2.2.- Ciclopirox olamina.

El ciclopirox olamina (Cx) es una droga perteneciente a la familia de las hidroxipiridonas que, a temperatura ambiente, se presenta como un sólido blanco, con un punto de fusión aproximado de 143 °C y solubilidad en medio acuoso, alcohólico y en dimetilsulfóxido ^[14]. En su forma farmacéutica, se trata de un antifúngico de amplio espectro generalmente de uso tópico que ha demostrado actividad sobre especies de dermatofitos (hongos capaces de consumir y metabolizar tejidos queratinosos como la piel, uñas y cabello), levaduras, mohos y algunas bacterias ^[15]. Se conoce que la droga actúa bloqueando la obtención y acción de enzimas esenciales en la biosíntesis de macromoléculas necesarias para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos ^[16] como, por ejemplo, la desoxihipusina hidroxilasa, enzima clave en el último paso de síntesis de moléculas llamadas factores de iniciación eucariota, que son responsables de la maduración final de los ribosomas, donde se produce la síntesis de las proteínas codificadas en el ARNm ^[17]; el mencionado bloqueo se extiende también a enzimas participantes en la eliminación de productos colaterales del metabolismo celular

potencialmente dañinos, como catalasas y peroxidasas, que actúan en la degradación de especies reactivas de oxígeno (peróxidos, radicales, entre otros) que surgen, en parte, por metabolismo natural de oxígeno molecular ^[18]; se sabe, además, que el ciclopirox también actúa generando perturbaciones en el transcurrir normal del ciclo celular ^[18] y en el transporte trans-membranal (en altas concentraciones ^[19]). Toda esta variada actividad obedece al mecanismo de acción del ciclopirox: a diferencia del grueso de los antifúngicos comerciales, cuyo efecto terapéutico consiste fundamentalmente en perturbar el funcionamiento de la membrana celular (en algunos casos por interferencia en la biosíntesis del ergosterol (un esteroide conformante de la membrana celular de hongos y algunos protozoarios), y en otros, por formación de enlaces con dicho esteroide, generando “canales” en la membrana celular a través de los cuales iones y pequeñas moléculas orgánicas fluirán hacia el espacio extracelular, conllevando a la muerte de la célula ^[20]), el ciclopirox actúa como un potente agente quelante de iones comunes en multiplicidad de cofactores asociados a enzimas (en especial iones trivalentes (como Fe^{3+}), hecho que explica su particular efectividad en la inactivación enzimática y la diversidad de organismos sobre los cuales registra actividad inhibitoria.

La molécula de Cx se presenta a continuación ^[15].

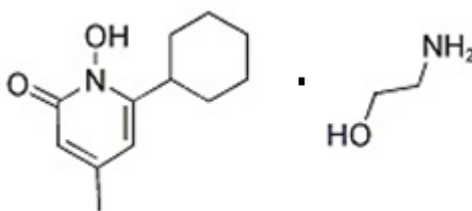


Figura 1. Molécula de ciclopirox olamina.

Su denominación química es 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridona, y en su preparación, suele presentarse mezclado con 2-aminoetanol en cantidades equimolares.

El ciclopirox comprende, además de su actividad fungicida, potencial antibacterial y hasta antiinflamatorio ^[17]. Aunado a ello, el Cx ha demostrado también viabilidad en el tratamiento de la leishmaniasis: en la literatura ^[17] 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. Además, recientemente también ha llamado la atención su efecto terapéutico contra el virus del VIH, aparentemente reactivando la apoptosis (muerte celular programada como mecanismo de defensa en caso de invasión viral) de células en las que el virus ha suprimido esta acción. En estudios *in vivo* utilizando ratones, se ha observado la ausencia de re-emergencia viral hasta 12 semanas post-tratamiento, y dosis varios órdenes de magnitud más altos que las necesarias para generar la muerte de células infectadas no mostraron citotoxicidad apreciable en células sanas ^[21].

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 ^[14].

2.3.- Breve introducción a los polímeros biocompatibles, la tecnología de microencapsulación y las microcápsulas.

La tecnología de membranas en la industria médica y farmacéutica es un campo que no sólo ha producido y mejorado múltiples aplicaciones en áreas tan diversas como la bioingeniería de regeneración de órganos y tejidos, liberación controlada de drogas, dispositivos de diagnóstico, recubrimientos para implantes médicos, entre otros ^[4], sino

que continúa en franco desarrollo y es aún un área completamente abierta a la investigación [22]. Dentro de este campo, el trabajo orientado a microcápsulas como sistemas de liberación controlada de drogas es el que atañe al presente proyecto. El objetivo de cualquier sistema de liberación controlada de fármacos es transportar y dosificar la sustancia en un lugar y tiempo específicos, bajo un patrón de liberación determinado; esto supone una ventaja sobre los métodos clásicos de administración de medicamentos (píldoras, inyecciones, etcétera) en cuanto a que éstos, por lo general, comprenden liberaciones en forma de “picos”, los cuales frecuentemente alcanzan concentraciones por encima de la dosis requerida. Lo recién expuesto se ilustra en la siguiente figura [4].

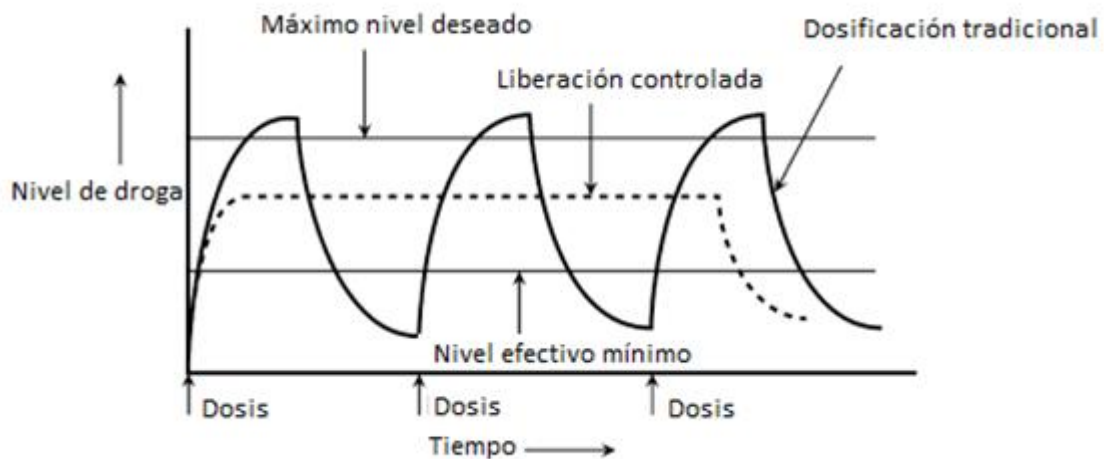


Figura 2. Concentración de la droga sangre a través del tiempo de liberación.

Varios dispositivos de liberación controlada han sido creados (liposomas, sistemas de emulsiones, entre otros), mas parece que las microcápsulas son los únicos lo suficientemente estables como para ser administradas vía oral, tópica y/o parenteral, logrando mayores alcances terapéuticos y versatilidad [23].

Existen pocos polímeros que puedan catalogarse como biocompatibles, e incluso, no todos los biomateriales (biopolímeros en este caso) tienen el mismo grado de biocompatibilidad; en ocasiones, de hecho, las propiedades superficiales del material deben ser modificadas para mejorar su interacción con los tejidos y fluidos del individuo en que se administrará, además de suprimir respuestas inmunológicas ^[4]. Entre los grupos de polímeros cuya factibilidad como portador y liberador biocompatible de drogas se han evaluado, están los poliésteres alifáticos, poli (alquil- α -ciano acrilatos), poliamidas, poliaminoácidos, polioctoésteres, poliuretanos, poliacrilamidas, y también polímeros naturales como colágeno y quitosano ^[4], etcétera; entre ellos, poliésteres alifáticos como el ácido poliláctico (PLA por sus siglas en inglés), el ácido poliglicólico (PGA por sus siglas en inglés) y el ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA por sus siglas en inglés) han atraído especial atención debido a su buena histocompatibilidad y biodegradabilidad ^[24]. Muchos materiales poliméricos biodegradables sintetizados consisten en bloques de dos o más de dos tipos de monómero, y dependiendo de las cantidades relativas de cada uno de ellos, se tendrán propiedades diferentes en cuanto al polímero así construido; algunos ejemplos los constituyen polímeros construidos con “tribloques” de oligómeros de ácido poliláctico-polietilenglicol-ácido poliláctico ^[23], bloques de ácido poliláctico o ácido poli (láctico-co-glicólico) unidos a bloques centrales de polioxietileno ^[5], “tribloques” de ácido poliláctico-polietilenglicol-ácido poliláctico copolimerizados con cadenas adicionales de ácido poliláctico ^[25], entre otros.

En lo relativo a las microcápsulas, la terminología aplicada puede ser muchas veces inconsistente y confusa. En sentido estricto, al hablar de “micropartícula” se hace referencia a partículas con diámetros entre 1 y 1000 μm , independientemente de sus características internas o externas; es así, que tanto una microcápsula como una microesfera puede ser catalogada como micropartícula, si cumple con dicha característica. En cuanto a la diferenciación entre microesfera y microcápsula, la microesfera se refiere limitativamente a una micropartícula de superficie esférica, mientras que una microcápsula es una micropartícula que consista en dos “dominios”

bien diferenciados: un recubrimiento, y un núcleo rodeado de tal recubrimiento; ambos dominios deben tener composiciones claramente distintas. Estrictamente, las microesferas son micropartículas vacías, pero en muchas ocasiones se ha adaptado la definición de microcápsula a la de microesfera, de modo que el concepto “integrado” de microcápsula se ha ampliado considerablemente, e incluso se encuentra en contraposición con la definición de una micropartícula per se, pues entiende a las microcápsulas como micropartículas esféricas (o microesferas) con rangos de entre 50 nm a 2 mm de diámetro (la definición clásica de micropartícula ubica los rangos de diámetro entre 1 y 1000 μm , como se describió más arriba), que contiene una sustancia núcleo. Dada la aparente complicación de todo lo expresado, muchos investigadores frecuentemente usan los términos microcápsula, microesfera y micropartícula de manera indiscriminada y/o a manera de sinónimos ^[26].

El trabajo relacionado con microcápsulas como método de liberación controlada de fármacos comprende varias etapas: primeramente, se lleva a cabo el proceso de síntesis del polímero y su caracterización, seguido de la elaboración de las microcápsulas, su caracterización, la evaluación de la cantidad de fármaco encapsulado y patrón de liberación del mismo en ambiente fisiológico. A continuación, se ahondará en torno a estas etapas.

2.4.- Métodos de preparación de polímeros.

Los poliésteres como el ácido poli (láctico-co-glicólico) son primordialmente sintetizados por dos métodos diferentes, dependiendo de qué peso molecular y qué características se deseen en relación a las microcápsulas que a partir de ellos se crearán: los PLGA de bajo a intermedio peso molecular se producen regularmente a partir de la policondensación directa de monómeros de ácido láctico y ácido glicólico, mientras que aquellos de alto peso molecular suelen ser generados mediante lactidas y glicolidas (dímeros cíclicos de ácido láctico y glicólico, respectivamente) en un proceso

de polimerización en cadena conocido como polimerización por apertura de anillo. A continuación se amplían las características de cada uno de estos procesos.

- *Policondensación directa*

La policondensación directa (también llamada dehidropolicondensación) es un tipo de polimerización por pasos, a partir de la cual se obtiene los polímeros mediante reacción entre grupos funcionales de los monómeros involucrados (esto es, centros electrofílicos (ácidos de Lewis como carbonos carbonílicos) y nucleófilos (bases de Lewis como grupos hidroxilo de dioles o nitrógenos de aminas)). Las polimerizaciones por pasos se caracterizan por comprender un rápido consumo inicial de los monómeros, quedando sólo especies oligoméricas a tiempos razonablemente cortos, que luego polimerizarán entre sí lentamente, frecuentemente con producción adicional de especies colaterales (generalmente pequeñas moléculas como agua, metanol, entre otras). En función de esto, puede intuirse que el éxito de la síntesis dependerá del establecimiento de condiciones térmicas y de remoción de productos colaterales (fuerza impulsora que favorecerá la polimerización al desplazar el equilibrio hacia la derecha) apropiadas, así como presencia de catalizadores idóneos, avalándose estas aseveraciones por el hecho de que las policondensaciones son procesos no favorecidos cinéticamente, y que necesitan de buenas extensiones de reacción para generar polímeros de altos pesos moleculares ^[27].

La reacción general de la policondensación directa del ácido láctico y el ácido glicólico se muestra en la **Figura 3** ^[28]; su modo de proceder es idéntico a las esterificaciones de ácidos y alcoholes monofuncionales, con la salvedad de que, al ser ambos ácidos moléculas bifuncionales (contienen ambas un ácido y una base de Lewis en su estructura), la polimerización ulterior es posible ^[27].

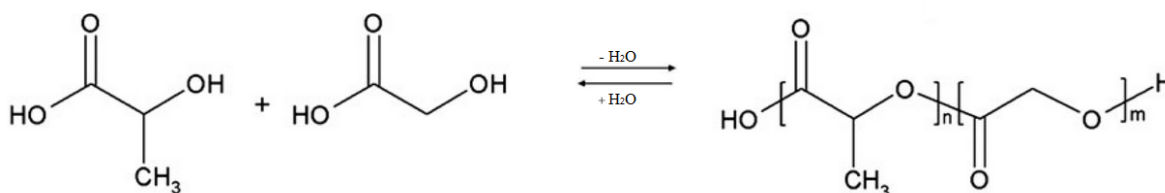


Figura 3. Reacción general del ácido láctico y el ácido glicólico por policondensación directa.

Dentro del marco de las reacciones de policondensación, varias técnicas han sido desarrolladas, cada una con aspectos particulares tanto positivos como negativos. Una revisión se provee a continuación.

**Policondensación por fusión:* suele consistir en la colocación de los monómeros dentro de un reactor discontinuo y en la promoción de su polimerización mediante aumento de temperatura por encima del punto de fusión de los monómeros y el polímero resultante. Deduciéndose que, conforme la reacción avance, el lecho de polimerización irá transformándose a una mezcla fundida de reactivos y especies oligoméricas, el medio verá paulatinamente acrecentada su consistencia viscosa, dificultando la eficiente remoción de las moléculas de agua que se producen como especie colateral ^{[29], [30]} (a pesar de que el trabajo a presión reducida para desalojar estas moléculas de agua es práctica común), lo que contribuye al mantenimiento del equilibrio hacia la izquierda. Las altas temperaturas necesarias y las bajas presiones aplicadas para generar el polímero también favorecen la emergencia de procesos de descomposición del mismo, entre los cuales figuran establecimientos de equilibrios colaterales paralelos que comprenden la depolimerización de segmentos de la macromolécula para dar cabida a la formación de diésteres cíclicos (en esencia, lactidas y glicolidas); este fenómeno, que consiste en transesterificaciones

intramoleculares ^[31], es conocido como “*back-biting*” (“retromordida”), cuyo mecanismo asociado se muestra a continuación ^[32]:

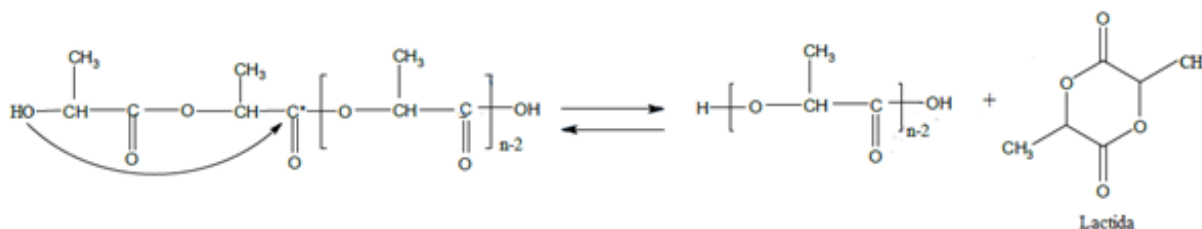


Figura 4. Mecanismo de la reacción de “*back-biting*”, uno de los equilibrios de depolimerización del PLGA y α -hidroxi ésteres afines. Aquí se ejemplifica con un pequeño oligómero de ácido poliláctico.

También se han descrito transesterificaciones intermoleculares entre cadenas poliméricas capaces de producir racemizaciones ^[33], pero aparentemente sin impacto en el peso molecular final.

**Policondensación en masa*: se lleva a cabo a temperaturas inferiores al punto de fusión del polímero final pero ligeramente superior al de los monómeros, lo que permite reducir los productos colaterales de degradación térmica de las especies involucradas ^[34]; no obstante, al igual que en la polimerización por fusión, el lecho de reacción irá deviniendo cada vez más viscoso conforme avanza la reacción, sólo que, en este caso, se llegará a solidificar por completo. Al estar enteramente solidificado el lecho de reacción, puede ser posible que las moléculas de agua generadas como productos colaterales ya no puedan de ninguna manera ser retiradas del reactor, hecho que constituye una limitante clara en el crecimiento ulterior del polímero final por policondensación de los oligómeros formados.

**Policondensación en solución*: la técnica de polimerización en solución implica la disolución de los monómeros y un catalizador adecuado en un solvente orgánico apropiado, mezcla que luego será sometida a calentamiento y agitación para promover

la reacción. Muchas son las razones por las que esta técnica genera atracción, valiendo citar las siguientes: al encontrarse disueltos los monómeros, su concentración será relativamente baja, conllevando a menores viscosidades que permitirán que la agitación sea mucho más fluida que en las policondensaciones por fusión y, sobre todo, en masa; esta fluidez en la agitación, aunada al incremento de la capacidad calorífica del sistema debido a la existencia de solvente ^[35], ayudará a lograr mejores transferencias de calor en el lecho de reacción, lo que evidentemente actúa en pro de paliar descomposiciones y depolimerizaciones extensivas. Se ha determinado también que el solvente ejerce, además, una restricción en la proliferación de especies colaterales no sólo por la disminución de degradaciones térmicas, sino que también funge como un “agente de retención” de dichas especies, manteniéndolas en solución y limitando el progreso de su equilibrio de formación ^[33]. Una ventaja adicional inherente al método toma en cuenta su rendimiento: se han reportado valores de más del 96% en este rubro ^[34]. En cuanto a las desventajas de la técnica, una de ellas es la lógica cota superior de temperatura que impone el punto de ebullición del solvente, que podría reducir la tasa de polimerización necesaria para alcanzar pesos moleculares adecuados ^[36]. Otra desventaja citada radica en que, como la longitud de cadena y la tasa de polimerización son proporcionales a la concentración de los monómeros ^[35], la reducción que causa en ésta la presencia de solvente tiende a ralentizar la obtención de pesos moleculares medios-elevados. Además de esto, se sabe que la técnica es sensible a impurezas derivadas del solvente ^[37] (incluidas, por supuesto, trazas de agua), y en los productos finales de la policondensación muchas veces se ha detectado cierta cantidad de solvente (aunque minúscula) en su estructura ^[38], ^[36], pese a recristalizaciones y purificaciones ulteriores. Por último, se ha descrito que, si el solvente no es lo suficientemente inerte, puede inducir transesterificaciones indeseables (se ha admitido que, en la práctica, es virtualmente imposible hallar un solvente completamente inerte ^[36]); además, para aplicaciones donde se necesita control de la estereoregularidad, esta técnica se ha observado inconvenientes derivados de la promoción de racemizaciones ^[34].

Aun cuando la policondensación es una vía de polimerización relativamente barata y sencilla desde el punto de vista experimental, y teniéndose que existe bibliografía ^[39] que describe la obtención de PLGA y los homopolímeros PLA (ácido poliláctico) y PGA (ácido poliglicólico) de altos pesos moleculares (por encima de 100.000 g/mol) mediante policondensación directa, la literatura que recoge en su contenido este hecho no es demasiado extensa y, más aun, un abundante cuerpo experimental cataloga como difícil la consecución de buenos resultados al trabajar por policondensación directa, frecuentemente topándose con la obtención de productos finales de consistencia semilíquida, viscosa y/o cerosa de muy bajos pesos moleculares promedio ^[40], ^[41] (a veces ni siquiera superando los 1000 g/mol en materia de peso molecular promedio numérico (Mn) ^[42], ^[43], ^[44]), donde las pobres interacciones intermoleculares y la movilidad incrementada de las cortas cadenas pre-poliméricas van en detrimento de entrelazamientos y empacamientos de las mismas, reduciendo su punto de fusión y/o su temperatura de transición vítrea (T_g) profunda y drásticamente ^[45] (existen amplios contrastes en este sentido, como PLGA con T_g de -8 °C para Mn promedio de apenas 430 g/mol y PLGA con T_g de 55,5 °C para Mn promedio de 23×10^3 g/mol ^[46]), y relegando estos materiales a aplicaciones en el área de pegamentos y recubrimientos ^[47]. Aun cuando las dificultades parecen categóricas, la posibilidad que ofrece la policondensación directa de obtener, bajo condiciones apropiadas, polímeros de intermedio peso molecular y alta amorficidad, resulta conveniente en el área de sistemas de liberación controlada de fármacos respecto al desempeño y propiedades del dispositivo, ya que los PLGA con estas características permiten una distribución más homogénea de los fármacos dentro de la matriz polimérica ^[48], ^[34], mejoran la biocompatibilidad del implante, ^[34], ^[49], y comprenden una mayor velocidad de degradación de la matriz que aquellos polímeros de altos pesos moleculares ^[50], generando un perfil de liberación no excesivamente extenso, hecho que resulta conveniente en la mayoría de las aplicaciones terapéuticas.

-Polimerización por apertura de anillo

En referencia a la polimerización por apertura de anillo (abreviada como ROP por *ring-opening polymerization*, su denominación en inglés) se sabe que, al tratarse comúnmente de un proceso de polimerización en cadena, no debería existir generación de productos colaterales diferentes al polímero deseado mientras esté ocurriendo la fase de propagación. Esto, desde luego, hace fácil concebir que, a través de este tipo de polimerización, sea posible obtener polímeros de altos pesos moleculares de manera rápida. En relación a la síntesis del ácido poli (láctico-co-glicólico) vía ROP, se tiene la siguiente ecuación general ^[51].

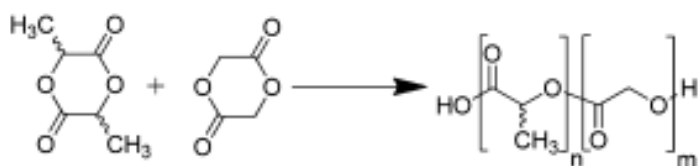


Figura 5. Reacción general de la lactida y la glicolida por apertura de anillo.

La lactida es un monómero que posee dos grupos metilo en los carbonos α , de modo que la molécula presenta dos centros quirales que soporta, cada uno de ellos, un grupo metilo como sustituyente, lo que trae como consecuencia que la misma pueda existir como tres isómeros diferenciados: d,d-lactida, l,l-lactida (frecuentemente abreviados como d-lactida y l-lactida) y la d,l-lactida (*meso*-lactida). De no existir racemizaciones, los polímeros producidos a partir de los enantiómeros puros pueden llegar a ser isotácticos, confiriéndole al material mayor rigidez y cristalinidad que aquellos obtenidos mediante polimerización de la *meso*-lactida, por cuanto estos polímeros suelen presentarse como materiales de alta amorficidad debido a su microestructura frecuentemente atáctica ^[48]. Por su parte, la glicolida, al no presentar grupos que generen ramificaciones en el esqueleto carbonado (como los metilos de la lactida), tiende a producir homopolímeros de alta cristalinidad; sin embargo, al ser

copolimerizada la glicolida con la lactida, la inclusión de la primera, lejos de favorecer la cristalinidad del producto, induce amorficidades aumentadas ^[28] debido al incremento de distorsiones e irregularidades estructurales; en función a esto, no es entonces de extrañar que PLGA con proporciones másicas de 50% lactida y 50% glicolida represente el copolímero de estos dos monómeros de más alta amorficidad y, por consiguiente, generalmente menor punto de fusión, menor temperatura de transición vítrea y mayor sensibilidad hidrolítica ^[52].

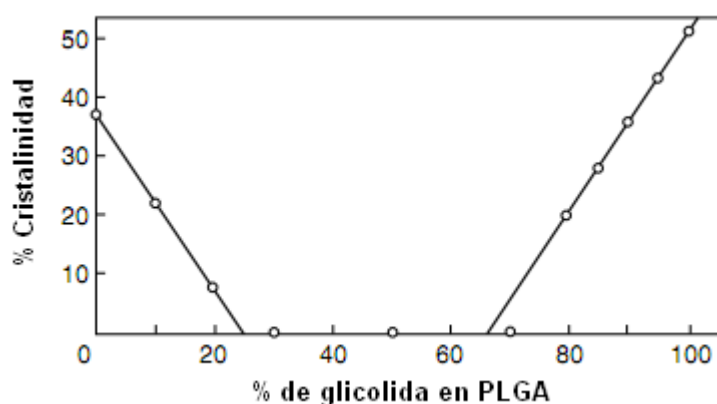


Figura 6. Variación de la cristalinidad del PLGA en función de su contenido en glicolida ^[29].

La fuerza impulsora de las polimerizaciones vía ROP viene dada por las tensiones estéricas que existen en las estructuras cíclicas que participan; se ha observado, de hecho, que estructuras con 4 y 8 miembros sufren apertura de anillo fácilmente bajo condiciones favorables debido a la estructura cíclica tensada que presentan, mientras que anillos de 5 miembros son difíciles de polimerizar, y anillos de 6 miembros en general lo hacen en pobre extensión ^[53]. Un caso particular lo constituye la polimerización de lactida y glicolida, pues son un caso extraño de fácil polimerización entre dos compuestos cíclicos de 6 miembros (su entalpía de polimerización es

negativa y razonablemente elevada en magnitud: -23 kJ/mol); este inusual comportamiento ha sido atribuido a la tensión que introduce en el anillo las funciones éster, que obligan a la estructura a mantenerse en el plano y restringen la movilidad de los enlaces ^[52].

En cuanto a la metodología generalizada para la polimerización vía ROP, las técnicas de síntesis por fusión, solución y en masa son, al igual que para las dehidropolicondensaciones, utilizadas regularmente, aunque vale decir que, dado que no existe la preocupación de eliminar moléculas de agua producidas *in situ*, la técnica de polimerización en masa es normalmente la más empleada, puesto que elimina las complicaciones y contaminaciones asociadas al trabajo con solventes, y limita la magnitud de la temperatura de trabajo y, por consiguiente, la extensión de transesterificaciones y descomposiciones térmicas no deseadas. Normalmente, y según los sistemas catalíticos empleados, la polimerización vía ROP puede comprender mecanismos iónicos (catiónicos y aniónicos) o de coordinación-inserción, siendo este último el más empleado ^[54]; tal mecanismo incorpora ácidos de Lewis como catalizadores, mayoritariamente alcóxidos metálicos ^[55].

Al ser la polimerización vía ROP un método más generalizado y estudiado en comparación a las dehidropolicondensaciones, se han plasmado en la literatura condiciones específicas y optimizadas de síntesis: por ejemplo, se ha reconocido frecuentemente que el intervalo de temperatura de trabajo óptimo va de 130 a $220 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[28], ^[29], ^[56], aunque se ha llegado a acotar a un rango de 160 a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[57], ^[58] e, incluso, se ha asegurado que $160 \text{ }^\circ\text{C}$ es la temperatura más óptima ^[59]. Adicionalmente, y conociendo que, como toda polimerización en cadena, las síntesis vía ROP necesitan un sistema catalizador/iniciador, se ha establecido que los monómeros, para el mecanismo de coordinación-inserción, deben estar aproximadamente en una relación molar de $100:1$ respecto al catalizador, mientras que la relación molar catalizador/iniciador debe ser de 2 (es importante que, sobre todo, se controle

acuciosamente la cantidad de iniciador adicionado, ya que el mismo, que suele consistir en moléculas hidroxiladas como agua o alcoholes ^{[52], [53]}, no solamente puede actuar como iniciador de la reacción sino también como agente de terminación; esto no sólo cercena el crecimiento del polímero, sino que, además, deja numerosos monómeros sin reaccionar que, finalmente, fungirán de impurezas ^[59]).

2.5.- Métodos de preparación de microcápsulas.

De entre de la amplia gama de técnicas que se han utilizado, los métodos más comunes de preparación de microcápsulas pueden agruparse en: métodos químicos, métodos fisicoquímicos y métodos físicomecánicos ^[60]. Se hará breve énfasis en los métodos químicos y fisicoquímicos, con breve mención de los físicomecánicos.

- Métodos químicos:

* *Polimerización interfacial:* la polimerización es llevada a cabo en la interfase de dos solventes inmiscibles, donde normalmente uno de ellos es agua. En el solvente más polar, suelen solubilizarse las bases de Lewis, y en el solvente orgánico, los ácidos de Lewis ^[27]. Dependiendo de la polaridad del fármaco, el mismo se disolverá en una u otra fase (siempre se solubilizará en la fase dispersa). Al poner en contacto los solventes con los respectivos monómeros solubilizados, en la interfase ocurrirán procesos de difusión de éstos de una fase a otra, produciéndose polímero que rodeará las gotas dispersas de la solución de fármaco, consiguiendo encapsularlo. Estas microcápsulas se depositarán en la interfase, y al retirarlas, nuevas “capas” de monómeros se pondrán en contacto directo, generando una nueva fina capa de microcápsulas; esta operación puede repetirse varias veces hasta dar la reacción por terminada ^{[27], [53]}.

* *Polimerización in situ*: la polimerización in situ es muy similar a la polimerización interfacial, sólo diferenciándose en que no se agregan reactivos a la fase dispersa donde se encuentra solubilizado el fármaco. Inicialmente, se forman tempranos “pre-polímeros” de bajo peso molecular en la fase continua, que irán creciendo conforme el tiempo transcurra, y eventualmente se depositarán sobre el fármaco en la interfase ^[60].

- Métodos fisicoquímicos:

* *Coacervación*: consiste en tres pasos fundamentales. En primer lugar, se dispersa el fármaco a encapsular en una solución del polímero que formará las microcápsulas. En seguida, se extrae el polímero de su solución (existen varias técnicas para lograrlo ^[61]) de modo que también quede como una especie dispersa; este polímero se depositará sobre la superficie del fármaco, formando las microcápsulas. Finalmente, las mismas pueden ser estabilizadas por desolvatación, tratamiento térmico o entrecruzamiento (“cross-linking”) de su estructura ^[60], y ser separadas de la solución. El método de la coacervación genera microcápsulas muy pequeñas (hasta de 4 μm) y una carga de material encapsulado de alrededor de 90% ^[62].

* *Encapsulamiento de polímeros por rápida expansión de fluidos supercríticos*: en esta técnica, tanto el polímero como el fármaco a encapsular son solubilizados en un fluido supercrítico (por lo general CO_2) mantenido a altas presiones. Al permitir la injerencia de la presión atmosférica por medio de una boquilla, el polímero y el fármaco se desolvatan, depositándose el primero sobre el segundo. Para esta técnica, es importante que tanto el polímero como el fármaco presenten alta solubilidad en el fluido supercrítico a altas presiones, pero no a presión atmosférica ^[61].

- Métodos físico-mecánicos: los más comunes son el secado por aspersion (“spray drying”), tecnología de lecho fluido (“fluidized-bed technology”), evaporación de solvente y recubrimiento en sistema de bombo (“coating pan”) ^[60]. Se explicará en qué

consiste el método de evaporación de solvente, pues el mismo fue empleado en la metodología experimental de este trabajo especial de grado.

* *Evaporación de solvente*: inicialmente, se solubiliza el material a encapsular y el polímero en un disolvente orgánico volátil (el material a encapsular también puede estar suspendido), y posteriormente, se vierte bajo agitación sobre un solvente insoluble en la fase orgánica mencionada (frecuentemente una fase acuosa) que contenga un agente tensoactivo solubilizado, produciendo una emulsión bajo agitación. La evaporación del solvente orgánico conduce a la deposición del polímero sobre el material a encapsular, generando así las microcápsulas, que precipitarán o se suspenderán en el medio acuoso y podrán ser separadas por filtración. El método de evaporación de solvente puede ser empleado mediante la variante de doble emulsión, que normalmente se emplea cuando la sustancia a encapsular posee característica hidrosolubles: en este caso, una primera emulsión, que comprenderá una fase interna acuosa con la sustancia hidrosoluble disuelta y una fase externa orgánica con polímero solubilizado, se vierte gota a gota bajo agitación sobre una nueva fase acuosa, contenedora ésta de un agente tensoactivo. El resultado es la ulterior formación de un sistema de emulsiones de distribución trifásica: fase acuosa/fase orgánica/fase acuosa. La evaporación de la fase orgánica conllevará a la aparición de las microcápsulas, que, de nuevo, se separarán por filtración. Mediante la aplicación de la técnica de evaporación de solvente con sólo dos fases (emulsión simple), suelen obtenerse micropartículas esféricas, mientras que si se lleva a cabo la técnica de doble emulsión, micropartículas con formas variadas pueden llegar a ser producidas ^[63].

2.6.- Características de las microcápsulas.

En términos globales, puede considerarse que existen dos parámetros a considerar cuando se preparan microcápsulas de liberación controlada: en primer lugar, la eficiencia de encapsulamiento del fármaco, un parámetro muy importante desde el

punto de vista comercial y, en segundo lugar, el comportamiento del dispositivo, lo cual requiere conocimiento del mecanismo y patrón de liberación del medicamento respecto al tiempo. Se ampliará la información acerca de estas variables globales y las “sub-variables” involucradas en las mismas. En todo momento, se orientará la discusión a la técnica de microencapsulación por evaporación de solvente, pues es ésta la que se aplicará en la metodología experimental del presente trabajo.

- *Eficiencia de encapsulamiento del fármaco:*

* *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 ^[64], 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) ^{[60], [47]}.

* *pH de la fase acuosa y solubilidad de la fase orgánica en la primera:* la eficiencia de encapsulamiento 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 pH=7 (por debajo

de este valor, el grupo amino estará protonado, y por encima, se desprotonarán los grupos hidroxilo) ^[47]. 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 ^[60].

* *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 ^[60], ^[47]. 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.

* *Tasa de remoción de solvente*: por lo general, es aceptado que 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 ^[60], de modo que el efecto de rápida precipitación de los polímeros es contrarrestado en casos como este.

* *Masa molar del polímero*: conforme el polímero posea menores masas molares, la eficiencia del encapsulamiento se verá drásticamente aumentada ^[65]. 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 ^{[65], [66]}, 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).

* *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 ^[66].

- *Comportamiento y características del dispositivo*:

* *Tamaño de microcápsulas y contenido de sustancia encapsulada*: es bien conocido que los mecanismos de liberación controlada comprenden un fenómeno de rápida y abundante expulsión inicial de material encapsulado, conocido como el efecto “burst”, que al traducirlo al español, vendría a ser algo similar a “efecto de ráfaga” o “efecto explosivo”. Luego de pasado cierto tiempo (característico de cada tipo y composición de polímero o copolímero), se normaliza la liberación, expulsándose la sustancia restante en un lapso de tiempo mucho más prolongado. Una de las razones que hacen posible este fenómeno es la relación entre el tamaño de las microcápsulas y la cantidad de droga encapsulada: en general, diámetros menores de partícula y altas concentraciones de sustancia dentro de la microcápsula resultan en una mayor expulsión inicial, puesto que esta sustancia estará más próxima a la superficie de la pared polimérica (aunque se estima que la mayor contribución a este efecto viene dado por parte del rápido desprendimiento de la sustancia a encapsular que queda adherida a la superficie externa de la microcápsula) ^{[63], [64], [67]}. Pasada esta primera liberación drástica, la expulsión concomitante tendrá un patrón mucho más controlado.

* *Porosidad de las microcápsulas:* las partículas que experimentan una precipitación lenta en el proceso de evaporación de solvente suelen sufrir también lentos endurecimientos de la matriz polimérica, permitiendo ingresos prematuros de agua por difusión a través del recubrimiento, generando porosidades y canales en su transitar hasta que la cápsula se haya conformado y endurecido definitivamente ^[66]. Estas porosidades permitirán la difusión del medio acuoso hacia el interior de la microcápsula una vez la cápsula haya sido completamente conformada, y a medida que existan más porosidades, más abundante será tal difusión, lo que por supuesto facilitará la salida del material encapsulado.

* *Concentración del polímero:* el número de poros superficiales de la microcápsula tiende a disminuir cuanto mayor sea la concentración del polímero en el proceso de formación de las mismas ^[68], ya que se tiende a generar coberturas más densas y menos quebradizas en el proceso de contracción de la matriz polimérica al momento de su endurecimiento por evaporación del solvente ^[47]; es así, que en general se infiere que a mayores concentraciones de polímero en el proceso de elaboración de las microcápsulas, menor cantidad de poros tendrán éstas, resultando en una menor tasa de liberación del fármaco.

* *Masa molar del polímero:* a menores masas molares (o pesos moleculares) de polímero en el proceso de elaboración de microcápsulas, mayor será su solubilidad en el medio orgánico, por lo que se deberá eliminar una gran cantidad de solvente para promover la precipitación de las mismas. Al generarse, estas microcápsulas serán altamente concentradas y densas, y tendrán poca porosidad ^[47]; el resultado será microcápsulas con menor tasa de liberación de fármacos. En otra fuente ^[69], se asume una tendencia contraria: polímeros con mayores masas molares generarán microcápsulas cuya erosión comenzará en tiempos mayores que en microcápsulas de menores masas molares. Una tercera fuente ^[70] afirma que, a pesar de que se podría inferir que microcápsulas hechas con polímeros de baja masa molar poseen menor

viscosidad y son más proclives a la erosión, se puede registrar casos donde exhiban menores tasas de liberación de fármacos que microcápsulas de polímeros de altas masas moleculares. La razón, al parecer, es similar a la ofrecida por la primera fuente citada: interacciones más íntimas entre las cadenas de polímeros de baja masa molar anula o reducen la existencia de porosidades, ralentizando la liberación de material encapsulado.

* *Tasa de agitación y concentración de emulsificante en la fabricación de la microcápsula:* mayores concentraciones de emulsificante aseguran mejor estabilización del sistema y limitan la coalescencia de las cápsulas, promoviendo la reducción de su tamaño. En cuanto a la tasa de agitación, cuanto mayor sea la misma, menores tamaños de microcápsula se tendrán, pues con altas agitaciones, también se favorecerá la producción de gotas de fase dispersa más pequeñas, que al ser recubiertas con la solución del polímero y solidificar, producirá microcápsulas de diámetros más reducidos y distribuciones de tamaño más estrechas ^[63].

* *pH de la fase acuosa:* dependiendo de los grupos funcionales de la pared polimérica, la misma sufrirá descomposición en menor o mayor grado conforme el pH aumente o disminuya pasado cierto límite. Si la sustancia encapsulada también posee grupos funcionales sensibles, aumentos o disminuciones de pH podrán transformar esta sustancia en una especie iónica, lo que incrementará su solubilidad en el medio acuoso y favorecerá su liberación.

2.7.- Microcápsulas de ácido poli (láctico-co-glicólico).

La atención dada al ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) comienza a partir de inicios de la década de los 70 cuando el ácido poliglicólico (PGA) se sintetiza por primera vez, fungiendo como el primer polímero biodegradable fabricado por el hombre. Le seguiría el ácido poliláctico (PLA), y luego, copolímeros entre ambas especies ^[64].

En estos mismos años, se comienza a experimentar con estos polímeros en aplicaciones de microencapsulación de sustancias para su liberación controlada, y su éxito se ve reflejado en estadísticas pasados aproximadamente 40 años de su primera consideración para los fines mencionados: se estima que desde el 2009 al 2011, unas 80 publicaciones se realizaron en relación a formulaciones de nano y microencapsulación con poliésteres sintéticos biocompatibles, dentro de las cuales la mayoría corresponden a la utilización de ácido poli (láctico-co-glicólico), ácido poliláctico y poli (ϵ -caprolactona) para tales aplicaciones ^[71].

Los primordiales factores responsables del éxito del PLGA como cobertura polimérica para medios de liberación controlada y prolongada de materiales en seres humanos radican en su buena histocompatibilidad, biodegradabilidad, seguridad en su aplicación en tejidos vivos (sus productos de degradación son el ácido láctico y el ácido glicólico, los cuales son fácilmente metabolizados y eliminados a través de la orina y del ciclo de Krebs en forma de CO_2 ^[23]) y la posibilidad de modular las propiedades de degradación y permeabilidad mediante el control del peso molecular del polímero y de la proporción de monómeros de ácido láctico y glicólico en su estructura. En este sentido, se ha encontrado que, a mayores proporciones de monómeros de ácido láctico, más lentamente se producirá la descomposición de la pared polimérica y la liberación de los productos encapsulados. Tal aseveración ocurre principalmente porque el ácido láctico posee un grupo metilo unido al carbono α , lo que hace lo hace más hidrófobo y limita la posibilidad de ocurrencia de hidrólisis (la misma se produce a través de la ruptura del enlace tipo éster entre ambos monómeros (ver **Figura 7**) y ralentiza la degradación ^[72]). La relación entre la cantidad de ácido láctico y ácido glicólico también definirá la cristalinidad del polímero, de lo cual ya se amplió en las páginas 20-21.

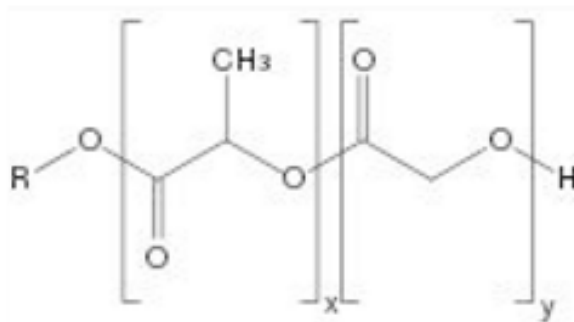


Figura 7. Molécula de ácido poli (láctico-co-glicólico). x = número de monómeros de ácido láctico; y = número de monómeros de ácido glicólico.

La relación entre la cantidad de ácido láctico y glicólico también afecta parámetros como la temperatura de transición vítrea (T_g), hecho que también fue disertado en las páginas 20-21; sin embargo, como complemento en este particular, es conocido que, a mayor cantidad de ácido glicólico, mayor proporción de hidratación sufrirá el polímero; en este sentido, el agua aparentemente surte un efecto plastificante en él, disminuyendo la rigidez de su estructura por aumentos en el denominado volumen libre (espacio entre cadenas poliméricas) y generando disminuciones concomitantes de la T_g ^[73]. Aun cuando el polímero esté hidratado, su T_g suele estar por encima de la temperatura fisiológica (37 °C), por lo que su consistencia normalmente es razonablemente rígida y vítrea ^[72] (por supuesto, la masa molar del polímero también tendrá efecto en esto, y tal correlación fue igualmente mencionada en la página 19).

Como último e importantísimo apartado en la caracterización y comprensión de los dispositivos de liberación controlada de PLGA de cara a su empleo terapéutico y su distribución comercial, una revisión más honda de su mecanismo de liberación de sustancias debe ser llevada a cabo. En ese sentido, es generalmente aceptado que la liberación de sustancias desde microcápsulas de PLGA puede ser mono, bi o trifásica ^[74], dependiendo de las características del polímero, del dispositivo y del material encapsulado (lo que significa que un sistema de microcápsulas puede enmarcar su

liberación en sólo una, dos o las tres fases en un mismo perfil). Cada fase se describe a continuación.

* *Primera fase*: se conoce como fase “burst” o de rápida liberación, la cual ya fue mencionada en la página 28. 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 ^[72]. En esta etapa, comienzan a hidrolizarse algunos enlaces tipo éster, el polímero va sufriendo reducciones en su temperatura de transición vítrea ^[28] 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 ^[72].

* *Segunda fase*: se produce una liberación lenta desde a 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 ^[72], ^[74]. 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.

* *Tercera fase*: masivo clivaje 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 ^[28], ^[75]. La liberación en esta fase se ha descrito como rápida (comparable con el efecto “burst” de la primera fase) ^[74]. Una vez concluida la tercera fase, se esperaría que la completa liberación de la sustancia encapsulada hubiera tenido lugar.

Recientemente, se ha determinado que no siempre la erosión de las matrices poliméricas ocurre de manera homogénea en toda su extensión. En función de la solubilidad del fármaco en el medio acuoso, la forma, tamaño y densidad de la cobertura polimérica, así como del peso molecular y la cristalinidad del polímero en cuestión, algunos dispositivos pueden sufrir aceleraciones en su proceso degenerativo a causa de especies oligoméricas y/o monoméricas de carácter ácido que, siendo liberadas en el interior de la matriz, ven impedida su difusión hacia el exterior, disminuyendo el pH interno y generando microclimas de degradación acelerada ^{[29], [57]} (desde luego, esto podría traer como consecuencia afectaciones en la sustancia encapsulada, si la misma se tratase de un compuesto sensible a ambientes ácidos.).

2.8.- Modelos matemáticos.

A través de los años, algunos modelos matemáticos han surgido a modo de estrategia para explicar, predecir y reproducir fenómenos y comportamientos asociados al desempeño de las microcápsulas. En un extremo, algunos modelos son proposiciones derivadas únicamente de observaciones empíricas, mientras que en el otro extremo, existen modelos que consideran estrictamente los postulados matemáticos que describen fenómenos de difusión como la ley de Fick. Entre los modelos más significativos, se tiene el modelo de Baker-Lonsdale, el de primer orden, el de orden cero, el de Hixson-Crowell, el de Jorgensen-Christesen, el de Higuchi y el de Korsmeyer-Peppas. De entre todos, los dos más figurativos son el de Higuchi y el de Korsmeyer-Peppas ^[73]. El modelo de Higuchi, que fue la primera propuesta de modelo matemático que persiguiera describir la liberación de drogas desde una matriz polimérica, y se enmarca dentro de las siguientes suposiciones ^[76]: i) la concentración de la droga dentro de la matriz es mucho mayor que su solubilidad. ii) la difusión de la droga sólo ocurrirá de manera unidimensional. iii) las partículas de droga son mucho más pequeñas que el espesor de la pared polimérica. iv) la disolución de la pared polimérica y la capacidad de hincharse de la matriz es insignificante. v) la difusividad de

la droga es constante. vi) la disolución de la droga en el medio de dispersión será perfecta. El modelo, pues, propone la siguiente relación.

$$f_t = Q = A \sqrt{D(2C - C_s) C_s t} \quad (1)$$

Donde Q es la cantidad de droga liberada en un tiempo t a través de unidad de área A, C es la concentración inicial de la droga, C_s es la solubilidad de la droga en el medio matricial y D es el coeficiente de difusividad de la droga en la sustancia polimérica. Para sistemas heterogéneos donde la concentración de la droga en la matriz es menor que su solubilidad, la liberación ocurre a través de porosidades y se define de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$f_t = Q = \sqrt{\frac{D\delta}{\tau} (2C - \delta C_s) C_s t} \quad (2)$$

Donde D ahora es la difusividad de la droga en el solvente, δ es la porosidad de la matriz, τ es la tortuosidad de la matriz (toma en cuenta el radio de los poros, así como las ramificaciones y canales en la superficie polimérica).

3.- OBJETIVOS.

3.1.- Objetivo general.

Sintetizar ácido poli (láctico-co-glicólico) y preparar microcápsulas para estudiar su viabilidad como agente de liberación controlada de fármacos de aplicación en la quimioterapia contra la leishmaniasis.

3.2.- Objetivos específicos.

- Sintetizar el ácido poli (láctico-co-glicólico) mediante policondensación directa de monómeros de ácido láctico y glicólico, tetrabutóxido de titanio como catalizador y xileno y/o anisol como solvente(s).

-Caracterizar el polímero sintetizado por métodos espectroscópicos.

- Utilizar la técnica de evaporación de solvente en doble emulsión para llevar a cabo el encapsulamiento del fármaco de acción leishmanicida.

-Caracterizar morfológicamente las microcápsulas sintetizadas.

-Determinar la eficiencia de encapsulamiento y la velocidad y patrón de liberación del fármaco contenido en las microcápsulas a pH fisiológico.

- Evaluar la eficacia del Cx encapsulado en cuanto a su efecto leishmanicida mediante ensayos *in vitro*.

4.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

4.1.- Reactivos, medios y/o solventes y equipos.

- Reactivos, medios y/o solventes

- Ácido láctico (85% m/m en solución acuosa) (Fisher Scientific International Inc., EUA).
- Ácido glicólico (Sigma-Aldrich Corporation, EUA).
- *m*-Xileno (Mallinckrodt Pharmaceuticals, Irlanda).
- Cloruro de estaño (II) dihidratado (Riedel-de Häen, Alemania).
- Cloruro de titanio (IV) (Riedel-de Häen, Alemania).
- *n*-Butanol (Riedel-de Häen, Alemania).
- Ácido sulfúrico (95-97%) (Riedel-de Häen, Alemania).
- Ácido fosfórico (85%) (Sigma-Aldrich Corporation, EUA).
- Ácido clorhídrico (Sigma-Aldrich Corporation, EUA).
- Cloroformo (Fisher Scientific International Inc., EUA).
- Metanol (Fisher Scientific International Inc., EUA).
- Isopropanol (Sigma-Aldrich Corporation, EUA).
- *d,l*-Lactida (Polysciences, Inc., EUA).
- Glicolida (Polysciences, Inc., EUA).
- Éter dietílico (Merck, Alemania).
- 1-Dodecanol (BDH Chemicals, Ltd., Gran Bretaña).
- Polivinil alcohol (PVA) (85.000-146.000 uma promedio) (Aldrich Chemical Company, Inc., EUA)
- Agar (HiMedia Laboratories Limited, India).
- Ciclopirox olamina (Sigma-Aldrich Corporation, EUA).

- Solución de buffer de fosfato (pH=7) (PBS por sus siglas en inglés) (Anachemia Ltd., Canadá).
- Miltefosina (Sigma-Aldrich Corporation, EUA).
- Paraformaldehído (Sigma-Aldrich Corporation, EUA).
- Medio de cultivo LIT para parásitos promastigotes de *Leishmania braziliensis*, preparado por el equipo de trabajo del Laboratorio de Biología y Quimioterapia de Parásitos Tropicales.
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilnitrotetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich Corporation, EUA).
- Medio de cultivo DMEM para macrófagos, preparado por el equipo de trabajo del Laboratorio de Biología y Quimioterapia de Parásitos Tropicales.
- Azul de tripano.

- Equipos

- Espectrómetro de UV-Visible (marca Shanghai Techcomp Instrument, Ltd., modelo 8500. Techcomp Ltd., China).
- Espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (modelo Nicolet 380. Thermo Fisher Scientific, Inc., EUA).
- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (modelo Eclipse 270. Jeol Ltd., Japón).
- Espectrómetros lectores de placas (marca BioTek, modelo Synergy HT. Biotek Instruments, Inc., EUA y modelo Infinite M200. Tecan Trading AG, Suiza).
- Microscopios ópticos (Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Alemania y modelo Cx31. Olympus Corporation, Japón).
- Microscopio óptico invertido (modelo IM 35. Zeiss, Alemania).
- Microscopio electrónico de barrido (marca Quanta, modelo 250 FEG. FEI Company, EUA).

- Incubadora microbiológica con agitación (modelo 311DS. Labnet International, Inc., EUA).
- Incubadora microbiológica con flujo de CO₂ (modelo AutoFlow 8500. NuAire, Inc., EUA).

4.2.- Secado de solventes empleados en las síntesis del tetrabutóxido de titanio y de los PLGA.

4.2.1.- Secado del *m*-xileno y el éter dietílico.

A un volumen de solvente contenido en un balón de tres bocas previamente secado y mantenido en atmósfera inerte se le añadió benzofenona (como indicador) y sodio metálico. La mezcla así preparada se mantuvo en agitación hasta que el solvente se tornó de una coloración azul oscuro-violeta, momento en que se separó de la mezcla inicial por destilación simple y fue almacenado en condiciones de atmósfera inerte y ambiente refrigerado.

4.2.2.- Secado del n-butanol.

Aproximadamente 200 mL de n-butanol fueron dispuestos en un balón de tres bocas, al cual se le anexó un condensador de reflujo. Tras establecer un ambiente de atmósfera inerte, un gramo de magnesio metálico (que fungió como desecante) se adicionó al n-butanol, y la mezcla se calentó a reflujo bajo agitación magnética por media hora. Transcurrido este lapso, se procedió a destilar el alcohol sustituyendo el condensador de reflujo por un montaje de destilación simple. Una vez separado, el n-butanol fue almacenado en condiciones de atmósfera inerte y refrigeración.

4.3.- Síntesis y caracterización del tetrabutóxido de titanio y de los PLGA.

4.3.1.- Síntesis del tetrabutóxido de titanio de los PLGA.

Para la síntesis de este catalizador, se dispuso en baño de hielo un balón de tres bocas dotado de un embudo de adición con nivelador de presión y trampa de hidróxido de sodio, de acuerdo a lo apreciado en la siguiente figura.

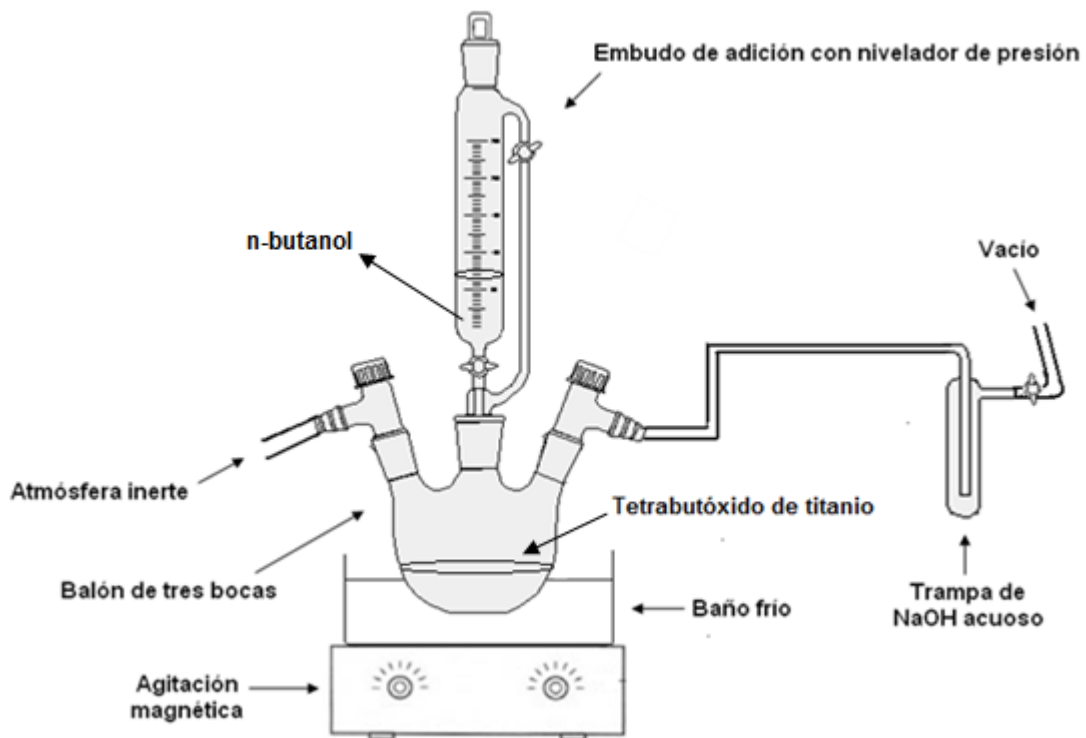
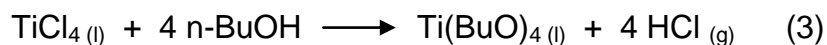


Figura 8. Montaje experimental asociado a la síntesis del tetrabutóxido de titanio.

Aproximadamente 0,5 mL de tetracloruro de titanio (sin previa purificación) fueron agregados al balón de tres bocas, para luego añadir, gota a gota, 10 mL de n-butanol

contenidos en el embudo de adición. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación hasta la obtención de un líquido amarillento, el cual se mantuvo almacenado en atmósfera inerte y ambiente refrigerado. La ecuación que representa la obtención del catalizador se muestra a continuación ^{[77], [78]}.



La caracterización se efectuó por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

4.3.2- Síntesis de PLGA por policondensación directa en solución

En un primer paso, se llevó a cabo la deshidratación de los monómeros: se introdujo, en un balón de 100 mL de capacidad, 4 g de mezcla inicial de monómeros, constituida por proporciones másicas de 90% de ácido láctico y 10% de ácido glicólico, además de 20 mL de *m*-xileno como solvente. La solución resultante fue destilada para eliminar el agua presente (ver **Figura 9**), para posteriormente ser sometida a condiciones de reflujo por un número determinado de horas bajo agitación magnética continua y en presencia de determinado catalizador. Al finalizar los lapsos establecidos, el solvente fue evaporado a sequedad, el producto resultante se disolvió en cloroformo, y luego se vertió en exceso de metanol en baño de hielo. El avance de la reacción fue seguida por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Para completar la eliminación de agua en la etapa de reflujo, en algunas experiencias se redujo parcialmente la presión interna del sistema mediante una bomba de vacío y empacando zeolitas en el condensador, como se muestra en la **Figura 10**.



Figura 9. Montaje de deshidratación por destilación de la solución de d,l-lactida y glicolida en *m*-xileno.

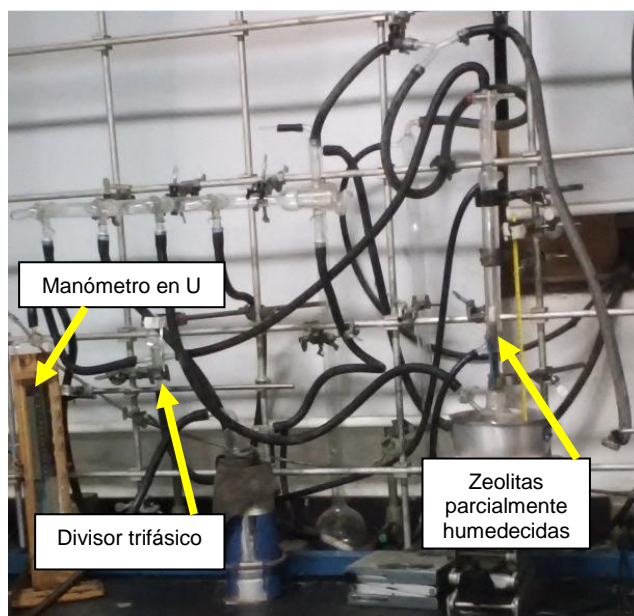


Figura 10. Sistema de reflujo a presión reducida.

4.3.3- Síntesis de PLGA por polimerización por apertura de anillo en masa.

La síntesis fue basada en la metodología utilizada en trabajos previos llevados a cabo en el Laboratorio de Polímeros de la Facultad de Ciencias ^{[79], [80], [81]}. En tres ampollas de vidrio previamente secadas y en atmósfera inerte, se añadieron 10 g de los monómeros, variando la composición másica en cada caso (99:1, 98:2 y 95:5 de proporciones en masa de d,l-lactida y glicolida, respectivamente). Luego, se agregaron 5 mL de una suspensión de cloruro de estaño (II) dihidratado (catalizador) en éter, y otros 5 mL de una solución de 1-dodecanol (iniciador) también en éter, representando estas cantidades de catalizador e iniciador un 0,2% y 0,05% de la masa total de monómeros, respectivamente. Todas las especies mencionadas fueron mezcladas mediante agitación magnética por una hora, para luego evaporar el solvente a través de vacío. Finalmente, las ampollas fueron selladas (manteniendo el vacío interno) empleando un soplete, y se sumergieron en baño térmico a 160 °C por 8 horas

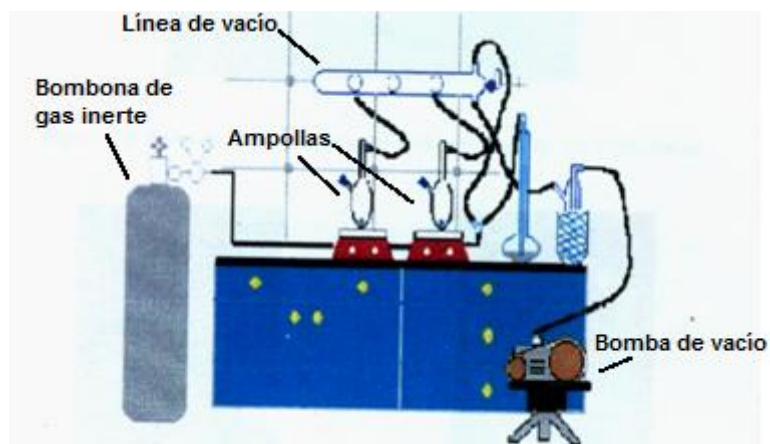


Figura 11. Montaje experimental empleado en la síntesis vía ROP en masa.



Figura 12. Ampollas selladas con monómeros en su interior, sumergidas en baño térmico en el proceso de calentamiento.

Finalizadas las 8 horas de síntesis, los reactores se almacenaron en el congelador para detener la reacción. Para recolectar el producto, se rompieron cuidadosamente las ampollas, y el sólido generado se solubilizó en una mínima cantidad de cloroformo, precipitándose seguidamente por adición de esta solución a un exceso de metanol. El polímero final fue filtrado por gravedad, secado al vacío, almacenado en atmósfera inerte y ambiente refrigerado, para posteriormente ser caracterizado por espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) y resonancia magnética nuclear (^1H RMN).

4.4.- Elaboración y caracterización de microcápsulas.

4.4.1- Elaboración de microcápsulas vacías.

La técnica de emulsión simple y evaporación de solvente fue empleada para esta metodología. Una solución de polímero al 0,05% en 10 mL de cloroformo fue adicionada gota a gota a 40 mL de solución acuosa de PVA al 2% en masa sometida a agitación mecánica a 250 rpm. La suspensión se mantuvo en agitación por tres horas y media a temperatura del laboratorio, elevándola posteriormente a 30 °C y manteniéndola así por una hora y media adicional para lograr la volatilización total del cloroformo. La fase acuosa final se filtró por gravedad, y las microcápsulas separadas se lavaron copiosamente con agua tibia para eliminar la mayor cantidad posible de PVA adherido. Finalmente, las cápsulas fueron secadas al vacío y almacenadas en atmósfera inerte y ambiente refrigerado.

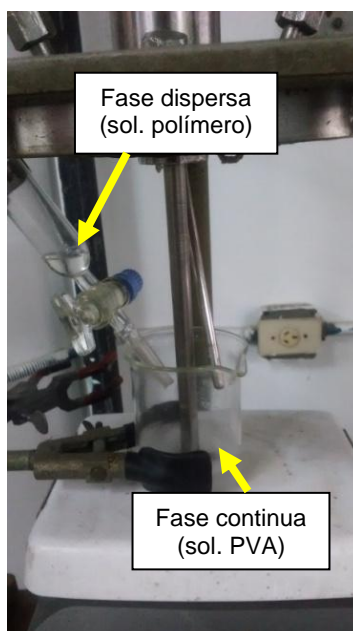


Figura 13. Montaje de elaboración de microcápsulas en ausencia de fármaco.

Las cápsulas fueron detalladas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Para observar su estructura interna, una muestra de las cápsulas fue incluida en resina epóxica, sumergida en nitrógeno líquido y fracturada en frío con una pequeña guillotina. La sección transversal de la resina fracturada fue posteriormente observada por MEB.

4.4.2.- Elaboración de microcápsulas con fármaco.

El método de doble emulsión (w/o/w) con evaporación de solvente fue puesto en práctica para la producción de microcápsulas cargadas del fármaco Cx, atendiendo a metodologías ya utilizadas con anterioridad en el Laboratorio de Polímeros^{[79], [80], [81]}. La primera emulsión fase acuosa/fase oleosa (w/o, del inglés *water/oil*, "agua/aceite") se preparó a partir de una fase continua (fase oleosa) constituida por una solución al 0,05 % en masa de polímero en 10 mL de cloroformo y una fase dispersa (fase acuosa), donde se disolvieron 7,4 mg de fármaco Cx en 1,6 mL de solución acuosa de agar al 1,8% en masa (el agar fungió de surfactante para la primera emulsión, y para mantenerlo solubilizado, debió preservarse la fase acuosa a 60 °C). Preparadas ambas fases, la fase oleosa se añadió, a través de embudo de adición, gota a gota sobre la fase acuosa, que se hallaba bajo agitación en ultrasonido. Una vez vertida toda la fase oleosa, se continuó agitando por 5 minutos, formando así la primera emulsión agua/aceite.

Para preparar la segunda emulsión fase acuosa/fase oleosa/fase acuosa (w/o/w, del inglés *water/oil/water*, "agua/aceite/agua"), se agregó la primera emulsión (que ahora fungiría de fase dispersa) en 200 mL de una solución acuosa de PVA al 2% en agitación mecánica a una velocidad de 800 rpm y mantenida a 15 °C por 30 minutos. Al transcurrir este tiempo, se redujo la velocidad de agitación a 500 rpm, se eliminó el baño frío para que el sistema alcanzara la temperatura del laboratorio y se continuó el proceso de agitación por un lapso adicional de 5 horas. La suspensión obtenida fue

centrifugada, y las microcápsulas así producidas fueron lavadas con agua destilada tibia para eliminar surfactantes adheridos en su superficie externa. Finalmente, las cápsulas fueron secadas al vacío, pesadas y almacenadas en atmósfera inerte y ambiente refrigerado.

Una imagen del montaje de preparación de las microcápsulas en presencia de fármaco se muestra a continuación:



Figura 14. Montaje general de la preparación de las microcápsulas en presencia de fármaco Cx.

4.4.3. Evaluación del tiempo de descomposición de las microcápsulas en condiciones fisiológicas emuladas.

Aproximadamente 5 mg de microcápsulas vacías de cada composición polimérica fueron colocadas en tubos de ensayo que contenían, cada uno, 1 mL de buffer de fosfato (pH=7). Los tubos fueron parcialmente sumergidos en un baño de agua a una temperatura constante de 37 °C por un periodo de tiempo que permitiera conseguir la degradación total del material. Para evaluar el estado morfológico de las microcápsulas, se tomaron alícuotas de suspensión de microcápsulas cada cierto tiempo, y las mismas fueron observadas al microscopio óptico.

4.4.4.- Determinación de la cantidad de fármaco asociado en las microcápsulas.

Inicialmente, se prepararon soluciones madre de cada composición de copolímero disolviendo 1 mg de microcápsulas con fármaco en 10 mL de cloroformo. A partir de cada solución madre, se prepararon soluciones más diluidas para hacer determinaciones cuantitativas de concentración del fármaco contenido en las cápsulas mediante espectrometría UV-Visible (longitud de onda de trabajo: 306 nm).

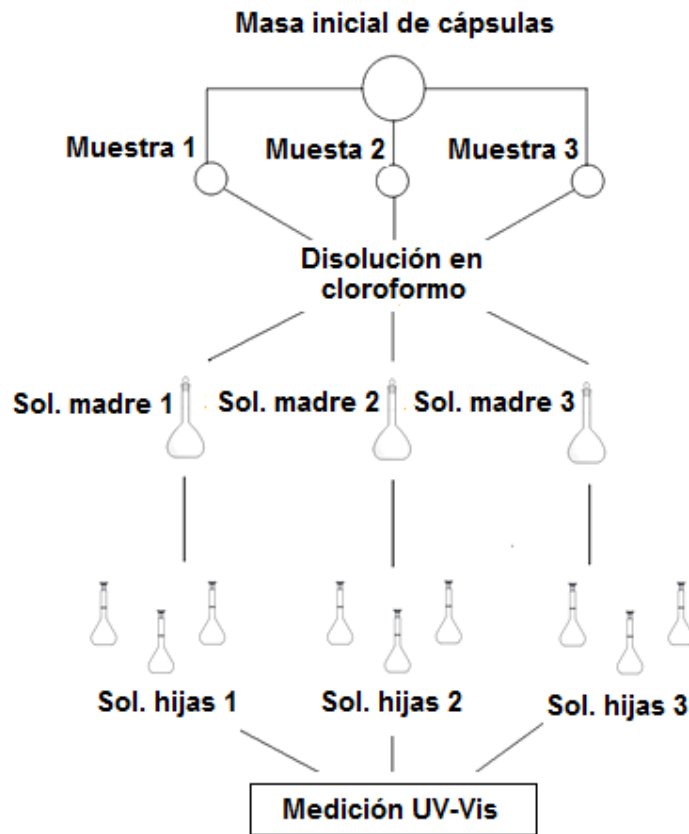


Figura 15. Esquema de muestreo de las microcápsulas con fármaco.

Las concentraciones asociadas a las absorbancias medidas fueron determinadas utilizando una curva de calibración de concentración del fármaco en cloroformo (ver **Anexos**).

Además de las microcápsulas con fármaco, muestras de cada polímero fueron procesadas, encontrando que éstos no interferían en la absorbancia del ciclopirox olamina en la longitud de onda de trabajo.

4.5.- Determinación de la cinética de liberación del ciclopirox desde las cápsulas.

4.5.1.- Cinética preliminar de liberación del ciclopirox en buffer de fosfato.

En una placa microtituladora de 24 pozos, se dispusieron 2 mL de solución de buffer de fosfato en tres pozos diferenciados. En cada uno de estos pozos, se coloca entre 0,6-0,7 mg de cápsulas de polímero con fármaco en su interior, destinando el primer pozo a la composición PLGA 99:1, el segundo para PLGA 98:2, y el tercero para PLGA 95:5, de acuerdo a la siguiente imagen.

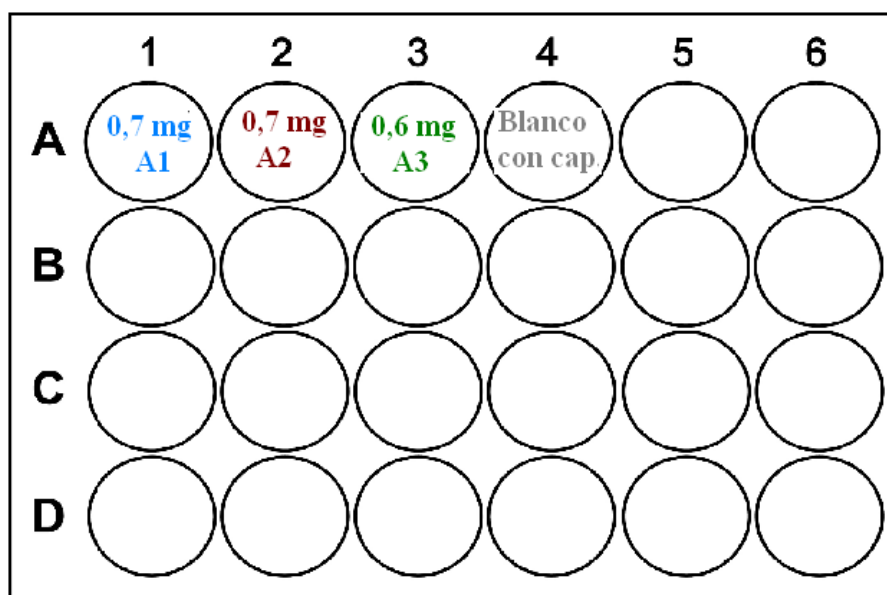


Figura 16. Disposición de las cápsulas en los pozos de la placa de 24 pozos.

La placa se dejó reposar en un equipo con agitación y control de temperatura (28-30 °C) durante una hora, resguardada en una cámara húmeda para mantener una atmósfera saturada en humedad que evitar la evaporación del buffer dispuesto en los pozos. Transcurrido el tiempo previsto, se tomaron tres alícuotas de 200 μ L, las cuales

fueron servidas en una placa adicional de 96 pozos, donde se dispusieron tres alícuotas de PBS como blanco. En los pozos de esta última placa donde se colocaron las alícuotas y el blanco, se incidió radiación ultravioleta a 306 nm con un espectrofotómetro lector de placas, obteniéndose la medida de su absorbancia a esta longitud de onda y determinando su concentración asociada a partir de una curva de calibración de ciclopirox olamina en PBS elaborada previamente (ver **Anexos**). Posterior a las medias, los 200 μ L tomados de la placa de 24 pozos y servidos en la de 96 fueron devueltos a sus respectivos pozos de origen.

El procedimiento recién descrito se efectuó por 30 días, distribuyéndose la adquisición de datos de la siguiente manera: el primer día de trabajo se realizaron 5 medidas, luego 3 medidas el segundo día, 2 medidas el tercer y cuarto día, y una sola medida el resto de los días. La dinámica de medición estuvo supeditada a la tendencia de liberación de fármaco que se iba observando desde las cápsulas, y al horario de trabajo reglamentario del personal operador del espectrofotómetro lector de placas.

4.5.2.- Cinética de liberación del ciclopirox en medio LIT.

La determinación del patrón de liberación en LIT se realizó de manera muy similar a como se efectuó en PBS, salvo que en el caso que ahora se expone, sólo se trabajó con las cápsulas de A₁, debido a que fueron las que presentaron el mejor desempeño en la determinación de la cinética preliminar en PBS. Los regímenes de medición de absorbancia, así como la longitud de onda y demás parámetros de trabajo, fueron idénticos a los empleados en la obtención de la cinética preliminar de liberación en PBS, con la salvedad de que las mediciones en medio LIT sólo se efectuaron por 10 días (prácticamente el mismo período de conteos directos en cámara de Neubauer para la construcción de la curva de crecimiento que se describirá próximamente).

4.6.- Determinación de viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

4.6.1.- Viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en presencia de fármaco Cx mediante ensayo colorimétrico.

En una placa microtituladora de 96 pozos, se depositaron 100 μL de medio LIT con 400×10^3 parásitos axénicos por cada pozo en un total de 30 pozos, y se dejaron incubar a 29-30 °C por 24 horas. En cada triplicado de pozos, se vertieron alícuotas apropiadas de una solución madre de ciclopirox olamina, obteniéndose concentraciones de 100, 50, 20, 10, 5, 1 y 0,5 μM en los pozos correspondientes (1-21); los pozos restantes donde se depositaron parásitos (pozos 22-30) consistieron en control positivo (parásitos en presencia de 20 μM de miltefosina), control negativo (parásitos en ausencia de fármacos u otra posible presión selectiva) y parásitos en presencia de microcápsulas vacías de A₁. En un triplicado adicional, se dispusieron 100 μL por pozo de medio LIT sin parásitos, el cual fungió como blanco. Un esquema de la disposición de las soluciones en la placa se muestra en la siguiente imagen.

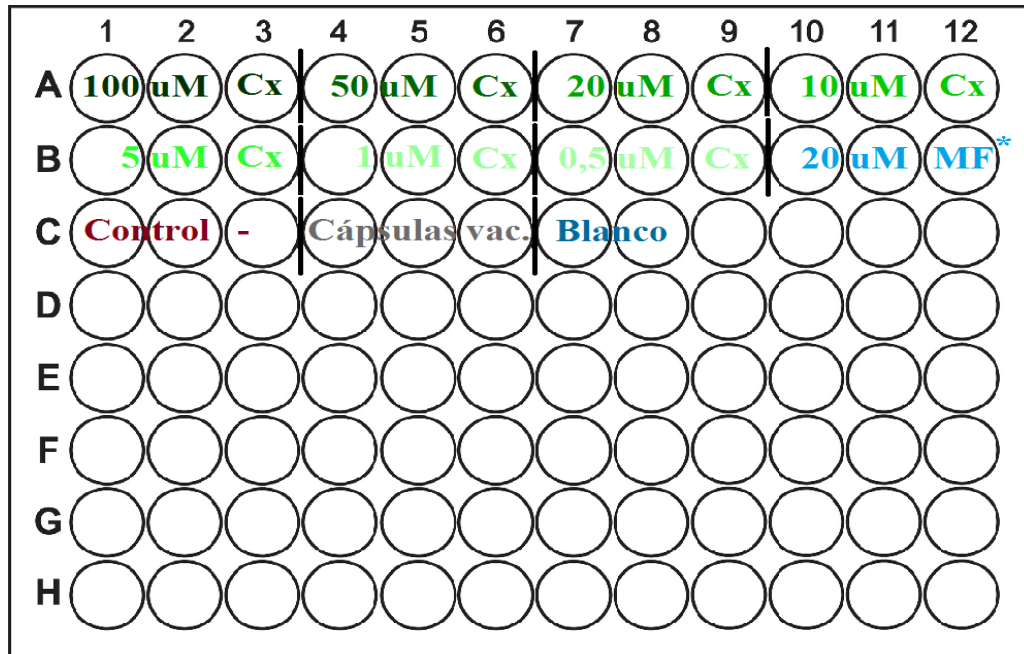


Figura 17. Disposición de las soluciones en la placa microtituladora de 96 pozos. El triplicado señalado con asterisco corresponde al Control positivo.

La placa de 96 pozos, preparada como se indicó, se dejó reposar a 28-30 °C durante 96 horas. Transcurrido el tiempo mencionado, a todos los pozos fueron adicionados 10 µL de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilnitrotetrazolio (MTT) en una concentración de 5 mg/mL, dejándose incubar por 4 horas y en oscuridad a 28-30 °C. Finalmente, se promovió la lisis de los promastigotes y la disolución de cristales de formazán (de haberse producido) con adición de 100 µL de solución de isopropanol en medio ácido en cada pozo, y la placa fue ulteriormente analizada a 570 nm en el espectrofotómetro lector de placas para cuantificar la absorbancia del mencionado formazán. A partir de los datos obtenidos, fue posible calcular un valor estimado de EC₅₀.

4.6.2.- Viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en presencia de microcápsulas con ciclopirox olamina mediante conteos directos.

Se dispusieron, en un total de 12 fiolas previamente autoclavadas (esterilizadas a altas temperaturas y presiones), 10 mL de medio LIT con una concentración de 1×10^6 parásitos axénicos por mililitro, y a cada triplicado de fiolas así dispuestas se le agregó, bajo condiciones de estricta esterilidad, lo siguiente: 1) Primer triplicado: aproximadamente 0,5 mg de microcápsulas A₁ por fiola. 2) Segundo triplicado: cápsulas vacías de A₁ 3) Tercer triplicado: alícuotas de solución madre de ciclopirox olamina tal que se lograra una concentración de 150 μ M del fármaco (Control +) 4) Cuarto triplicado: parásitos sin presión selectiva (Control -).

Las fiolas se mantuvieron en agitación y a temperatura de 28-30 °C permanentemente, tomándose alícuotas de todas las condiciones cada 24 horas para efectuar conteos directos de proliferación parasitaria en cámara de Neubauer por un total de 11 días. A partir de los conteos directos, se empleó la siguiente ecuación para determinar la población parasitaria

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

4.7.- Estudio de la citotoxicidad del ciclopirox olamina en macrófagos BMDM.

Macrófagos BMDM axénicos cultivados en recipientes T25 fueron rastrillados y disgregados en esterilidad, para seguidamente ser depositados sobre placas cubreobjetos (80 μ L de medio DMEM con 8×10^3 parásitos por placa en un total de 63 placas), las cuales, a su vez, fueron dispuestas dentro de placas microtituladoras de 6 pozos. Tras ser sembradas las células, las placas se dejaron reposar a 37 °C en incubadora de CO₂ por 24 horas para permitir la fijación de las células a las superficies

de las mismas. Transcurrido el tiempo de incubación, en los primeros doce pozos se vertieron 2,5 mL de disoluciones de 1000, 500, 300 y 100 μM de ciclopirox olamina en medio DMEM, considerando cada condición por triplicado (lo que expuso 9 placas cubreobjetos a cada condición); los pozos restantes donde se depositaron placas cubreobjetos (pozos 13-21) consistieron en control positivo (macrófagos en presencia de 2,5 mL de solución de 100 μM de miltefosina en DMEM), control negativo (macrófagos en ausencia de fármacos u otra posible presión selectiva) y macrófagos en presencia de microcápsulas vacías. Un triplicado adicional fue colmado con medio DMEM, que únicamente fue dispuesto para saturar el interior de la placa microtituladora e inhibir evaporaciones del medio líquido de los demás pozos. La disposición de las soluciones en los pozos se muestra en la siguiente imagen.

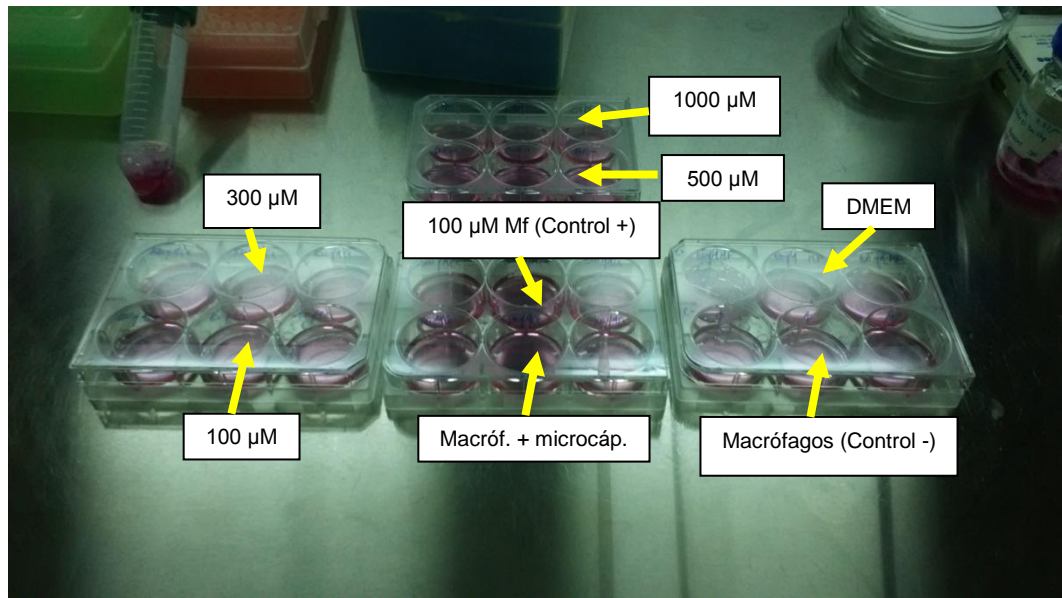


Figura 18. Triplicados de pozos por cada condición de trabajo con macrófagos BMDM.

Dispuestos los pozos de la manera señalada, la placa microtituladora se dejó reposar a 37 °C en la incubadora de CO₂ durante 96 horas. Seguidamente, se retiraron gentilmente las placas cubreobjetos según se fuesen a contabilizar, para lo cual se les adicionaron 10 µL de solución de azul de tripano al 1%; el aspecto de las placas cubreobjetos dispuestas a ser contabilizadas se muestra a continuación.

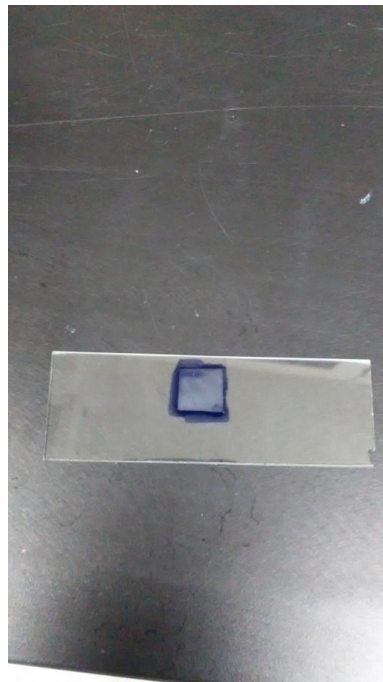


Figura 19. Aspecto de placa cubreobjetos donde se sembraron células tras adicionarle solución de azul de tripano.

Para cada placa se consideraron 10 campos visuales al microscopio, para un total de 90 campos por condición. Las células vivas contabilizadas fueron aquellas que no adquirieron la tonalidad del colorante, puesto que, al mantener intacta su membrana celular, fueron capaces de restringir el ingreso del colorante.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1.- Síntesis y caracterización de los PLGA.

Previamente a ser utilizado en las polimerizaciones, se sintetizó el catalizador tetrabutóxido de titanio a partir de tetracloruro de titanio y n-butanol y se caracterizó por FT-IR. En la siguiente figura se presenta el espectro obtenido, en conjunto con una tabla de asignaciones de señales.

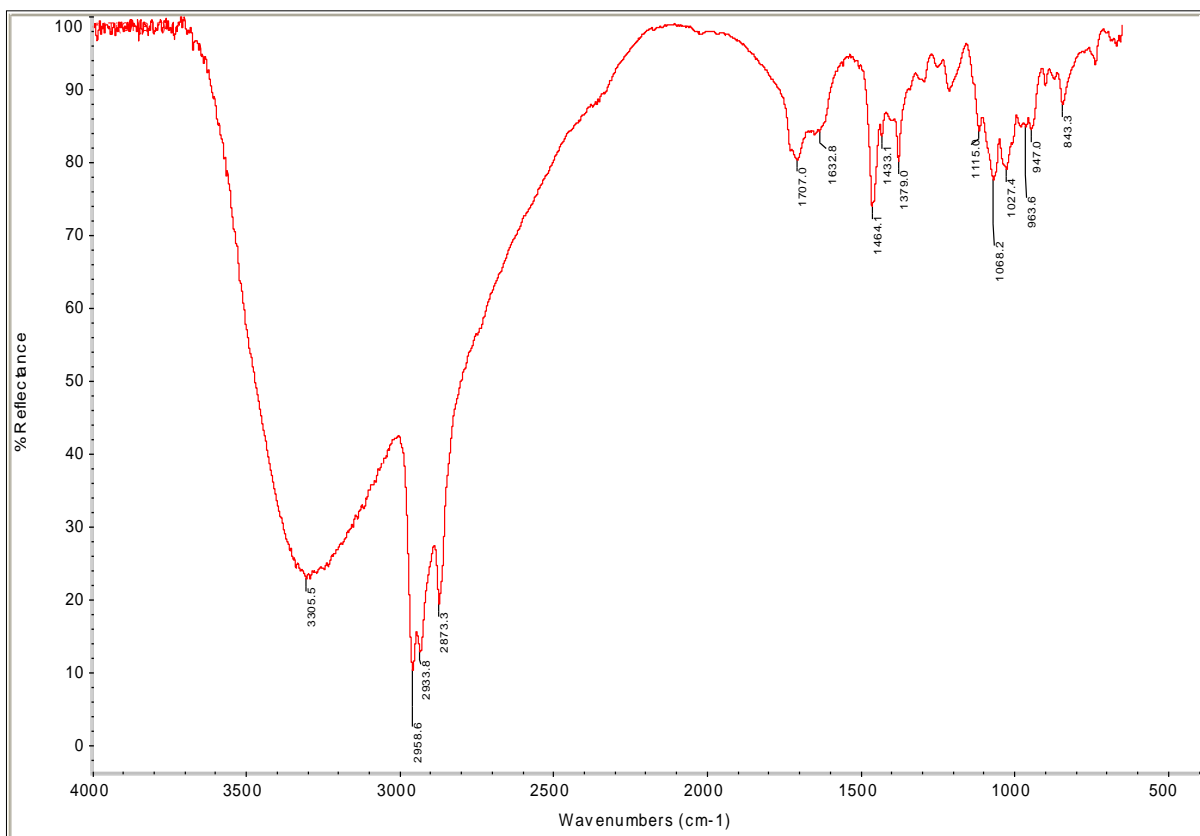


Figura 20. Espectro FT-IR del tetrabutóxido de titanio en butanol, sintetizado en el laboratorio.

| Señal FT-IR (cm-1) | Enlaces involucrados | Referencia |
|---------------------------|---|------------|
| 3305,5 | Estiramientos O-H del butanol | |
| 2958,6; 2933,8; 2873,3 | Estiramientos C-H esqueleto carbonado | [77] |
| 1379 - 1470 | Flexiones C-H esqueleto carbonado | |
| 1115; 1068,2; 1027,4 | Estiramientos de enlaces Ti-O-C tetrabutóxido de titanio | |

Tabla 1. Señales FT-IR y asignaciones de enlaces.

Las bandas de mayor interés son aquellas asociadas a estiramientos de los enlaces Ti-O-C del tetrabutóxido de titanio final, a 1115; 1068,2; 1027,4 cm-1.

Al emplear el tetrabutóxido de titanio como catalizador en la policondensación, se estima que el siguiente mecanismo pueda tener lugar [82].

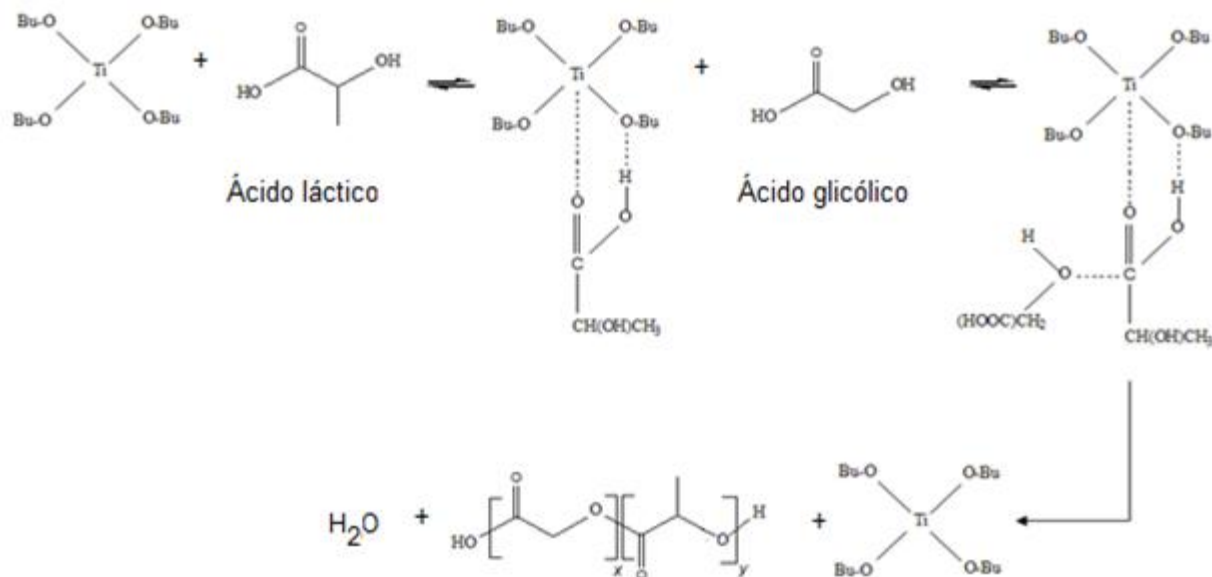


Figura 21. Mecanismo de condensación de una molécula de ácido láctico y otra de ácido glicólico, catalizada por el tetrabutóxido de titanio.

5.1.1.- Síntesis y caracterización de PLGA por policondensación directa en solución.

En la **Tabla 2** se muestra las condiciones para la síntesis del PLGA por policondensación directa en solución, utilizando *m*-xileno como solvente.

| Referencia | Comp. alim. (%m _{A.L.} : %m _{A.G.}) | Catalizador | Cant. catal. (%m alim. total) | t reflujo (h) | T reflujo (°C) |
|------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------|---------------|----------------|
| PLGA 1 | 87,4 : 12,6 | Ti(BuO) ₄ | 4 | 6 | 160 |
| PLGA 2 | 87,6 : 12,4 | Ti(BuO) ₄ | 4 | 10 | 160 |
| PLGA 3 | 87,6 : 12,4 | H ₂ SO ₄ | 1,5 | 10 | 150 |
| PLGA 4 | 90,1 : 9,9 | H ₃ PO ₄ | 1,5 | 19 | 160 |
| ¹ PLGA 5 | 88,1 : 11,9 | H ₃ PO ₄ | 1,4 | 11 | 155 |
| ^{1,2} PLGA 6 | 88,4 : 11,6 | SnCl ₂ ·2 H ₂ O | 0,11 | 70 | 140 |

¹Reacción realizada a presión reducida.

²Uso de Zeolita como agente desecante.

Tabla 2. Condiciones de síntesis de los PLGA por policondensación directa en solución.

Los polímeros obtenidos en cada uno de los sistemas resultaron ser un material de consistencia viscosa, muy parecido a lo mostrado en la siguiente figura ^[83].



Figura 22. Polímero en bloque de PLGA con polietilenglicol (PLGA-PEG-PLGA), de consistencia y apariencia muy similar a los productos obtenidos por policondensación directa en solución.

Los productos **PLGA 1**, **PLGA 2** y **PLGA 4** exhibieron prácticamente el mismo aspecto, coloración y consistencia, mientras que el **PLGA 3** emergió como un material de consistencia también viscosa pero de tonalidad parda, posiblemente gracias a fenómenos de descomposición por reacción de oxidación o carbonización debido a la presencia del ácido sulfúrico. Se estima que la naturaleza oleosa de estos productos haya sido una consecuencia de su bajo peso molecular (pudiéndose catalogar como materiales oligoméricos) y la razón por la que no fue posible obtener un polímero de mayor magnitud en este parámetro radicó en la dificultad para eliminar de manera eficiente el agua que se genera en la reacción de condensación. Tal motivo impulsó la implementación de vacío durante la síntesis del **PLGA 5**, aunque, desafortunadamente, el material producido volvió a mostrar características casi idénticas a los materiales **PLGA 1**, **PLGA 2** y **PLGA 4**.

Con el fin de establecer condiciones que promovieran una remoción de agua más eficiente y mayor crecimiento polimérico, en la síntesis de **PLGA 6** se incluyeron,

en el condensador de reflujo, zeolitas (previamente activadas por tratamiento térmico) como desecante del agua que se formara en la policondensación; además, se empleó cloruro de estaño (II) dihidratado como catalizador, el cual ha demostrado un desempeño superior en la producción de PLGA de alto peso molecular ^{[33], [84]}, y el tiempo de reflujo se extendió notablemente. El mecanismo de formación de PLGA por policondensación con cloruro de estaño (II) dihidratado no se ha comprendido profundamente, pero uno de los modelos propuestos se muestra en la **Figura 23** ^{[84], [85]}.

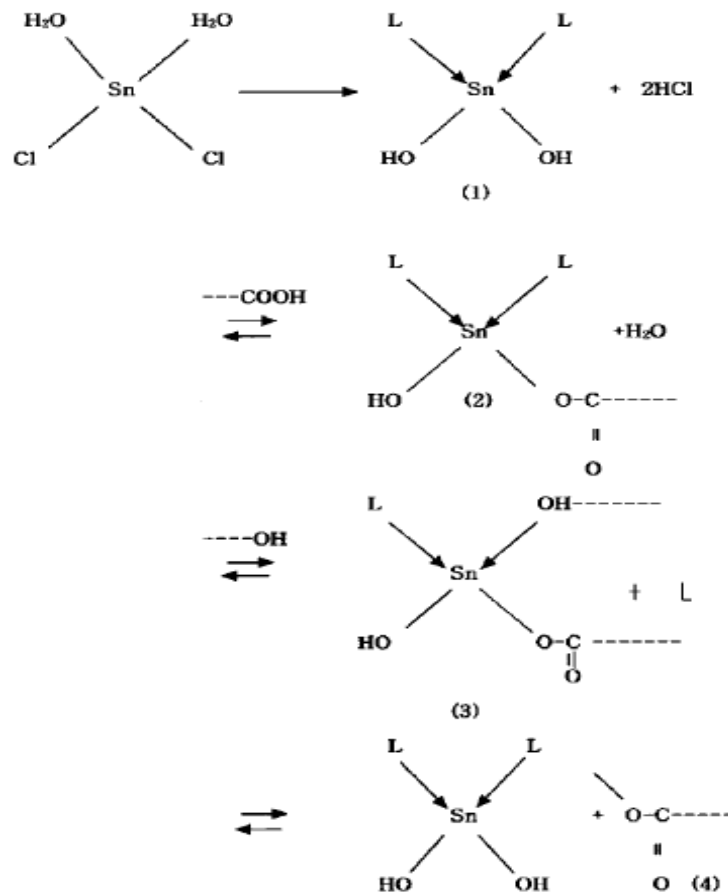


Figura 23. Mecanismo de formación de PLGA por policondensación con cloruro de estaño (II) dihidratado.

Aun habiendo tomado las medidas mencionadas, el material obtenido fue un oligómero, al igual que en las reacciones anteriores. Está claro que el proceso de eliminación del agua que se forma en el transcurso de la reacción es uno de los factores más importantes en la definición de la masa molecular del polímero final, por lo que su optimización es clave en cuanto a la funcionalidad del método de síntesis por condensación directa en lo que a la preparación de un polímero con mayor peso molecular se refiere.

Todos los productos reportados en la **Tabla 2** fueron caracterizados por espectrometría FT-IR; en la **Figura 24** se muestra el espectro del polímero obtenido en PLGA 1, con cual todos los demás guardaron semejanzas.

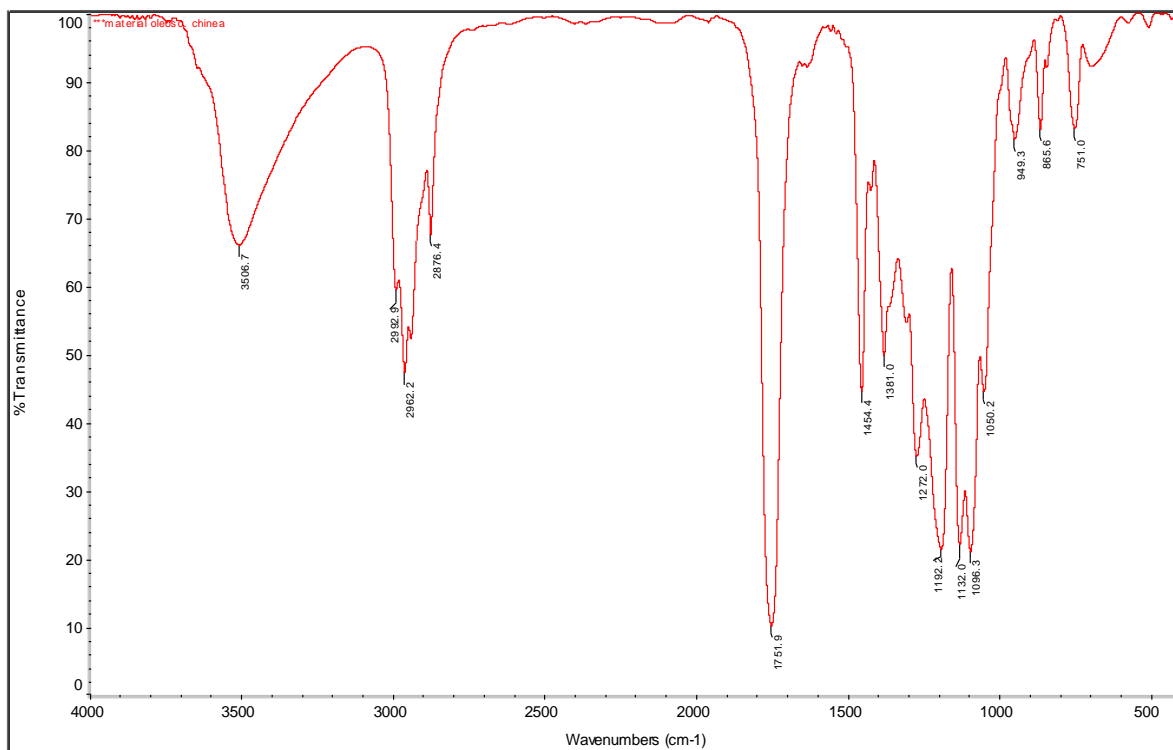


Figura 24. Espectro FT-IR del producto **PLGA 1**.

| Señal FT-IR (cm^{-1}) | Enlaces involucrados | Referencia |
|----------------------------------|---|------------|
| 3506,7 | Estiramientos O-H. | [86], [30] |
| 1050,2 | Flexiones O-H de grupos finales. | [86] |
| 2992,9 | Estiramientos $-\text{CH}_3$. | [86] |
| 1454,4 | Mov. de enlaces C-H de $-\text{O}-\text{CH}_2-$. | [46], [86] |
| 2962,6 | Estiramientos -CH. | [46], [86] |
| 1381 | Flexiones -CH. | [75] |
| 1751,9 | Estiramientos C=O carbonílico. | [30], [46] |
| 1192,2; 1132; 1096,3 | Flexiones de enlaces C-H | [30], [46] |

Tabla 3. Señales FT-IR y asignaciones de enlaces involucrados de la **Figura 24**.

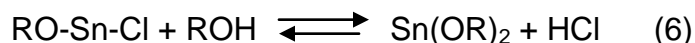
En la **Tabla 3** se muestran las asignaciones de las señales correspondientes a los copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico preparados. Se observa una señal de estiramiento del enlace C=O que aparece entre 1751 y 1733 cm^{-1} (en este caso, 1751,9 cm^{-1}) y que corresponde a un éster alifático (para los monómeros de ácido láctico y glicólico, esta señal aparecería a 1721 cm^{-1} y 1730 cm^{-1} respectivamente; su no existencia confirma el consumo completo de estos ácidos en la reacción). Se aprecia, además, una señal en 1454 cm^{-1} asignada a las vibraciones de la deformación del enlace C-H sobre los grupos $-\text{O}-\text{CH}_2-$ presentes en la fracción de ácido glicólico. Son dignas de mencionar también las bandas de vibración en 2992 y 2962 cm^{-1} pertenecientes a los estiramientos simétricos del enlace C-H sobre los grupos CH_3 y CH y las señales de flexión de los enlaces C-H a 1050, 1132 y 1192 cm^{-1} de la fracción de ácido láctico en los copolímeros. Finalmente, la señal a 3506 cm^{-1} pertenece al modo de estiramiento de los grupos hidroxilo (OH), posiblemente debidos a agua no debidamente retirada en la policondensación y/o absorbida por el material.

5.1.2.- Síntesis y caracterización de PLGA por apertura de anillo en masa.

Debido a las dificultades que se presentaron en la obtención de un copolímero de PLGA de alto peso molecular por policondensación en solución, se decidió cambiar la estrategia sintética y poner en práctica el método de la polimerización por apertura de anillos de d,l-lactida y glicolida (frecuentemente referida como síntesis vía ROP, acrónimo de su denominación en inglés: *ring-opening polymerization*) en masa, una vía de síntesis que ya había sido seguida con éxito en anteriores trabajos realizados en el Laboratorio de Polímeros ^{[79], [80], [81]}.

Las síntesis por ROP en masa ensayadas comprendieron tres composiciones másicas nominales diferenciadas de d,l-lactida y glicolida, a saber: 99:1 (A₁), 98:2 (A₂) y 95:5 (A₃). Como se mencionó con anterioridad, el iniciador empleado para la polimerización fue lauril alcohol (dodecil alcohol), y el cloruro de estaño (II) dihidratado fungió como catalizador, adicionándose cantidades de estos últimos que representaron 0,2% y 0,05% de la masa total de monómeros, respectivamente.

El mecanismo propuesto en la síntesis por ROP practicadas es de coordinación-inserción y se muestra en la **Figura 25** ^{[50], [55]}.



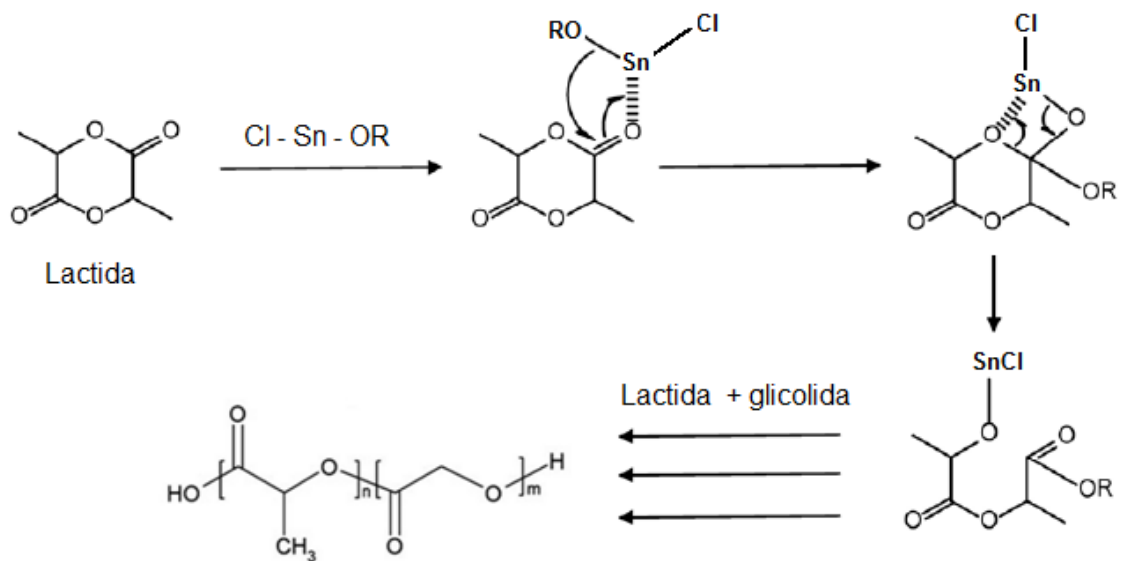


Figura 25. Mecanismo de síntesis de PLGA por coordinación-inserción usando cloruro de estaño (II) dihidratado y un iniciador alcohólico.

Para todas las composiciones se obtuvo al menos dos productos: uno mayoritario (sólido blanco, que en todos los casos fue aislado y analizado) y un remanente viscoso no caracterizado pero de idéntica consistencia y aspecto que los oligómeros producidos en las policondensaciones directas en solución. Para el material A_2 , el sólido blanco resultó el producto minoritario, siendo el mayoritario las especies oligoméricas; además de ello, se obtuvo un tercer producto de esta síntesis: se trató de un compuesto de tonalidad marrón, el cual no fue caracterizado. A continuación, se muestran y discuten los espectros de FT-IR de los sólidos blancos para cada composición.

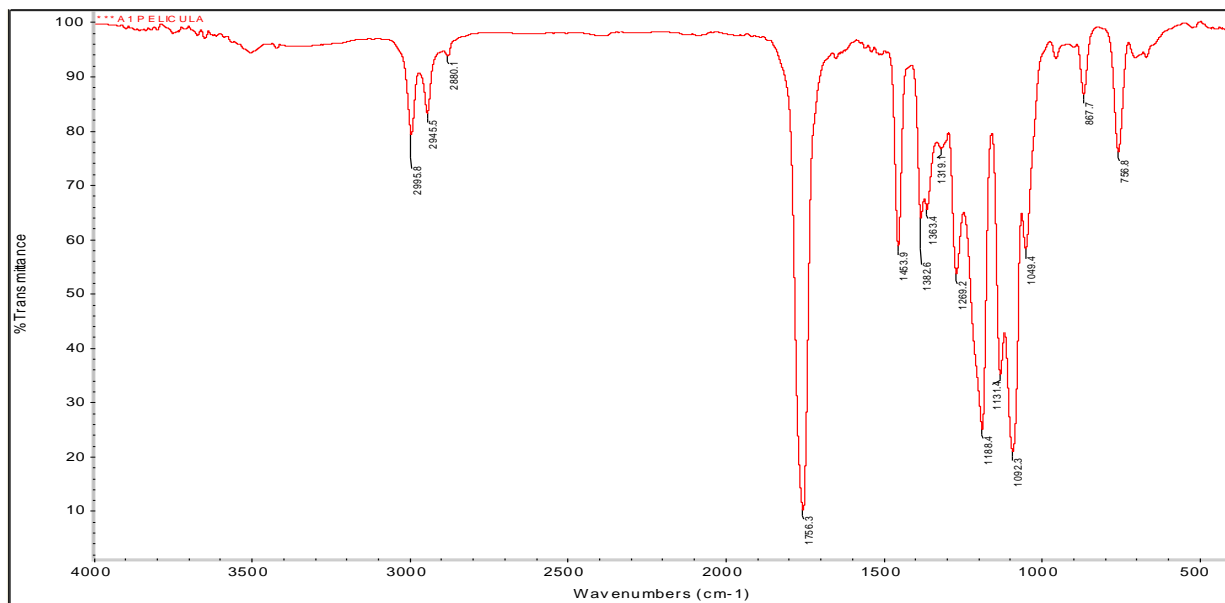


Figura 26. Espectro FT-IR del producto A₁.

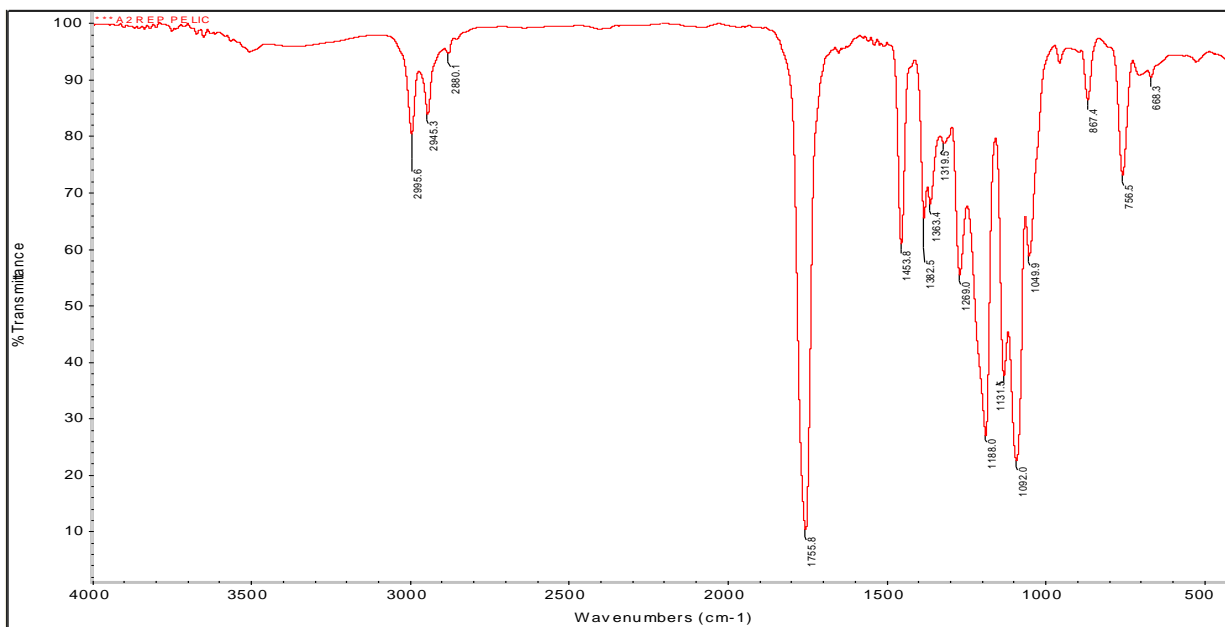


Figura 27. Espectro FT-IR del producto A₂.

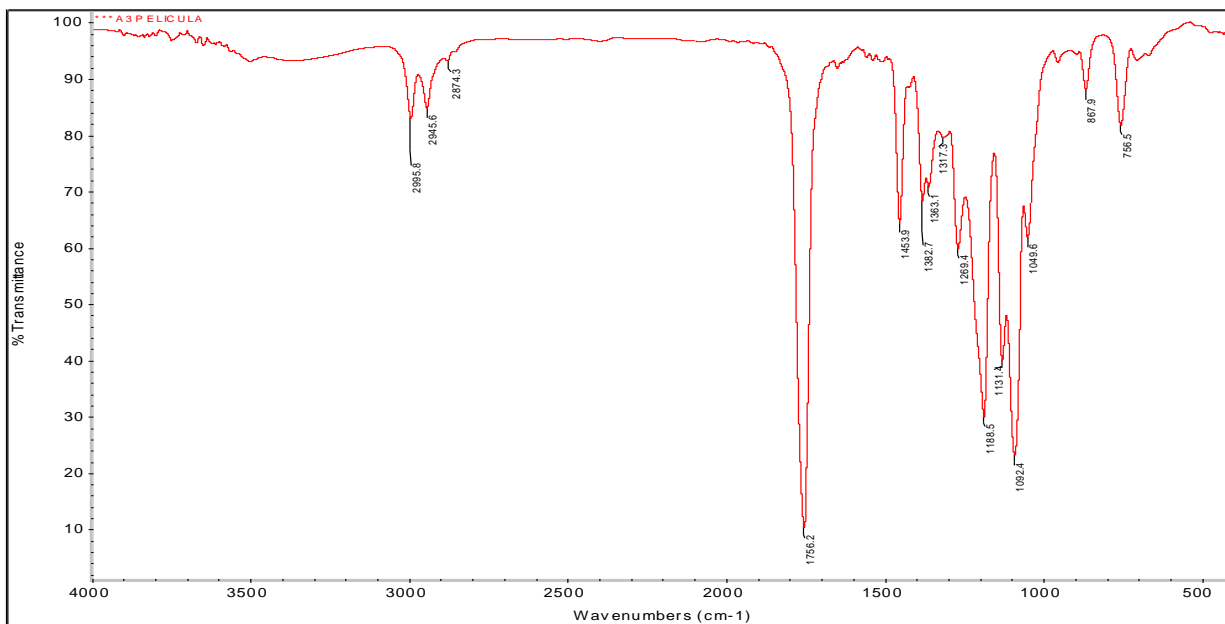


Figura 28. Espectro FT-IR del producto **A₃**.

En los espectros de los productos **A₁**, **A₂** y **A₃** se distingue prácticamente el mismo grupo de señales encontrado y analizado en los espectros de los productos de síntesis por policondensación en solución (ver **Tabla 3**), confirmando su naturaleza de poliéster alifático. Por otro lado, estos materiales también fueron caracterizados por espectrometría de resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN), lo cual no solamente permite identificar más claramente los tres grupos diferenciados de protones que deberían estar presentes en el polímero (protones metílicos y metínicos de la lactida y protones metilénicos de la glicolida), sino que, además, a partir de las áreas delimitadas por las integrales de los protones metílicos aportados por la lactida y los protones metilénicos correspondientes a la glicolida, puede determinarse cuantitativamente la proporción real de los monómeros en el polímero sintetizado [48]. Los espectros y su discusión asociada se plasman a continuación.

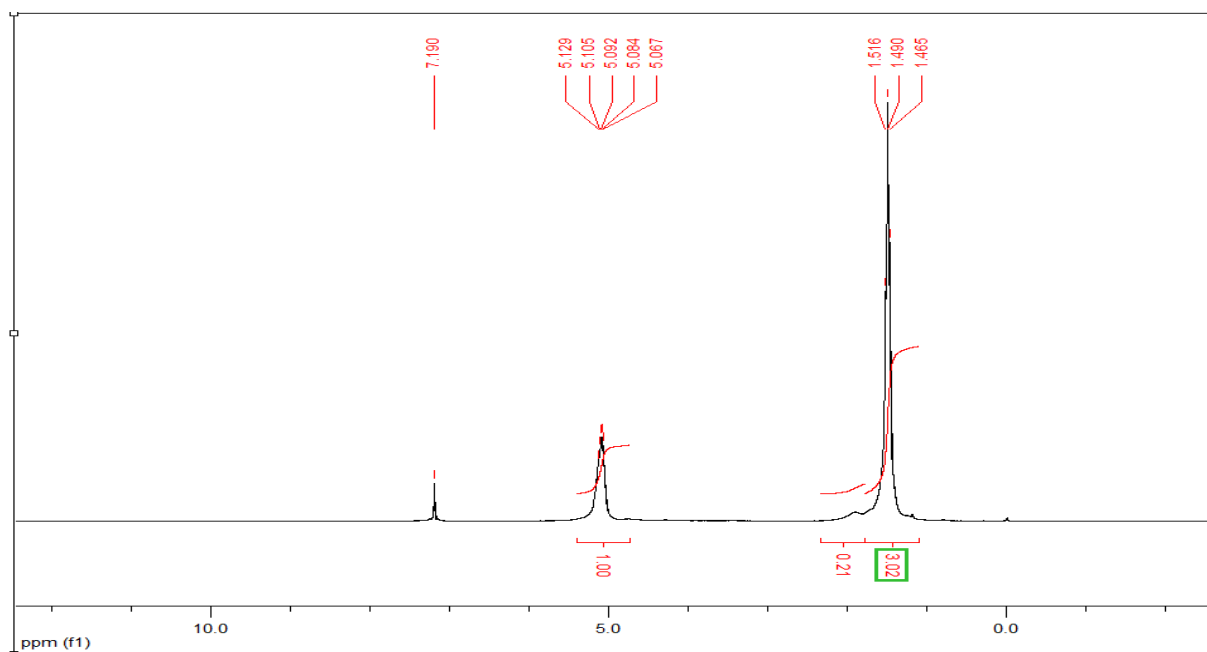


Figura 29. Espectro ^1H RMN para A_1 .

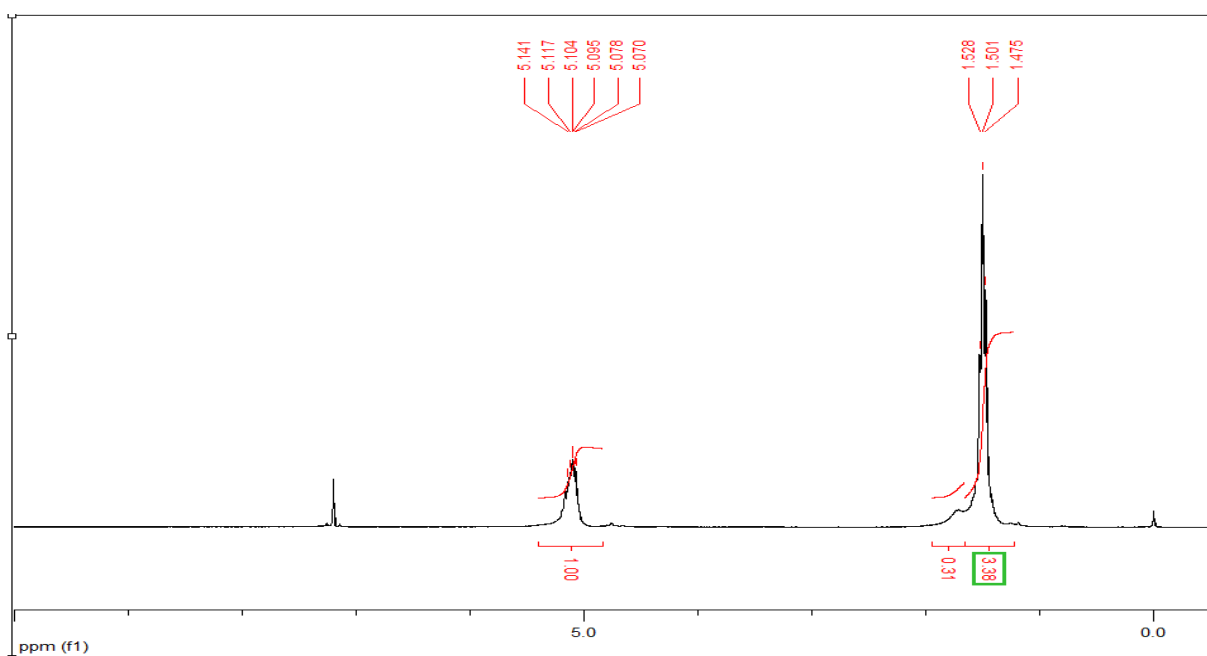


Figura 30. Espectro ^1H RMN para A_2 .

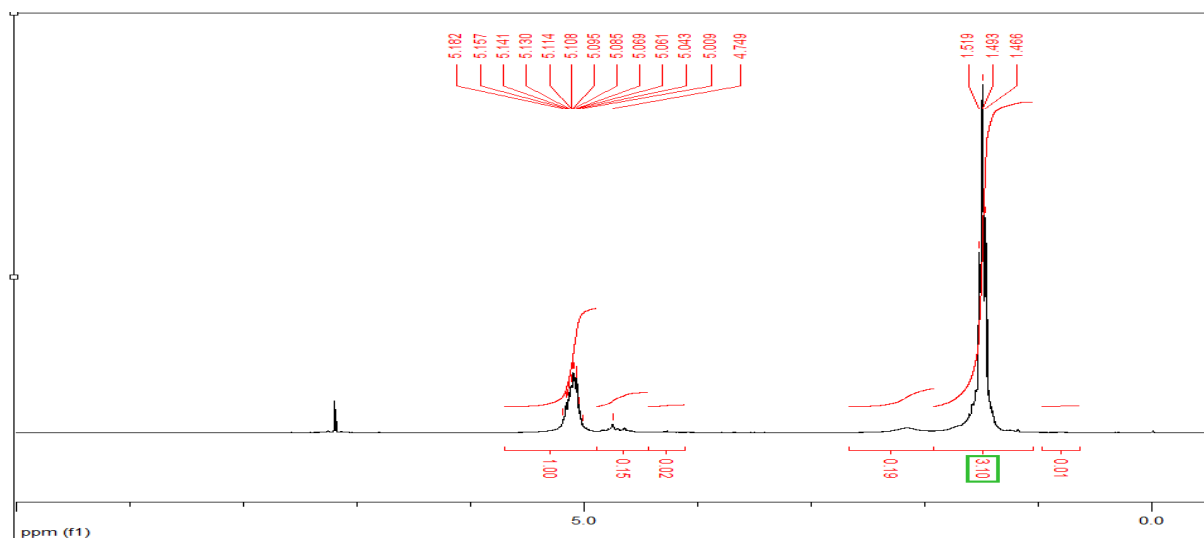


Figura 31. Espectro ^1H RMN para A_3 .

En la **Tabla 4** se muestran los desplazamientos químicos de los protones para cada uno de los monómeros utilizados en la síntesis, y en la **Tabla 5** se muestran los desplazamientos químicos de los protones en el copolímero de lactida-glicolida.

| Grupo Funcional | CH_3 | CH_2 | CH | Ref. |
|----------------------------|---------------|---------------|------|------|
| δ d,l-lactida (ppm) | 1.66 | N/A | 5.08 | [48] |
| δ glicolida (ppm) | N/A | 4.99 | N/A | |

Tabla 4. Desplazamientos químicos de los protones de los monómeros de d,l-lactida y glicolida.

| Grupo Funcional | CH_3 | CH_2 | CH |
|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| δ (ppm) | 1.490 - 1.687 | 4.675 - 4.909 | 5.157 - 5.302 |

Tabla 5. Desplazamientos químicos de los protones de los polímeros sintetizados.

En las **Figuras 29, 30 y 31** se observa que la intensidad del multiplete entre 4,5 y 4,9 ppm (que se atribuye a los protones metilénicos del fragmento de la glicolida en el copolímero) es muy baja debido a que su contenido apenas representa ente 1 y 5 % en la composición total nominal del material. En cuanto a evidencias de la presencia de fragmentos de lactida, se identifican claramente las señales correspondientes a los grupos metino a 5,15 ppm y una señal atribuida a los grupos metilo a 1,55 ppm del fragmento de lactida en el copolímero, dando así cuenta de la estructura del material.

Para calcular la composición monomérica real de los polímeros sintetizados, deben tomarse en cuenta las integrales de cada señal, de conformidad con las siguientes ecuaciones ^[48].

$$\%d,l - lactida = \frac{\text{integral de área } \frac{CH3}{3}}{\text{integral de área } \frac{CH3}{3} + \text{integral de área } \frac{CH2}{2}} \times 100 \quad (7)$$

$$\%glicolida = \frac{\text{integral de área } \frac{CH2}{2}}{\text{integral de área } \frac{CH3}{3} + \text{integral de área } \frac{CH2}{2}} \times 100 \quad (8)$$

Dada la baja intensidad de las señales asociadas a la glicolida, una ampliación de la misma debió efectuarse mediante el software de manipulación de espectros RMN *MasterReNova*. Un ejemplo de esta ampliación, que se realizó para las tres composiciones poliméricas, se muestra a continuación.

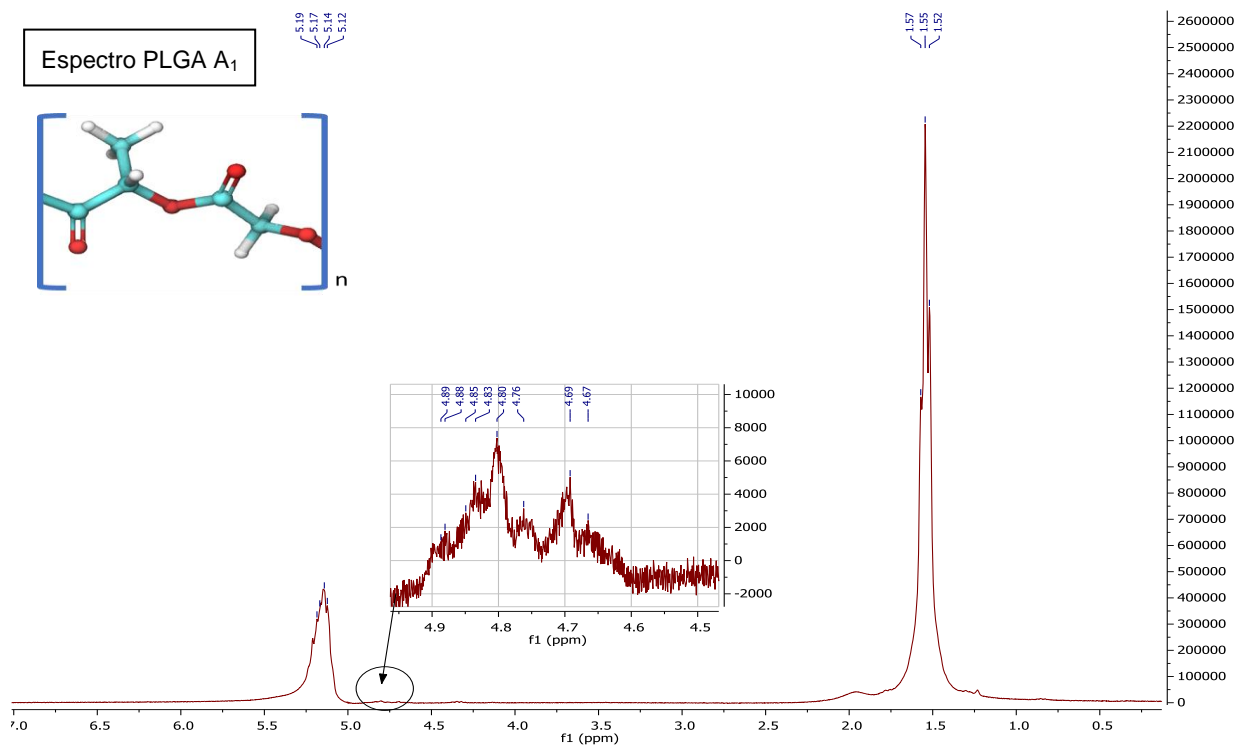


Figura 32. Ampliación de la zona de la señal de la glicolida para A₁ mediante manipulación del espectro a través del software *MasterReNova*.

En la tabla siguiente se agrupan las composiciones reales determinadas para cada monómero en el PLGA final.

| Producto | Alim. d,l-lac./glic.(%) | Experimental d,l-lac. | Experimental glic. |
|----------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|
| A ₁ | 99/1 | 98,6 | 1,3 |
| A ₂ | 98/2 | 98,07 | 1,93 |
| A ₃ | 95/5 | 97,2 | 2,7 |

Tabla 6. Composición de alimentación y experimental (real) de los polímeros sintetizados.

Para todas las composiciones, las proporciones monoméricas correspondieron adecuadamente con los valores de carga.

En ampliación de la información del análisis de los productos, a partir de los multipletes de la señal a 4,5 ppm de los grupos metilenos de la glicolida, pudo estimarse parte de la secuencia de la microestructura del copolímero, comparándose los desplazamientos químicos experimentales con los reportados en la literatura ^[87] para diferentes secuencias de monómeros.

| Número de señal | Secuencia | δ (ppm) reportado | δ (ppm) experimental |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| 1 | GLGGG o GGGLG | 4,96 | - |
| 2 | LGGLG o GLGGL | 4.94 | - |
| 3 | GGGGG | 4.90 | - |
| 4 | LLGGL + LGGLL | 4.88 | 4,88 |
| 5 | GGGGL + LGGGG | 4.87 | - |
| 6 | LLGGG + GGGLL | 4,86 | 4,86 |
| 7 | LLGLL + GLGLL + LLGLG + GLGLG | 4.83 | 4,82 |
| 8 | GGGLG o GLGGG | 4.80 | 4,80 |
| 9 | LGGGL + GLGGL or LGGLG | 4.78 | 4,78 |

Tabla 7. Posibles secuencias de inserción de los monómeros en el polímero final.

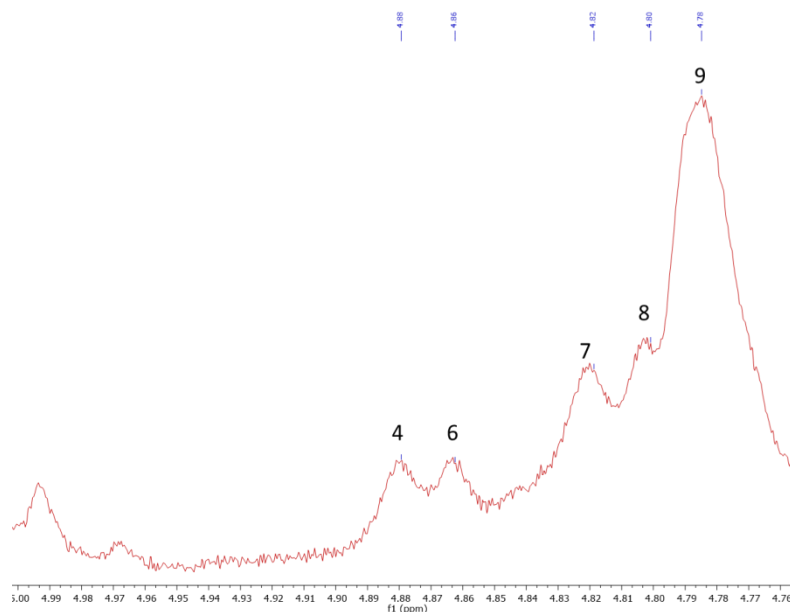


Figura 33. Multiplete de señales ubicadas en el área de los protones metilénicos, de donde se extrajo información de la **Tabla 7**.

En la **Figura 33** son rotuladas las señales experimentales que coinciden con las reportadas en la bibliografía arriba citada. En la **Tabla 7**, puede verse que la mayoría de las secuencias de abundante contenido de glicolida (por ejemplo, las señales 1, 3 y 5) están ausentes en los productos, hecho que robustece la idea de que el ingreso de este monómero a los polímeros se produjo de manera aleatoria y que su proliferación en bloques fue nimia. Esta observación tiene asidero lógico en razón de que, dadas las pequeñas cantidades de glicolida usadas en esta investigación, no se esperaba la existencia de grandes bloques conformados por ésta en los polímeros.

5.2.- Elaboración y caracterización de microcápsulas en ausencia y presencia de fármaco.

5.2.1.- Microcápsulas en ausencia de fármaco.

5.2.1.1.- Caracterización morfológica.

Algunas de las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido son presentadas enseguida.

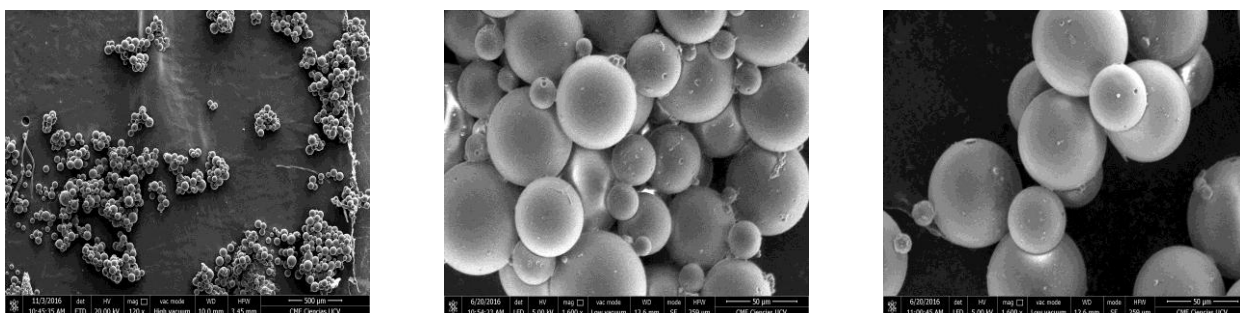


Figura 34. Micrografías de microcápsulas vacías de A₁.

La caracterización morfológica de las microcápsulas vacías, así como el histograma de su distribución de tamaño (se presentará en esta misma discusión) sólo se realizaron con la composición A₁ en virtud de que, para la utilización que se le dio a estas cápsulas, no era imprescindible conocer a ciencia cierta estos parámetros dimensionales para todas las composiciones. En cuanto a lo observado en el conjunto de micrografías de la **Figura 34**, las mismas permiten apreciar que las cápsulas poseían una geometría esférica y regular, con superficie lisa y suave. Por otro lado, en el conjunto de micrografías de la **Figura 35** se muestran secciones transversales de microcápsulas incluidas en una resina epóxica fracturada en nitrógeno líquido.

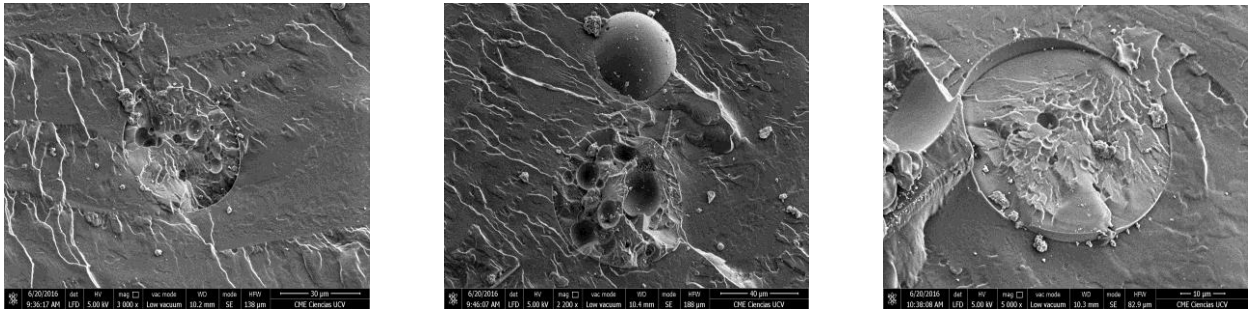


Figura 35. Micrografías de secciones transversales de microcápsulas vacías de A₁.

El estudio morfológico de las secciones transversales presentadas permite augurar que, si bien las escasas micrografías adquiridas no son totalmente determinantes, la estructura interna para estas microcápsulas pareció ser de tipo reservorio o cáscara, de consistencia mayoritariamente maciza y no demasiado porosa.

5.2.1.2.- Distribución de tamaño.

La evaluación de la distribución de tamaño de partícula se realizó mediante la construcción de un histograma a partir de la determinación de los diámetros de 151 microcápsulas, utilizando para la misma el software *Image J*. El histograma construido se muestra a continuación.

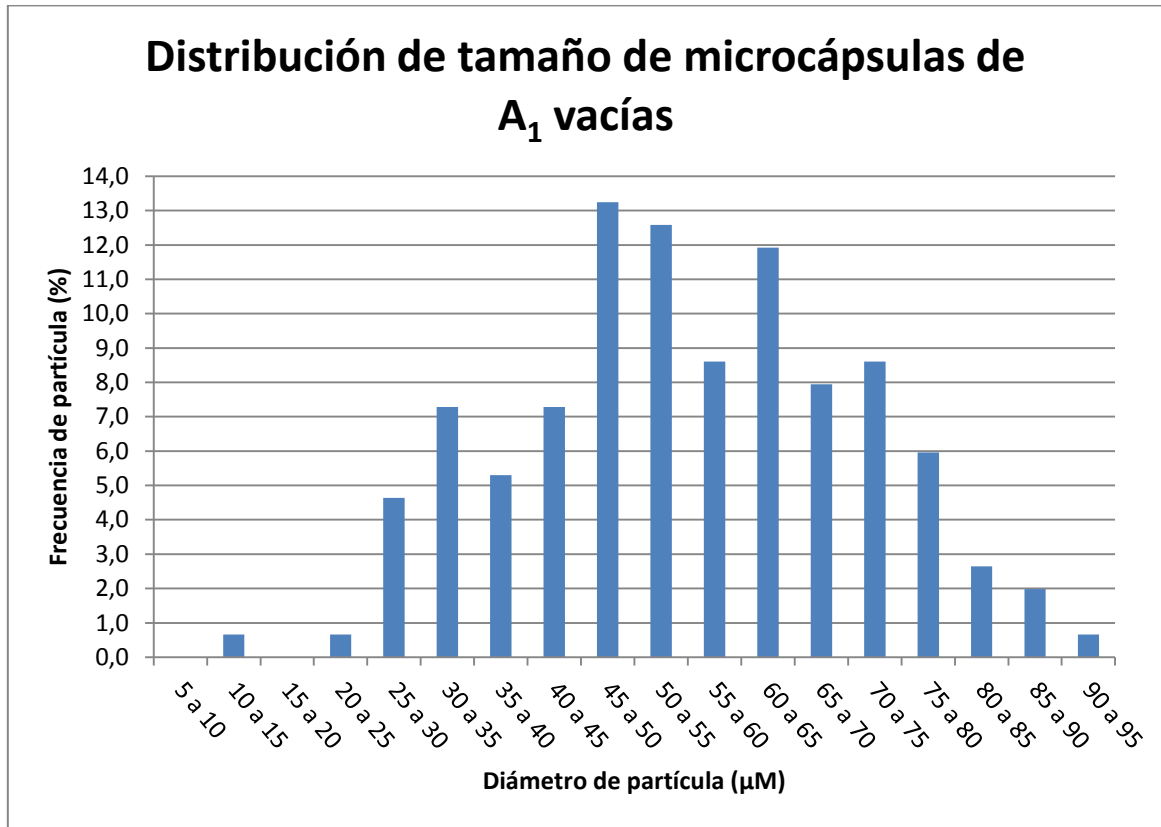


Gráfico 1. Distribución de tamaño de microcápsulas vacías de A₁ generadas por emulsión simple y evaporación de solvente.

En el **Gráfico 1** se distingue una distribución de tamaño con más del 90% de los diámetros comprendidos entre 25 y 80 μm pero con máximos de ocurrencia (45-50 μm, 50-55 μm y 60-65 μm) de apenas 12-13%.

5.2.1.3.- Evaluación del tiempo de descomposición de las microcápsulas en condiciones fisiológicas simuladas.

Las alteraciones morfológicas de la matriz polimérica por efecto de la acción hidrolítica del medio acuoso donde se encuentre ésta (sea *in vitro* o *in vivo*) tienen

participación en todas las etapas de la cinética de liberación (aunque, como ya fue explicado en la sección **Revisión bibliográfica**, el efecto es particularmente importante en etapas avanzadas del proceso). Teniendo en mente lo susodicho, la degradación de las microcápsulas producidas anteriormente fue seguida a través de microscopía óptica. En las **Figuras 36** a la **45** se muestran las micrografías de las microcápsulas de A_1 , A_2 y A_3 obtenidas a varios tiempos de exposición a condiciones fisiológicas emuladas (solución de buffer de fosfato a temperatura constante de 37 °C).

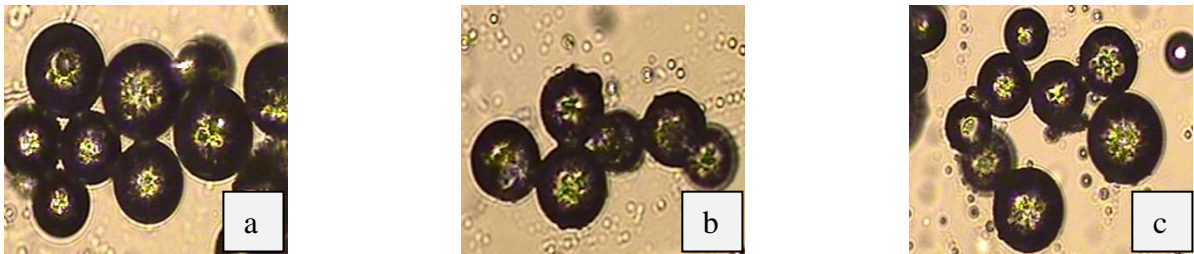


Figura 36. Microcápsulas de a) A_1 b) A_2 c) A_3 a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas después de **1 hora**.

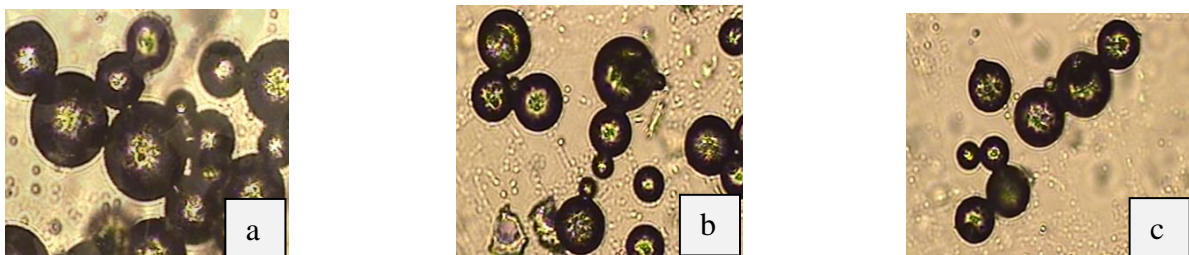


Figura 37. Microcápsulas de a) A_1 b) A_2 c) A_3 a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas después de **6 horas**.

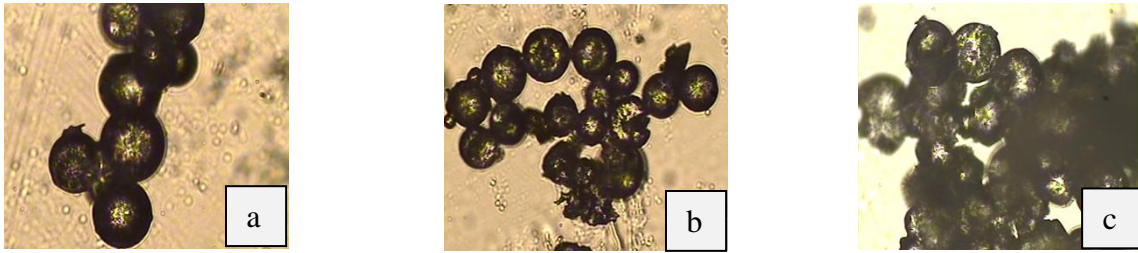


Figura 38. Microcápsulas de a) A_1 b) A_2 c) A_3 a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas después de **12 horas**.

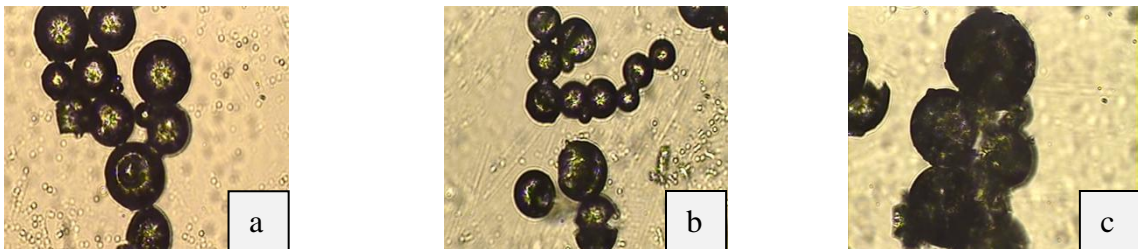


Figura 39. Microcápsulas de a) A_1 b) A_2 c) A_3 a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de **24 horas**.

En las primeras seis horas de experimento las capsulas no mostraron ningún cambio morfológico; no obstante, partir de las 12 horas sí comienza a observarse el surgimiento de aglomeraciones y ciertas modificaciones superficiales. Luego de 24 horas, se aprecia una mayor aglomeración e inicio de un proceso de coalescencia, particularmente para A_3 .

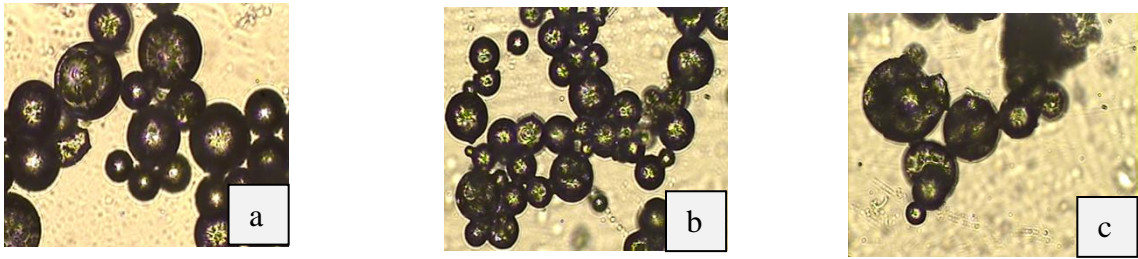


Figura 40. Microcápsulas de a) A₁ b) A₂ c) A₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de **36 horas**.

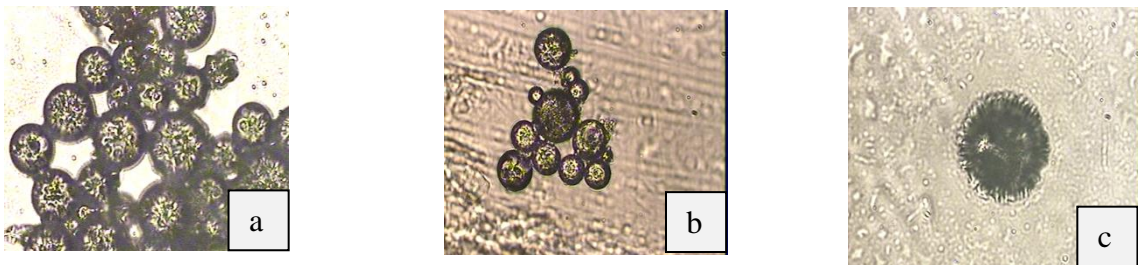


Figura 41. Microcápsulas de a) A₁ b) A₂ c) A₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de **84 horas**.

A las 36 horas, se comienza a observar erosión superficial de las microcápsulas de manera más notoria, intensificándose claramente la misma a las 84 horas.

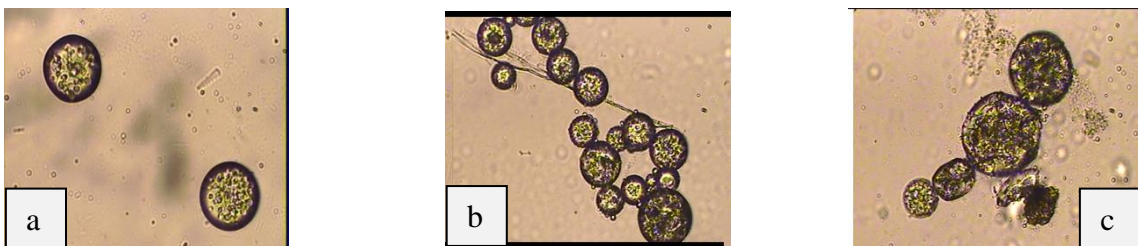


Figura 42. Microcápsulas de a) A₁ b) A₂ c) A₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas a los **7 días**.

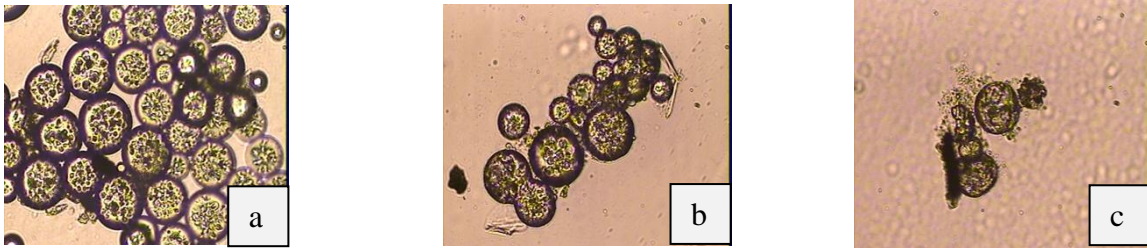


Figura 43. Microcápsulas de a) A₁ b) A₂ c) A₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas a los **12 días**.

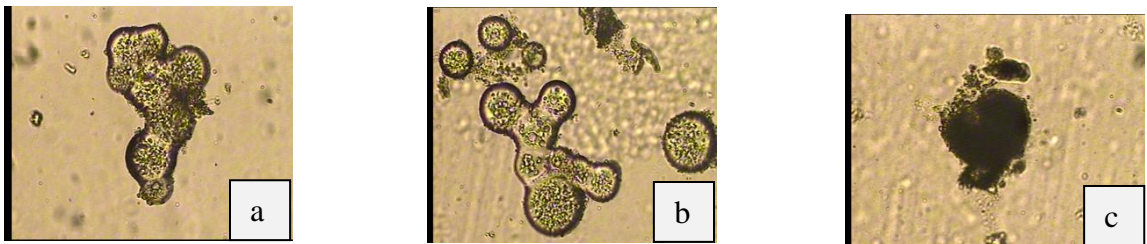


Figura 44. Microcápsulas de a) A₁ b) A₂ c) A₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de **40 días**.

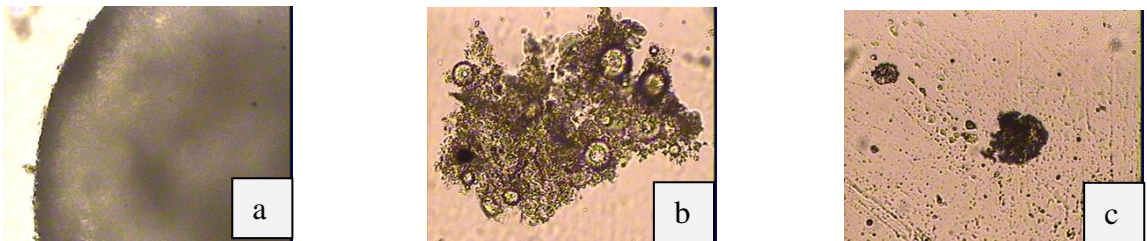


Figura 45. Microcápsulas de a) A₁ b) A₂ c) A₃ a tiempo de exposición a condiciones fisiológicas emuladas de **50 días**.

Finalmente, a los 40 días de exposición, se produce la coalescencia total de las cápsulas y evidente pérdida de la morfología, observándose la evolución ulterior de

estas estructuras a masas amorfas de polímero que pudieron evidenciarse a los 50 días.

Al finalizar esta experiencia, debe informarse que, desafortunadamente, y gracias a la muy limitada cantidad de A_2 que se obtuvo a raíz de varios inconvenientes experimentales asociados a su síntesis, el material en cuestión fue agotado definitivamente, de modo que no fue posible elaborar microcápsulas con fármaco empleando esta composición.

5.2.2.- Microcápsulas en presencia de fármaco.

5.2.2.1.- Caracterización morfológica.

Para las cápsulas contenedoras de fármaco, algunas micrografías para cada composición polimérica se muestran a continuación.

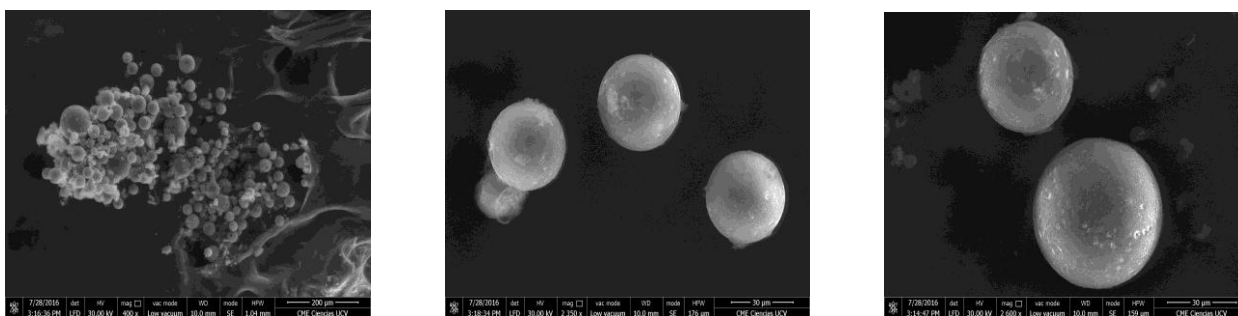


Figura 46. Micrografías de las cápsulas de A_1 con fármaco.

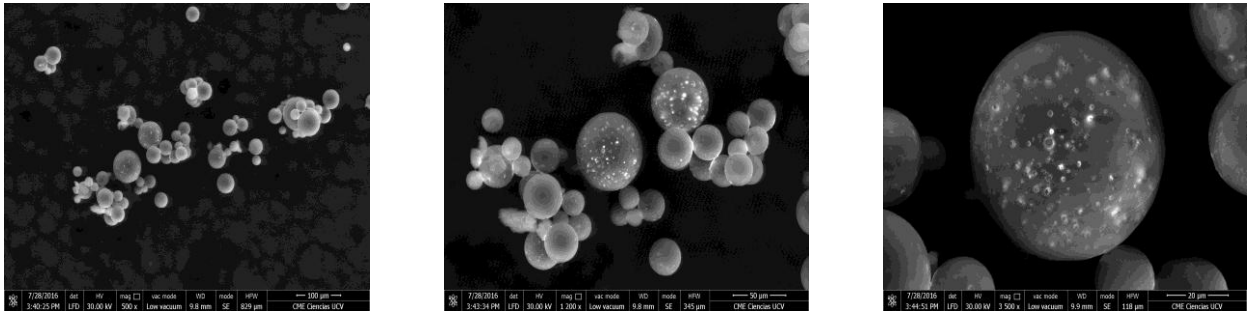


Figura 47. Micrografías de las cápsulas de A_3 con fármaco

Como se observa en las micrografías, se obtuvieron cápsulas de geometría esférica y superficie lisa y razonablemente suave (si bien algunas cápsulas presentan cierto grado de porosidad superficial, no parece ser una observación generalizable).

A continuación se observa una micrografía que permite apreciar la morfología interna de estas cápsulas (micrografía correspondiente a A_1).

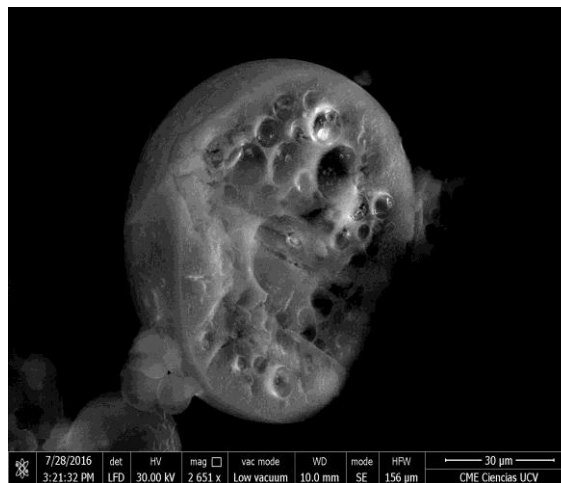


Figura 48. Micrografía de la morfología interior de una microcápsula contenedora de fármaco fracturada.

La morfología interna se muestra altamente poblada de porosidades, estructura netamente de tipo “panal”, la cual surge cuando el endurecimiento polimérico es lo suficientemente lento como para no generar interiores huecos, y las gotas de primera emulsión son mucho más pequeñas que la microcápsula final ^[63].

5.2.2.2.- Distribución de tamaño.

Discutida la morfología de las cápsulas, se analizará a continuación la distribución de partícula tanto de A₁ como de A₃.

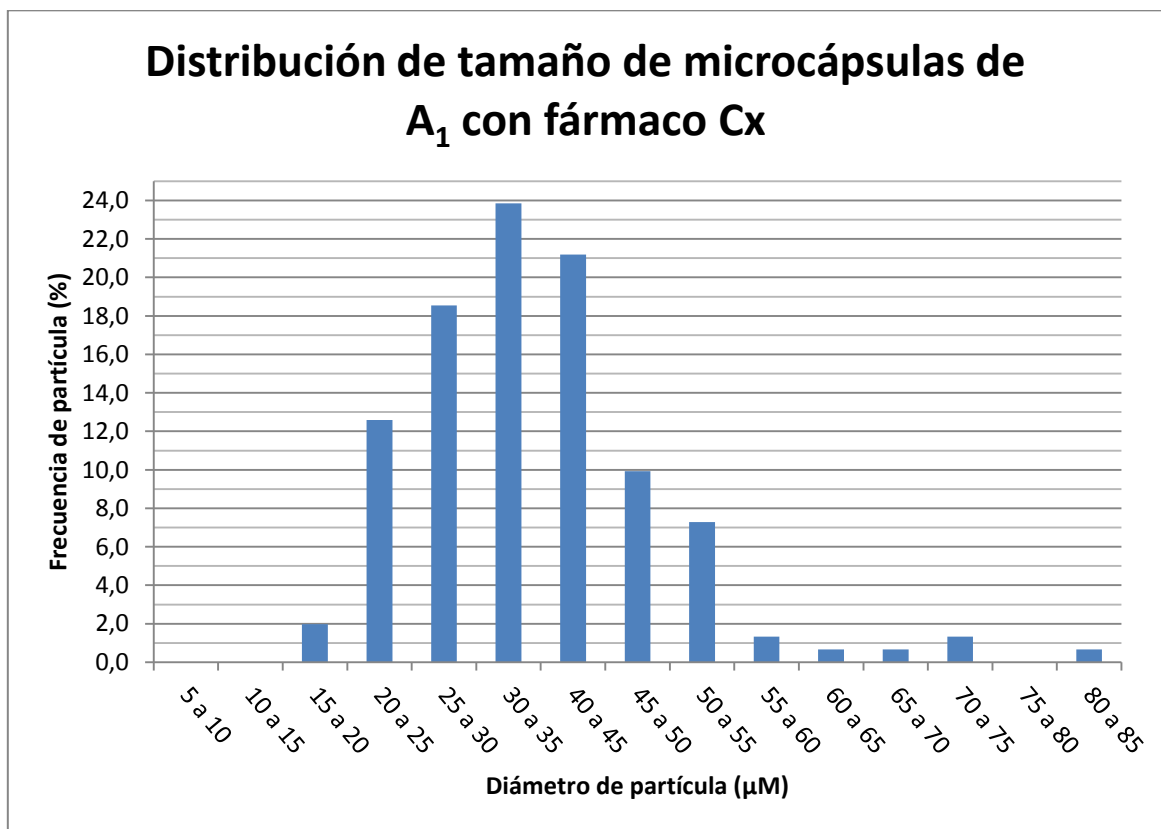


Gráfico 2. Distribución de tamaño de microcápsulas de A₁ con fármaco asociado, generadas por doble emulsión y evaporación de solvente.

Comparativamente con las cápsulas vacías (ver **Gráfico 1**), las cápsulas de A₁ con fármaco presentaron tamaños de partícula más reducidos, así como también una distribución de tamaño más estrechas (más del 90% de la frecuencia de partícula se ubica entre 20 y 55 μm , con más del 60% acotada entre 25 y 45 μm). Sin lugar a dudas, la mayor velocidad de agitación en la formación de la segunda emulsión (paso determinante del tamaño promedio y distribución de tamaño de las cápsulas) promovió a que esto sucediera (con ayuda, por supuesto, del manejo de la tasa de remoción del solvente, puesto que, en la producción de las cápsulas vacías, la misma fue seguramente más veloz porque la temperatura se mantuvo por encima de la ambiental en ciertos momentos, mientras que, para las generación de las cápsulas con fármaco, en algunos momentos la temperatura más bien se ubicó por debajo de la ambiental. Mayores tasas de remoción de solvente favorecen la producción de cápsulas de mayor tamaño).

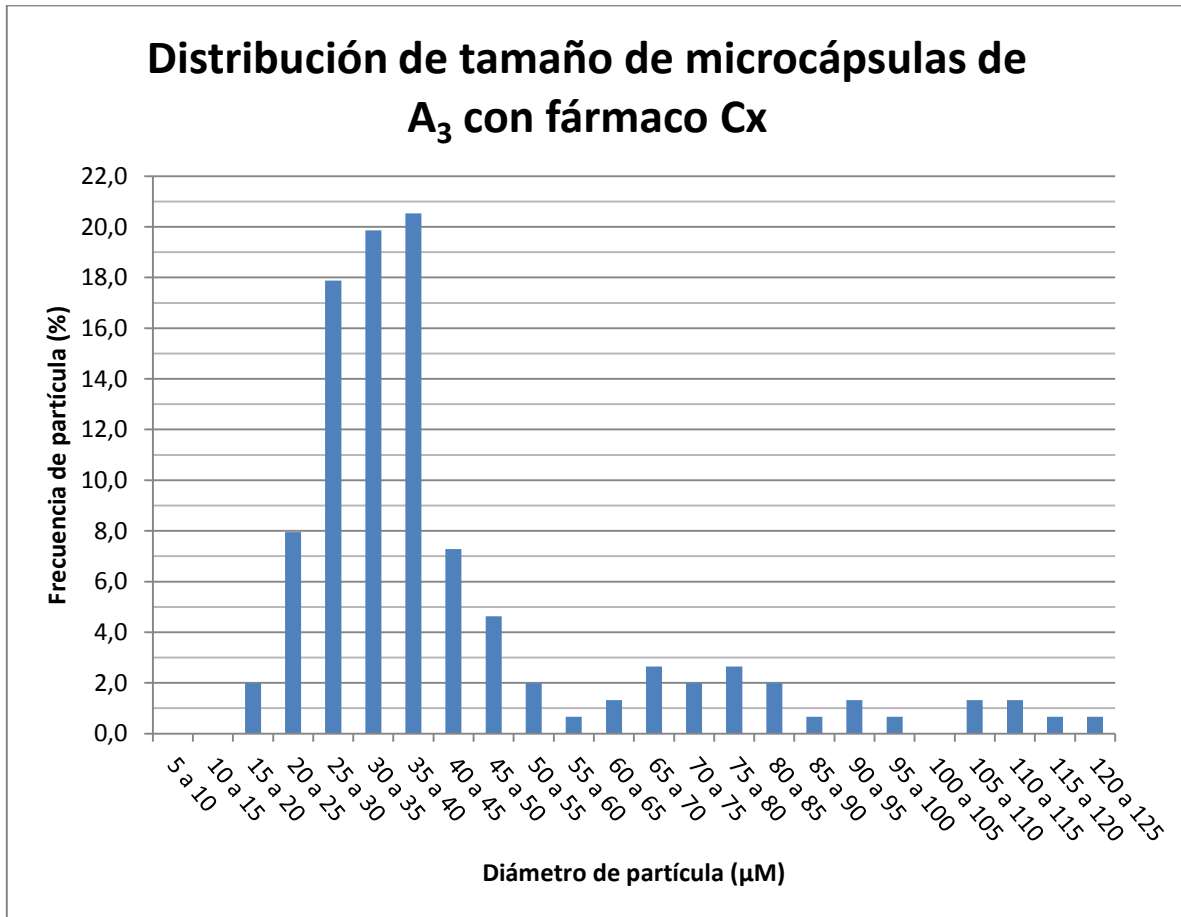


Gráfico 3. Distribución de tamaño de microcápsulas de A₃ con fármaco asociado, generadas por doble emulsión y evaporación de solvente.

Para A₃, tanto el tamaño promedio como su distribución, arrojaron valores muy cercanos a los registrados para el polímero A₁ (casi un 80% de los tamaños de partícula de A₃ coincidieron entre 20 y 45 µm, con un 60% entre 25 y 40 µm). La similitud del promedio de diámetros y su distribución entre las cápsulas de ambos polímeros obedecen a la igualdad de condiciones en que fueron producidas.

5.2.2.3.- Fármaco asociado a las microcápsulas.

La cantidad de fármaco encapsulado en las microcápsulas fue expresada de tres diferentes maneras ^[88], a saber:

$$\% R = \frac{\textit{masa neta de microcápsulas}}{\textit{masa total de polímero + droga usada en formulación}} \times 100 \quad (9)$$

$$\% E.E = \frac{\textit{masa de fármaco encapsulada}}{\textit{masa de fármaco disponible para ser encapsulada}} \times 100 \quad (10)$$

$$\% C.D = \frac{\textit{masa de fármaco encapsulada}}{\textit{masa de microcápsulas}} \times 100 \quad (11)$$

Donde R es el rendimiento de producción de cápsulas, E.E es la eficiencia de encapsulación, y C.D es el contenido o carga de droga en las microcápsulas.

En la **Tabla 8** se presentan un resumen de estas cantidades para las cápsulas A₁ y A₃, determinadas mediante espectrometría UV-Visible y utilizando de curva de calibración de soluciones de ciclopirox olamina en cloroformo (ver **Anexos**).

| Producto | %Rendimiento | %Efic. de encapsulación | %Contenido de droga |
|----------------|--------------|-------------------------|---------------------|
| A ₁ | 6,7 | 4 | 57 |
| A ₃ | 23,8 | 5 | 20 |

Tabla 8. Porcentaje de rendimiento, eficiencia de encapsulación y contenido de droga de microcápsulas de A₁ y A₃.

El porcentaje de rendimiento de producción de cápsulas resultó ser más del triple para A₃ que para A₁, hecho atribuible a la pérdida de las microcápsulas en el proceso de purificación de A₁ (filtración y lavado con agua tibia, método en el cual muchas cápsulas, por su reducido diámetro, no quedaron retenidas en el papel de filtro) en comparación con el aplicado a A₃ (múltiples centrifugados). Aun cuando el rendimiento de producción de A₃ fue superior al de A₁, para ambos casos el mismo resultó muy bajo, teniéndose como explicación el hecho de que, en el proceso de preparación de las cápsulas por doble emulsión, gran parte del polímero no formó cápsulas, sino que, en su lugar, quedó adherido a las paredes del reactor. En cuanto la eficiencia de encapsulación, en la formulación de preparación de las microcápsulas la cantidad adicionada de fármaco fue más del doble que de polímero; teniéndose, pues, que el parámetro de masa de medicamento empleado en la formulación se encuentra en el denominador de la Ecuación 8, se entiende que la eficiencia de encapsulación haya resultado ínfima. Finalmente, habiendo sido idénticos los parámetros de formulación tanto para A₁ como para A₃, el mayor contenido de droga en A₁ podría apuntar en dirección a cierta afinidad aumentada del ciclopirox por un polímero de características más hidrófobas.

5.3.- Evaluación de la cinética de liberación del ciclopirox olamina desde las microcápsulas.

5.3.1.- Cinética preliminar de liberación en buffer de fosfato.

El siguiente paso consistió en determinar el perfil de liberación de la droga desde la matriz, así como la rapidez y cantidad de medicamento expelido respecto al tiempo. En el **Gráfico 4** se muestra el perfil de liberación de ciclopirox olamina desde las microcápsulas de A₁ y A₃.

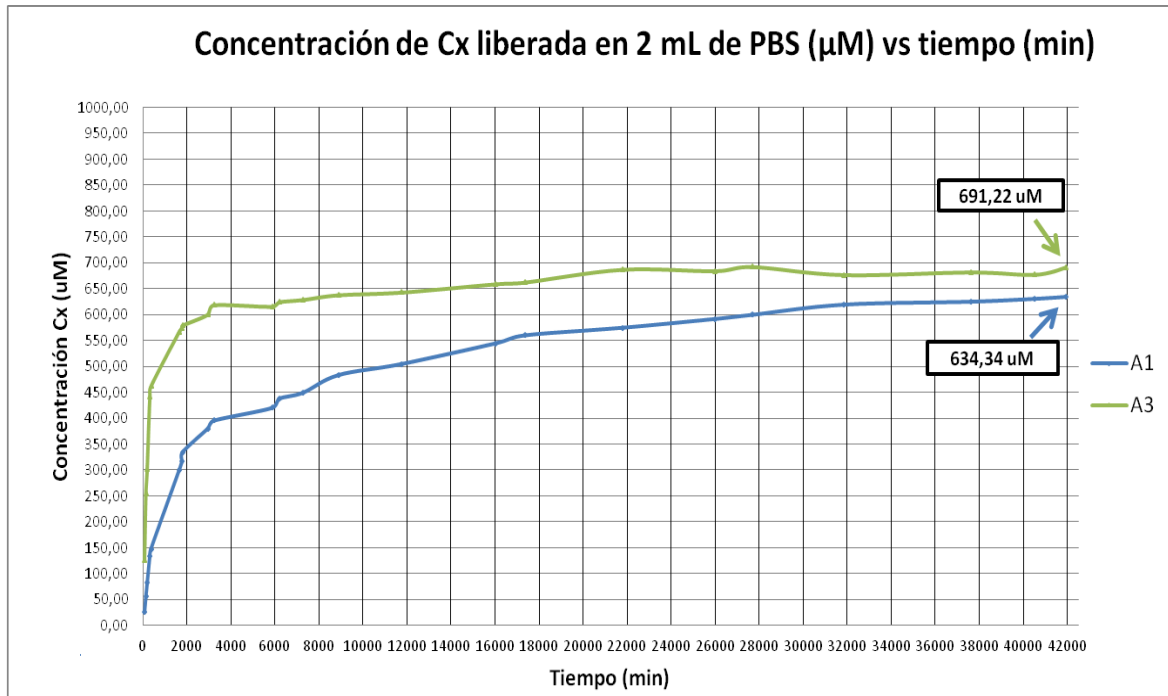


Gráfico 4. Perfil general de liberación del fármaco desde 0,5 mg de cápsulas en PBS.

El perfil general revela, para ambos tipos de cápsulas, un patrón de liberación bimodal, con un rápido incremento en la concentración de medicamento en solución durante los primeros 3000 minutos de mediciones (básicamente los primeros tres días de trabajo); este fenómeno es conocido como efecto *burst* o de “explosión” inicial, normalmente adjudicado a la veloz expulsión de la droga asociada a la superficie interna de la matriz. Al finalizar esta primera etapa, la pendiente se suaviza en señal de una estabilización del régimen de liberación, generando en adelante incrementos mucho más moderados de concentración de ciclopirox en solución que se constituyen dentro de la segunda etapa del patrón bimodal, la cual es netamente gobernada por procesos difusivos de la droga hacia el exterior a través de las porosidades y canales de la matriz.

En el **Gráfico 5** se muestra más al detalle el efecto *burst* de la primera fase de liberación. Es claro que dicho efecto es considerablemente superior para las cápsulas de A₃, hecho imputable al mayor contenido de glicolida en este copolímero, ya que al poseer mayor cantidad de este monómero, se incrementa la hidrofiliidad del material, favoreciendo la degradación hidrolítica inicial responsable de producir las primeras porosidades que permitirían la expulsión del fármaco más superficial (además, como se planteó en el análisis de la **Tabla 8**, es posible que el fármaco sea menos afín al polímero según aumente su hidrofiliidad, lo que facilitaría su liberación desde A₃ por sobre A₁).

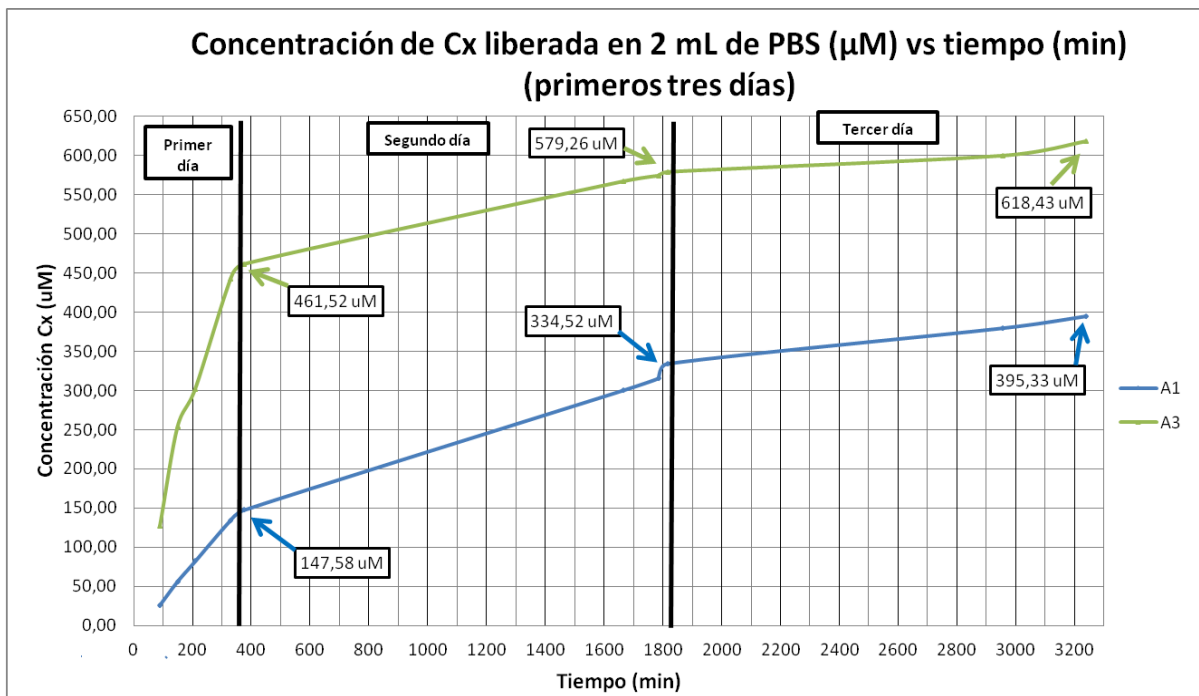


Gráfico 5. Perfil general de liberación del fármaco desde 0,5 mg de cápsulas los tres primeros días de experimentación.

En función a la cantidad máxima de liberación para cada sistema, se aprecia que, al tercer día, las microcápsulas de A₃ presentaron una altísima tasa de liberación

en la primera etapa (casi el 90% de su contenido total), lo que hace concluir que este sistema no es apropiado para el uso como dispositivo de liberación controlada en un tratamiento prolongado. En cuanto a A₁, a pesar de que este dispositivo también liberó una razonable cantidad de fármaco en la primera etapa (un 62% de su contenido total), su desempeño resultó mucho más conveniente, de modo que este sistema A₁ denota mejores características de cara a su empleo en un tratamiento de liberación controlada. La **Tabla 9** recoge los datos necesarios para este último discernimiento.

| | % Cx final liberado en primera fase | | |
|----------------|-------------------------------------|-------------|------------|
| | Primer día | Segundo día | Tercer día |
| A ₁ | 23,27 | 52,74 | 62,32 |
| A ₃ | 66,77 | 83,80 | 89,47 |

Tabla 9. Cantidades porcentuales de droga liberada los primeros tres días de experimentación (porcentaje relativo a la cantidad máxima de droga liberada a lo largo del proceso).

5.3.2.- Cinética de liberación en medio LIT.

Habiendo escogido las cápsulas de A₁ como sistema a evaluar en el cuerpo experimental restante, se optó por determinar la cinética de liberación de fármaco en el medio LIT, puesto que, al ser éste el medio donde los promastigotes se cultivaron *in vitro*, la evaluación de la cinética de liberación en este medio permitiría establecer comparaciones cuando se examinase el efecto leishmanicida del medicamento liberado.

,

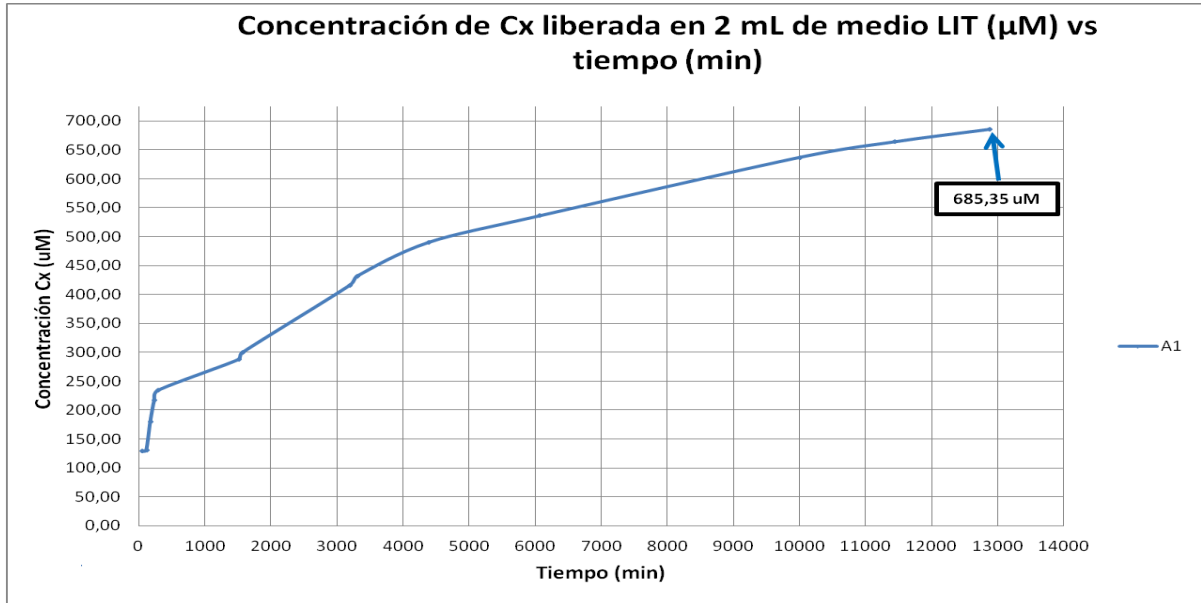


Gráfico 6. Perfil general de liberación del fármaco desde 0,5 mg de cápsulas en medio LIT.

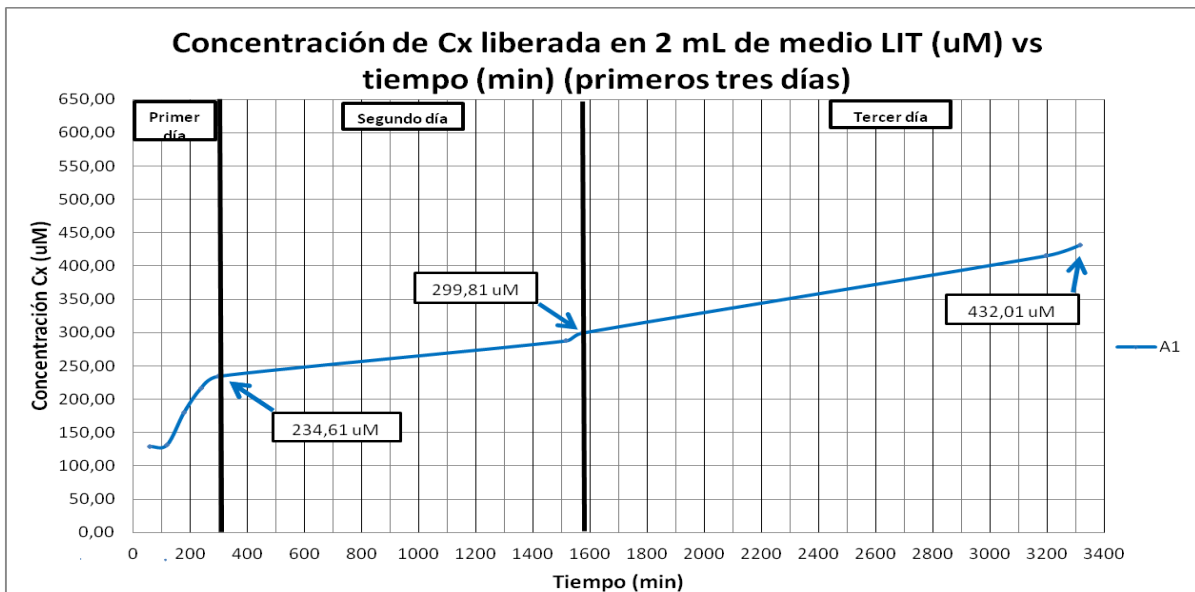


Gráfico 7. Perfil general de liberación del fármaco desde 0,5 mg de cápsulas en medio LIT por espacio los tres primeros días de experimentación.

En cuanto a la descripción de la tendencia del **Gráfico 6**, se distingue una cinética de liberación un tanto más veloz que la registrada en PBS, aunque, decididamente, se muestra igualmente bimodal, con una primera fase de efecto “*burst*” bien definida los tres primeros días (**Gráfico 7**). Llama la atención que no solamente la velocidad de liberación haya sido mayor en medio LIT, sino que, en 10 días, se haya liberado un 10% más de ciclopirox del que se liberó en PBS en casi un mes. En cuanto a este fenómeno, podría argumentarse que, o bien el medio LIT demostró contener componentes en su formulación que, de alguna manera, estimularon una liberación más rápida del medicamento, o bien que las cápsulas, debido a desgastes por su ya prolongado tiempo de manipulación, hayan sufrido exudaciones de fármaco hacia el exterior de la matriz. Para develar esta incógnita, algunos miligramos reservados de cápsulas se sometieron nuevamente a determinación de cantidad de fármaco encapsulado por disolución en cloroformo y medición espectrofotométrica, consiguiéndose que, efectivamente, las microesferas de A₁ mostraban mayor porcentaje de ciclopirox asociado, lo que aparentemente niega que el medio LIT tenga propiedades que induzcan aumento de velocidad en la degradación del polímero.

5.4.- Estudio de la viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en presencia de ciclopirox olamina.

5.4.1- Determinación del EC₅₀ de ciclopirox olamina para los promastigotes mediante ensayo colorimétrico.

La prueba del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilniltetrazolio (MTT) es un popular ensayo colorimétrico *in vitro* normalmente empleado en la evaluación de viabilidad celular en presencia de posible presión selectiva exógena, esto es, examen de proliferación (o muerte) celular asegurando condiciones de crecimiento exponencial del cultivo, de modo que sólo la acción de agentes de presión selectiva pueda (o no) surtir el efecto a explorar. El ensayo en cuestión depende básicamente de la

transformación del sustrato MTT (inicialmente un sólido amarillo) en un compuesto conocido como formazán (de tonalidad violeta) al encontrarse en presencia de un número determinado de células, pudiéndose obtener información cuantitativa de su absorbancia al ser ésta normalmente proporcional a la cantidad o concentración de células vivas. La transformación del MTT a formazán es producto de procesos reductivos metabólicos intracelulares: inicialmente, el MTT ingresa a las células (aparentemente la carga neta positiva del MTT (ver **Figura 49**) es el factor predominante que permite el ingreso de la molécula al interior de la célula, atendiendo al potencial eléctrico negativo que posee con respecto al espacio extracelular ^[89]), para luego participar de un proceso reductivo que ocurre, según dicta la evidencia, mayoritariamente por acción de coenzimas de nicotinamina adenina dinucleótido hidrogenado (NADH), intercambiadoras de electrones intracelulares por excelencia ^[90], ^[91]; estas coenzimas, que son generadas en las mitocondrias, lisosomas y retículo endoplasmático, son exportadas al citoplasma, donde ejercen su acción reductora ^[91] (en la literatura temprana ^[92] se especulaba con que las reacciones reductivas del MTT ocurrían dentro de las mitocondrias por acción de oxidorreductasas específicas, como la succinato deshidrogenasa, pero esto ha venido siendo progresivamente desplazado por nuevas evidencias que apuntan hacia el mencionado NADH).

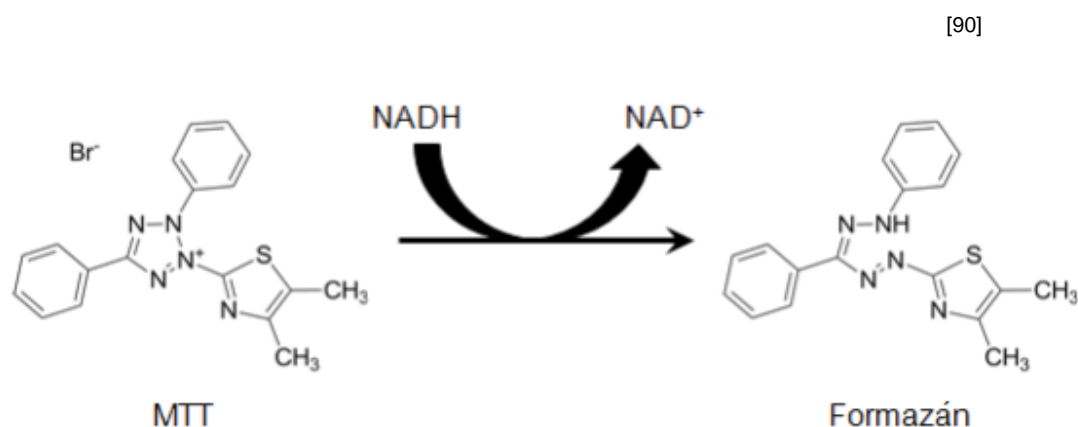
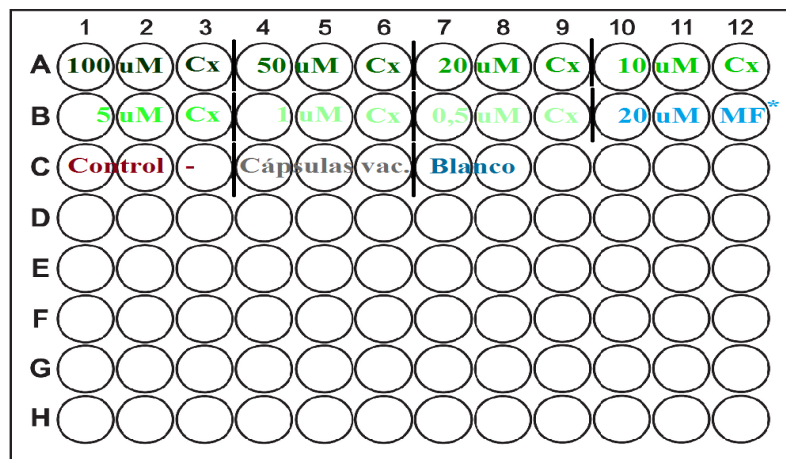


Figura 49. Representación de la reducción intracelular del MTT a formazán.

Respecto a este trabajo especial de grado, para conveniencia y comodidad en cuanto a los análisis de resultados, el esquema de la disposición en la placa microtituladora de las concentraciones seriadas del fármaco Cx y demás condiciones a evaluar en el ensayo MTT se reproduce una vez más a continuación, mas sin numerarlo como una figura adicional (en sección **Metodología experimental** se anexa este esquema de manera formal).



Teniendo presente tales disposiciones y ubicaciones, se presenta seguidamente una fotografía del resultado visual del ensayo una vez llevado a completación.

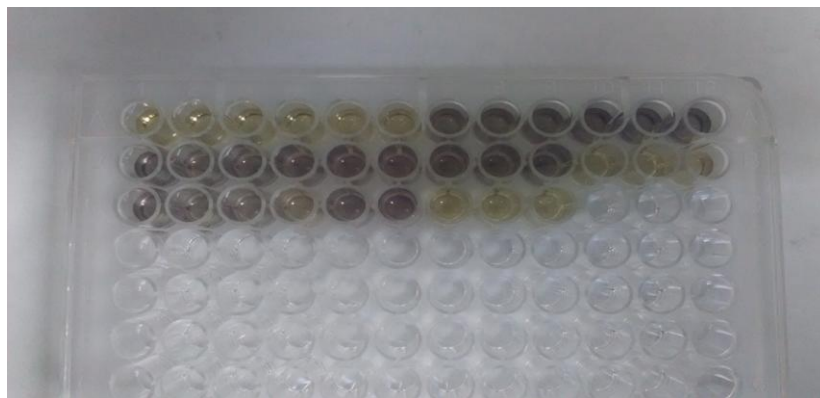


Figura 50. Resultado cualitativo (visual) del MTT de promastigotes.

El primer detalle que se hace rápidamente evidente es la aparición de tonalidad violeta sólo en determinados pozos (aquellos donde la concentración final de fármaco osciló entre 20 y 0,5 μM , así como los pozos con parásitos más microcápsulas vacías y, por supuesto, el blanco sin parásitos). Tal observación da indicios preliminares del efecto parasiticida de la droga, por cuanto la no aparición de tonalidad violeta en los pozos donde se dispusieron las dos concentraciones más altas de fármaco apuntaría a una disrupción importante de la proliferación de los promastigotes expuestos, reduciendo su población hasta niveles donde la cantidad de formazán biosintetizado por éstos no sería suficiente para ser apreciable a simple vista.

En función de lo dicho, se presenta a continuación el conjunto de datos de absorbancia para cada una de las condiciones a evaluar.

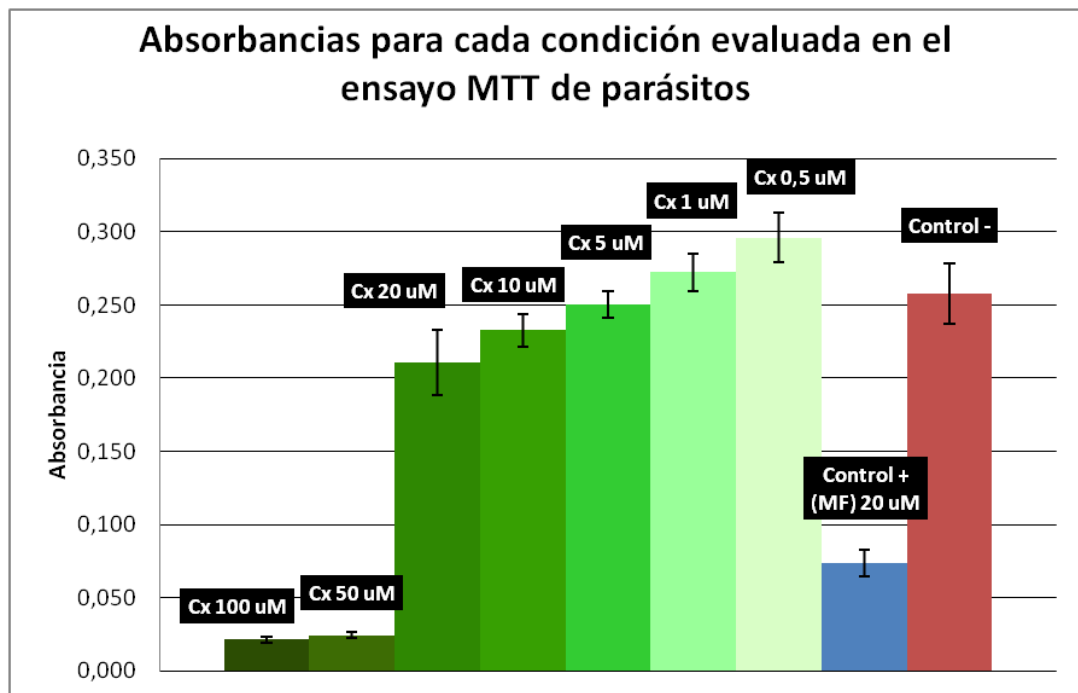


Gráfico 8. Valores de absorbancia para cada condición evaluada en el MTT de parásitos ($\lambda = 570 \text{ nm}$).

A partir de los datos adquiridos y graficados, puede calcularse el porcentaje de proliferación de los promastigotes para cada condición, tomando como referencia al Control – como el correspondiente a 100% de proliferación.

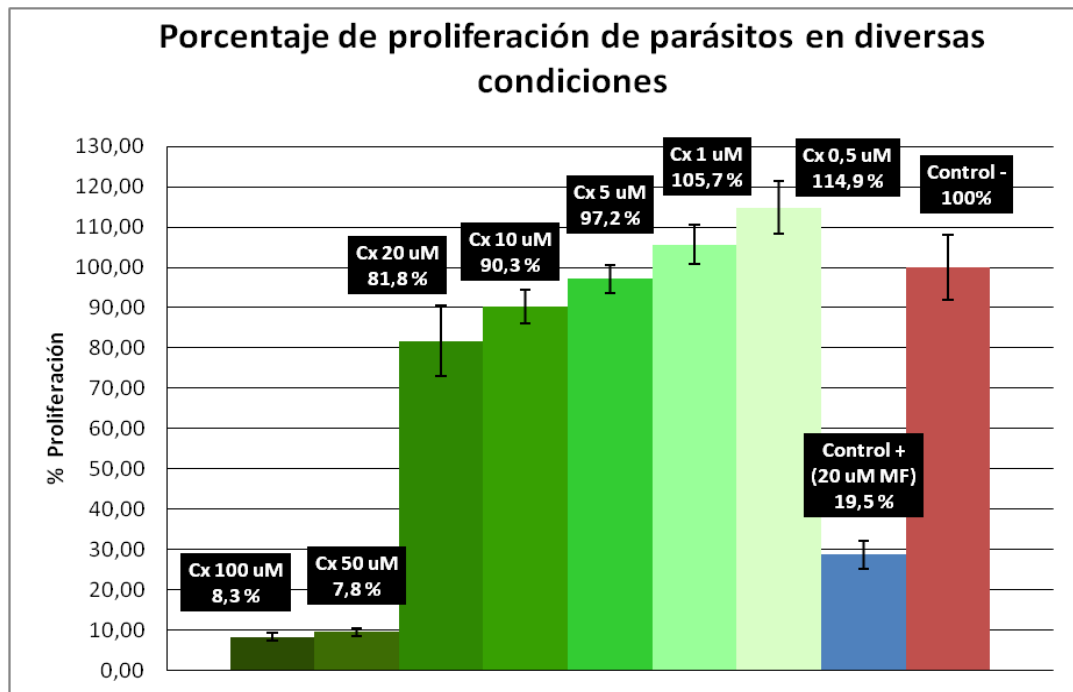


Gráfico 9. Porcentaje de proliferación de los promastigotes para cada condición experimental evaluada en el ensayo de MTT de parásitos.

De acuerdo a lo que se observa en el **Gráfico 9**, la población viva de parásitos en presencia de 100 y 50 μM es pequeña, no llegando siquiera a suponer un 10% de la población del Control - en ninguno de los dos casos, lo cual indica un claro efecto leishmanicida del ciclopirox a estas concentraciones, hecho del cual se habían ya obtenido indicios cualitativos en el surgimiento o no de la coloración característica del formazán (**Figura 76**). Como complemento, puede notarse que los porcentajes de proliferación específicos cuando las concentraciones de ciclopirox fueron 1 y 0,5 μM resultaron mayores para estas concentraciones que el correspondiente al Control -; la

magnitud de tales diferencias, sin embargo, se enmarca dentro de la de los errores de las tres condiciones mencionadas, por lo que no necesariamente deben ser consideradas significativas y/o atribuibles a determinado fenómeno. En cuanto a la condición de Control +, los resultados expuesto en el **Gráfico 9** parecen dar luces de que el ciclopirox comprende una actividad parasiticida que, si bien quedó demostrada, parece ser inferior a la ofrecida por la miltefosina (un fármaco de utilización generalizada en quimioterapias leishmanicidas que fue incluido en el ensayo precisamente con fines comparativos).

A partir de los datos presentados en el **Gráfico 9**, puede ahora procederse a la estimación final de un valor de EC_{50} (siglas correspondientes a *effective concentration* (concentración efectiva), parámetro que expresa la concentración necesaria de droga para infligir la muerte del 50% de la población respecto a controles que no han sido expuestos al fármaco). Esta concentración de droga se obtuvo mediante un método de interpolación lineal propuesto en la bibliografía ^[93], el cual postula que, en una representación gráfica del logaritmo de la concentración (variable independiente) vs densidad parasitaria (variable dependiente), se toman dos concentraciones de fármaco (X_1 y X_2) de manera tal que la densidad de parásitos (Y_1) correspondiente a X_1 (y todas las concentraciones inferiores) sea mayor que la mitad de la densidad encontrada en el control (Y_0), y que la densidad encontrada para la concentración X_2 (y todas las concentraciones superiores) sea menor que la mitad de la densidad (Y_0).

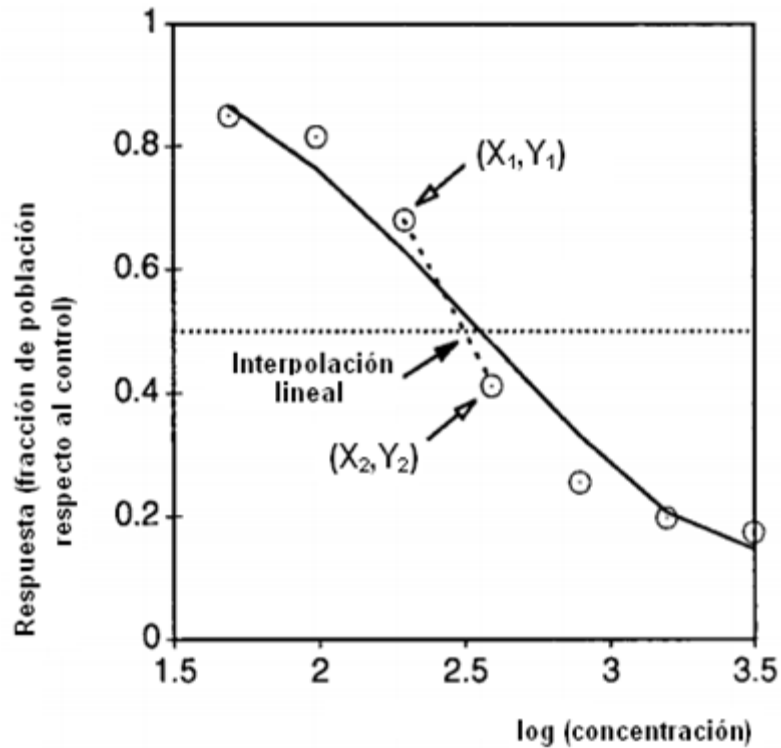


Figura 51. Representación gráfica del modelo de interpolación lineal para el cálculo del EC_{50} ^[93].

La ecuación propuesta para determinar el EC_{50} a partir del método descrito es presentada a continuación ^[93]:

$$\log(EC_{50}) = \log(x_1) + \frac{y_1 - \frac{y_0}{2}}{y_1 - y_2} (\log(x_2) - \log(x_1)) \tag{12}$$

En función lo obtenido y plasmado en el **Gráfico 9**, valores plausibles para satisfacer el método podrían ser $X_1 = 20 \mu\text{M}$ y $X_2 = 50 \mu\text{M}$, con sus correspondientes $Y_1 = 81,8$ y $Y_2 = 8,3$, respectivamente. Al introducir los valores en la ecuación recién mostrada y computar, se obtuvo, finalmente un EC_{50} de **29,73 μM** .

Como complemento a la discusión, el valor de EC_{50} de la miltefosina ha sido estimado en aproximadamente 38 μ M para promastigotes de la cepa UA306 y especie *Leishmania braziliensis*, que es exactamente la cepa y especie de trabajo en esta investigación (aunque, bajo las condiciones del ensayo MTT del presente trabajo, se encontraron luces de que el valor podría ser menor, de acuerdo al **Gráfico 9**); por otro lado, la actividad de algunos otros alquil-fosfolípidos leishmanicidas análogos a la miltefosina, como la edelfosina, perifosina y erucilfosfocolina también ha sido evaluada sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*, arrojando valores de EC_{50} de aproximadamente 18, 14 y 21 μ M, respectivamente ^[94]. Contrastando estos valores con el obtenido para el ciclopirox, éste parece dar indicios de ser una sustancia competitiva en lo que a su potencial en terapias leishmanicidas se refiere; no obstante, debido a sensibilidad de los valores de EC_{50} respecto a multiplicidad de parámetros tanto experimentales como relativos a la especie del parásito en evaluación y la ausencia de magnitudes reportadas de EC_{50} del ciclopirox para parásitos de *Leishmania braziliensis* (sólo se han publicado IC_{50} de efectos inhibitorios por parte del ciclopirox sobre enzimas específicas de *L. donovani* ^[17]) se hace imperativo aumentar el número de experimentos que tengan como fin determinar esta concentración para este “sistema” parásito-droga.

5.4.2- Efecto parasiticida del ciclopirox olamina liberado desde las microcápsulas.

En virtud de que las cápsulas de funcionamiento más eficiente fueron las producidas a partir del polímero A₁, en el ensayo de efecto leishmanicida de fármaco liberado se emplearon exclusivamente tales micropartículas.

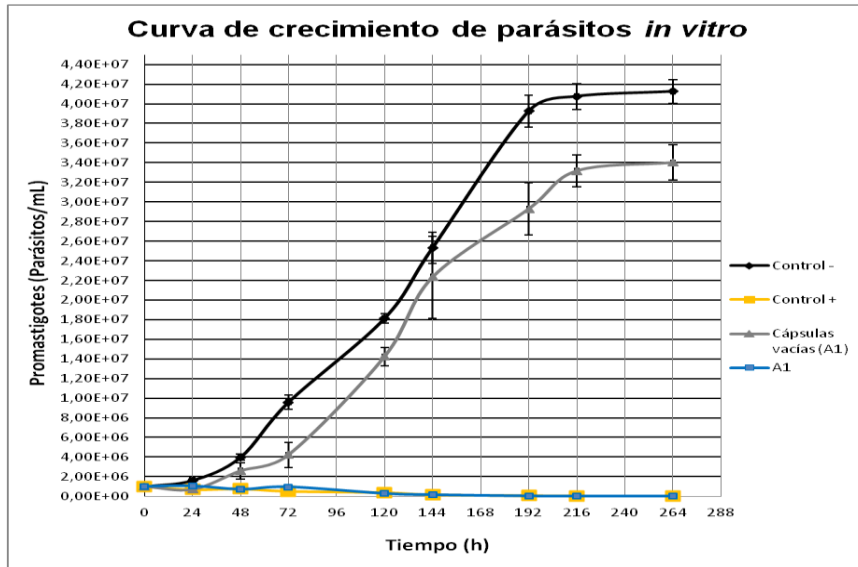


Gráfico 10. Efecto de diversas condiciones de presión selectiva sobre viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis*.

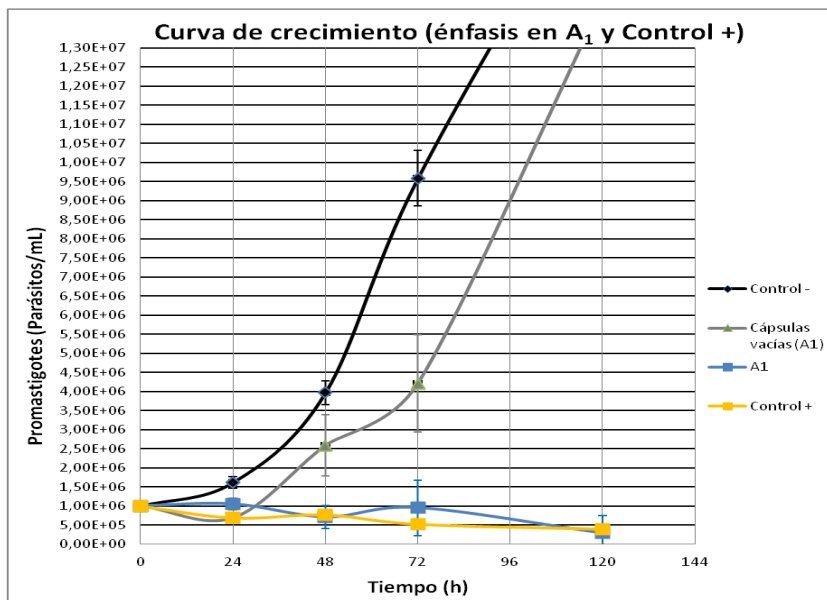


Gráfico 11. Énfasis en el comportamiento de los parásitos sometidos a cápsulas de A₁ con fármaco y Control +.

Como Control + se dispuso una solución de ciclopirox olamina libre de concentración igual a 150 μM (el establecimiento de esta condición obedeció a la máxima concentración de droga que las cápsulas fueron capaces de producir al llevar a cabo los ensayos preliminares de cinética de liberación en PBS, la cual fue de casi 700 μM (valor alcanzado por las cápsulas de A₃); como esa cantidad fue determinada en 2 mL de solvente, se estableció que, en 10 mL, esta concentración sería cinco veces menor, de acuerdo al factor de dilución correspondiente). Los parásitos del Control – exhibieron un crecimiento en franca fase exponencial por aproximadamente 8 días, momento en el cual ingresan, de manera natural, a etapa estacionaria o de rezago (conocida más comúnmente como fase *lag*, por su denominación en inglés); esto no hace sino demostrar que los parásitos, en ausencia de presión selectiva externa, se encontraban en buen estado, con óptimas condiciones metabólicas y competentes en términos de reproducción. En contraste, sobre los parásitos expuestos a las cápsulas con fármaco se evidenció un claro efecto leishmanicida que ejerció el ciclopirox olamina expelido, cuya concentración en este ensayo, de acuerdo al **Gráfico 6**, debió haber sido superior al EC₅₀ del Cx para parásitos desde los primeros conteos efectuados (de ahí la notable y sostenida merma de la población parasitaria). En el **Gráfico 11** también puede visualizarse que el efecto leishmanicida del ciclopirox olamina libre (Control +) es muy similar al de la droga liberada desde la matriz polimérica, hecho que constata que esta droga liberada tiene el mismo efecto biológico en los parásitos que la droga libre administrada directamente (no puede hablarse aún de efecto terapéutico, dado que éstos no estaban siendo evidenciados en pacientes). Lo recién expresado presenta incluso cierta evidencia visual, manifestada en las imágenes que se muestran a continuación.

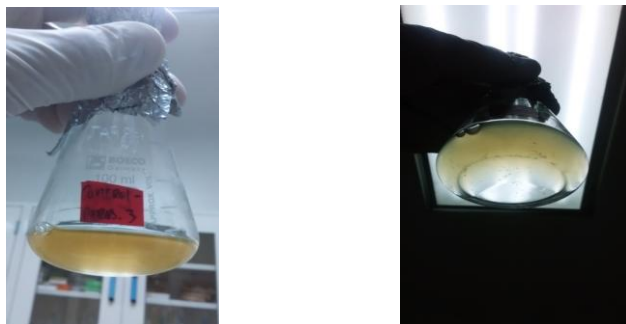


Figura 52. Aspecto del medio LIT contenedor de parásitos sin presión selectiva externa (Control -).



Figura 53. Aspecto del medio LIT contenedor de parásitos en presencia de cápsulas de A₁ con fármaco.

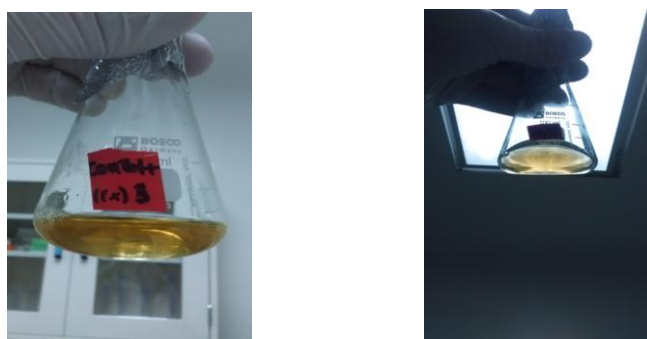


Figura 54. Aspecto del medio LIT contenedor de parásitos en presencia de 150 μ M de fármaco libre (Control +).

La **Figura 52** muestra un medio LIT de apariencia turbia, producto de la proliferación parasitaria, no así para los medios con presencia de microcápsulas de A₁ con fármaco y medicamento libre, lo cual, como se señaló, es evidencia visual y cualitativa de significativas diferencias en la concentración de microorganismos para cada caso. Ahora bien, volviendo a la afirmación referente a la igualdad en el efecto biológico del ciclopirox olamina administrado de manera discreta y de manera continua, la misma permite dilucidar, de cara a futuras aplicaciones médicas, lo siguiente: de proporcionarse el ciclopirox a un eventual paciente de forma discreta, el fármaco ejercería el efecto leishmanicida descrito; sin embargo, al cabo de determinadas horas, el fármaco sería finalmente metabolizado y expulsado del organismo, necesitándose el suministro de una nueva dosis (esto se enmarcaría dentro de un régimen de dosificación tradicional del medicamento); en contraste, de proveerse la droga mediante un implante que comprenda microcápsulas de liberación controlada (por ejemplo, cápsulas embebidas en alguna clase de ungüento tópico), el fármaco liberado tendría, como se dijo, el mismo efecto leishmanicida sobre los parásitos que si se hubiese administrado en dosis diferenciadas, mas su suministro sería continuo y prolongado, asegurando su dosificación permanente y trayendo como consecuencia la amplificación de su eficiencia de acción y la concomitante reducción del tiempo de tratamiento, siendo esto, naturalmente, el fin último, la motivación y la ventaja esenciales del desarrollo de sistemas de liberación prolongada de fármacos.

Una última observación se desprende del **Gráfico 10** en cuanto al comportamiento de los parásitos en presencia de cápsulas vacías. Al detallar la tendencia de crecimiento que estos parásitos exhiben, parece develarse cierto efecto leishmanicida causado por las matrices poliméricas del dispositivo de liberación controlada de droga, el cual, a modo de conjetura, pudo haberse originado debido a los microclimas ácidos que las microcápsulas de PLGA son capaces de generar, sobre todo si ha transcurrido un tiempo razonable desde la síntesis del polímero (la posibilidad de existencia de estos microclimas fueron ya mencionados en la **Revisión**

bibliográfica), aunque valga decir que, de haberse producido tales microclimas, los mismos sólo tuvieron influencia muy localizada, puesto que, al medir el pH de los medios en estudio con papel tornasol, no se registraron descensos del mismo. Sea como fuere, investigaciones más amplias y específicas en cuanto a un posible efecto leishmanicida de las microcápsulas sin fármaco asociado se harían necesarias para esclarecer esta cuestión.

5.5.- Estudio de la citotoxicidad del ciclopirox olamina en macrófagos BMDM.

Al evaluar la viabilidad y pertinencia de una droga en quimioterapia parasitaria, no solamente tal droga debe ejercer la acción biológica (y, eventualmente, terapéutica) buscada, sino que, además, es preciso que sus efectos secundarios sean lo más marginales posibles. En este sentido, se juzgó coherente evaluar la interacción del ciclopirox con un modelo celular consistente en macrófagos extraídos de médula ósea de ratones BALB/c (macrófagos BMDM, acrónimo inglés de *bone marrow derived macrophages*, traducido al español como macrófagos derivados de médula ósea), por cuanto tales leucocitos constituyen una de las primeras líneas de respuesta inmunológica del mamífero hospedador y, además, su rol en el ciclo de vida de los parásitos del género *Leishmania* es amplio y frecuentemente referenciado en la literatura.

Para la evaluación de la citotoxicidad del ciclopirox olamina en el modelo celular mencionado, se estimó trabajar con concentraciones ampliamente superiores al EC₅₀ calculado para parásitos, de modo que, de verificarse poca vulnerabilidad por parte de las células expuestas, un paso importante en la aceptación del Cx de cara a quimioterapias parasiticidas habría sido dado. Como corolario a esto, las concentraciones de fármaco seleccionadas y ensayadas fueron 100, 300, 500 y 1000 µM, generándose gráfico de barras de proliferación celular que se muestra a continuación.

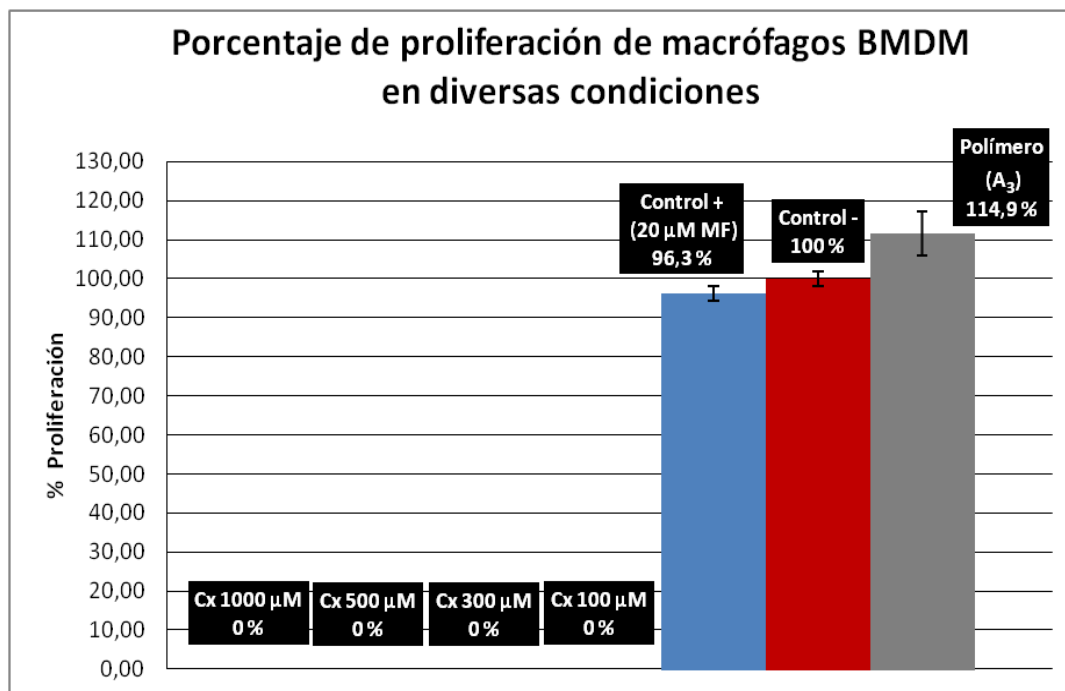


Gráfico 12. Porcentaje de proliferación de los macrófagos para cada condición experimental evaluada.

La observación inmediata que emana del gráfico es la total erradicación de la población celular en todas las concentraciones de Cx ensayadas, lo cual devela un efecto citotóxico importante generado por éste en tales concentraciones. Este fenómeno, ciertamente, no es inaudito si se escudriña en la literatura, donde se ha descrito para el ciclopirox un EC_{50} de 20,27 μM para macrófagos de exudado peritoneal de ratones^[95], además de algunos valores de EC_{50} en forma de intervalos (por ejemplo, se ha publicado un EC_{50} que simplemente se define como mayor a 10 μM para macrófagos de cepas humanas^[17]). Al realizar los experimentos, se pudo obtener fotografías del estado de las células adheridas a las placas para cada concentración del medicamento, apreciándose únicamente despojos y detritos celulares, tal como se detalla a continuación.

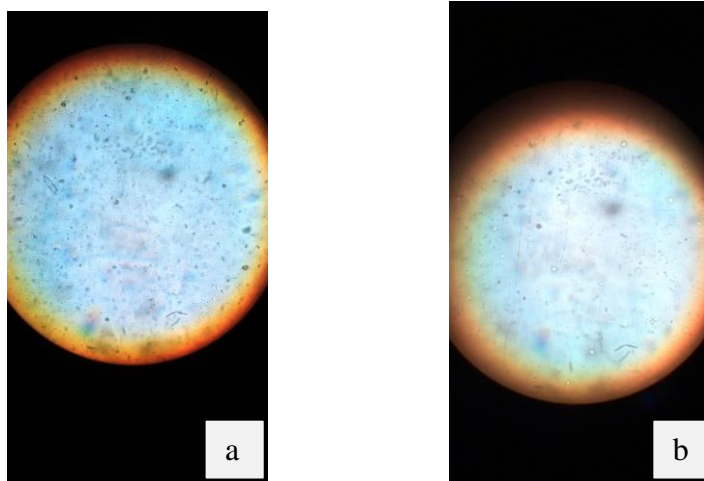


Figura 55. Inspección visual del estado de las células expuestas a: a) 1000 μM b) 500 μM de ciclopirox.

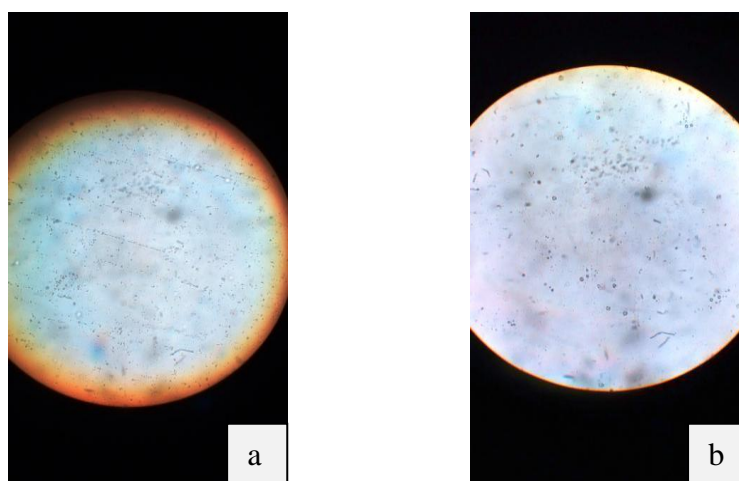


Figura 56. Inspección visual del estado de las células expuestas a: a) 300 μM b) 100 μM de ciclopirox.

. Compárese estas imágenes con la obtenida para el Control -.

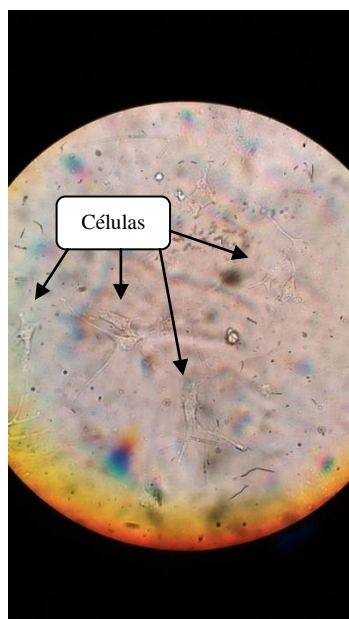


Figura 57. Inspección visual del estado de las células expuestas sin presión selectiva externa (Control -).

La diferencia de proliferación es, pues, notable. Ahora bien, en otro orden de ideas, en contraste con los parásitos, el efecto citotóxico de 20 μM de miltefosina (Control +) fue prácticamente inexistente, puesto que, como se observa en el **Gráfico 12**, la proliferación de las células expuestas a esta condición fue virtualmente idéntica a la del Control -; esta observación es, de hecho, esperable, en razón a los valores de EC_{50} de miltefosina que arroja la literatura, los cuales se reportan siempre por encima de 25 μM para macrófagos BMDM ^[96], con concentraciones tope de invulnerabilidad de hasta 40 μM ^[97] e, incluso, aparecen EC_{50} de hasta 92,7 μM para macrófagos de exudado peritoneal de ratones BALB/c ^[98]. Una imagen que confirma la buena proliferación de los macrófagos expuestos al Control + se muestra a continuación.

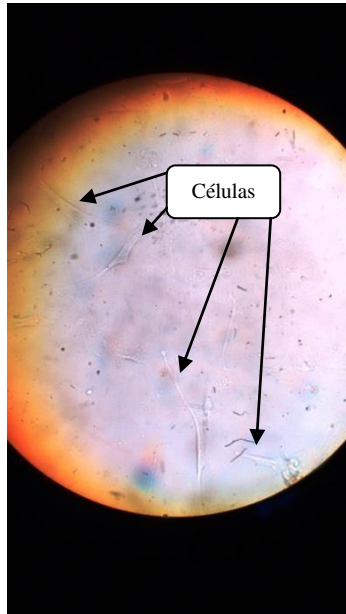


Figura 58. Inspección visual del estado de las células expuestas al Control + (20 μ M de miltefosina).

Como análisis final, se observa en el **Gráfico 12** lo que aparenta ser un fenómeno de sobre-proliferación celular cuando las mismas se exponen a polímero carente de fármaco, con aumento poblacional por encima del 100% del Control – de hasta casi 15 por ciento. Cabe la posibilidad de que, al igual que puede haber ocurrido con los parásitos en presencia de concentraciones de 0,5 y 1 μ M de ciclopirox, los macrófagos hayan identificado al polímero como una amenaza para su subsistencia (quizá por el microclima ácido que se especuló que haya podido prevalecido en torno a ellas) y, como estrategia adaptativa, hayan desplegado mecanismos que permitiesen acrecentar la multiplicación celular de manera superior a como ocurrió en un ambiente sin presión selectiva, como en el caso del Control -. Al igual que el aparente efecto leishmanicida de las cápsulas vacías, el presunto fenómeno de sobre-proliferación aquí observado requeriría investigaciones más profundas para esclarecerse por completo.

Como conclusión, está claro que lo más importante aquí registrado es la erradicación celular producida por las concentraciones ensayadas de ciclopirox olamina. Esto, valga decir, no dilapida inmediatamente su candidatura para establecerse como un fármaco importante en la quimioterapia leishmanicida, pero definitivamente se requiere que su citotoxicidad sea evaluada empleando concentraciones mucho más cercanas a las ensayadas previamente con los parásitos (y, en caso de seguir exhibiendo citotoxicidad comparable a la que ofrece para los promastigotes, podría ser considerado para su empleo en terapias de combinación de fármacos).

A modo de síntesis final y general de los resultados recabados en este trabajo especial de grado, se establece que fue posible sintetizar copolímeros de d,l-lactida y glicolida en proporciones particulares, generar microesferas con ciclopirox olamina encapsulado en su interior, comprobar que, a partir de las mismas, el fármaco fue liberado paulatina y prolongadamente por varios días en medios acuosos, y observar que el medicamento liberado tuvo efecto parasiticida sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis* en condiciones *in vitro*. El hecho de haber observado una liberación prolongada del ciclopirox a partir de las microcápsulas valida la metodología aplicada, y justifica la inversión en tiempo, recursos y esfuerzo que supuso producir este constructo polimérico, finalmente estableciendo diferencias entre la administración de droga a partir de éste y por dosificación discreta (dosificación tradicional).

6.- CONCLUSIONES.

6.1.- Síntesis poliméricas.

- Todos los materiales sintetizados por policondensación directa de ácido d,l-láctico y ácido glicólico en solución consistieron en polímeros de bajo peso molecular.
- La síntesis por apertura de anillos de d,l-lactida y glicolida en masa ofreció copolímeros con composición consistente con la proporción de monómeros de alimentación.

6.2.- Elaboración y caracterización de microcápsulas.

- Tanto al emplear la técnica de emulsión simple en ausencia de fármaco como la de doble emulsión en presencia del mismo, se produjeron cápsulas de geometría esférica y superficie externa razonablemente lisa.
- Las cápsulas preparadas por emulsión simple poseyeron una estructura interna maciza y poco porosa, mientras que las generadas por doble emulsión mostraron estructuras internas tipo “panal”.
- Las cápsulas preparadas por emulsión simple mostraron distribuciones de tamaño más amplias que las obtenidas por doble emulsión.
- La eficiencia de encapsulación resultó ser muy baja para todas las composiciones poliméricas, probablemente por el hecho de haber utilizado un exceso de droga en relación a la cantidad de polímero. Mayores contenidos de

droga se registraron para las composiciones más hidrófobas, lo que sugiere que esto se favoreció por mejores interacciones droga-matriz polimérica hidrófoba.

- Las microcápsulas vacías sometidas a condiciones fisiológicas emuladas respondieron de manera diferenciada al estrés hidrolítico, resultando más rápidamente afectadas aquellas de mayor carácter hidrófilo. Al tiempo máximo de exposición evaluado (50 días), todos los dispositivos habían perdido completamente su integridad morfológica como microcápsulas.

6.3.- Cinética de liberación de ciclopirox olamina desde las microcápsulas.

- En buffer de fosfato, la liberación de ciclopirox, para todas las composiciones, resultó bifásica, con una primera etapa de liberación asociada a “efecto *burst*” de aproximadamente tres días de duración, seguida de liberación mucho más controlada hasta la conclusión del experimento.
- La liberación de droga fue siempre más veloz desde las cápsulas de composición más hidrófila en ambas fases del perfil, lo que soporta la propuesta de mejores interacciones del fármaco con PLGA hidrófobos. Teniéndose, además, que la cantidad de fármaco expelido en la etapa de “efecto *burst*” fue notablemente superior para las composiciones de mayor hidrofiliidad, se conservó el dispositivo de composición más hidrófobo para su empleo en la liberación en medio LIT y los exámenes de viabilidad celular.
- La liberación en medio LIT fue superior y más veloz que en buffer de fosfato para todas las etapas del perfil, aunque esto se adjudicó a lesiones en las microcápsulas más que en diferencias debidas a la composición del medio.

6.4.- Viabilidad de promastigotes de *Leishmania braziliensis* en presencia de ciclopirox olamina libre y expelido desde las cápsulas.

- El EC₅₀ obtenido de ciclopirox olamina para macrófagos fue de 29,73 μ M.
- El fármaco liberado desde las cápsulas poliméricas mostró el mismo efecto leishmanicida que la droga libre, mermando la población parasitaria en los 11 días de duración de la exposición.
- Las microcápsulas vacías mostraron también un efecto leishmanicida que, aunque mucho más limitado que el del fármaco, se pudo registrar. Se elucubró que este efecto quizá pudo deberse a posibles microclimas ácidos en las proximidades de las partículas, que afectaron a la población parasitaria en continuo contacto con ellas.

6.5.- Viabilidad de macrófagos BMDM en presencia de ciclopirox olamina.

- El ciclopirox olamina es letal para los macrófagos en concentraciones de 100 μ M o superiores.
- El polímero del cual se fabricaron las microcápsulas no ejerció efecto citotóxico directo sobre los macrófagos.

6.6. Conclusión general

Se produjeron copolímeros de d,l-lactida y glicolida en proporciones másicas específicas, a partir de los cuales se elaboraron microesferas dentro de las que pudo ser encapsulado ciclopirox olamina. Las microcápsulas fueron capaces de liberar el

fármaco de manera continua y prolongada por varios días en medios acuosos, y el medicamento así expelido exhibió actividad leishmanicida comprobada.

7.- RECOMENDACIONES.

- Teniendo en cuenta las dificultades en el control de la presión en las síntesis por policondensación directa, y sabiendo la importancia de este parámetro de cara a la obtención de buenos resultados bajo esta estrategia sintética, debe establecerse un trabajo enfocado exclusivamente hacia la puesta en práctica exitosa de la misma. Podría recomendarse, como complemento, elegir la polimerización por fusión y en masa en lugar de en solución, debido a los inconvenientes que supone la volatilización del solvente al aplicar presión reducida.
- En la polimerización por apertura de anillo, conviene utilizar ampollas cuyas bocas sean de mayor diámetro y extensión, con el fin de permitir el ingreso de agitadores magnéticos más grandes y evitar dificultades al momento del sellado de ellas.
- En cuanto al proceso de microencapsulación, ya habiendo sido comprobado que el polímero encapsuló satisfactoriamente al fármaco, sería útil, de cara a próximos trabajos, considerar en la formulación cantidades de droga inferiores a las que se adiciones de polímero, con el fin de obtener eficiencias de encapsulación más apegadas a la verdadera capacidad del método y el material para encapsular el ciclopirox.
- De mucha utilidad sería evaluar la viabilidad de macrófagos en presencia del mismo rango de concentraciones a las que se expusieron los parásitos, para así poder obtener un EC_{50} para estas células y establecer un índice de selectividad correlacionando este parámetro con el de los parásitos.

8.- BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Núñez-Durán, J. y col., **Rev. Fac. Farm. UCV**. 2012; 75 (2): 50-58.
- [2] Vásquez de Ricciardi, L., **Gac. Méd. Caracas**. [Revista en línea]. 2009 [fecha de último acceso: 21 de junio de 2017]; 117 (2): 93-111. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0367-47622009000200002&script=sci_arttext
- [3] Serrano-Martín, X., **RET**. 2010; 2 (1): 69-75.
- [4] Stamatialis, D. y col., **J. Mem. Sci**. 2008; 308 (2): 1-34.
- [5] Youxin, L., Kissel, T., **J. Control. Rel**. 1993; 27: 247-257.
- [6] Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud, República Argentina, **Guía para el equipo de salud**. [Monografía en línea]. 2010 [fecha de último acceso: 21 de junio de 2017]; (3): 5-40. Disponible en: <http://www.msal.gob.ar/zoonosis/>.
- [7] Montalvo Álvarez, A. M., **Rev. Cubana Hig. Epidemiol**. 2010; 48 (1): 78-81.
- [8] Serrano-Martín, X., **Un enfoque soberano y nacionalista para combatir las parasitosis tropicales olvidadas por las transnacionales farmacéuticas**. En: **1er. Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación en el Marco de la LOCTI y del PEII**. Caracas, Venezuela: Ediciones ONCTI/MPPCTI; 2013. 113-119.
- [9] Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, **VITAE, Academia Biomédica Digital**. [revista en línea]. 2007 [fecha de último acceso: 21 de junio de 2017]; (33). Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=39&n=1165&m=5&e=1218>.

- [10] Serrano-Martín, X., Payares, G., Mendoza-León, A., ***Antimicrob. Agents Chemother.*** 2006; 50 (12): 4214-4216.
- [11] Orué, A. y col., ***Rev. Salus.*** 2007; 11 (1): 32-36.
- [12] Serrano-Martín, X., y col., ***Mem. Inst. Biol. Exp.*** 2008; 5: 21-24.
- [13] Ordóñez-Gutiérrez, L. y col., ***Int. J. Antimicrob. Ag.*** 2007; 30: 325-329.
- [14] <http://www.scbt.com/es/datasheet-204688-ciclopirox-olamine.html> Fecha de último acceso: 27 de marzo de 2015.
- [15] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01646580> Fecha de último acceso: 27 de marzo de 2015.
- [16] <http://faculty.swosu.edu/scott.long/phcl/antifung.htm> Fecha de último acceso: 27 de marzo de 2015.
- [17] Chawla, B. y col., ***PLOS ONE.*** 2012; 7(3): 1-12.
- [18] Leem, S. y col., ***Mol. Cells.*** 2003; 15 (1): 55-61.
- [19] Gupta, A., Skinner, A., ***Int. Soc. Derm.*** 2003; 42: 3-9.
- [20] Ghannoum, M., Rice, L., ***Clin. Microbiol. Rev.*** 1999; 12 (4): 501-517.
- [21] Hanauske-Abel, H. y col., ***PLOS ONE.*** 2013; 7 (3): 1-22.
- [22] Ruan, G., Feng, S., ***Biomaterials.*** 2003; 24: 5037-5044.

- [23] Lima, K., Rodrigues, J., **Braz. J. Med. Biol. Res.** 1999; 32 (2): 171-180.
- [24] Jalil, J., Nixon, J., **J. Microencapsul.** 1990; 7 (3): 297-325.
- [25] Rashkov, I. y col., **Macromolecules.** 1996; 29: 50-56.
- [26] Singh, M., y col., **J. Res. Pharm. Sci.** 2010; 5 (2): 65-77.
- [27] Carraher, C. **Polymer Chemistry.** Séptima edición. Florida, EUA: CRC Press, LLC; 2008. Capítulo 4, páginas 83-131.
- [28] Gentile, P. y col., **Int. J. Mol. Sci.** 2014; 15(3): 3640-3659.
- [29] Avgoustakis, K. **Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA).** En: Wneck, G., Bowlin, G. (editores). **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering.** Segunda edición. Florida, EUA: CRC Press LLC; 2008. 2259-2270.
- [30] Garlotta, D., **J. Polym. Environ.** 2002; 9 (2): 63-84.
- [31] D'Souza, S., y col., **Adv. Biomaterials.** 2014, ID: 834942.
- [32] Pandey. A., **Adv. Mat. Lett.** 2013, DOI: 10.5185/ amlett.2013.6489.
- [33] Marques, D., **Micromol.Symp.** 2010; 296: 63-71.
- [34] Singh, V., Tiwari, V., **Int. J. Polym. Sci.** 2010, DOI: 10.1155/2010/652719.
- [35] Ebewele, R. **Polymer Science and Technology.** Primera edición. Florida, EUA: CRC Press LLC; 2000. Capítulo 10, sección II.

- [36] Nicholson, J. ***The Chemistry of Polymers***. Tercera edición. Cambridge, Reino Unido: RSC Publishing; 2006. Capítulo 2, páginas 23-37.
- [37] Xiao, L. y col. **Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications**. En: Ghista, D. (editor). ***Biomedical Science, Engineering and Technology***. [libro en línea]. Primera edición: InTech; 2012 [fecha de último acceso: 22 de junio de 2017]. 247-282. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/biomedical-science-engineering-and-technology/poly-lactic-acid-based-biomaterials-synthesis-modification-and-applications>.
- [38] ***Encyclopedia of Polymeric Materials***. Primera edición. Berlín, Alemania: Springer-Verlag; 2015. Polyamide Syntheses, pág. 1754.
- [39] Ajioka, M. y col., ***J. Environ. Polym. Degrad.*** 1995; 3 (4): 225-234.
- [40] Albertsson, A. y col. **Desing and Synthesis of Different Types of Poly (Lactic Acid)**. En: Auras, R., Lim, L., Selke, S., Tsuji, H. (editores). ***Poly (Lactic Acid): Synthesis, Structure, Properties, Processing, and Applications***. Primera edición. Nueva Jersey, EUA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. 43-55.
- [41] Katiyar, V. y col. **Environmental Friendly Packaging Polymers**. En: Alavi, S., Thomas, S., Sandeep, K., Kalarikkal, N., Varghese, J. Yaragalla, S. (editores). ***Polymers for Packaging Applications***. Primera edición. Florida, EUA: CRC Press, LLC y Toronto: Apple Academic Press, Inc.; 2015. 115-152.
- [42] Blencowe, A., Hayes, W. **The Application of Coupling Agents in Polymer Synthesis**. En: Hopper, A. (editor). ***Developments in Polymer Research***. Primera edición. Nueva York, EUA: Nova Science Publishers, Inc.; 2007. 193-246.

- [43] Frediani, P. y col. **Synthetic Polymers from Natural Source for the Protection and Consolidation of Cultural Heritage**. En: *Proceedings of the 4th International Congress on "Science and Technology for the Safeguard of Cultural Heritage in the Mediterranean Basin, vol. II"*. El Cairo, Egipto: Angelo Ferrati – Istituto di Metodologie Chimiche, Consiglio Nazionale di Ricerca, Italia; 2009. 435-438.
- [44] Akuysu, F. y col., **Polym. J.** 1998; 30 (5): 421-423.
- [45] Wang, N. y col., **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.** 2000; 11 (3): 301-318.
- [46] Sedlarik, V. y col., **J. App. Polym. Sci.** 2010; 116: 1597-1602.
- [47] Mehta, R. y col., **J. Macrom. Sci.** 2005; 45: 325-349.
- [48] D'Avila, C., y col., **JBNB.** 2012; 3: 208-225.
- [49] Alsaheb, R. y col., **J. Chem. Pharma. Res.** 2015; 7 (12): 51-63.
- [50] Hu, Y. y col., **Materials.** 2016; 9 (133): 1-14.
- [51] Babiuch, K. y col. **RSC Adv.** 2012; 2: 10427-10465.
- [52] Delchy-Cabaret, O., Martín-Vaca, B., Bourisson, D., **Chem. Rev.** 2004; 104 (12): 6147-6176.
- [53] Gowariker, V., Viswanathan, N., Sreedhar, J. **Polymer Science**. Nueva Delhi, India: New International (P) Ltd., Publishers; 1986. Capítulo 2, páginas 40-64.

- [54] Fiorini, M., Sisi, L., Colonna, M., **Report on Plastic Materials for Extrusion**. Bologna, Italia: Centro Interdipartimentale di Ricerca Industriale, Edilizia e Costruzione; 2013. Serie identificativa del informe: LIFE13 ENV/IT/000614.
- [55] Masutani, K., Kimura, Y. **PLA Synthesis: from Monomer to the Polymer**. En: Jiménez, A., Peltzer, M., Ruseckaite, R. **Poly (lactic acid) Science and Technology**. Primera edición. Cambridge, Reino Unido: RSC Publishing, 2015. 3-36.
- [56] Rueda, C. y col., **Rev. Mex. Ing. Quím.** 2015; 14 (3): 813-827.
- [57] Kapoor, D. y col., **Ther. Deliv.** 2015; 6 (1): 41-58.
- [58] Gümüşderelioğlu, K., Denz, G., **Turk J. Chem.** 1999; 23: 153-161.
- [59] Cabezas, L. y col., **eXPRESS Polym. Lett.** 2013; 7 (11): 886-894.
- [60] Jyothi, N. y col., **J. Microencapsul.** 2010; 27(3): 187–197.
- [61] Nack, H., **J. Soc. Cosmet. Chem.** 1970; 21: 85-98.
- [62] Villena, M. y col., **Ars. Pharm.** 2009; 50 (1): 43-50.
- [63] Rosca, I., Watari, F., Uo, M. **J. Control. Rel.** 2004; 99: 271–280.
- [64] Gabor, F. y col., **J. Microencapsul.** 1996; 16 (1): 1-12.
- [65] Boury, F. y col., **J. Control. Rel.** 1997; 45: 75-86.
- [66] Fu, X., Ping, Q., Gao, Y., **J. Microencapsul.** 2005; 22 (7): 705-714.

- [67] Rafati, H. y col. **J. Control. Rel.** 1997; 43: 89-102.
- [68] Murtaza, G., **J. Pharm. Sci.** 2009; 22 (3): 291-300.
- [69] Mehta, R. y col., **J. Control. Rel.** 1994; 29: 375-384.
- [70] Kansal, S. y col., **J. Microencapsul.** 2013; 30 (5): 441-450.
- [71] Schubert, S., Delaney, J., Schubert, U. **Soft Matter.** 2011; 7: 1581-1588.
- [72] Makadia, H., Siegel, S., **Polymers.** 2011; 3 (3): 1377-1397.
- [73] Passerini, N., Craig, D. **J. Control. Rel.** 2001; 73: 111-115.
- [74] Gasmi, H.. **Microparticules à libération contrôlée: impact du gonflement sur la cinétique de libération de substance active.** [Tesis doctoral]. Lille, Francia: École Doctorale Biologie-Santé, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Lille Nord de France; 2016.
- [75] Kucharczyk, P. **Preparation and modifications of biodegradable polyesters for medical applications.** [Tesis doctoral] Zlín, Rep. Checa: Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín; 2013.
- [76] Freitas, S., Merkle, H., Gander, B. **J. Control. Rel.** 2005; 102: 313-332.
- [77] Velasco, M. y col., **Spectrosc. Lett.** 1999; 32 (2): 289-304.
- [78] Song, G. y col., **Adv. Mat. Res.** 2014; 997: 475-479.

[79] Tortolero, M. **Empleo de polímeros biodegradables sintéticos como sistemas de liberación controlada de drogas en el tratamiento de infecciones óseas.** [Tesis doctoral]. Caracas, Venezuela: Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela; 2002.

[80] Román, M. **Estudio de la velocidad de liberación de sustancias encapsuladas y caracterización morfológica de sistemas poliméricos biodegradables utilizando técnicas de UV y fluorescencia láser confocal.** [Tesis de grado]. Caracas, Venezuela: Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela; 2005

[81] Morgado, M. **Estudio de la inhibición de Monoamino Oxidasa (MAO) por Deprenilo mediante uso de polímeros biodegradables como agente de liberación controlada.** [Tesis de grado]. Caracas, Venezuela: Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela; 2006.

[82] Tian, W. y col., **Chin. J. Chem. Eng.** 2010; 18 (3): 391-396.

[83]<http://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/materialsscience/thermogelation.html>- Fecha de último acceso: 23/06/2017.

[84] Kim, K., Woo, S., **Macromol. Chem. Phys.** 2002; 203(15): 2245-2250.

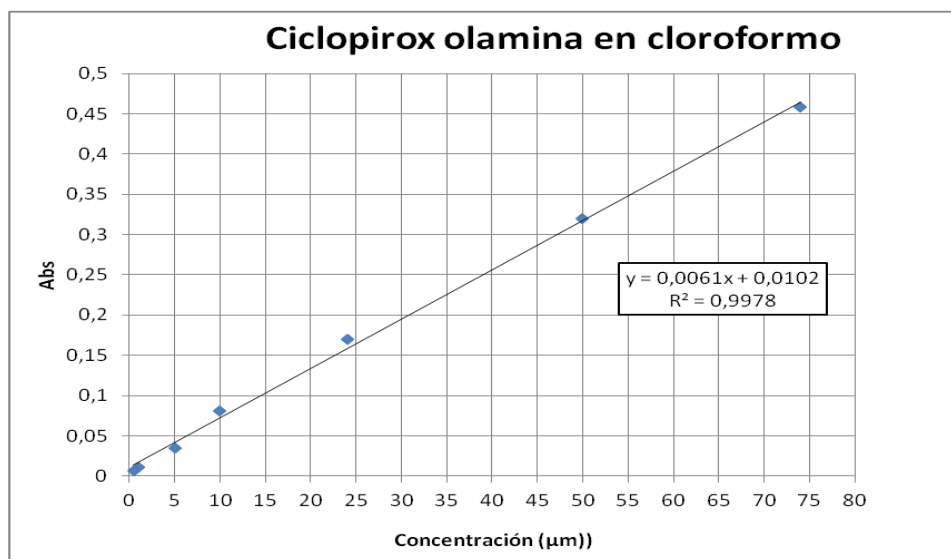
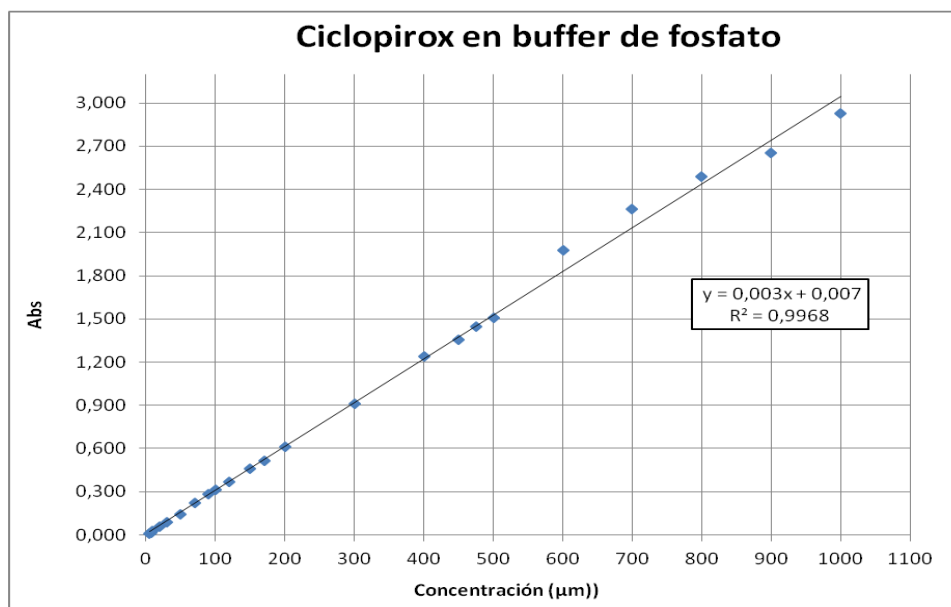
[85] Yamaoka, T. y col., **J. Polym. Sci., A.** 1999; 37: 1513-1521.

[86] Gajendiran, M. y col., **Colloids Surf., B.** 2013; 104: 107-115.

[87] Chlopek, J. y col., **Polym. Degrad. Stab.** 2009; 94: 1479-1485.

- [88] Vysloužil, J. y col., **Acta Pharm.** 2014; 64: 403-417.
- [89] Berridge, M., Herst, P., Tan, S., **Biotechnol. Annu. Rev.** 2005; 11: 128-152.
- [90] Sittampalam, S. y col. **Cell Viability Assays.** En: Ghista, D. (editor). **Assay Guidance Manual.** [libro en línea]. Primera edición: Eli Lilly & Company, National Center for Advancing Translational Sciences; 2016 [fecha de último acceso: 24 de junio de 2017]. 247-282. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
- [91] Stockert, J., y col., **Acta Histochem.** 2012; 14: 785-796.
- [92] Mosmann, T., **J. Immunol. Methods.** 1983; 63: 55-63.
- [93] Huber, W., Koella, J., **Acta Trop.** 1993; 55: 257-261.
- [94] Varela, R. y col., **PLOS ONE.** 2012; 6 (4): 1-14.
- [95] Kaiser, M. y col., **PLOS ONE.** 2015; 10 (8): 1-16.
- [96] Mao, W. y col., **Sci. Rep.** [Revista en línea]. 2017 [fecha de último acceso: 24 de junio de 2017]; 7 (751): 1-14. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-00848-8>.
- [97] Coelho, A. y col., **PLOS ONE.** 2014; 8 (7): 1-11.
- [98] Morais-Teixeira, E. y col., **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 2011; 106 (4): 475-478.

*Las citas bibliográficas se han elaborado siguiendo las normas estilo Vancouver

9.- ANEXOS.**Anexo 1:** curva de calibración del ciclopirox olamina en cloroformo.**Anexo 2:** curva de calibración de ciclopirox olamina en PBS.

Anexo 3: curva de calibración del ciclopirox olamina en medio LIT.