



Nanotransportadores a base de Quitosano para la liberación de fármacos

Chitosan-based nanocarriers for drug delivery

KARLA K CALO O^{1*}, ISABEL C ANDUEZA G^{2*}

Resumen

Los biomateriales mucoadhesivos en formulaciones farmacéuticas son potencialmente útiles en la administración transmucosa de ingredientes activos para mejorar sus efectos localizados y prolongados. Los avances recientes en nanotecnología han permitido el diseño de nanosistemas que permiten prolongar la retención local, reducir la frecuencia de dosificación y aliviar la irritación de las mucosas. El quitosano es un polisacárido natural, frecuentemente utilizado en el desarrollo de distintas formas de dosificación, debido a sus excepcionales propiedades fisicoquímicas y biológicas. La bilastina, como nuevo antihistamínico eficaz y bien tolerado, está aprobada para el tratamiento sintomático de la rinoconjuntivitis alérgica estacional o perenne y urticaria en muchos países europeos. Con el objetivo de diseñar y caracterizar un sistema nanotransportador empleando quitosano como polímero mucoadhesivo, en este trabajo se desarrollaron dos nanosistemas, uno encapsulando bilastina en el núcleo oleoso de nanocápsulas de quitosano y otro mediante una modificación química que permitió la asociación del fármaco mediante su unión covalentemente al quitosano. Se obtuvieron nanocápsulas esféricas, de tamaño nanométrico (<300 nm) y carga superficial positiva. Se evaluó su estabilidad en fluido nasal simulados (hasta 24 h), tras almacenamiento en suspensión por un mes y tras su liofilización. Los dos nanosistemas presentaron perfiles de liberación adecuados en medio nasal, aumentando la cantidad de fármaco liberado en función del tiempo. Los resultados obtenidos presentan a estos nanosistemas como candidatos de interés para la administración nasal de antihistamínicos.

Palabras clave: Nanocápsulas, Bilastina, Quitosano, Maleimida, Rinitis

Abstract

Mucoadhesive biomaterials in pharmaceutical formulations are potentially useful for transmucosal delivery of active ingredients, improving their localized and prolonged effects. Recent advances in nanotechnology have enabled the design of nanosystems that prolong local retention, reduce dosing frequency, and alleviate mucosal irritation. Chitosan, a natural polysaccharide, is frequently used in dosage form development due to its exceptional physicochemical and biological properties. Bilastine, a new effective and well-tolerated antihistamine, is approved for the symptomatic treatment of seasonal or perennial allergic rhinitis and urticaria. This study aimed to design and characterize a nanocarrier system using chitosan as a mucoadhesive polymer. Two nanosystems were developed: one encapsulating bilastine in the oily core of chitosan nanocapsules, and another using a chemical modification that allowed covalent binding of the drug to chitosan. Spherical nanocapsules of nanometric size (<300 nm) and positive surface charge were obtained. Their stability was evaluated in simulated nasal fluid (up to 24 h), after one month of storage in suspension, and after lyophilization. Both nanosystems showed suitable drug release profiles in the nasal medium, increasing the amount of drug released over time. The results suggest these nanosystems are promising candidates for nasal administration of antihistamines.

Keywords: Nanocapsules, Bilastine, Chitosan, Maleimide, Rhinitis

* Unidad de Formulación, Caracterización y Optimización, Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, Facultad de Farmacia - Universidad Central de Venezuela. Caracas - Venezuela. Correspondencia: karlakco07@gmail.com

Orcid: [0000-0003-2985-9110](https://orcid.org/0000-0003-2985-9110)

[0000-0002-1585-862X](https://orcid.org/0000-0002-1585-862X)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2025.88.2.3](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2025.88.2.3)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 23/10/2025

Aprobación: 31/10/2025

Rev. Fac. Farmacia 88(2): 124-137. 2025

Introducción

La rinoconjuntivitis alérgica es una afección inflamatoria común que combina síntomas nasales y oculares, y cuya prevalencia mundial se estima entre un 10 y un 25 %, aunque en algunas regiones puede alcanzar hasta el 40 % de la población. En España, algunos estudios han reportado que más de la mitad de los individuos evaluados presentaron diagnóstico de rinitis alérgica, lo cual indica una carga clínica considerable (Dávila y col., 2011). Los síntomas, que incluyen picor nasal, estornudos, rinorrea y congestión, pueden afectar de forma significativa la calidad de vida de los pacientes, alterando el sueño, el rendimiento académico y la productividad laboral (Valero Santiago y Ferrer, 2013).

La histamina es el principal mediador implicado en la fisiopatología de la rinitis alérgica y otras enfermedades alérgicas. Esta amina biogénica, liberada por mastocitos y basófilos en respuesta a alérgenos ambientales, se une a receptores H1 ubicados en la mucosa nasal y otros tejidos, lo cual desencadena una cascada inflamatoria característica (Lynde y col., 2020). Los antagonistas del receptor H1, llamados antihistamínicos, actúan como agonistas inversos estabilizando el receptor en su conformación inactiva, y constituyen el pilar terapéutico en esta patología (Sadaba y col., 2013).

La Bilastina es un antihistamínico de segunda generación con alta afinidad por el receptor H1 y escasa interacción con otros receptores, como los muscarínicos o serotoninérgicos. Su acción farmacológica, caracterizada por una rápida aparición del efecto y una duración prolongada ($t_{1/2} \sim 14$ h), la ha posicionado como una opción eficaz y segura en el tratamiento

de la rinoconjuntivitis alérgica y la urticaria (Lyseng-Williamson y Carter, 2012). A nivel molecular, se trata de un derivado de piperidina con una estructura única que no deriva de otros antihistamínicos existentes (Figura 1) (Ridolo y col., 2015). Además, presenta una biodisponibilidad cercana al 60 %, una alta unión a proteínas plasmáticas (84–90 %) y una distribución bicompartimental, lo cual influye en su comportamiento farmacocinético (Gafaroni y Telechea, 2017).

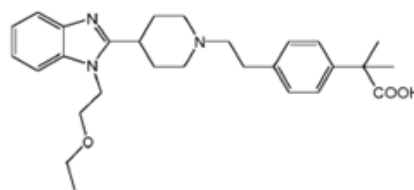


Figura 1. Estructura molecular de la bilastina

En los últimos años, la nanotecnología ha ofrecido soluciones innovadoras en el campo de la liberación de fármacos, permitiendo diseñar nanosistemas con propiedades que mejoran la retención en el sitio de acción, reducen la frecuencia de dosificación y aumentan la estabilidad del principio activo (Fadeel y col., 2012; Grenha, 2012). Estos sistemas nanométricos pueden atravesar barreras biológicas y facilitar una absorción más eficiente, incluso para moléculas poco biodisponibles por otras vías de administración (Mohanta y col., 2022).

Entre los polímeros más empleados para la obtención de sistemas nanométricos destaca el quitosano (CS), un polisacárido lineal derivado de la desacetilación de la quitina. Gracias a sus propiedades bioadhesivas, biodegradables y biocompatibles, el CS ha sido utilizado exitosamente en sistemas de liberación ocular, nasal y oral (Casettari

e Illum, 2014; Andueza, 2020; Prego y col., 2006). Su estructura química le confiere carga positiva en medio ácido, lo que permite su interacción electrostática con mucinas, prolongando el tiempo de residencia del fármaco en la mucosa (Sahoo y col., 2009). Además, puede ser modificado químicamente para incorporar grupos funcionales como la maleimida, lo que facilita la conjugación covalente con moléculas bioactivas (Goycoolea y col., 2009; Martínez-Jothar y col., 2018).

La vía nasal representa una alternativa atractiva para la administración de fármacos tanto de acción local como sistémica. Su gran vascularización, la ausencia de metabolismo de primer paso hepático y el área superficial disponible favorecen una absorción rápida y eficiente. Sin embargo, la presencia de una barrera mucosa dinámica y su constante renovación suponen un reto para el diseño de sistemas de liberación eficaces (Grenha, 2012; Goycoolea y col., 2014). Para mejorar la retención y biodisponibilidad en esta vía, se han desarrollado sistemas mucoadhesivos basados en CS, capaces de aumentar el tiempo de contacto con la mucosa y controlar la liberación del fármaco (Singh y col., 2017; Andueza y col., 2018).

El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar y caracterizar dos nanosistemas basados en CS para la administración nasal de bilastina. El primero se diseñó como nanocápsulas con núcleo oleoso donde se encapsuló el fármaco, mientras que el segundo se obtuvo mediante una conjugación química entre bilastina-N-succinimidil-S-acetilthioacetato (SATA) y CS funcionalizado con maleimida, que permita explorar su potencial como formas farmacéuticas nasales innovadoras para el tratamiento localizado de patologías alérgicas.

Materiales y Métodos

Materiales

Para llevar a cabo este estudio, se emplearon una serie de materiales provenientes de distintos proveedores especializados en productos farmacéuticos y químicos. Entre estos materiales se incluyen: la bilastina de laboratorios Normon, el quitosano HCl ($C_6H_{11}NO_4Cl$), Mw: 1526,5 g/mol, grado de desacetilación del 85 %, de Heppe Medical, Miglyol 812[®] Cremer Oleo, estearato de polietilenglicol 40 (PEG-st 40) de Croda Chemicals, el glicocolato de sodio (SGC) de los laboratorios Dextra. Ltd., clorhidrato de carbodiimida (EDC, $C_8H_{17}N_3$, Mw: 191,7 Da), N-hidroxisuccinimida (NHS, $C_4H_5NO_3$, Mw: 115,09 Da), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) y mucina tipo III de Sigma-Aldrich. El ácido 3-maleimidopropiónico al 95 % (m-PA, $C_{11}H_{10}N_2O_6$, Mw: 169,13 Da) y la hidroxilamina se obtuvieron de Alfa Aesar, El succinimidil éster de S-acetilthioacetato (SATA, Mw: 231,23 Da) y el tubo de diálisis SnakeSkin[™] 3,5K MWCO se obtuvieron de Fischer Scientific. N-hidroxisuccinimida (NHS), clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC).

CONJUGACIÓN DE QUITOSANO-MALEIMIDA

Se llevaron a cabo pruebas para evaluar tres proporciones diferentes de carga en la combinación de CS y maleimida, específicamente en las relaciones 10:2, 10:4 y 10:5, respectivamente. El ensayo se realizó haciendo reaccionar la maleimida del ácido propiónico (mPA) con 5 mg de CS, en presencia de NHS y EDC como agentes reticulantes, y se mantuvo bajo agitación

constante durante 24 horas, conforme al esquema descrito en la Tabla I. Los excesos de reactivos se eliminaron mediante diálisis utilizando una membrana con un peso de corte de 3,5 kDa. La unión química entre el CS y la maleimida se confirmó mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN) utilizando un equipo Bruker BRX-500, y se evaluó el rendimiento del proceso tras la liofilización.

Tabla I.

Componentes para la conjugación del CS-maleimida cargas expresadas en mg

Componente (mg)	CS: mPA 10:2	CS: mPA 10:4	CS: mPA 10:5
Quitosano	5	5	5
mPA	0,498	0,9967	1,245
EDC	0,188	0,377	0,4718
NHS	0,339	0,678	0,847

CONJUGACIÓN DE BILASTINA-SATA

Para llevar a cabo la conjugación de la bilastina, se agregaron 0,2 μ g de SATA (100 mg/mL) en tres intervalos separados por 5 minutos en 6 mL de solución de bilastina en PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (1 mg/mL) a un pH de 7,2-7,4 bajo condiciones de agitación. Posteriormente, la mezcla de reacción se dializó en agua destilada para eliminar el exceso de reactivo, utilizando una membrana de diálisis con un peso de corte de 3,5 kDa. Luego, se procedió con la reacción de desacetilación, donde la solución anterior se hizo reaccionar con una solución de desacetilación (compuesta por 1,74 g de hidroxilamina y 0,475 g de EDTA, con un pH ajustado a 7,2-7,4. Esta mezcla también se dializó en las mismas condiciones durante 2 horas.

El rendimiento del proceso se evaluó posteriormente tras la liofilización, y la asociación de la bilastina con SATA se cuantificó utilizando el analizador Elemental FISIONS modelo EA 1108 (Universidad de Santiago de Compostela).

PREPARACIÓN DE LAS NANOCÁPSULAS

Se llevó a cabo la preparación de nanocápsulas de CS y de quitosano-maleimida mediante la técnica de desplazamiento de solvente (Grenha, 2012). La fase orgánica consistió en una mezcla de 1,59 mg de PEG st-40, 0,5 mg de SGC, 6,25 μ L de Miglyol® (0,94 g/mL) y 191,2 μ L de etanol. Por otro lado, la fase acuosa se preparó con una solución de CS a 0,5 mg/mL para las nanocápsulas de CS, o con CS-maleimida en el caso de las cápsulas de quitosano-maleimida.

La fase orgánica se agregó a la fase acuosa bajo agitación constante. Luego, el solvente orgánico se eliminó mediante evaporación rotatoria (R-300 Buchi®, 150 rpm, 40 mbar, 5 min a 37°C). Posteriormente, las nanocápsulas se aislaron por centrifugación (Eppendorf 5430R®) a 20.000 g durante 30 minutos a 4°C, y finalmente se resuspendieron en agua milliQ una vez eliminado el sobrenadante, alcanzando una concentración final de 8 mg/mL.

La asociación de las nanocápsulas con el fármaco (Bilastina o Bilastina-SATA) se llevó a cabo de dos formas diferentes según el sistema. Para las nanocápsulas de CS-bilastina, se disolvió la bilastina en el etanol de la fase orgánica y se continuó el proceso como se describió anteriormente. En el caso de las nanocápsulas de CS-maleimida bilastina-SATA, primero se prepararon las

nanocápsulas vacías y luego se incorporó bilastina-SATA, manteniendo la mezcla en agitación constante durante 30 minutos.

Para evaluar su estabilidad, las nanocápsulas se liofilizaron durante 24 horas en presencia de trehalosa al 5 % (p/v) como crioprotector. Se congelaron a -80°C y luego se transfirieron al liofilizador (Labconco Corp., USA).

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS NANOCÁPSULAS

El diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersión (PDI) de las nanocápsulas se determinaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS). Los valores de potencial zeta se obtuvieron mediante anemometría láser Doppler utilizando un Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments). Antes de las mediciones, las nanocápsulas se diluyeron en agua MilliQ®. Cada análisis se realizó por triplicado a una temperatura de 25°C .

Además, se realizó un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) para medir el tamaño de partícula de las nanocápsulas después de la dilución en agua MilliQ®, utilizando un equipo NanoSight NS3000 (Malvern Analytic Ltd).

El rendimiento de los diferentes sistemas se determinó mediante la ecuación 1 para evaluar la viabilidad de conservación y estabilidad después de procesos de transformación, como la liofilización, y sus propiedades después de volver a suspender el producto final con el propósito de incorporarlo en posibles procesos de fabricación.

ECUACIÓN 1. CÁLCULO DEL RENDIMIENTO

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{mg NCs finales} - \text{mg NCs iniciales}}{\text{mg NCs iniciales}} \times 100$$

ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE ASOCIACIÓN

La eficiencia de asociación de la bilastina a las nanocápsulas de CS se evaluó tanto de manera directa como indirecta. En el primer caso, se llevó a cabo mediante la determinación del ingrediente activo farmacéutico utilizando cromatografía líquida de alta resolución (Acquity UPLC H-Class Plus system) equipado con una columna C18 (Waters symmetry 1,7 μm , 2,1x 50 mm). Para ello, la bilastina se extrajo de las nanocápsulas mediante la rotura de estas, utilizando una mezcla de metanol, acetonitrilo y ácido fosfórico como fase móvil. Posteriormente, se centrifugó a 20.000g durante 30 minutos a 4°C (centrifugadora Eppendorf 5430R®). Finalmente, la solución de bilastina se resuspendió. La cuantificación se realizó a una longitud de onda de 273 nm, con un flujo de 0,1 mL/min, durante 5 minutos.

En el segundo caso, se llevó a cabo la cuantificación indirecta de la bilastina no asociada en las nanocápsulas mediante la lectura por análisis UV en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 273 nm, midiendo la cantidad de bilastina no asociada en el sobrenadante de las nanocápsulas.

En ambos casos, una vez conocida la cantidad de fármaco incorporado, se calculó la eficiencia de encapsulación utilizando la ecuación 2.

ECUACIÓN 2. CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DE ASOCIACIÓN

$$\text{Eficiencia de encapsulación (EE\%)} = \frac{\text{mg asociados}}{\text{mg añadidos}} \times 100$$

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

La morfología superficial de las nanocápsulas fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) y de transmisión de barrido (STEM), utilizando un microscopio FESEM Ultra Plus de ZEISS. En cuanto a los estudios de STEM, las nanocápsulas de CS diluidas, se depositaron en rejillas de cobre con películas de carbón. Las rejillas se secaron al aire durante la noche en el desecador antes de proceder con el análisis.

ESTABILIDAD DE LOS NANOSISTEMAS

La estabilidad coloidal de las nanocápsulas conjugadas, tanto antes como después del procedimiento de liofilización, se investigó *in vitro* bajo tres condiciones distintas. En primer lugar, se evaluó su estabilidad en fluido nasal simulado (SNF), compuesto por 7,45 mg/mL de NaCl, 1,29 mg/mL de KCl y 0,32 mg/mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, con un pH ajustado a 6,5. En segundo lugar, se realizó el estudio tras la incorporación de mucina tipo III al 0,1% al SNF. En tercer lugar, se llevó a cabo un estudio en medio de cultivo celular (DMEM). En los tres casos, se analizó el cambio en el tamaño de partícula y en el índice de polidispersión (PDI) durante un período de 24 horas. Además, se evaluó la estabilidad de las nanocápsulas después de 30 días de almacenamiento en suspensión a 4°C. Para todos los experimentos, se utilizaron celdas del equipo ZetaSizer, que fueron

incubadas a 37°C con agitación constante. Se realizaron mediciones del tamaño y PDI en diferentes puntos de tiempo (0, 30 minutos y a 1, 2, 5 y 24 horas) mediante dispersión de luz dinámica (DLS), tal como se describe en la sección correspondiente de "Caracterización Físicoquímica de Nanocápsulas".

ENSAYO DE LIBERACIÓN

Los estudios de liberación *in vitro* de bilastina se llevaron a cabo mediante la incubación de las nanocápsulas con bilastina, así como del sistema CS-maleimida bilastina-SATA, en un volumen final de 10 mL de fluido nasal simulado (SNF) en una incubadora con agitación (Biosan Termo-Shaker TS-100C) a 37°C. En diferentes intervalos de tiempo (30 minutos y a 1, 2, -5 y 24 horas), se tomó 1 mL de muestra y se reemplazó con medio SNF fresco para mantener las condiciones. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 g y temperatura ambiente, y el sobrenadante obtenido se analizó mediante espectrofotometría UV a 273 nm.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) y media \pm error estándar de la media (SEM) para los estudios de células. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software Microsoft Excel® y GraphPad Prism v.6.01 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Este enfoque estadístico permitió una evaluación rigurosa y detallada de los datos recopilados, proporcionando una

comprensión clara de las tendencias y variaciones observadas en los resultados experimentales.

Resultados y Discusión

CONJUGACIÓN DE QUITOSANO-MALEIMIDA

El CS es un biomaterial polimérico altamente versátil que contiene grupos amino (Sahoo y col., 2009), lo que amplía las posibilidades de su implementación mediante diversas formas de conjugación. La evidencia ha demostrado la factibilidad de su unión con grupos maleimida, los cuales contienen grupos tiol que permiten un entrecruzamiento mediante una adición de tipo Michael, facilitando así la bioconjugación del CS con diversas biomoléculas (Martínez-Jothar y col., 2018). Inicialmente, se evaluaron varias proporciones de carga de CS: maleimida (10:5, 10:4 y 10:2), y se obtuvieron rendimientos muy diferentes en los tres casos evaluados. Se concluyó que el empleo de la proporción 10:2 resultaba la conjugación óptima, ya que no se observaron diferencias significativas con las otras dos proporciones evaluadas, los cuales emplearon una mayor cantidad de reactivos. Además, los valores de rendimiento fueron mayores al emplear la proporción antes mencionada (10:2) (Tabla II).

Tabla II.
Rendimiento post liofilización
de las 3 cargas utilizados

Ratio	Rendimiento (%)
10:2	54,5
10:4	27,3
10:5	39,7

Para confirmar la conjugación satisfactoria, los materiales se analizaron mediante resonancia magnética nuclear (RMN). El espectro típico en la Figura 2a, presentó una señal en 4,9 ppm, correspondiente al protón anomérico, el cambio químico del protón del anillo como señales superpuestas en 3,6–4,0 ppm, lo que confirmó la presencia del resto de glucosamina, mientras que el protón del anillo del grupo amino adyacente (H1) apareció en 3,2 ppm. También se observa como el grupo metilo de la parte no desacetilada del polisacárido se expresó en 2,1 ppm. En la Figura 2b, se observaron señales similares a las nativas señales del CS y la presencia de nuevos picos a 3,5 y 2,7 ppm, respectivamente, correspondiente a los protones típicos del resto maleimida, como se ve en la Figura 2c, demostrando la modificación química del quitosano y su conjugación con el grupo maleimida (Kumirska y col., 2010).

CONJUGACIÓN DE BILASTINA-SATA

Se procedió a la conjugación de la bilastina con el propósito de lograr su unión covalente a un nanotransportador basado en CS-maleimida, y los resultados se detallan en la Tabla III. La determinación se efectuó mediante análisis elemental, revelando que la muestra correspondiente a bilastina contiene grupos de nitrógeno, carbono e hidrógeno. Por otro lado, en la muestra de bilastina-SATA se observó un incremento en la cantidad de carbono y la aparición de azufre, contenido en la molécula del reactivo SATA, el cual no estaba presente en la muestra inicial.

Este proceso de conjugación confirma exitosamente la unión de la bilastina al nanotransportador a través del reactivo

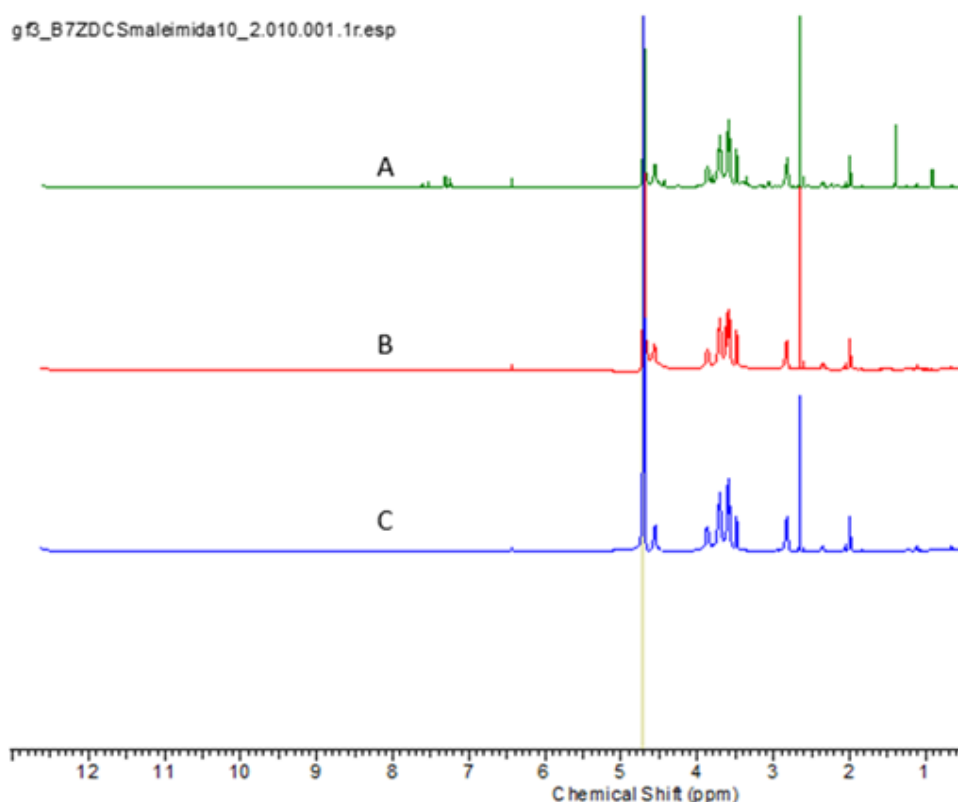


Figura 2. Espectros ^1H -NMR (400 MHz, D_2O) y picos de integración de quitosano y maleimida expresados en partes por millón (ppm), usando el cambio químico de las resonancias del solvente residual como referencia (D_2O : $\delta = 4,80$ ppm). A) quitosano B) quitosano-male

Tabla III.
Análisis elemental de las muestras de bilastina y bilastina-SATA

Nombre	Bilastina		Bilastina-SATA	
	% elemento	Tiempo de Retención	% elemento	Tiempo de Retención
Nitrogeno	7,665	0,817	6,064	0,817
Carbono	70,723	1,217	31,183	1,258
Hidrógeno	8,691	3,067	4,744	3,133
Azufre	-	-	0,612	7,533

SATA, lo que sugiere la preparación eficaz de un sistema de transporte de fármacos específico y funcionalizado.

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS NANOCÁPSULAS

Las nanocápsulas se prepararon utilizando la técnica de desplazamiento

de solvente y su formación se debe principalmente a las interacciones iónicas entre las cadenas de polímero catiónico y el núcleo oleoso cargado negativamente. Se evaluaron los parámetros críticos que afectan el comportamiento de un nanosistema, como su tamaño, la carga de superficie y el índice de polidispersión. En el desarrollo de los nanosistemas se emplearon surfactantes no iónicos como el PEG-estearato 40, que ayuda a prevenir la agregación de partículas durante la formación del sistema (Singh y col., 2017) y SQC, co-surfactante que proporciona carga negativa y mayor estabilidad al núcleo oleoso (Real y col., 2018). Como se puede apreciar en la Tabla IV, el tamaño de partícula estuvo en un rango de 190-230 nm para las nanocápsulas de CS-bilastina y de

Tabla IV.

Caracterización de los nanosistemas por NTA, indicando tamaño (nm), desviación estándar (SD) y concentración (partículas/mL)

	TAMAÑO (nm)	CONCENTRACIÓN (partículas/mL)
Quitosano blancas Ncs	150 ± 48	1.91e+11
Quitosano-Bilastina Ncs	162 ± 41	1.60e+11
Quitosano-maleimida blancas Ncs	182 ± 61	1.44e+11
Quitosano-maleimida-bilastina-SATA Ncs	109 ± 41	2.60e+10

290-320nm para las nanocápsulas de CS-maleimida-bilastina-SATA y se corroboró la presencia de un recubrimiento de quitosano por presentar cargas superficiales positivas debido a los grupos amina en la estructura del CS. Los sistemas presentaron un aumento de tamaño de partícula al llevarse a cabo la asociación del fármaco, lo que es indicativo de la unión exitosa del sistema al fármaco por ambas técnicas.

El análisis por NTA demostró el tamaño de partícula promedio de los sistemas, como se ilustra en la Figura 3. Se observó una leve disminución en los tamaños de partícula (Tabla IV) en comparación con los resultados obtenidos mediante DLS. Esto se debe a diferencias en las técnicas de medición, ya que los datos del ZetaSizer se derivan del movimiento browniano de las partículas en suspensión, mientras que en el NTA se utilizan características de dispersión de luz, lo que puede generar lecturas ligeramente mayores.

ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE ASOCIACIÓN

En ambos casos se determinó de manera directa la cantidad de bilastina libre, obteniéndose una asociación de alrededor del 10%, similar para ambas formulaciones. En el caso de la determinación indirecta, determinada por UV-VIS se observó que la cantidad asociada sería mucho menor que lo evaluado de forma directa, sin embargo, se mantiene la tendencia de que el sistema de CS-bilastina tiene una mayor asociación tras la rotura del nanosistema. Hay varios factores a considerar para justificar

la diferencia en ambos métodos, como lo es el hecho de que la bilastina haya podido degradarse en el sobrenadante o bien que la mezcla no se haya mantenido homogénea en el tiempo, complicando la cuantificación real del fármaco no encapsulado. Esta asociación se determinó mediante UPLC (Tabla V).

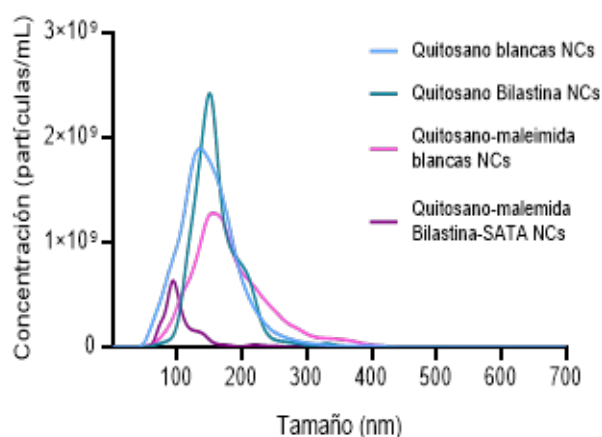


Figura 3. Distribución del tamaño de partícula por análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) de nanopartículas de quitosano

Tabla V.

Caracterización fisicoquímica de las nanocápsulas de quitosano blancas, de quitosano asociadas con Bilastina, de quitosano-maleimida blancas y de quitosano-maleimida asociadas con Bilastina-SATA indicando el tamaño (nm), el índice de polidispersión (PDI), el potencial zeta (mV) y el % de asociación (media \pm SD; n = 3)

Nombre	Tamaño (nm)	PDI	Carga (mV)	% Asociación UV-VIS	% Asociación UPLC
Quitosano blancas NCs	207 \pm 21	0,26	11 \pm 0,0	-	
Quitosano Bilastina NCs	237 \pm 21	0,22	14 \pm 0,1	26 \pm 9	81,69 \pm 5,35
Quitosano-maleimida blancas NCs	270 \pm 32	0,27	9 \pm 0,2	-	
Quitosano-maleimida Bilastina-SATA NCs	290 \pm 32	0,27	9 \pm 0,2	12 \pm 9	16,60 \pm 16,20

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Se emplearon diversas técnicas de microscopía para caracterizar los nanosistemas. Las imágenes obtenidas mediante microscopía FESEM (Figura 4A y 4B) y STEM (Figura 4C y 4D) revelaron la presencia de una población de partículas con morfología redondeada, lo que confirma la estructura esférica de las mismas. Además, se observó una distribución homogénea de estas partículas, lo cual corrobora los hallazgos obtenidos en los estudios de NTA previamente realizados.

Estas observaciones morfológicas respaldan la uniformidad y la forma esférica de los nanosistemas, aspectos cruciales para su aplicación en diversas áreas, incluyendo la nanomedicina y la entrega de fármacos.

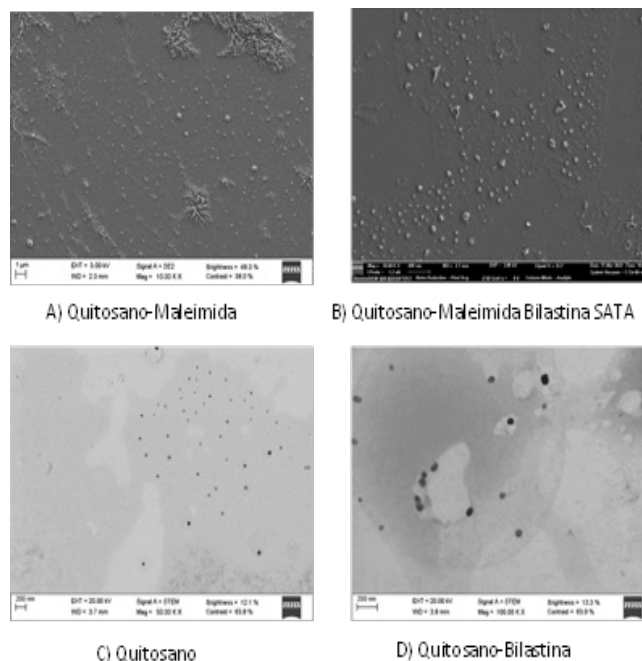


Figura 4. Imágenes de SEM y TEM de los nanosistemas elaborados (A) Nanocápsulas de quitosano-maleimida blancas, (B) Nanopartículas de Quitosano-maleimida-Bilastina-SATA (C) Nanopartículas de quitosano (D) Nanopartículas de quitosano-Bilastina-Sata

ESTABILIDAD DE LOS NANOSISTEMAS

En el diseño de sistemas de liberación por vía mucosa, la estabilidad de las formulaciones es de suma importancia, ya que refleja su comportamiento *in vitro* en los medios biológicos correspondientes.

Para evaluar la estabilidad de las nanocápsulas, las formulaciones fueron sometidas a liofilización en presencia de trehalosa al 5%, seguido de su redispersión en agua ultrapura. Como se muestra en la Figura 5, se observó un ligero cambio en el diámetro de las partículas. El rendimiento de producción, calculado por la diferencia entre el peso inicial y el peso tras el proceso de liofilización, fue del 85% para las nanocápsulas de CS vacías, 81% para las nanocápsulas de CS-bilastina, 89% para las nanocápsulas de CS-maleimida vacías y del 26% para las nanocápsulas de CS-maleimida Bilastina-SATA. Todas las formulaciones conservaron su carga positiva.

Asimismo, se evaluaron los mismos parámetros después de un mes de almacenamiento en suspensión, y se observó

que los sistemas mantuvieron su integridad durante este período sin comprometer su estabilidad como suspensión ni la integridad del sistema en sí.

Estos hallazgos indican que las nanocápsulas de CS liofilizadas pueden conservar su integridad en forma sólida tras la liofilización, sin comprometer su estabilidad como suspensión ni la integridad del sistema, lo que sugiere su potencial para aplicaciones en liberación de fármacos por vía mucosa.

Asimismo, se realizó una evaluación de la estabilidad del sistema en diversos momentos y en tres medios distintos, como se describió anteriormente. Como se ilustra en la Figura 6, se observó un aumento significativo en el tamaño de partícula al complementar el medio SNF con mucina tipo III. Este aumento podría atribuirse a la disminución del movimiento browniano de las partículas debido a la mayor viscosidad del medio en presencia de mucina. Esta interacción electrostática entre las nanocápsulas de CS cargadas positivamente y las moléculas de mucina cargadas negativamente conduce

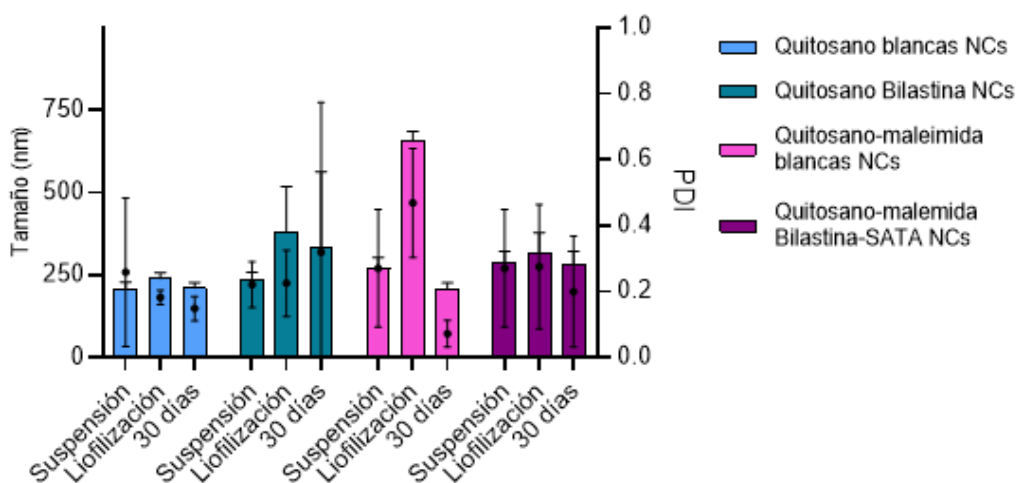


Figura 5. Estabilidad de nanocápsulas de quitosano (CS) tras liofilización. Las barras representan el tamaño (nm) y los puntos representan el índice de polidispersión (PDI) (media ± SD; n = 3)

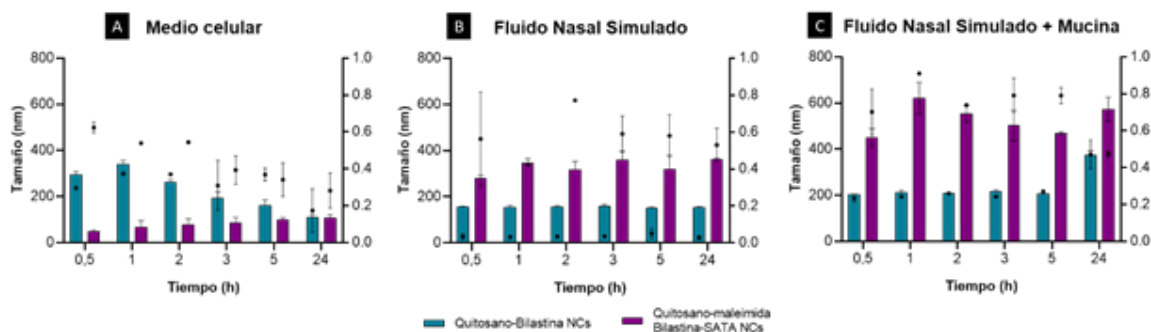


Figura 6. Estabilidad de nanopartículas de quitosano (CS), Quitosano-Bilastina, Quitosano-Maleimida y Quitosano-Maleimida-Bilastina-SATA en (A) medio celular DMEM suplementado hasta 24h, (B) FSN y (C) FNS+mucina. Las barras representan el tamaño (nm) y los puntos representan el índice de polidispersión (PDI) (media \pm SD; n = 2)

a la formación de complejos de proteína-polisacárido. Además, este incremento refleja la capacidad mucoadhesiva del polímero quitosano, lo que podría prolongar el tiempo de contacto del producto con el sitio de acción mientras se libera el contenido de los sistemas (Menchicchi y col., 2014; Andueza y col., 2018; Vieira y Andueza, 2018).

En el caso del medio celular, para el sistema de CS-bilastina se observó inicialmente un aumento en el tamaño de partícula, indicativo de una ligera aglomeración, que disminuyó con el tiempo. Para el sistema de CS-maleimida-bilastina-SATA, se observó inicialmente una gran disminución en el tamaño de partícula, seguida de un aumento posterior. Este fenómeno podría sugerir una ruptura de cadenas, lo que podría facilitar la liberación de la bilastina del transportador.

ESTUDIO DE LIBERACIÓN

El estudio de liberación se llevó a cabo utilizando fluido nasal simulado (SNF, pH = 6,5), mediante la cuantificación del fármaco liberado de las distintas formulaciones en diferentes intervalos de tiempo (30 min, 1

h, 2 h, 3 h, 5 h y 24 h). Como observa en la Figura 7, la liberación del fármaco de las nanocápsulas de CS que incorporaron bilastina en su núcleo oleoso mostró una rápida liberación inicial durante las primeras horas, seguida de una liberación gradual a lo largo de las 24 horas del estudio, alcanzando un porcentaje cercano al 60%. Esta liberación se mantuvo relativamente estable después de las 5 horas del ensayo. Por otro lado, en el caso de las nanocápsulas de CS-maleimida, en las cuales el fármaco se asoció covalentemente al CS, se observó una liberación lineal a lo largo de todo el proceso, con un incremento sostenido en las últimas horas. Tras 24 horas, se obtuvo

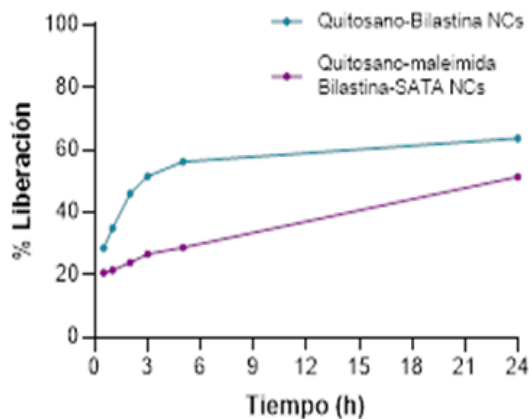


Figura 7. Perfil de liberación acumulada in vitro de bilastina y bilastina-SATA de sus respectivos sistemas (media \pm S.D.; n = 3). CS: quitosano, NC: nanocápsulas

valores de liberación del fármaco superiores al 40%. Estos resultados sugieren que estas formulaciones podrían ser prometedoras para el diseño de medicamentos con perfiles de liberación específicos o mixtos, lo que podría contribuir a mejorar la eficacia terapéutica.

Conclusiones

El diseño de los nanosistemas basados en quitosano para la administración de fármacos antihistamínicos ha resultado en una propuesta prometedora para el tratamiento de la rinoconjuntivitis alérgica. En este estudio, se caracterizó exhaustivamente el sistema nanotransportador, confirmando sus propiedades mucoadhesivas, lo que sugiere su capacidad para mejorar la eficacia terapéutica al prolongar el tiempo de residencia en la mucosa nasal.

La integración exitosa de la bilastina en los nanosistemas se logró mediante conjugaciones químicas eficientes entre el quitosano y el ingrediente activo farmacéutico, asegurando así la estabilidad y la biodisponibilidad del fármaco. La preparación de los nanosistemas se llevó a cabo utilizando la técnica adecuada, garantizando la uniformidad y la reproducibilidad del proceso de fabricación para obtener un producto final de alta calidad y eficacia.

Los estudios de asociación demostraron una carga eficiente de bilastina en los nanosistemas, lo que indica una capacidad de carga significativa y una potencial mejora en la biodisponibilidad del fármaco. Además, la evaluación de la estabilidad de los nanosistemas reveló su capacidad para conservar sus propiedades físicas y

químicas durante un período prolongado, lo que respalda su idoneidad para aplicaciones terapéuticas.

Los estudios de liberación *in vitro* demostraron una liberación controlada y sostenida de la bilastina desde los nanosistemas, lo que sugiere su potencial aplicación para el tratamiento de la rinoconjuntivitis alérgica mediante la vía nasal.

En conjunto, estos hallazgos respaldan la viabilidad y la efectividad de los nanosistemas basados en quitosano como una estrategia prometedora para la administración de fármacos antihistamínicos, ofreciendo una alternativa eficaz y segura para el tratamiento de esta enfermedad.

Referencias Bibliográficas

- Andueza I. 2020. Nanotecnología: innovación farmacéutica en sistemas de liberación oftálmicos. *Rev Fac Farm UCV* 83 (1-2): 49-56.
- Andueza I, Calo K, Vieira M. 2018. Preparación y evaluación *in vitro* de las propiedades mucoadhesivas para dispersiones de Escleroglucano/Dextrano y Escleroglucano/Quitosano. *Rev Fac Farm UCV* 81 (1-2): 90-98.
- Casettari L, Illum L. 2014. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *J Controlled Release* 190: 189-200.
- Dávila I, Sastre J, Mullol J, Montoro J, Jáuregui I, Ferrer M. 2011. Effect of bilastine upon nasal obstruction. *J Investig Allergol Clin Immunol* 21: 1-8.
- Fadeel B, Farcal L, Hardy B, Vázquez-Campos S, Hristozov D, Marcomini A, Lynch I. 2012. Advanced tools for the safety assessment of nanomaterials. *Nature Nanotechnol* 7(9): 511-512.
- Gafaroni DF, Telechea H. 2017. Bilastina: ¿Posible tercera generación de antihistamínicos? Universidad de la República, Uruguay. <http://hdl.handle.net/20.500.12008/11046>.
- Goycoolea FM, Remuñán-López C, Alonso MJ. 2014. Nanopartículas a base de polisacáridos:

- Quitosano. En *Nanotecnología en la Ciencia de los Alimentos* (pp. 83–95). Zaragoza: Ed. Acribia. ISBN 978-84-936890-8-7.
- Grenha A. 2012. Chitosan nanoparticles: A survey of preparation methods. *J Drug Target* 20: 291-300.
- Lynde CW, Andriessen A, Vender RJ. 2020. Antihistamines and topical therapy for allergic rhinitis: Pharmacologic rationale and clinical evidence. *Allergy Asthma Clin Immunol* 16 (1): 100.
- Lyseng-Williamson KA, Carter NJ. 2012. Bilastine: a guide to its use in the treatment of symptomatic allergic rhinoconjunctivitis and urticaria. *Drugs Ther Perspect* 28 (4): 120-126.
- Martínez-Jothar L, Doukeridou S, Schiffelers RM, Sastre Torano J, Oliveira S, van Nostrum CF, Hennink WE. 2018. Insights into maleimide-thiol conjugation chemistry: Conditions for efficient surface functionalization of nanoparticles for receptor targeting. *J Control Release* 282:101-109.
- Menchicchi B, Fuenzalida JP, Bobbili KB, Hensel A, Swamy MJ, Goycoolea FM. 2014. Structure of chitosan determines its interactions with mucin. *Biomacromolecules* 15 (10): 3550-3558.
- Mohanta YK, Biswas K, Jena SK, Hashem A, Abd_Allah EF. 2022. Nanotechnology in pharmaceutical drug delivery: A comprehensive review. *J Drug Deliv Sci Technol* 70: 103200.
- Prego C, Torres D, Fernandez-Megía E, Novoa-Carballal R, Quiñoá E, Alonso MJ. 2006. Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery: Effect of chitosan pegylation degree. *J Controlled Release* 111 (3): 299-308.
- Real D, Hoffmann S, Leonardi D, Salomon C, Goycoolea FM. 2018. Chitosan-based nanodelivery systems applied to the development of novel triclabendazole formulations. *PLoS One* 13 (12): e0205245.
- Ridolo E, Montagni M, Bonzano L, Incorvaia C, Canonica GW. 2015. Bilastine: New insight into antihistamine treatment. *Clin Mol Allergy* 13: 1-6.
- Sadaba B, Azanza JR, Gomez-Guiu A, Rodil R. 2013. Critical appraisal of bilastine for the treatment of allergic rhinoconjunctivitis and urticaria. *Ther Clin Risk Manag* 9: 197-205.
- Sahoo D, Sahoo S, Mohanty P, Sasmal S, Nayak PL. 2009. Chitosan: A new versatile bio-polymer for various applications. *Designed Monomers & Polymers* 12 (5): 377-404.
- Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan F, Chaurasia, M, Jain NK, Chourasia MK. 2017. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Controlled Release* 252: 28-49.
- Valero Santiago A, Ferrer MD. 2013. Bilastina: una nueva perspectiva en alergia. Up-dosing en urticaria: aspectos de eficacia y seguridad. *Rev Esp Alergol Inmunol Clín* 28 (2): 91-99.
- Vieira M, Andueza I. 2018. Comparación de la adhesividad por diferentes ensayos *in vitro* para dispersiones poliméricas de uso oftálmico. *Rev Fac Farm UCV* 81 (1-2): 13-24.