

DISEÑO DE NANOMEDICINAS PARA EL TRANSPORTE Y LIBERACIÓN DE FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES

Romero Argote Francisco Javier (1), Vázquez Ramírez Cruz Eduardo (2), Delgado García José Jorge (3), Quintero Ortega Iraís Amaranta (3), Rosillo de la Torre Argelia (3)

1 [Ingeniería Química Sustentable, Universidad de Guanajuato] | [fj.romeroargote@ugto.mx]

2 [Ingeniería Biomédica, Universidad de Guanajuato] | [ce.vazquezramirez@ugto.mx]

3 [Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [jorgedel@fisica.ugto.mx] | [iraisq@ugto.mx] | [rosillo.a@ugto.mx]

Resumen

Introducción: La nanomedicina es la aplicación de la nanotecnología al cuidado de la salud. El diseño de nanomateriales aplicado al transporte y liberación de fármacos en sitios específicos es una de las aplicaciones más sobresalientes de la nanomedicina debido a que los usos de estos sistemas presentan múltiples ventajas. El presente trabajo se centró en el diseño de un nanotransportador poroso a base de sílice capaz de liberar fármacos anticonvulsivos como fenitoína (PHT). **Materiales y métodos:** Las nanopartículas (NPs) fueron sintetizadas mediante el método Stöber, cargadas con el fármaco mediante adsorción y caracterizadas fisicoquímicamente mediante microscopía y FTIR. La liberación *in vitro* fue realizada en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa), para simular condiciones fisiológicas. **Resultados y conclusión:** Se obtuvieron nanopartículas con un diámetro promedio de 403.77 ± 157.15 nm que presentan alto índice de polidispersidad. Los datos obtenidos en la liberación *in vitro* indican que las nanopartículas sintetizadas presentan un comportamiento representativo de un sistema de liberación sostenida de fármacos por periodos de tiempo largos, además de gran capacidad de carga de PHT, evidenciada en la cuantificación de la carga total de la misma en los nanotransportadores (36.213 ± 0.2248 mg de PHT / 90 mg de NPs).

Abstract

Introduction: Nanomedicine is the application of nanotechnology to health care. The design of nanomaterials applied to the transport and drug release in specific areas is one of the most outstanding applications of the nanomedicine due to the uses of these systems have multiple advantages. The present work was focused in the design of a silica-based porous nanocarriers capable of release anticonvulsant drugs such as phenytoin (PHT). **Materials & methods:** Nanoparticles (NPs) were synthesized by Stöber method, loaded via adsorption and characterized physicochemically by microscopy and FTIR. *In vitro* release was performed in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) to simulate physiological conditions. **Results & conclusion:** Nanoparticles with average diameter of 403.77 ± 157.15 nm with a high polydispersity index were obtained. The data obtained for *in vitro* release indicate that synthesized NPs have a high capacity for drug release in long periods, in addition to high PHT loading capacity (36.213 ± 0.2248 mg de PHT / 90 mg de NPs).

Palabras Clave

Farmacorresistencia, Epilepsia, Nanopartículas de sílice, Sol-gel, Barrera Hematoencefálica.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los descubrimientos de investigación realizados en el diseño de fármacos han avanzado considerablemente en el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas de fármacos, así como en los mecanismos de captación celular que conducen a numerosas estrategias terapéuticas eficaces. Sin embargo, en algunos casos, los métodos de tratamiento actuales se basan principalmente en el uso de fármacos citotóxicos convencionales que tienen efectos secundarios adversos y/o sólo eficacia limitada [1]. El diseño de nuevos sistemas para la liberación de fármacos es una alternativa para superar este obstáculo evitando así la citotoxicidad y/o mejorando el transporte de fármaco al área de interés promoviendo así una mayor eficacia contra afecciones en específico.

Método sol-gel o Stöber

Por décadas este método ha sido ampliamente usado en la producción de sílice, vidrios y materiales cerámicos debido a que forma productos puros y homogéneos además de no requiere condiciones extremas de síntesis. [2]

El proceso involucra la hidrólisis y la condensación de alcóxidos metálicos como tetraetil ortosilicato (TEOS, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) o sales inorgánicas como silicato de sodio (Na_2SiO_3) en presencia de un ácido (HCl) o base (NH_3) como catalizador. Las reacciones que se llevan a cabo en el proceso de sol-gel utilizando TEOS para la formación de nanopartículas de sílice se muestran en la Figura 1. La hidrólisis del TEOS forma grupos silanol y, a su vez, la polimerización de estos grupos o la de grupos silanol con grupos etoxi, crean enlaces siloxanos (Si-O-Si) que forman la estructura de las nanopartículas. [2] La síntesis Stöber permite obtener NPs monodispersas y esféricas en un intervalo de 5–2000 nm de diámetro utilizando alcoholes de bajo peso molecular. [3]

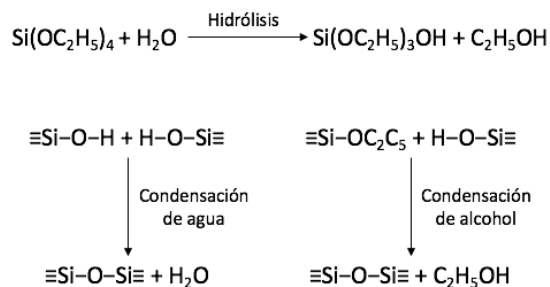


FIGURA 1: Reacciones generales para la formación de nanopartículas de sílice por método de Stöber usando TEOS.

La justificación del proyecto radica en el gran potencial de este tipo de nanomateriales como herramientas potenciales para el transporte y liberación de fármacos al sistema nervioso central en condiciones patológicas especiales como la farmacorresistencia, pero que al momento no se han evaluado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

TEOS (Sigma-Aldrich), Etanol (Sigma-Aldrich), Fenitoína (Sigma-Aldrich), Hidróxido de Amonio (Sigma), Agua destilada.

Síntesis de nanopartículas de sílice cargadas con fenitoína

• Síntesis de NPs de sílice

Las NPs de sílice fueron sintetizadas mediante el método Stöber también conocido como sol-gel. El procedimiento fue realizado modificando la versión de la técnica reportada en 2009 por Jafarzadeh [4] cambiando la sonicación por agitación mecánica constante a 800 rpm, la cual se mantuvo durante todo el proceso de síntesis (Figura 2). Se preparó una mezcla de TEOS (0.58 M) en etanol. Posteriormente, se inyectó 1 ml de H_2O a una velocidad de alimentación de $0.2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, seguido de la adición de 2 ml de NH_4OH (30%) a una velocidad de $0.03 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Después, la mezcla se dejó en agitación por 1 h más para llevar a cabo la gelación. Posteriormente, las nanopartículas se centrifugaron y lavaron con una mezcla etanol y

agua destilada 1:1 a 6000 rpm tres veces. Finalmente, las NPs se secaron en un horno durante 24 h a 70°C.

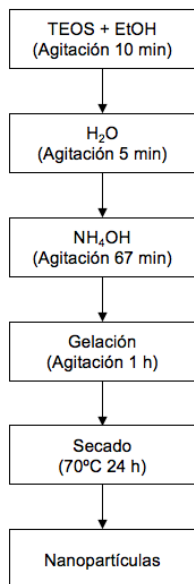


FIGURA 2: Diagrama de flujo para la síntesis de nanopartículas de sílice.

Carga de PHT en NPs de sílice

El fármaco fue cargado en las nanopartículas mediante adsorción. Primero, la fenitoína fue solubilizada en agua (pH 11) a una concentración de 2 mg·ml⁻¹. Luego, 90 mg de NPs se añadieron a la solución y ésta fue agitada a 1000 rpm durante 1 h. Finalmente, la muestra se decantó y las NPs se secaron a 50°C durante 12h.

Caracterización de NPs de sílice

- *Caracterización fisicoquímica*

Las nanopartículas sin cargar fueron analizadas utilizando las metodologías que se describen a continuación. El diámetro de las NPs fue analizado realizando microscopías con el estereomicroscopio de un equipo de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, alpha300 RA). Previo al análisis, cada muestra (separada) se dispersó en etanol y se agitó durante 10 s usando un vortex. Posteriormente, una gota se depositó sobre una placa de silicio y las muestras se observaron al

microscopio utilizando los objetivos de 20X, 50X y 100X y se obtuvieron imágenes con una resolución de 10 μm. El análisis estructural fue realizado mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).

- *Cuantificación de fármaco cargado*

Los sobrenadantes decantados en el proceso de carga de la PHT en las NPs fueron analizados mediante espectroscopia UV-Visible para determinar la cantidad de PHT no adsorbida. Lo anterior, con base en una curva de calibración realizada previamente.

- *Estimación de la liberación in vitro de fenitoína*

El ensayo de la liberación *in vitro* de PHT proveniente de las NPs de sílice se realizó siguiendo la metodología reportada por Rosillo y col. [5] con una modificación (la cantidad de NPs en la solución). Se colocaron 50 mg de NPs cargadas en 1 ml de líquido ceforraquídeo artificial (LCRa) el cual fue utilizado como medio de liberación del fármaco, en un baño termocirculador a 37°C. Las muestras fueron tomadas continuamente (cada 10 minutos durante la primera hora y cada hora hasta 6 horas de liberación). En cada toma de muestra se decantó la muestra en su totalidad y se añadió un volumen igual de solución nueva de LCRa. Cada muestra fue analizada mediante espectroscopia UV-Visible para determinar la cantidad de fármaco liberado en cada intervalo de tiempo, con base en una curva de calibración donde el blanco fue LCRa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de NPs de sílice

- *Distribución de diámetro en NPs sintetizadas*

La Figura 3 muestra una micrografía representativa de las NPs de sílice. Ésta fue analizada utilizando el software ImageJ para determinar la distribución de diámetro de las nanopartículas (Figura 4). Este análisis se realizó descartando las partículas que no fuesen esféricas.

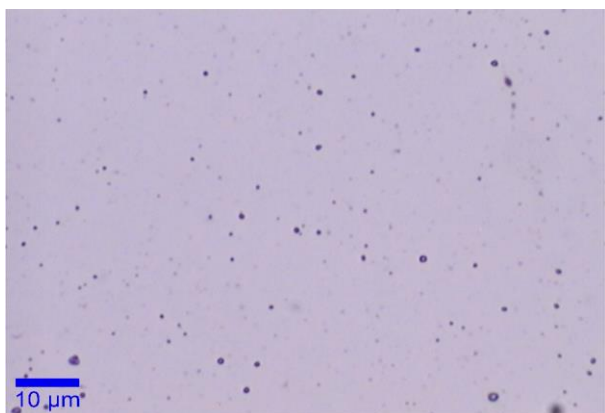


FIGURA 3: Micrografía de nanopartículas de sílice (50X).

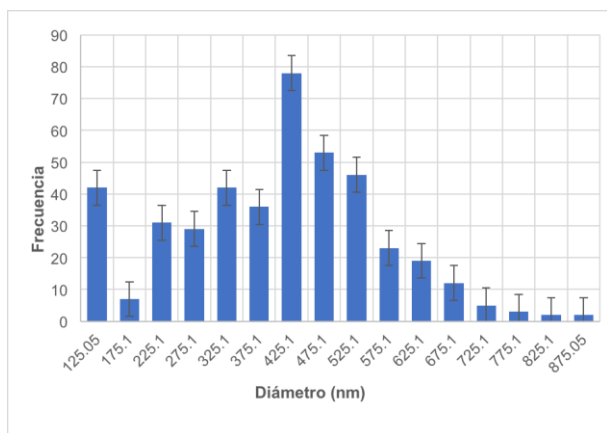


FIGURA 4: Distribución de tamaño de diámetro de las NPs.

La distribución de tamaño de partícula (Figura 4) muestra NPs de gran tamaño (403.7 nm en promedio). Lo anterior, contrasta con lo reportado por Jafarzadeh y col. (2009), quienes reportaron diámetros de NPs de entre 10.5 y 19.8 nm. Sin embargo, la metodología presentada por el autor no se siguió por completo, y se modificaron y evitaron varios pasos del proceso de síntesis, lo cual puede ser un factor que influya en el gran tamaño de NPS.

- *Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)*

La Figura 5 muestra los espectros del fármaco, de las NPs blancas y las NPs cargadas con PHT. El espectro de las NPs cargadas presenta dos bandas de adsorción a 1780 y 1740 cm^{-1} . [5], las cuales son bandas características de la PHT. Con lo anterior, se puede constatar la presencia de fármaco anticonvulsivante en las NPs cargadas, lo

que comprueba que las NPs adsorbieron PHT en el proceso de carga.

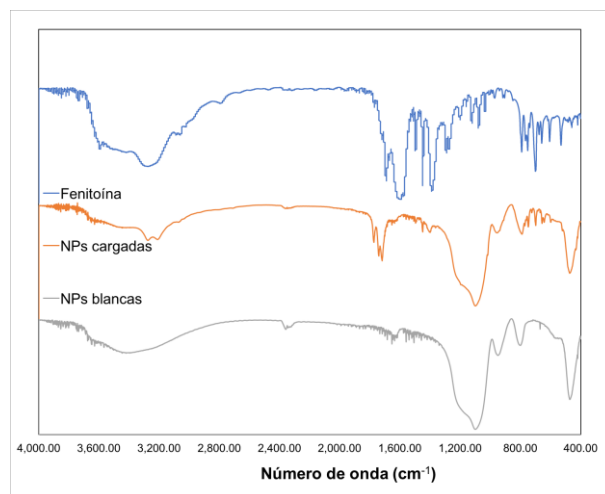


FIGURA 5: Espectros obtenidos para NPs blancas, NPs cargadas y PHT.

- *Cuantificación de fármaco cargado*

La curva de calibración fue realizada con PHT solubilizada en agua (pH 11) usando concentraciones de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obteniendo así la Figura 6.

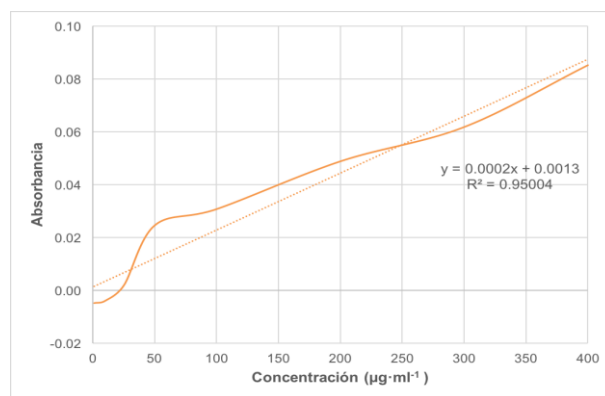


FIGURA 6: Curva de calibración con NaOH como blanco para cuantificar PHT cargado.

De acuerdo a los datos obtenidos de las soluciones decantadas, y utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración (Figura 6), se logró cargar 36.213 ± 0.2248 mg de PHT por cada 90 mg de NPs.

- Estimación de la liberación in vitro de fenitoína

La Figura 7, muestra la curva de calibración usada para la cuantificación de la PHT liberada en cada intervalo de tiempo mientras que la 8 se muestra la liberación de PHT de las NPs de sílice. En la cinética se pueden observar dos fases de liberación: 1) Durante la primera hora de la liberación se presenta una liberación súbita del fármaco en un periodo de tiempo corto (efecto estallido), lo anterior, debido a la rápida desorción de la PHT adsorbida de manera superficial. 2) Posteriormente, se muestra una cinética de liberación sostenida del fármaco, liberando concentraciones “constantes” por un periodo de tiempo más prolongado.

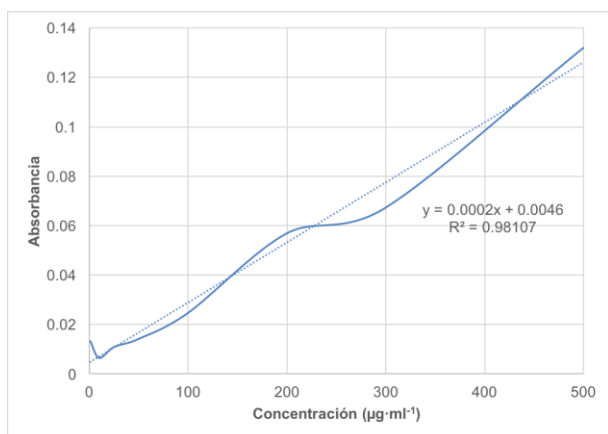


FIGURA 7: Curva de calibración con LCRa como blanco para cuantificar PHT liberado.

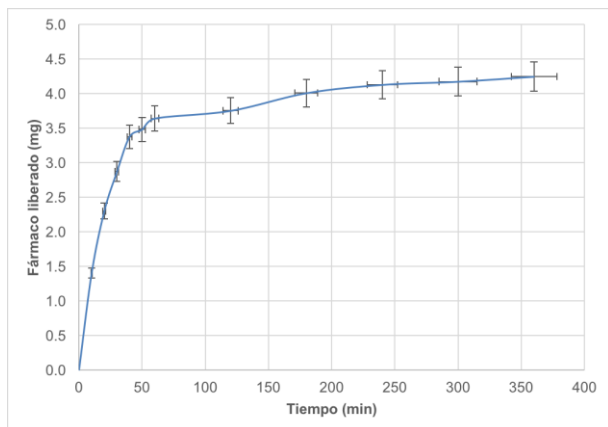


FIGURA 8: Liberación de PHT durante 6 horas.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron NPs de sílice de un tamaño significativamente diferente a lo esperado. Característica que se debe de mejorarse mediante la modificación del proceso de síntesis o la verificación de variables que se excluyeron y que pueden influir de manera directa en el diámetro y la distribución del tamaño de partícula (sonicación, por ejemplo). Sin embargo, a pesar del gran tamaño de las NPs, éstas mostraron una cinética de liberación sostenida a lo largo del tiempo. Propiedad que resulta de gran relevancia para la aplicación que se le desea dar.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Universidad de Guanajuato, al Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACyT), a los Dres. Argelia Rosillo, Iraís Quintero y Jorge Delgado, así como a mis compañeros y amigos de verano Xally Mares, Karime Hernández, Eduardo Vázquez y Jorge Tavares.

REFERENCIAS

- [1] Slowing, I. I., et al. (2008). Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1278-1288.
- [2] Rahman, A. I. & Padavettan, V. (2012) Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites – A review. *Journal of Nanomaterials*, 2012.
- [3] Green, D. L. et al. (2003) Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface*, 266, 346-358.
- [4] Jafarzadeh, M., Rahman, I. A., Sipaut, C. S. (2009) Synthesis of silica nanoparticles by modified sol-gel process: the effect of mixing modes of the reactants and drying techniques.
- [5] Rosillo-de la Torre, et al. (2015). Phenytoin carried by silica core iron oxide nanoparticles reduces the expression of pharmacoresistant seizures in rats. *Nanomedicine*, 10(24), 3563-357.