

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización de copolímeros en bloque conjugados como vehículos nanoestructurados para Anfotericina B

Elsa Ruth Arias Patrón

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2020

Caracterización de copolímeros en bloque conjugados como vehículos nanoestructurados para Anfotericina B

Elsa Ruth Arias Patrón

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias-Química

Director (a):

Ph.D. León Darío Pérez Pérez

Codirector (a):

Ph.D. Yolima Baena Aristizábal

Línea de Investigación:

Copolímeros funcionales

Grupo de Investigación en Macromoléculas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2020

Dedicatoria

A Esteban, quien me enseña a vivir sin miedo.

Agradecimientos

Agradezco a Esteban y Jorge por su apoyo y amor incondicional.

Al profesor León Darío Pérez, mi director, por confiar en mi para el desarrollo de esta investigación, siendo una compañía indispensable con sus acertados aportes y sabios consejos.

A la profesora Yolima Baena, mi codirectora, por su guía en el estudio de los modelos de liberación de esta investigación.

Al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, en cabeza del profesor César Sierra por haberme permitido desarrollar la presente investigación.

A todos los integrantes del grupo de investigación en Macromoléculas por ser mi compañía y fuente de inspiración para llevar a cabo el presente estudio, fue un verdadero honor poder trabajar con ustedes.

Al Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Pontificia Universidad Javeriana por abrirme las puertas de su laboratorio al permitirme realizar allí los ensayos microbiológicos.

Resumen

La Anfotericina B (AmB) es un antifúngico de amplio espectro de acción, su actual administración se encuentra limitada por su toxicidad relacionada con su autoagregación al ser una molécula anfifílica. El uso de micelas poliméricas constituye una alternativa promisoría como vehículo de AmB con toxicidad reducida. Sin embargo, los sistemas micelares reportados en la literatura muestran interacciones débiles con la AmB, originando bajos porcentajes de encapsulación y altas velocidades de liberación.

En la presente investigación se caracterizaron sistemas de entrega micelar bioinspirados para AmB basados en polietilenglicol (PEG), policaprolactona (PCL) y 5-metil-5-propargiloxycarbonil-1,3-dioxan-2-ona (MCP), modificados con biomoléculas como colesterol, ácido oleico y 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE). Para tal fin, se estudió su capacidad de solubilizar, el estado de agregación, los perfiles de liberación y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los sistemas micelares. Del mismo modo se estudiaron sus propiedades térmicas y morfológicas.

Se comprobó que existe una estrecha relación entre la composición química de los materiales poliméricos y su desempeño como vehículos nanoestructurados de AmB. La conjugación de dichos materiales con biomoléculas como DSPE incrementó la capacidad de encapsulación del fármaco hasta un 20%. Se determinó que segmentos de PCL cortos favorecen la encapsulación de AmB. Las formulaciones estudiadas permitieron una liberación controlada con porcentajes de liberación cercanos al 10% transcurridas 6 horas. Se logró disminuir los valores de CMI en comparación a los obtenidos para la formulación comercial de AmB (Fungizone®).

En conclusión, los materiales bioinspirados diseñados pueden ser empleados como vehículos nanoestructurados de fármacos como la AmB.

Palabras clave: Micela polimérica, Anfotericina B, polietilenglicol, policaprolactona, copolímeros en bloque, encapsulación.

Abstract

Amphotericin B (AmB) is a broad-spectrum antifungal, its current administration is limited by its toxicity related to its self-aggregation as it is an amphiphilic molecule. The use of polymeric micelles constitutes a promising alternative as an AmB vehicle with reduced toxicity. However, the micellar systems reported in the literature show weak interactions with AmB, resulting in low encapsulation percentages and high release rates.

In the present investigation, bioinspired micellar delivery systems for AmB protocols were characterized in polyethylene glycol (PEG), polycaprolactone (PCL) and 5-methyl-5-propargyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-one (MCP), modified with biomolecules such as cholesterol, oleic acid and 1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (DSPE). To this end, their ability to solubilize, the state of aggregation, release profiles and minimum inhibitory concentration (MIC) of the micellar systems was studied. In the same way its thermal and morphological properties were studied.

It is proven that there is a close relationship between the chemical composition of polymeric materials and their performance as nanostructured AmB vehicles. The conjugation of these materials with biomolecules such as DSPE increased the encapsulation capacity of the drug up to 20%. It was determined that short PCL segments favor the encapsulation of AmB. The formulations studied allowed a controlled release with release rates close to 10% after 6 hours. The MIC values were reduced compared to the results for the commercial formulation of AmB (Fungizone®).

In conclusion, the proposed bioinspired materials can be used as nanostructured vehicles for drugs such as AmB.

Keywords: Polymeric micelle, Amphotericin B, polyethylene glycol, polycaprolactone, aggregation, encapsulation.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVIII
Introducción	21
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
1. Marco Teórico	25
1.1 Enfermedad Fúngica Invasiva.....	25
1.2 La molécula de Anfotericina B (AmB)	26
1.2.1 Abordaje de Interacciones AmB-polímero	28
1.2.2 AmB y su forma de agregación	29
1.3 Las Nanopartículas Poliméricas.....	31
1.4 Copolímeros anfífilicos en bloque (CAB)	33
1.5 Liberación controlada de fármacos	34
1.5.1 Modelos cinéticos de liberación de fármacos	34
1.6 Antecedentes.....	35
2. Metodología	39
2.1 Materiales	40
2.2 Preparación de sistemas micelares	42
2.3 Evaluación de sistemas micelares	43
2.3.1 Determinación del porcentaje de encapsulación	43
2.3.2 Determinación de tamaño de partícula	44
2.3.3 Ensayo de solubilización	44
2.3.4 Estudio de liberación de AmB	44
2.3.5 Estudio de agregación.....	45
2.3.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	45
2.3.7 Difracción de Rayos X (DRX).....	45
2.3.8 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	45
2.3.9 Espectrometría de fotoelectrones inducida por rayos X (XPS)	46
2.3.10 Concentración mínima inhibitoria (CMI)	46
2.3.11 Hemólisis	46

3. Efecto de la composición de CBAs como vehículos de AmB	48
3.1 Porcentaje de encapsulación de CAB	48
3.1.1 Efecto de la longitud del segmento hidrófobo	49
3.1.2 Efecto de la composición del segmento hidrófobo	50
3.1.3 Tamaño de Partícula y Potencial Z	51
3.2 Evaluaciones de CBAs conjugados con DSPE	54
3.2.1 Estudios de solubilización	55
3.2.2 Determinación del porcentaje de encapsulación	56
3.2.3 Caracterización de las formulaciones por espectrometría de fotoelectrones inducida por rayos X (XPS).....	59
3.2.4 Tamaño de partícula y potencial zeta de copolímeros modificados.....	61
3.2.5 Caracterización de las propiedades térmicas.....	64
3.2.6 Estudio de liberación.....	66
3.2.7 Estudios de Agregación	70
3.2.8 Concentración mínima inhibitoria (CMI)	76
3.2.9 Estudio de Hemólisis	77
4. Caracterización de CAB decorados con colesterol y ácido oléico	81
4.1 Evaluación del porcentaje de encapsulación	83
4.2 Tamaño de partícula y potencial z	84
4.3 Propiedades térmicas de CAB decorados	86
5. Conclusiones	91
A. Anexo: Reacciones usadas para obtener PEG-<i>b</i>-PCL y PEG-<i>b</i>-PDLLA.....	93
B. Anexo: Reacciones usadas para la obtención de CAB decorados con colesterol y ácido oleico	95
C. Fotos ensayos Concentración mínima inhibitoria.....	97
Bibliografía	99

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Estructura química de la molécula de AmB [2]	27
Figura 1-2: Modelo atómico de AmB de forma monomérica (A), dimérica (B), tetramérica (C) y tetramérica incorporada en la bicapa lipídica (D) [26].	30
Figura 1-3: Estructuras típicas de copolímeros que tienen dos tipos de bloque [36].	33
Figura 2-1: Esquema general del diseño metodológico.	40
Figura 3-1: Estructuras de CAB compuestos por segmentos de PCL (A) y PLA (B)	50
Figura 3-2: Análisis de diámetro hidrodinámico (Dh) por DLS del copolímero C.	51
Figura 3-3: Tamaño de Dh para copolímeros en bloque A y B con y sin AmB.	52
Figura 3-4: Concentración de Anfotericina B (AmB) solubilizada (mg/mL) teniendo en cuenta la concentración de copolímero (mg/mL).	55
Figura 3-5: Contenido de AmB para copolímeros base y modificados con DSPE.	57
Figura 3-6: Estructura química de CAB de tipo PEG- <i>b</i> -PCL conjugado con DSPE.	58
Figura 3-7: Estructura química de Anfotericina B (AmB).	58
Figura 3-8: Espectro de fotoelectrones inducidos por rayos X de A. AmB, B. muestra BE y C. Formulación AmB/BE.	60
Figura 3-9: Espectro de alta resolución para los electrones 2p del fósforo A. BE y B. AmB/BE.	61
Figura 3-10: A. Diámetro hidrodinámico (nm) para CAB E y BE. B. Imagen para partículas obtenidas por dilución directa de BE.	62
Figura 3-11: Posible estructura individual-plegamiento de PCL en CAB.	63
Figura 3-12: Difractogramas de copolímeros B y BE	64
Figura 3-13: Termogramas DSC obtenidos para CAB A, B, BE y E.	65
Figura 3-14: Perfiles de liberación de CAB cargados con AmB, % de liberación acumulada versus tiempo (h).	67
Figura 3-15: Espectros UV de AmB disuelta en PBS (azul) y metanol (rojo).	71
Figura 3-16: Espectros UV de Fungizone (azul) y BE (rojo) disuelto en PBS.	72
Figura 3-17: Espectros UV-vis de AmB en presencia de BE (PEG- <i>b</i> -PCL bajo peso molecular), B (PEG- <i>b</i> -PCL-DSPE bajo peso molecular) y AmB en PBS.	73
Figura 3-18: Perfiles hemolíticos obtenidos para Fungizone® y CAB cargados con AmB	77
Figura 4-1: Estructura química de CAB PEG- <i>b</i> -PCL A. decorado con una molécula de colesterol B. decorado con una molécula de ácido oleico [62].	81

Figura 4-2: Porcentajes de encapsulación de AmB para CAB de ambas longitudes de segmento hidrófobo (A y B). 1 molécula de colesterol (1C), 3 moléculas de colesterol (3C) y 5 moléculas de colesterol (5C).	83
Figura 4-3: Distribuciones de tamaño de partícula de CAB A y A1C	85
Figura 4-4: Distribuciones de tamaño de partícula de CAB B y B1O	86
Figura 4-5: Termogramas de fusión para CAB A1O, A3O, B1O y B3O.	87
Figura 4-6: Termogramas de fusión para CAB A3O y A3C.	88

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Composición, código asignado, peso molecular (Mn) e índice de dispersión de los materiales poliméricos estudiados.	41
Tabla 3-1: Composición, código, porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación para copolímeros de distinta composición y longitud.	49
Tabla 3-2: Promedio, Pdl para Diámetro hidrodinámico (Dh) y potencial Z de CAB A, B, C y D, a un pH de 6,9.	51
Tabla 3-3: Composición, peso molecular e índice de dispersión de copolímeros modificados.	54
Tabla 3-4: Composición, código, porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación para copolímeros base y modificados con DSPE.	56
Tabla 3-5: Promedio, Pdl para Diámetro hidrodinámico (Dh) y potencial Z de CAB A, B, AE, BE y E, a un pH de 6,9.	61
Tabla 3-6: Resultados de entalpías de fusión para CAB A, AE, B, BE y E	66
Tabla 3-7: Análisis para modelos de liberación de 0 a 6 horas.	68
Tabla 3-8: Análisis para modelos de liberación de 24 a 100 horas.	69
Tabla 3-9: Estado de agregación de AmB basado en la relación de áreas para picos agregados y Área total del espectro UV-Vis en PBS.	75
Tabla 3-10: Valores de CMI para copolímeros cargados con AmB y la formulación comercial.	76
Tabla 4-1: Composición, código, % de encapsulación, eficiencia de encapsulación de CAB modificados con Colesterol y ácido oleico.	82
Tabla 4-2: Resultados de tamaño de partícula promedio, índice de polidispersidad y potencial z de CAB modificados con colesterol y ácido oleico.	84
Tabla 4-3: Propiedades térmicas de los CAB modificados con colesterol y ácido oleico.	86

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

AmB	Anfotericina B
CAB	Copolímero Anfifílico en Bloque
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difracción de Rayos X
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DSPE	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
EFI	Enfermedad Fúngica Invasiva
MCP	Carbonato cíclico 5-metil-5-propargiloxycarbonil-1,3-dioxan-2-ona
PCL	Poli(caprolactona)
PEG	Poli(etilenglicol)
PLA	Poli(ácido láctico)
T _g	Temperatura de transición vítrea
THF	Tetrahidrofurano
T _m	Temperatura de fusión
XPS	Espectrometría de Fotoelectrones Inducida por Rayos X

Introducción

La Anfotericina B (AmB) es un macrólido poliénico de amplio espectro usado en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas [1]. El mecanismo de acción de la AmB consiste en la unión con el ergosterol, el principal esteroide presente en las membranas celulares de los hongos, esta interacción promueve la formación de poros tipo barril que permean la membrana de las células fúngicas permitiendo la salida de iones y moléculas polares vitales para su funcionamiento lo que conlleva a la muerte del hongo [2]. Pese a su alta eficacia en el tratamiento de micosis sistémicas, el uso de AmB como agente antifúngico ha mostrado algunas limitaciones debido a su pronunciada toxicidad, por ejemplo, el mecanismo de acción no selectivo de la AmB resulta en una interacción con el colesterol presente en las membranas celulares de los mamíferos [3] ocasionando muerte celular y un marcado efecto nefrotóxico.

Una de las alternativas propuestas para disminuir la toxicidad de la AmB es su encapsulación en nanopartículas poliméricas tales como micelas. Debido a que las micelas poliméricas son sistemas coloidales con tamaños menores a 100 nm, alta estabilidad coloidal y mecanismos sencillos de encapsulación y liberación de fármacos, son candidatas promisorias para el desarrollo de formulaciones antimicóticas a partir de AmB [4].

En la mayoría de los sistemas micelares reportados, los precursores poliméricos se componen de un segmento de polietilenglicol (PEG) el cual, gracias a su hidrofiliidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y que no interactúa con proteínas, permite tiempos prolongados de circulación y alta estabilidad coloidal. Por su parte, dentro de los fragmentos que se han reportado como segmento hidrófobo se encuentran los compuestos por policaprolactona (PCL), para la que se ha encontrado reducción en la toxicidad en comparación con algunas formulaciones intravenosas de AmB [5]. De forma similar, nanopartículas compuestas por segmentos hidrófobos de PEG y poli-(ácido láctico) (PEG-

b-PLA) han mostrado reducción en la toxicidad de AmB para el hígado, los riñones y el sistema sanguíneo con un efecto terapéutico mejorado [6].

Investigaciones recientes se han enfocado en diseñar núcleos micelares que presenten interacciones favorables con la AmB, para tal fin se ha estudiado el efecto de la conjugación de mPEG-*b*-PCL con moléculas lipofílicas como colesterol [7] y retinol [8]. Sin embargo, los porcentajes de encapsulación y su inestabilidad son una de sus principales desventajas. Por tal motivo, se ha demostrado que el aumento de compatibilidad química entre el fármaco y la estructura del copolímero incrementa la eficiencia de encapsulación y disminuye la velocidad de liberación del fármaco desde la micela polimérica. Este incremento de compatibilidad de fármaco-polímero puede llevarse a cabo mediante el diseño de materiales bioinspirados, caracterizados por su habilidad de mimetizar el comportamiento de las membranas celulares favoreciendo las interacciones entre el fármaco y el ambiente que lo rodea. En este enfoque, los copolímeros compuestos por PEG y fosfolípidos (DSPE), poseen la habilidad de disminuir la agregación de la AmB conforme se incrementa la cantidad del material polimérico, lo cual repercute en la reducción de su toxicidad mientras que parámetros asociados con la actividad antifúngica tales como la concentración mínima inhibitoria permanece inalterada [9].

Por otro lado, los copolímeros en bloque son sistemas macromoleculares que presentan segmentos poliméricos de distinta composición enlazados covalentemente. El comportamiento en solución de los copolímeros en bloque está limitado por la afinidad que cada uno de los bloques presenta con el solvente. En el caso de los copolímeros en bloque anfífilicos los cuales se componen de segmentos con diferente hidrofiliidad, al disolverse en agua, se organizan de tal forma que se minimice la energía de interacción, los segmentos hidrófilos quedan expuestos al agua y los hidrófobos se agregan, lo cual genera una estructura tipo "core-shell".

La solubilidad se favorece cuando las fuerzas cohesivas que forman el núcleo micelar y las del soluto son de la misma magnitud y se desea disolver solutos pequeños [10]. En el caso específico de la AmB, dado su gran tamaño molecular, su solubilización en el núcleo micelar es, por tanto, poco favorable; por ende es necesario diseñar el núcleo a partir de segmentos hidrófobos que puedan presentar interacciones favorables con ella, no solo con el fin de solubilizarla, si no también disminuir su agregación, lo cual a su vez permitirá su liberación controlada, aumentando su eficiencia y reduciendo su toxicidad.

En la presente investigación se describen los estudios de nuevos vehículos nanoestructurados de AmB compuestos por copolímeros anfifílicos en bloque usando como segmentos hidrófobos ácido poliláctico y policaprolactona de dos longitudes diferentes, conjugados con biomoléculas como colesterol y fosfoetanolamina (DSPE) y con moléculas de carácter hidrofóbico como ácido oleico.

Objetivo general

Caracterizar copolímeros en bloque bioconjugados como vehículos nanoestructurados para anfotericina B.

Objetivos específicos

- Establecer relaciones entre la estructura y longitud de los copolímeros con su eficiencia en la encapsulación de AmB.
- Determinar relaciones entre la estructura de los copolímeros y la naturaleza de su unión a la AmB con su desempeño en cuanto a control de liberación teniendo en cuenta su forma de agregación.
- Evaluar los sistemas micelares por medio de la realización de pruebas biológicas como concentración mínima inhibitoria y actividad hemolítica.

1.Marco Teórico

En este capítulo se abordarán las generalidades necesarias para el entendimiento del problema de investigación y las estrategias propuestas para su solución.

1.1 Enfermedad Fúngica Invasiva

La enfermedad o infección fúngica invasiva (EFI) se considera una infección de tipo oportunista que acontece casi exclusivamente en el paciente inmunodeprimido [1]. El tratamiento al que se someten pacientes que sufren enfermedades como VIH, cáncer y desordenes autoinmunes hace que el cuerpo no pueda producir una respuesta inmunitaria adecuada haciéndolo blanco de diversas especies de hongos oportunistas. Las infecciones fúngicas invasivas se han reconocido cada vez más como una causa importante de morbilidad y mortalidad en el huésped inmunocomprometido [11].

Hay numerosas especies de hongos oportunistas que son capaces de infectar a pacientes inmunosuprimidos, algunas de ellas son: las levaduras del género *Cándida* responsables de producir Candidiasis Invasiva, el hongo filamentoso *Aspergillus spp.* a quien se le atribuye la Aspergilosis Invasiva o la Zygomycosis producida por mohos de la familia de los mucorales. Según cifras suministradas por el Sistema Integral de información de la Protección Social (SISPRO) del Ministerio de Salud, en 2018, 98% de las EFI diagnosticadas fueron causadas por levaduras del género *Candida*. Más específicamente, la especie *Candida Albicans* es la levadura de mayor importancia clínica en los casos de candidemia, siendo la que con mayor frecuencia es aislada (45-50%), pese a que hace parte de la microbiota de mucosa y piel humana, en pacientes inmunocomprometidos la mortalidad por este hongo es alta [12]. Otras especies del género *cándida* también aisladas incluyen: *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*; sin embargo, la mayoría de ellas son menos virulentas que *C. albicans* pero presentan mayor resistencia a los anti fúngicos o tienden a desarrollarla más rápidamente. La resistencia a los anti fúngicos y el tipo de especie aislada en los pacientes está ligada directamente a la región geográfica [13].

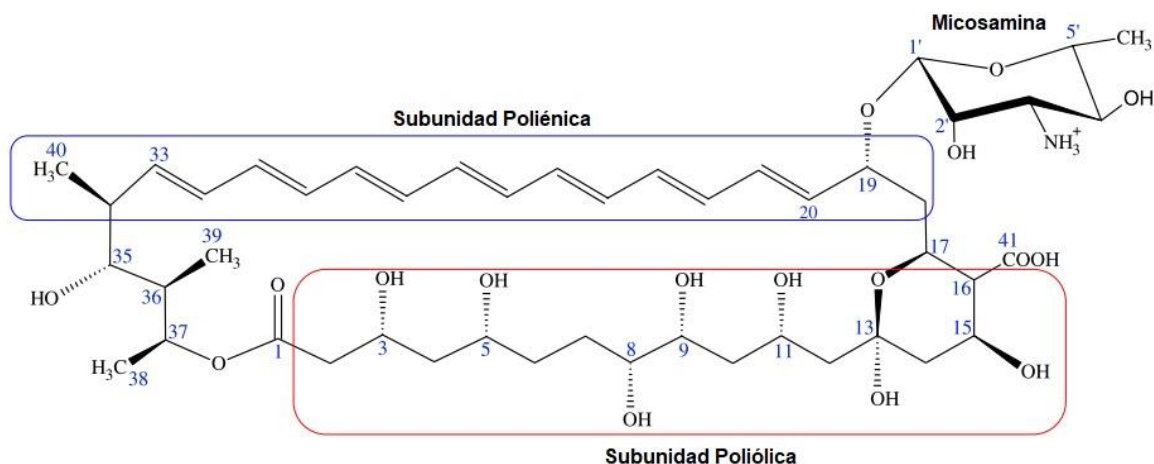
Por otro lado, los casos de Criptococosis que presentan afectaciones a nivel mundial, son generados por las especies *C. neoformans*, *C. gattii* y *Cryptococcus sp*; las cuales corresponden a un grupo de levaduras encapsuladas de la clase de los Basidiomicetos, que se adquieren por la inhalación de los propágulos infectantes (blastoconidias o basidiosporas) del hongo, y que en caso de hospederos inmunocompetentes puede generar una infección crónica, que posteriormente puede reactivarse y desarrollar una enfermedad sistémica o EFI [14]. La criptococosis diseminada puede afectar cualquier órgano o sistema, pero el hongo tiene especial predilección por el sistema nervioso central, siendo la meningitis la manifestación clínica más frecuentemente diagnosticada [15]

La mayor dificultad que se tiene en el tratamiento de la EFI es el número limitado de antifúngicos aprobados. Mientras las candidemias se tratan con tres grupos de antifúngicos: Polienos (anfotericina B), Azoles (Fluconazol) y el más reciente, Equinocandinas (caspofungina, micafungina, y anidulafungina); para el tratamiento de la Criptococosis, se tienen aún menos opciones, debido a que los patógenos asociados naturalmente presentan resistencia a las equinocandinas. Para su tratamiento, dependiendo de la severidad de la enfermedad, se indica el uso de anfotericina B (AmB) sola o en combinación con 5-flucitosina y azoles, como el Fluconazol, itraconazol o voriconazol [16].

1.2 La molécula de Anfotericina B (AmB)

La AmB pertenece a la clase de antibióticos poliénicos. Es un producto natural de color amarillo a naranja que se extrae de cultivos de *Streptomyces nodosus* a escala industrial [17]. La molécula de AmB consiste en una macrolactona β -glicosilada con un grupo micosamida en el carbono 19. En las posiciones de los carbonos 13 y 17, esta macrolactona tiene un anillo hemiacetal. La presencia de un grupo carboxilo en el C 16 y un grupo amino en el anillo de micosamina determina el carácter anfotérico de esta molécula [2]. El carácter anfifílico de la AmB se explica por poseer siete enlaces dobles conjugados en conformación trans, responsables de su carácter hidrofóbico y cinco grupos hidroxilo del carbono 3 al 11 que le confieren hidrofiliidad. Dado su carácter anfifílico, la AmB tiende a agregarse a concentraciones superiores a 0.1 μ M. Este proceso es espontáneo y presenta un comportamiento micelar similar al observado para surfactantes, en donde los agregados coexisten con la forma monomérica de la sustancia (Figura 1-1).

Figura 1-1: Estructura química de la molécula de AmB [2]



Son varios los mecanismos que se han propuesto para explicar la forma en la que la molécula de AmB interactúa con las moléculas de ergosterol presentes en la membrana fúngica. Estos mecanismos también muestran la razón por la que, además de tener un mecanismo de acción antifúngica, la AmB es culpable de los marcados efectos nefrotóxicos causados por su interacción con las moléculas de colesterol presentes en el riñón.

Inicialmente, Finkelstein y Holz plantearon en 1973 que las moléculas de AmB se agregan en forma de barril a través de la bicapa con los grupos de cadenas polihidroxiladas apuntando hacia adentro y los segmentos de heptaeno apuntando hacia afuera [2], esto hace que la célula pierda iones y moléculas polares vitales para su funcionamiento. En 2011 se publicaron estudios acerca del efecto de la AmB en *Cryptococcus neoformans*, encontrándose que el daño en las células fúngicas se da por la inducción de radicales libres responsables del deterioro y oxidación temprana seguida de un aumento en la permeabilidad de la membrana celular. En otras palabras, los investigadores encontraron que las células se vuelven metabólicamente inactivas antes de que se pierda la integridad de su membrana lo que sugiere que el efecto primario de la AmB sobre *C. neoformans* no ocurre a nivel de la membrana [18].

Una de las explicaciones del mecanismo de acción de la AmB que ha tomado gran relevancia en los últimos años se fundamenta en los hallazgos publicados por Anderson y colaboradores en 2014. Ellos proponen la formación de una esponja de esteroides

en la que la AmB existe principalmente como grandes agregados extramembranosos que extraen ergosterol de las bicapas lipídicas, esto fundamentado en que la unión del ergosterol en ausencia de actividad del canal o barril es suficiente para producir la muerte de la célula [19].

Pese a su alta eficacia en el tratamiento de micosis sistémicas, el uso de AmB como agente antifúngico ha mostrado algunas limitaciones debido a su pronunciada toxicidad, por ejemplo, el mecanismo de acción no selectivo de la AmB resulta en una interacción con el colesterol presente en las membranas celulares de los mamíferos [3] ocasionando muerte celular y un marcado efecto nefrotóxico.

1.2.1 Abordaje de Interacciones AmB-polímero

Teniendo en cuenta el carácter hidrofílico del segmento compuesto por polietilenglicol (PEG), se propone emplear segmentos hidrofóbicos (policaprolactona y ácido poliláctico) de dos longitudes diferentes para encapsular AmB, esto con el fin de obtener copolímeros anfifílicos en bloque que sean capaces de ensamblarse de forma espontánea. Del mismo modo se modificaron estos copolímeros con moléculas que se conoce tienen interacciones favorables con la AmB, esto con el fin de estudiar el efecto de la injersión de dichas moléculas en la eficiencia de encapsulación. La afinidad de estas sustancias con la AmB se abordará a partir de análisis espectroscópicos, lo cual permitirá caracterizar a nivel molecular la naturaleza y fortaleza de las interacciones involucradas, facilitando establecer relaciones entre la estructura de los materiales poliméricos y su desempeño en la fabricación de vehículos micelares. Entre las sustancias que se proponen para modificar los copolímeros estudiados, se tiene:

- **Colesterol:** El colesterol es un componente de las membranas celulares, por tanto, es completamente biocompatible [20]; su uso se propone ya que puede interactuar a través de interacciones hidrofóbicas con la AmB, facilitando su inclusión en el núcleo micelar y por ende su encapsulación, tal como ha sido demostrado en trabajos de investigación desarrollados por el grupo de Macromoléculas [7] [8] y autores como Torrado y colaboradores [21].
- **El 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE)** es un fosfolípido encontrado en las membranas celulares, por lo cual es biocompatible. Copolímeros compuestos por

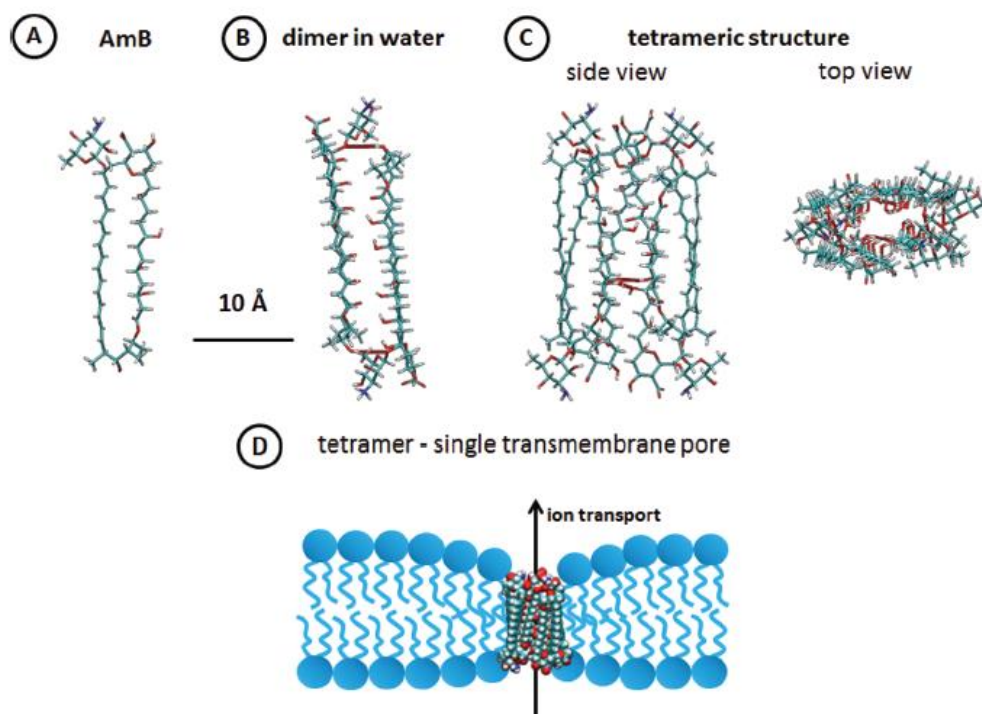
DSPE y polietilenglicol se han reportado como aditivos del Fungizone® logrando reducciones importantes en su toxicidad [9], también se reporta su uso como estabilizantes de emulsiones de AmB en formulaciones orales [22]. Dada la naturaleza anfífila de fosfolípidos como el DSPE, se presumen que pueda interactuar con la AmB a través de fuerzas de Van der Waals que comprometen sus segmentos hidrocarbonados y que adicionalmente, pueda presentar interacciones polares tales como puentes de hidrógeno con los grupos fosfato [23].

- **Ácido oleico:** Recientemente, las formulaciones basadas en lípidos han sido investigadas ampliamente para mejorar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles después de la administración oral. El ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado caracterizado por ser el más abundante de los aceites en la naturaleza [24]. Este compuesto ha sido usado para elaborar microemulsiones de tipo O/W (aceite en agua) y mejorar tanto la solubilidad como la entrega de AmB en formulaciones orales [25]. Dicha molécula podría tener interacciones de tipo hidrofóbico favorables con la AmB a través de su cadena hidrocarbonada.

1.2.2 AmB y su forma de agregación

La AmB puede presentarse en distintos tipos de agregados, estos pueden ser de forma monomérica, dimérica o tetramérica (Figura 1-2). Se sabe que la estructura dimérica de la AmB se estabiliza por medio de interacciones dipolo-dipolo entre los cromóforos y adicionalmente por dos enlaces de H entre grupos hidroxilo [26]. Estos dímeros pueden asociarse con facilidad dando lugar a estructuras tetraméricas en las que dos dímeros de AmB están unidas por medio de una red de enlaces de hidrógeno. Esta conformación tetramérica tiene forma de poro y siempre que dicha estructura pueda penetrar la bicapa lipídica sería una de las conformaciones que la AmB adoptaría para explicar la formación de canales responsable de la acción de este fármaco.

Figura 1-2: Modelo atómico de AmB de forma monomérica (A), dimérica (B), tetramérica (C) y tetramérica incorporada en la bicapa lipídica (D) [26].



El espectro UV de la AmB en su forma monomérica y agregada presentan diferencias significativas, mientras los monómeros disueltos en medio acuoso presentan cuatro máximos de absorción cercanos a 350, 370, 388 y 415 nm. Los agregados presenta una banda de absorción ancha centrada a 332 nm [27]. Es por esto que la espectroscopía UV-vis es una técnica confiable para caracterizar el estado de agregación de AmB porque sus características espectrales dependen de los arreglos moleculares obtenidos por su autoagregación en presencia de surfactantes, solventes y biomoléculas.

Por otro lado y pese a ser un antifúngico de gran actividad, amplio espectro de acción y pocos casos de resistencia reportados [28], la AmB presenta toxicidad frente a células humanas tales como los glóbulos rojos. Este hecho, se atribuye a la habilidad de la AmB de complejar los esteroides presentes en las membranas celulares, y por tanto el mecanismo de toxicidad es similar al que explica su actividad antifúngica, debido a las similitudes estructurales entre las moléculas de colesterol y ergosterol y, por ende, la naturaleza de su unión. El diseño de formas farmacéuticas de AmB que presenten alta

actividad fungicida, pero menor toxicidad exige por ende entender mejor las interacciones que presentan con estas dos sustancias

Otro factor importante a tener en cuenta es que, dado su carácter anfifílico, la AmB tiende a agregarse a concentraciones superiores a $0.1\mu\text{M}$. Este proceso es espontáneo y presenta un comportamiento micelar similar al observado para surfactantes, en donde los agregados coexisten con la forma monomérica de la sustancia. De acuerdo Zielińska y colaboradores la agregación procede vía interacciones hidrofóbicas, mientras que las interacciones entre los grupos polares y su carácter anfotérico presentan una menor contribución [29].

Una de las alternativas propuestas para disminuir el marcado efecto nefrotóxico dado por la interacción de la AmB con moléculas de colesterol presentes en las membranas de órganos como el riñón, es su encapsulación en nanopartículas poliméricas tales como micelas.

1.3 Las Nanopartículas Poliméricas

Las nanopartículas poliméricas son agregados de polímeros insolubles o de baja solubilidad en agua, son de gran potencial para ser empleadas en la liberación controlada de fármacos. Según Prasad y colaboradores las nanopartículas se definen como partículas sólidas coloidales en el rango de 10 nm a 1000 nm [30]. La principal ventaja de su uso, se debe a que el riñón no puede depurar partículas de tamaño superior a 5.5 nm, por lo cual presentan tiempos prolongados de circulación y dependiendo de sus propiedades superficiales pueden ser captados por las células blanco en donde liberan el principio activo que transportan en aplicaciones tales como quimioterapia y terapia génica [31].

Algunos de los métodos más usados para la fabricación de nanopartículas poliméricas partiendo de un polímero preformado son: evaporación de solvente, salting-out, fluidos supercríticos, diálisis y nanoprecipitación. El método que se usará para la obtención de nanopartículas poliméricas que serán materia de estudio de la presente investigación es nanoprecipitación. Fessi desarrolló el método de nanoprecipitación para preparación de nanopartículas poliméricas [32]. El principio básico de esta técnica se basa en la deposición interfacial de un polímero después del desplazamiento de un solvente

semipolar, miscible con agua, de una solución lipofílica. El sistema de nanoprecipitación consta de tres componentes básicos: el polímero (sintético, semisintético o natural), el disolvente del polímero y el no disolvente del polímero [30].

Para que un polímero pueda emplearse en la fabricación de nanopartículas para liberación controlada debe presentar varias características tales como no ser tóxico, no generar respuesta inmune y preferiblemente ser biodegradable generando productos no tóxicos o que sean eliminados del cuerpo a través de rutas metabólicas naturales con efectos colaterales mínimos, las características de los productos de degradación definen la biocompatibilidad del polímero. Debido a estas características, polímeros tales como poli(ácido láctico-co- ácido glicólico) (PLGA), poli(ácido glicólico) (PGA) y poli(ácido láctico) (PLA), poli(etilenglicol) (PEG) y poli(caprolactona) (PCL) son aceptados por la FDA para ciertas aplicaciones biomédicas, los productos de su biodegradación se eliminan del cuerpo humano como dióxido de carbono y agua [33].

Son varios los tipos de nanopartículas usados en aplicaciones biomédicas, estos incluyen: Polímeros, liposomas, ciclodextrinas anfifílicas, dendrímeros, nanopartículas de oro, micelas, nanotubos de carbono y puntos cuánticos [34].

Los sistemas micelares, basados en polímeros que contienen un núcleo hidrófobo rodeado por polímeros hidrófilos, se suelen ensamblar a partir de un copolímero anfifílico (di-bloque o tri-bloque) y han sido ampliamente explorados como portadores de fármacos hidrofóbicos. Por ejemplo, se han preparado y protegido nanocápsulas con un recubrimiento de PEG (bloque hidrófilo), estas tienen un núcleo-envoltura multifuncionales y están compuestas por micelas de copolímeros anfifílicos [35].

Debido a que las micelas poliméricas son sistemas coloidales con tamaños menores a 100 nm, alta estabilidad coloidal y mecanismos sencillos de encapsulación y liberación de fármacos, son candidatas promisorias para el desarrollo de formulaciones antimicóticas a partir de AmB [4]. En la mayoría de los sistemas micelares reportados, los precursores poliméricos se componen de un segmento de polietilenglicol (PEG) el cual, gracias a su hidrofiliidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y que no interactúa con proteínas, permite tiempos prolongados de circulación y alta estabilidad coloidal. Por su parte, dentro de los fragmentos que se han reportado como segmento hidrófobo se encuentran los

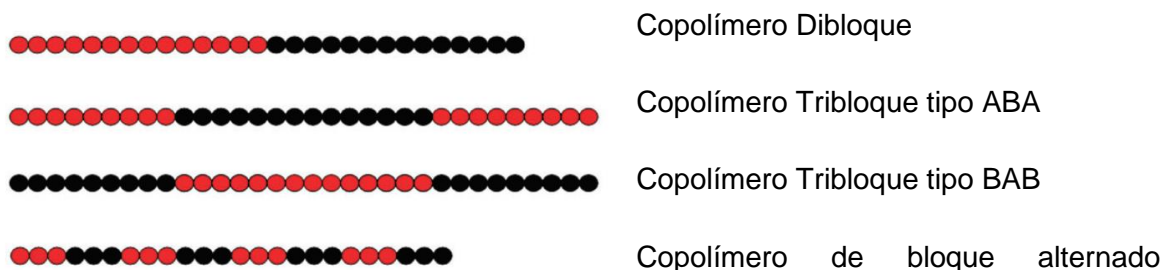
compuestos por policaprolactona (PCL), para la que se ha encontrado reducción en la toxicidad en comparación con algunas formulaciones intravenosas de AmB [5].

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron micelas poliméricas dado que estas son copolímeros anfifílicos con estructuras de tipo dibloque.

1.4 Copolímeros anfifílicos en bloque (CAB)

Cuando en un proceso de polimerización se usan dos o más monómeros químicamente diferentes, el polímero resultante se llama copolímero. Los copolímeros se clasifican según la secuencia de los monómeros como se muestra a continuación (Figura 1-3).

Figura 1-3: Estructuras típicas de copolímeros que tienen dos tipos de bloque [36].



Los CAB se caracterizan por tener un segmento de naturaleza hidrofílica, constituido por polietilenglicol (PEG), y un segmento de tipo hidrofóbico compuesto por olicaprolactona (PCL) y ácido poliláctico (PLA), ambos de diferente longitud. Los sistemas micelares basados en polímeros que contienen un núcleo hidrófobo rodeado de polímeros hidrófilos se suelen ensamblar espontáneamente y han sido ampliamente explorados como portadores de fármacos hidrofóbicos [35].

El autoensamblaje de CAB estables termodinámicamente, de varias morfologías es gobernada por tres contribuciones a la energía libre del sistema. 1. El grado de estiramiento de los bloques que forman el núcleo. 2. La tensión interfacial entre el núcleo de la micela y el solvente fuera del núcleo. 3. La fuerza de repulsión entre las cadenas que forman la corona. De este mismo modo, la morfología de los agregados puede ser controlada por factores que afecten estas tres contribuciones [36].

1.5 Liberación controlada de fármacos

El empleo de biopolímeros en el desarrollo de sistemas que permitan modular la liberación del fármaco busca principalmente, por una parte, el control de su concentración plasmática dentro de la ventana terapéutica disminuyendo las fluctuaciones, lo que conllevaría a la reducción de efectos adversos y a asegurar su actividad biológica, y por otro lado, la disminución en la frecuencia de dosificación, mejorando la adherencia a la terapia por parte del paciente. El empleo de biopolímeros, capaces de agregarse, como lo son los copolímeros de bloque anfífilicos, presentan ventajas adicionales como la posibilidad de solubilizar fármacos y mejorar su permeación, lo que trae como consecuencia una mejora en el proceso de absorción a nivel intestinal y por ende un aumento en la biodisponibilidad [37].

Comúnmente, la liberación controlada de fármacos sucede en dos fases, inicialmente una salida rápida (efecto burst), seguida por un periodo de liberación lenta. Los mecanismos de liberación más frecuentemente involucrados incluyen la difusión del fármaco y la erosión, por degradación del polímero [38]. Entre los factores fisicoquímicos que se destacan en la liberación de principios activos están: la solubilidad del fármaco, el tamaño de las partículas, la porosidad, el grado de sustitución y las longitudes de los segmentos poliméricos [39]. El uso de modelos cinéticos contribuye a la determinación de las velocidades de liberación del fármaco a partir del sistema y a la elucidación de su mecanismo de liberación [40].

1.5.1 Modelos de liberación de fármacos

Son varios los modelos de liberación que pueden ser usados para ilustrar la liberación controlada de fármacos, algunos de los más importantes se describen a continuación:

- Orden cero: aplica para sistemas de liberación con una velocidad constante, independiente de la concentración del fármaco. El comportamiento de liberación se representa por la siguiente ecuación [41]:

$$D_t = D_0 + k_0 t \quad (1.1)$$

Donde: D_t es la cantidad de fármaco disuelto en un tiempo t , D_0 es la cantidad inicial de fármaco en el sistema y k_0 es la constante de velocidad de liberación de orden cero expresado en unidades de concentración/tiempo.

- Primer orden: Para este modelo la cantidad de fármaco liberada depende de la concentración del mismo. El modelo cinético de primer orden se expresa por la siguiente ecuación [42]:

$$\log C = \log C_0 - kt/2.303 \quad (1.2)$$

Donde: C es la concentración de fármaco C_0 es la concentración inicial de fármaco, k es la constante de velocidad de primer orden y t es el tiempo.

- Modelo Higuchi: Es un modelo matemático que relaciona la concentración liberada con la raíz cuadrada del tiempo. El modelo simplificado se representa con la siguiente ecuación [41]:

$$f_t = K_H \sqrt{t} \quad (1.3)$$

Donde: f_t es la fracción de fármaco liberada en un tiempo t , K_H es la constante de velocidad de liberación de Higuchi y t es el tiempo.

- Korsmeyer-Peppas: Es un modelo matemático que describe la liberación del fármaco, en términos de su velocidad y mecanismo. Este modelo se describe por la siguiente ecuación [41]:

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (1.4)$$

Donde: M_t/M_∞ es la fracción de fármaco liberado en un tiempo t , k es la constante de velocidad de liberación y n es el índice de liberación que indica el mecanismo por el que se está dando la liberación del fármaco.

1.6 Antecedentes

Dada la prevalencia de infecciones fúngicas, su difícil diagnóstico y el bajo número de antifúngicos disponibles; los sistemas nanoestructurados para la liberación controlada juegan un papel importante en obtener formulaciones menos tóxicas y más eficientes [43]. La administración oral es la vía más utilizada para la entrega de fármacos [44]. En la última década son varias las investigaciones que se realizaron con el fin de desarrollar formulaciones orales de AmB usando distintos sistemas transportadores. Estas incluyen nanopartículas sólidas lipídicas estudiadas por Chaudhari et al. en 2016, nanopartículas de PLGA ensayadas por Italia et al. en 2009, en 2012 Yang et al. publicaron avances en

formulaciones orales usando cubosomas así como Jain et al. estudiaron nanopartículas poliméricas lipídicas híbridas, Wasan et al. publicaron acerca del uso de emulsiones en 2009 y Risovic et al. en 2003 trabajaron en formulaciones compuestas por micelas, todas estas investigaciones exhibieron menor nefrotoxicidad al ser comparadas con formulaciones parenterales [45].

Chaudhari et al. en 2016 reportó la administración oral eficaz en forma de nanopartículas sólidas lipídicas de AmB, se divulgó la formación predominante de superagregados no tóxicos de AmB, resultantes de la técnica de nanoprecipitación asistida por sonicación con sonda. Chaudhari et al. realizaron una investigación profunda del estado de agregación de AmB, el atrapamiento del fármaco en nanopartículas y estabilidad en los pasos de la formulación y en los fluidos GI. [46].

En la investigación publicada por Yang et al. en 2014, se empleó un método top-down simple que utiliza agitación magnética con muy poca energía para producir nanocristales de AmB para administración oral. Se usó una mezcla de surfactantes compuesta de desoxicolato de sodio y carbómero, esta se usó para recubrir la superficie de las nanopartículas de AmB, actuando como un estabilizador polimérico para reducir la inestabilidad termodinámica y disminuir la tendencia de agregación y sedimentación. Alrededor del 32% de AmB de los nanocristales de AmB se liberaron en el agua a las 4 h, mientras que la AmB sin procesar no alcanzó el límite de detección mínimo. La solubilidad de saturación y la velocidad de disolución demostraron que la tecnología de nanocristales tenía el potencial de mejorar la absorción oral de AmB y aumentar las concentraciones de fármaco en plasma (Yang et al., 2014). En 2012 este mismo investigador publicó sus estudios de encapsulación de AmB usando partículas cristalinas líquidas nanoestructuradas o cubosomas, para entonces Yang et al. expresaron “los cubosomas podrían mejorar efectivamente la biodisponibilidad del fármaco tras la administración oral. Los cubosomas cargados de AmB mostraron un progreso muy alto hacia el desarrollo de una formulación potencial para la administración oral, ya que la formulación cubosomal demostró efectividad para mejorar la biodisponibilidad oral de AmB y disminuir la nefrotoxicidad del fármaco.” [47]

Benincasa et al. publicaron acerca del uso y la funcionalización de los nanotubos de carbono por conjugación de AmB como una herramienta innovadora y eficiente para

mejorar la solubilidad, disminuir los efectos tóxicos y mejorar la actividad antifúngica. Los nanotubos de carbono mostraron una actividad antimicótica de amplio espectro contra cepas fúngicas clínicas, con valores de concentración inhibitoria mínima que oscilan entre 5 y 20 mg / ml, comparables a los de Fungizone. Los nanotubos de carbono conjugados con AmB ejercieron una marcada actividad antifúngica hacia cepas resistentes a AmB. [48]

Por su parte, Italia et al. publicaron en 2009 un método eficiente para la obtención de AmB encapsulando PLGA para administraciones orales empleando DMSO como co-solvente. La reducida toxicidad de las nanopartículas de AmB pudo deberse a la liberación gradual de la dosis de AmB incorporada a la formulación, o como resultado de una exposición reducida toda vez que las nanopartículas estaban secuestradas en los tejidos. [49]

Debido a que las micelas poliméricas son sistemas coloidales con tamaños menores a 100 nm, alta estabilidad coloidal y mecanismos sencillos de encapsulación y liberación de fármacos, son candidatas promisorias para el desarrollo de formulaciones antimicóticas a partir de AmB [4]. En la mayoría de los sistemas reportados, los precursores poliméricos se componen de un segmento de PEG el cual, gracias a su hidrofiliidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y que no interactúa con proteínas, permite tiempos prolongados de circulación y alta estabilidad coloidal. Son varios los fragmentos que se han reportado como segmento hidrófobo. Por ejemplo, el uso de poli(propilenglicol) [50], poli(caprolactona-co-trimetilencarbonato) [5], poli(amino ácidos) tales como poli(acil-(N-hexil-l-aspartamida)) [51], poli(N-hexil-estearato L-aspartamida) (Lavasani, Samuel & Sattari, 2002), poli(l-histidina) [52] y fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina [9]. En todos los casos los autores reportan reducción en la toxicidad de la AmB en comparación con Fungizone®; sin embargo, los bajos porcentajes de encapsulación logrados son una de sus principales desventajas.

Dado su gran tamaño molecular y carácter anfifílico, la encapsulación de la AmB es menos favorable que para moléculas hidrófobas pequeñas [27]. Por tal razón, investigaciones recientes se han enfocado en diseñar núcleos micelares que presenten interacciones favorables con la AmB para así aumentar su solubilidad. Algunos reportes incluyen micelas obtenidas a partir de copolímeros de PEG y policarbonatos modificados con úrea y ácido fenil bórico [53], poli(2-etil-2-oxazolina)-b-poli(ácido aspártico) [54] y AmB conjugada con PEG [55], en los tres casos se aumenta la encapsulación y se reduce la toxicidad lo cual

presume interacciones favorables AmB - polímero. Sin embargo, dado que estos polímeros contienen grupos polares como promotores de la interacción con el fármaco, la reducción en la toxicidad no es consecuente con la supresión en la agregación de la AmB.

En un estudio reportado por Álvarez y colaboradores, el Fungizone® fue reformulado empleando 1,2-distearoil-n-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino (polietilenglicol)] (PEG-DSPE) copolímero anfifílico formado por PEG y DSPE que es un fosfolípido encontrado en las membranas celulares, los autores encontraron que al incrementar la cantidad de este copolímero disminuye la agregación de la AmB, lo cual repercute en reducir su toxicidad mientras que parámetros asociados con la actividad antifúngica tales como la concentración mínima inhibitoria permanecen inalterados [9]. En otro estudio, tomando como base que la AmB presenta interacciones favorables con esteroides como el colesterol [56]. Torrado y colaboradores demostraron que moléculas anfifílicas formadas por poli(etilenglicol) y ácido cólico presentan interacciones favorables con la AmB, con lo cual se incrementa significativamente su solubilidad, mientras que se reduce su toxicidad [21].

Teniendo en cuenta la manifiesta necesidad de obtener materiales poliméricos capaces de encapsular AmB de manera eficiente, previniendo su agregación y modulando su toxicidad, a continuación, se muestra la metodología empleada para la obtención de los sistemas micelares, las pruebas mediante las que se evaluaron los CAB, así como los materiales y reactivos necesarios para llevar a cabo la investigación.

2. Metodología

Los materiales poliméricos que se evaluarán son copolímeros anfifílicos en bloque (CAB) compuestos por un segmento hidrofílico de Polietilenglicol (PEG), con el fin de estudiar el efecto de la composición del segmento hidrofóbico se usaron dos tipos de bloques diferentes: Polilactida (PLA) y Policaprolactona (PCL) ambos de dos longitudes diferentes. También se evaluaron CAB (PEG-*b*-PCL) modificados mediante la inserción de un fosfolípido (DSPE) en el extremo terminal del segmento hidrofóbico. De manera similar se estudiaron CAB decorados con un número específico de biomoléculas como colesterol y ácido oleico.

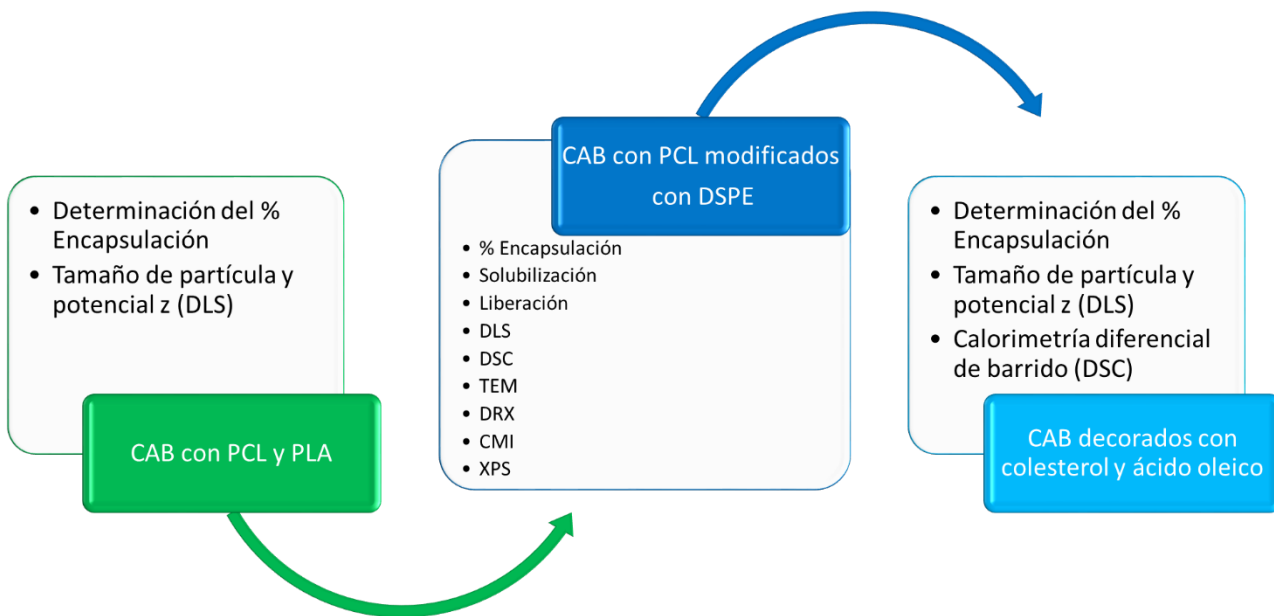
El diseño metodológico (Figura 2-1) usado para el desarrollo de la presente investigación se dividió en tres etapas, en la primera etapa se compararon los porcentajes de encapsulación de AmB en CAB compuestos por segmentos hidrofóbicos de naturaleza (PCL y PLA) y peso molecular diferente, se tuvo en cuenta tanto el porcentaje de encapsulación de AmB como el tamaño de las partículas obtenidas y el potencial ζ (DLS) para determinar cuáles eran los mejores sistemas poliméricos.

En la segunda etapa se prepararon nanopartículas cargadas con el fármaco usando los materiales poliméricos de mejor desempeño, obtenidos de la primera etapa, modificados con DSPE, estos fueron estudiados en cuanto a su capacidad de solubilizar, liberar y al comportamiento de agregación de AmB. Las nanopartículas poliméricas cargadas con AmB se caracterizaron empleando microscopía electrónica de transmisión (TEM) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). También les fue evaluada su actividad antifúngica por medio de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). De manera similar se evaluó su actividad hemolítica. El material polimérico que presentó el mejor

desempeño fue estudiado por medio de espectrometría de fotoelectrones inducida por rayos X (XPS).

Teniendo en cuenta los resultados derivados de la segunda etapa y con el fin de establecer el efecto de la adición de biomoléculas en los CAB se estudió el porcentaje de encapsulación de AmB, DSC y DLS luego de la adición de un número controlado de moléculas como colesterol y ácido oleico.

Figura 2-1: Esquema general del diseño metodológico.



2.1 Materiales

Todos los copolímeros usados en la presente investigación fueron obtenidos de la etapa inicial del proyecto financiado por Colciencias “Diseño de formulaciones orales de Anfotericina B encapsulada en nanopartículas poliméricas biodegradables y su eficacia frente a levaduras multi-drogo resistentes: Una aproximación a partir de las interacciones fármaco – polímero”.

Pese a que la síntesis de los CAB no es uno de los objetivos de la presente investigación, a continuación se describe brevemente el procedimiento seguido para su obtención: los

materiales poliméricos se sinterizaron empleando polimerización por apertura de anillo (ROP), usando mPEG de 5kDa como iniciador. El peso molecular del segmento hidrófobo se determinó a través de la relación $[\text{monómero}]_0/[\text{PEG}]$. Estos materiales se modificaron con biomoléculas empleando diversas estrategias sintéticas. La conjugación con DSPE se realizó empleando amidación por medio de agentes de acople. Mientras que el ácido oleico y colesterol, previamente modificados con grupos azida terminal, fueron injertados mediante química “click”. El esquema de reacciones seguidas para la obtención de los materiales poliméricos de partida puede ser consultado en los anexos A y B.

En la Tabla 2-1 se muestra la composición, código, peso molecular (Mn) e índice de dispersión para cada uno de los materiales poliméricos estudiados. Todos los materiales poliméricos tenían un segmento hidrofílico compuesto por polietilenglicol (PEG) de 5 KDa de longitud, seguido de un segmento de carácter hidrofóbico que puede ser policaprolactona (PCL) ó polilactida (PLA) de dos longitudes diferentes. En algunos materiales poliméricos se observa un número que precede cada letra, este corresponde al número de unidades de propargilo (Carbono triple enlace carbono) presentes en el segmento terminal de la cadena. Como segmento terminal de cada material polimérico se puede tener: Colesterol, ácido oleico ó 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina

Tabla 2-1: Composición, código asignado, peso molecular (Mn) e índice de dispersión de los materiales poliméricos estudiados.

Composición Material Polimérico	Código Asignado	Peso molecular (Mn)	Índice de dispersión
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₇₅	A	15,0	1,070
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₆	B	13,5	1,150
m(PEG) ₁₂₁ -b-(LA) ₃₅	C	9,5	1,069
m(PEG) ₁₂₁ -b-(LA) ₂₁	D	9,2	1,043
m(PEG) ₁₂₁ -DSPE	E	8,7	1,022
m(PEG) ₁₂₁ -b-((PCL) ₄₃ -co-P(MCP) ₁)	A1	10,4	1,10
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₄₂ -co-(P(MCP) ₃)	A3	14,6	1,16
m(PEG) ₁₂₁ -b-P(CL) ₄₃ -co-P(MCP) ₅)	A5	15,4	1,17
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₄₃ -co-(P(MCP) ₁ -g-(Colesterol) ₁)	A1C	12,9	1,09
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₄₂ -co-(MCP) ₃ -g-(Colesterol) ₃	A3C	14,3	1,10
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₄₃ -co-(MCP) ₅ -g-(Colesterol) ₅	A5C	14,2	1,13
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₄₃ -co-(P(MCP) ₁ -g-(Oleico) ₁)	A1O	12,3	1,09

m(PEG) ₁₂₁ - <i>b</i> -(PCL) ₄₂ - <i>co</i> -P((MCP) ₃ - <i>g</i> -(Oleico) ₃)	A3O	14,1	1,13
m(PEG) ₁₂₁ - <i>b</i> -P(CL) ₄₃ - <i>co</i> -P((MCP) ₅ - <i>g</i> -(Oleico) ₅)	A5O	10,0	1,21
m(PEG) ₁₂₁ - <i>b</i> -(PCL) ₂₃ - <i>co</i> -(P(MCP) ₁)	B1	14,7	1,25
m(PEG) ₁₂₁ - <i>b</i> -(PCL) ₂₃ - <i>co</i> -(P(MCP) ₃)	B3	12,4	1,09
m(PEG) ₁₂₁ - <i>b</i> -(PCL) ₂₃ - <i>co</i> -(P(MCP) ₅)	B5	13,8	1,21
m(PEG) ₁₂₁ - <i>b</i> -(PCL) ₂₃ - <i>co</i> -(P(MCP) ₁ - <i>g</i> -(Colesterol) ₁)	B1C	15,1	1,31
m(PEG) ₁₂₁ - <i>b</i> -(PCL) ₂₃ - <i>co</i> -(P(MCP) ₃ - <i>g</i> -(Colesterol) ₃)	B3C	21,4	1,36
m(PEG) ₁₂₁ - <i>b</i> -(PCL) ₂₃ - <i>co</i> -(P(MCP) ₅ - <i>g</i> -(Colesterol) ₅)	B5C	16,4	1,29
m(PEG) ₁₂₁ - <i>b</i> -(PCL) ₂₃ - <i>co</i> -(P(MCP) ₁ - <i>g</i> -(Oleico) ₁)	B1O	13,6	1,34
m(PEG) ₁₂₁ - <i>b</i> -(PCL) ₂₃ - <i>co</i> -(P(MCP) ₃ - <i>g</i> -(Oleico) ₃)	B3O	13,7	1,19
m(PEG) ₁₂₁ - <i>b</i> -(PCL) ₂₃ - <i>co</i> -(P(MCP) ₅ - <i>g</i> -(Oleico) ₅)	B5O	10,4	1,12

El tetrahidrofurano-THF ($\geq 99,8\%$) y la acetona ($>99,0\%$) fueron adquiridos comercialmente con Merck. Tanto el metanol ($\geq 99,5\%$) como el dimetilsulfóxido ($\geq 99,0\%$) fueron adquiridos con Pan Reac. El estándar de AmB usado para la preparación de los sistemas micelares fue adquirido con Sigma Aldrich.

2.2 Preparación de sistemas micelares

Las nanopartículas poliméricas cargadas con AmB se obtuvieron empleando el método de nanoprecipitación, partiendo de procedimientos previamente reportado por el grupo de Macromoléculas [27], [57], con algunas modificaciones. En primer lugar, se preparó la fase orgánica en la cual se encuentra disuelta la AmB y el copolímero correspondiente. Para la obtención de esta fase, una disolución de 2 mg/mL del copolímero en THF se goteó a una disolución metanólica de AmB con concentración 0,1 mg/mL. Esta disolución se agitó, permitiendo que se evapore un volumen de solvente equivalente al THF empleado. La fase orgánica resultante se goteó en un vaso de precipitado que contenía 25 mL de agua destilada bajo agitación constante se sometió a agitación con el fin de promover la formación de las micelas cargadas con AmB. Posteriormente, la dispersión resultante se centrifugó por 30 minutos a 4400 rpm con el fin de precipitar la AmB que no se hubiera unido al núcleo micelar y por último fueron sometidas a liofilización. La concentración de

AmB solubilizada en el núcleo de las micelas fue cuantificada por espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 406 nm.

2.3 Evaluación de sistemas micelares

Los sistemas micelares cargados con AmB fueron evaluados en cuanto al % de encapsulación, diámetro hidrodinámico y potencial ζ , también en cuanto a su capacidad de solubilizar, liberar y modular la agregación de AmB. Les fueron determinadas sus propiedades térmicas por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC), la morfología de la superficie micelar fue estudiada por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM). De manera similar se evaluó su capacidad antifúngica mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

2.3.1 Determinación del porcentaje de encapsulación

Para determinar el porcentaje de encapsulación de AmB para cada uno de los copolímeros estudiados se usó la siguiente formula:

$$\% \text{ capacidad de carga} = \frac{\text{mg de AmB en la micela}}{\text{mg de liofilizado}} \times 100$$

(2.1)

Para tal fin, se prepararon muestras de liofilizado de 0,1 mg/mL en metanol. De manera similar, se preparó una curva de calibración con un estándar de AmB en metanol. Se hicieron lecturas para los siguientes niveles de concentración de la solución estándar: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0 y 5,0 mg de AmB/L). Todas las mediciones de hicieron por triplicado.

De manera similar el porcentaje de eficiencia de encapsulación de calculó por medio de la ecuación mostrada a continuación:

$$\% \text{ eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{mg de AmB en la micela}}{\text{Contenido teórico} \left(\frac{\text{mg AmB}}{\text{mg Copolímero}} \right)} \times 100 \quad (2.2)$$

2.3.2 Determinación de tamaño de partícula

Con el fin de realizar las determinaciones de diámetro hidrodinámico se tomó 1 mL de cada una de las soluciones obtenidas en el numeral 2.2.1. antes del proceso de liofilización y se diluyeron con agua destilada hasta 25 mL (solución A). Para la determinación de potencial zeta se tomó 1 mL de la solución A y se agregó 1 mL de una solución 0,1 mM de NaCl. El equipo usado para estas mediciones fue un DLS, Litesizer 500, Anton Paar.

2.3.3 Ensayo de solubilización

La solubilización de la AmB en sistemas micelares se evaluó, disolviendo una cantidad constante de AmB en dispersiones micelares de cada uno de los copolímeros con diferente concentración. Para esto, a diferentes cantidades de copolímero en solución (disuelto en THF) les fue añadida la misma cantidad de una solución metanólica de AmB (50 ppm). De cada una de las soluciones se tomaron 5 mL y se llevaron a vasos de precipitado que contenían 5 mL de agua, estas soluciones fueron sometidas a agitación. Las muestras obtenidas fueron llevadas a tubos falcon, centrifugadas por 1 hora y filtradas usando papel filtro Watman No. 4, para separar la AmB que no se hubiera solubilizado. De cada solución filtrada se tomaron 2 mL y se agregaron 2 mL de MeOH, se centrifugó por 10 min. El sobrenadante fue analizado por UV-vis, a una longitud de onda de 406 nm, para así evaluar la concentración de AmB solubilizada con respecto al cambio en la concentración de polímero.

2.3.4 Estudio de liberación de AmB

Se pesaron cerca de 1 mg de cada liofilizado obtenido del procedimiento de preparación de sistemas micelares (numeral 2.2.) en tubos de ensayo. El liofilizado se redispersó mediante la adición de 2 mL de agua y empleando un homogenizador vortex por 1 min, luego se sometieron a ultrasonido por 15 minutos. Cada muestra fue depositada en un tubo que tenía en el extremo una membrana de diálisis Zellutrans MWCO de 3,500, y luego fueron puestos por separado en frascos bajo agitación y 37° C de temperatura en presencia de 15 mL de medio de liberación. El medio de liberación consistía en una solución 2:1 (v/v) de dioxicolato de sodio (DNa) y dimetilsulfóxido (DMSO). Se tomaron alícuotas de 1 mL luego de 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72, 100, 120 y 144 horas de comenzado el análisis, haciéndose la respectiva reposición de medio.

Las muestras tomadas fueron analizadas usando un espectrofotómetro UV-vis. Para esto, se realizó un barrido entre 300 y 500 nm.

Para realizar el análisis de la liberación se graficaron los resultados obtenidos teniendo en cuenta las ecuaciones propuestas en el numeral 1.5.1. y se tomaron los datos de coeficiente de correlación (R^2) y pendiente de la recta.

2.3.5 Estudio de agregación

Se estudió la agregación de AmB en las micelas poliméricas por medio de espectrofotometría UV-vis. Las dispersiones fueron diluidas en buffer de fosfatos a un pH de 7,4 (PBS) y Metanol y analizadas en un rango de 300 a 450 nm usando un espectrofotómetro UV-vis Evolution 300. La concentración final de las soluciones fue 3,0 $\mu\text{g/mL}$.

2.3.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El método empleado para conocer las propiedades térmicas de los sistemas micelares cargados con AmB fue: enfriar desde temperatura ambiente hasta -60°C a una velocidad de 10°C/min . Luego, y por espacio de 10 min se mantuvo la temperatura a -60°C . Por último, se calentó la muestra hasta 150°C a una velocidad de 10°C/min . Para estas mediciones se utilizó un DSC Mettler Toledo DSC 1 STAR System.

2.3.7 Difracción de Rayos X (DRX)

Los experimentos de difracción de rayos X se llevaron a cabo en un equipo X'pert de marca Panalytical con un tubo anódico de cobre de longitud de onda $\lambda = 0,154\text{ nm}$. Un tiempo de recolección de 1s por paso, con un barrido desde 2° hasta $50^\circ 2\theta$, un incremento de $0,1^\circ$ y una abertura del detector de $0,5^\circ$.

2.3.8 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El estudio de la morfología del material polimérico cargado con AmB se realizó utilizando un microscopio electrónico de barrido TESCAN. Para esto, se prepararon muestras de 0,2 mg/mL usando agua destilada como solvente. Estas muestras fueron sometidas a ultrasonido y agitación. Se tomaron 3 μL de cada muestra y se depositaron en una rejilla

de cobre recubierta con una película de formvar (grid), permitiendo que la muestra se seque sobre el grid luego de 48 h.

2.3.9 Espectrometría de fotoelectrones inducida por rayos X (XPS)

La espectroscopía de fotoelectrones por rayos X fue usada para determinar composición superficial de los macroiniciadores. Las mediciones fueron hechas en un espectrómetro equipado con un detector PHOIBOS 150 1-D y una fuente monocromática de rayos X de A1-K α (1486.7 eV, 13 kV, 100 W)

2.3.10 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se realizó una prueba de susceptibilidad antifúngica de acuerdo con el método de microdilución en caldo (DMO) del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) siguiendo las pautas M27-A3 [58]. Se evaluaron las diluciones de los copolímeros y Fungizone® con concentraciones de AmB en el rango de 0,11 a 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las CMI se determinaron visualmente después de 24 h como la concentración más baja de fármaco que puede causar una disminución considerable en relación con el control del crecimiento sin fármaco. Las CMI se determinaron visualmente y se respaldaron mediante mediciones de absorbancia, que se determinó por espectrofotometría a 600 nm. Los valores obtenidos en esta fase se corroboraron adicionalmente empleando resazurina (7 mM) como indicador redox. La resazurina es un compuesto azul no tóxico permeable a las células y no fluoresce. Al ingresar a las células vivas, la resazurina se reduce a resorufina, un compuesto de color violeta a rosado y altamente fluorescente [59].

2.3.11 Hemólisis

El estudio de hemólisis se realizó siguiendo un protocolo publicado por Villamil y colaboradores [7]. La sangre tomada de donadores O+ fue adicionada a una solución de EDTA 1 mM y luego centrifugada a 500xg por 5 minutos para separar los glóbulos rojos (GR). Los GR recolectados fueron lavados dos veces con una solución buffer de fosfatos de pH 7,4 (PBS) y diluidos con el mismo buffer hasta obtener una absorbancia de 0,5 UA a 540 nm. Luego 190 μL de la dispersión de GR fueron tratados con 10 μL de una solución del material a evaluar. El PBS fue usado como control negativo mientras que en presencia

de Triton X-100 se garantiza la hemólisis completa de los glóbulos rojos. Las soluciones de GR tratadas fueron incubadas a 37°C bajo agitación continua por 1 hora. Posteriormente, la placa se centrifugó a 500xg por 5 minutos para separar los glóbulos rojos no lisados. El porcentaje de hemólisis se determinó midiendo la absorbancia de la hemoglobina en solución a 541 nm como se muestra a continuación:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{A_S - A_{NC}}{A_{PC} - A_{NC}} \times 100 \quad (2.3)$$

Donde, A_S es la absorbancia de los GR tratados con el fármaco, A_{NC} y A_{PC} son los valores de absorbancia del control negativo y positivo, respectivamente.

3. Efecto de la composición de CBAs como vehículos de AmB

Esta investigación contempla, inicialmente, la comparación de dos copolímeros diferentes (PEG-*b*-PCL y el PEG-*b*-PLA) como posibles vehículos de AmB. Aun cuando ambos copolímeros comparten características similares, como ser semicritalinos y tener segmentos hidrófobos de tipo poliéster, exhiben diferencias como su polaridad y rigidez molecular. Posteriormente, el mejor segmento hidrófobo se evaluó conjugado con biomoléculas en el segmento hidrófobo del CAB que de acuerdo a sus características estructurales y reportes previos podrían presentar interacciones favorables con la AmB permitiéndose su encapsulación.

En primera instancia se evaluaron copolímeros dibloque de diferente longitud de segmento hidrofóbico conjugados con DSPE en el extremo terminal de dicho segmento, para esto se comparó su capacidad de encapsular AmB y liberarla de manera controlada, su comportamiento térmico, morfología, tamaño de partícula, potencial ζ y actividad antifúngica. Los resultados observados con los CAB conjugados con DSPE se contrastaron con los que se obtuvieron empleando el correspondiente CAB y con PEG conjugado con DSPE.

Posteriormente, se estudió el efecto de conjugar CAB (PEG-*b*-PCL) de diferentes pesos moleculares de segmento hidrófobo con un numero controlado de moléculas de colesterol y ácido oleico. Se discutieron los resultados de % de encapsulación, comportamiento térmico, tamaño de partícula y potencial ζ obtenidos.

3.1 Porcentaje de encapsulación de CAB

Dado que la AmB es una sustancia que presenta carácter anfifílico y que además tiene un gran tamaño molecular, su encapsulación en matrices poliméricas es poco eficiente, pese a que atenúe su toxicidad y le provean liberación controlada, esta característica limita la traslación de los sistemas desarrollados a estudios clínicos. Por esta razón, la capacidad de los sistemas micelares de encapsular AmB es una característica esencial para evaluar su conveniencia como vehículos. En este estudio, inicialmente se comparó sistemas micelares obtenidos a partir de copolímeros compuestos por PEG y segmentos hidrófobos

de PCL y PLA de dos pesos moleculares en cuanto a su capacidad de encapsular AmB (ecuaciones 2.1 y 2.2) obteniéndose los valores que se muestran en la Tabla 3-1. Las diferencias observadas en los materiales empleados se analizan a continuación en términos de la longitud del segmento hidrófobo y de su composición.

Tabla 3-1: Composición, código, porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación para copolímeros de distinta composición y longitud.

Composición Material Polimérico	Código Asignado	% Carga	Eficiencia de encapsulación (%)
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₇₅	A	8,37 ± 0,34	30,81 ± 1,27
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₆	B	10,62 ± 0,78	40,43 ± 1,75
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PLA) ₃₅	C	5,88 ± 0,17	22,60 ± 0,64
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PLA) ₂₁	D	7,49 ± 0,14	28,96 ± 0,56

3.1.1 Efecto de la longitud del segmento hidrófobo

El efecto de la longitud del segmento hidrófobo sobre la capacidad de las micelas poliméricas de encapsular AmB se analizó tomando como referencia la Teoría de Flory-Huggins, la cual provee un modelo termodinámico para predecir la solubilidad de un polímero a partir de sus interacciones con el solvente [60]. Dado que los fármacos por su tamaño molecular podrían compararse a las moléculas de solvente, la teoría de Flory-Huggins podría aplicarse para analizar su solubilidad en una matriz polimérica [60]. El cambio de energía libre de Gibbs, que determina la espontaneidad del proceso, se escribe como:

$$\Delta G_m = RT [n_1 \ln \phi_1 + n_2 \ln \phi_2 + n_1 \phi_2 \chi] \quad (3.1)$$

Donde: n_1 y n_2 son las moles de disolvente y polímero respectivamente.

ϕ_1 y ϕ_2 son las fracciones molares de los componentes de la solución.

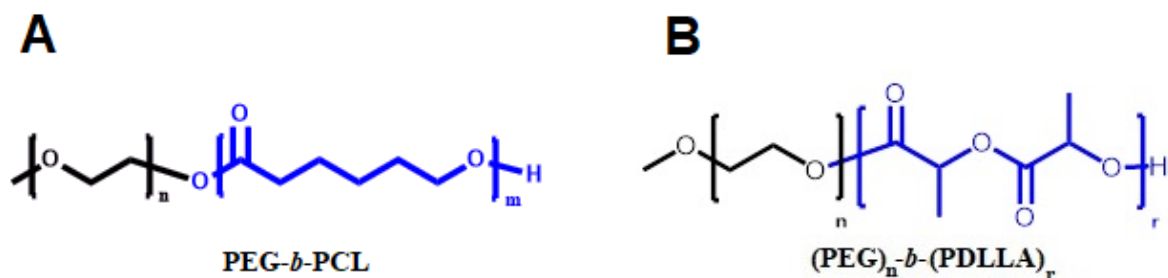
χ es el parámetro de interacción de Flory-Huggins.

En consecuencia, si tomamos como sistema una micela polimérica de volumen fijo formada a partir de cada uno de los CBA, para los materiales de menor peso molecular (B y D) se tendrá un número mayor de moles (n_2) y por ende la solubilización de la AmB será más favorable. A partir de la estructura de los polímeros y la AmB, se puede inferir un parámetro de interacción (χ) superior a 0.5, que denota interacciones químicas débiles, por tanto la solubilidad de la AmB es determinada por la entropía del sistema. El comportamiento predicho por este modelo se corrobora con los mayores porcentajes de encapsulación de AmB en copolímeros de menor longitud de segmento hidrófobo (3KDa) de acuerdo con la Tabla 3.1. La misma tendencia se obtuvo en el caso de PCL y PLA.

3.1.2 Efecto de la composición del segmento hidrófobo

Los copolímeros constituidos por bloques lineales como el PEG y el PCL o con grupo laterales pequeños como el PLA pueden formar dominios cristalinos, siendo de mayor interés el comportamiento del segmento hidrófobo ya que ello determinará su capacidad de encapsular fármacos hidrófobos [61]. Ambos el PCL y el PLA (pese a que este último se obtuvo como una mezcla racémica) son semicristalinos, por lo cual sus segmentos tienden a plegarse en el núcleo micelar formando estructuras regulares (Figura 3-1). En presencia de la AmB, las cadenas de estos polímeros requieren adoptar nuevas conformaciones, incrementando el volumen libre y por ende promoviendo la retención del fármaco. De acuerdo con los resultados dados en la Tabla 3-1, el segmento de PLA, que de acuerdo con su valor de T_g (60°C frente a -60°C para PCL), es más rígido que el PCL, presenta para ambos pesos moleculares menores porcentaje de encapsulación. Este resultado sugiere que segmentos hidrofóbicos flexibles favorecen la encapsulación de AmB.

Figura 3-1: Estructuras de CAB compuestos por segmentos de PCL (A) y PLA (B)



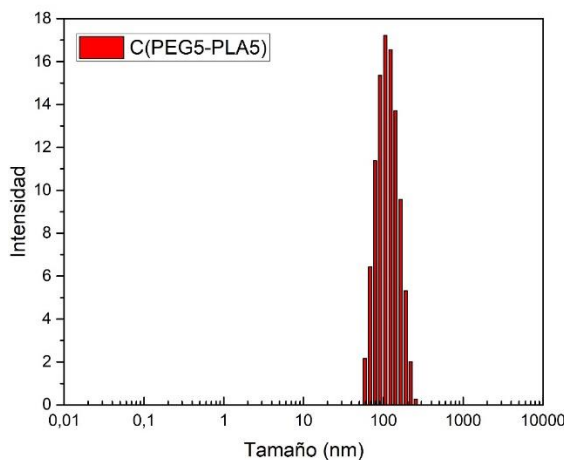
3.1.3 Tamaño de Partícula y Potencial ζ

El diámetro hidrodinámico (D_h) de las nanopartículas de CAB cargadas con AmB se estudió empleando dispersión dinámica de luz (DLS) para obtener los valores listados en la Tabla 3-2. Las muestras analizadas exhibieron distribuciones de unimodales (Figura 3-2). Los copolímeros de ambos segmentos hidrófobos de menor peso molecular exhibieron los menores tamaños de partícula, en tanto a mayor peso molecular este valor fue superior a 200 nm. Por su parte, el índice de polidispersidad (PDI) para todas las muestras fue inferior a 0,37, sugiriendo distribuciones estrechas en el tamaño de las micelas [22]. El menor tamaño de las micelas obtenidas a partir de copolímeros de menor peso molecular sugiere que los segmentos hidrófobos cortos pueden reacomodarse más fácilmente en el núcleo micelar dando lugar a un mejor empaquetamiento.

Tabla 3-2: Promedio, PDI para Diámetro hidrodinámico (D_h) y potencial ζ de CAB A, B, C y D, a un pH de 6,9.

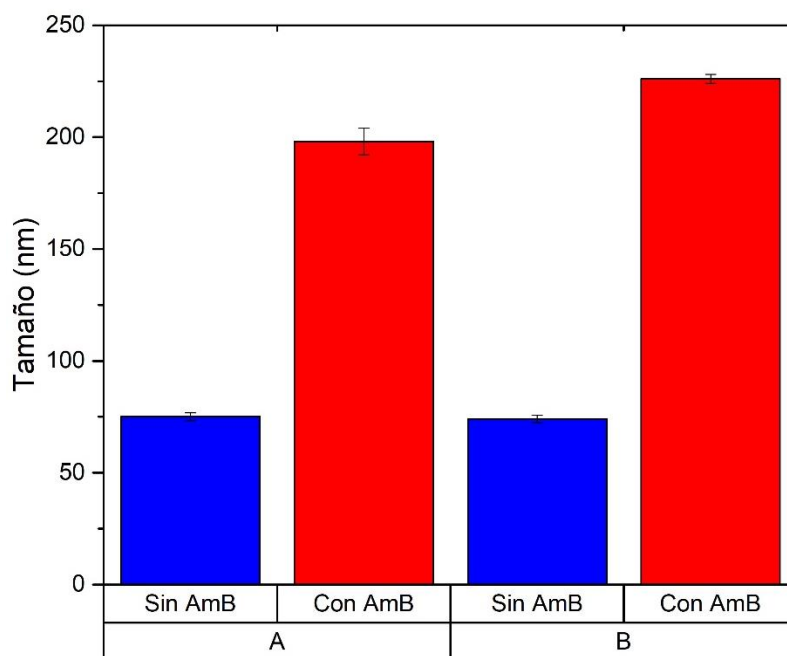
Muestra	Composición Material Polimérico	Diámetro hidrodinámico (D_h) (nm)		Potencial ζ (mV)
		Promedio	PDI	
A	m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₇₅	205,7 ± 2,3	0,271	-4,19 ± 0,9
B	m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₆	198,1 ± 1,8	0,334	-3,05 ± 1,3
C	m(PEG) ₁₂₁ -b-(PLA) ₃₅	255,0 ± 8,3	0,180	-18,80 ± 0,4
D	m(PEG) ₁₂₁ -b-(PLA) ₂₁	112,1 ± 1,0	0,364	-11,00 ± 0,7

Figura 3-2: Análisis de diámetro hidrodinámico (D_h) por DLS del copolímero C.



Aunque en la literatura poco se ha discutido sobre el mecanismo de formación de micelas poliméricas en presencia de un fármaco anfifílico como la AmB, por analogía a los procesos de cristalización, es de esperarse que se presente una nucleación heterogénea, en donde la AmB actúa como núcleo para el crecimiento de las nanopartículas micelares. La Figura 3-3 compara el diámetro de agregados micelares y las correspondientes partículas cargadas con AmB, se observa que en presencia del fármaco su diámetro incrementa significativamente, lo cual corrobora que la AmB afecta tanto su formación como la dinámica de cadenas poliméricas involucradas.

Figura 3-3: Tamaño de Dh para copolímeros en bloque A y B con y sin AmB.



El potencial ζ medido mediante la técnica de movilidad electroforética para cada una de las dispersiones micelares se muestra en la Tabla 3-2. Mientras que los copolímeros que contiene PCL presentan valores cercano a cero, que se correlacionan con superficies eléctricamente neutras, en presencia de PLA el potencial ζ presenta valores negativos, sugiriendo o que bien, la AmB en este tipo de nanopartícula está expuesta a la interface con agua o que las cadenas de PLA debido a que son propensas a la hidrólisis, podrían estar terminadas en grupos carboxilato. En ambos casos, los valores de potencial ζ

pequeños en magnitud, indican que interacciones de tipo estérico son las principales responsables de mantener la estabilidad en los agregados micelares.

Como se mencionó antes, la espontaneidad del proceso de solubilización de la AmB en núcleos micelares y por ende la eficiencia de encapsulación podría incrementarse o bien reduciendo el peso molecular de los copolímeros (incremento de entropía), lo cual podría acarrear que los sistemas micelares sean menos estables frente a la dilución, ya que no solo el valor de su concentración micelar crítica se reduce a bajos pesos moleculares, si no también se favorecería cinéticamente su disolución. Como alternativa, los núcleos micelares pueden modificarse con compuestos que presenten interacciones químicas favorables con la AmB y por ende si analizamos el sistema en el marco teórico del modelo de Flory-Huggins, se reduciría la magnitud del parámetro de interacción, lo cual favorece la espontaneidad. Los segmentos de naturaleza hidrófoba, PCL y PLA, cuyas cadenas se encuentran conformadas por poliésteres no polares no interactúan de manera favorable con la AmB. Por esta razón, con el fin de incrementar los porcentajes de encapsulación obtenidos para los copolímeros estudiados inicialmente, se evaluaron materiales poliméricos modificados con biomoléculas que se presume tendrían interacciones favorables con la AmB. Estudios previos han demostrado que cuando copolímero en bloque mPEG-*b*-PCL se modifican con colesterol, se incrementa su capacidad de encapsular AmB [7]. En estudios más recientes, se encontró una tendencia similar para copolímeros de tipo AB y ABA conjugados con biomoléculas como retinol y colesterol [8].

Teniendo en cuenta que los copolímeros PEG-*b*-PCL fueron los que mostraron mejores porcentajes de encapsulación y con el fin de demostrar que el desempeño de los CAB como vehículos nanoestructurados de AmB está estrechamente relacionado con la composición química de los precursores poliméricos, se caracterizaron CAB de tipo PEG-*b*-PCL de dos longitudes de segmento hidrófobo conjugados con moléculas de 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE). El DSPE de acuerdo a estudios previos, forma estructuras autoensambladas con la AmB cuando se encuentra en membranas celulares simuladas. Así mismo, estudios computacionales que se llevan a cabo en el proyecto de investigación en el cual se enmarcan el presente estudio corroboran que entre la AmB y el DSPE (que también es anfifílico) además de interacciones hidrofóbicas es posible que se presenten interacciones de mayor magnitud como los son enlaces de hidrógeno.

En el Anexo A3 se muestra el esquema de reacciones seguido para la obtención de los materiales poliméricos. Los materiales fueron obtenidos mediante la técnica de polimerización por apertura de anillo aniónica (AROP). La estructura de los materiales de mPEG-b-PCL fue modificada mediante una carboxilación, sucedida por una amidación activada por N,N'-diciohexilcarbodiimida con el fin de enlazar covalentemente el fosfolípido (DSPE) a la estructura [62].

En la Tabla 3-3 se muestra la composición, peso molecular e índice de dispersión de los materiales poliméricos que se evaluarán. El copolímero de código E se usó como material de referencia con el fin de comparar la influencia de la modificación de los materiales.

Tabla 3-3: Composición, peso molecular e índice de dispersión de copolímeros modificados.

Composición Material Polimérico	Código Asignado	Peso molecular (Mn)	Índice de dispersión
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₇₅	A	15,0	1,070
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₆	B	13,5	1,150
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₇₅ -DSPE	AE	15,7	1,131
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₆ -DSPE	BE	13,1	1,107
m(PEG) ₁₂₁ -DSPE	E	8,7	1,022

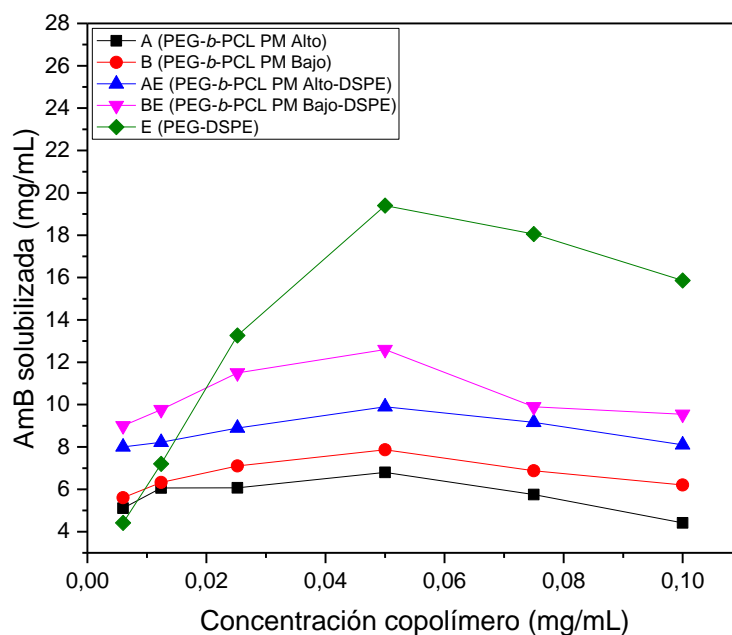
3.2 Evaluaciones de CABs conjugados con DSPE

Para realizar la caracterización de los CAB como vehículos de AmB se evaluó como primera medida la solubilización de AmB en dispersiones micelares de estos materiales poliméricos, luego se cuantificó la cantidad de AmB que cada CAB modificado podía encapsular. A continuación, se estudió el comportamiento de liberación de AmB desde los sistemas micelares evaluados. También se establecieron relaciones entre la estructura de los CAB y la agregación de AmB. Se estudiaron las propiedades térmicas de los copolímeros mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y su morfología por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Con el fin de establecer las interacciones fármaco polímero se realizaron análisis de Espectrometría de fotoelectrones inducida por rayos X (XPS) y por último se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las formulaciones resultantes.

3.2.1 Estudios de solubilización

Inicialmente, para la caracterización de CAB se estudió la cantidad de AmB que los copolímeros en bloque conjugados con DSPE podían solubilizar. Para esto, se usaron soluciones de diferente concentración de copolímero que fueron mezcladas con una solución metanólica de AmB de la misma concentración, estas soluciones fueron evaluadas en cuanto a su capacidad de captar AmB a través de la determinación de la concentración de dicho fármaco utilizando UV-vis previa centrifugación y filtración de la muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3-4.

Figura 3-4: Concentración de Anfotericina B (AmB) solubilizada (mg/mL) teniendo en cuenta la concentración de copolímero (mg/mL).



A partir de la Figura 3-4 se observa que cuando la concentración del polímero se aumenta hasta 0,05 mg/mL, la cantidad de AmB solubilizada incrementa, sin embargo aumentos superiores en la concentración del polímero conllevan a reducciones en la solubilidad del fármaco, resultados similares fueron obtenidos por Luengo-Alonso y colaboradores, quienes estudiaron la solubilidad de AmB en PEG_{5kDa}-OH y PEG_{5kDa}-Cholane y

adjudicaron la reducción en la solubilidad de la AmB al incremento en la viscosidad del medio causado por las concentraciones altas de los polímeros [21].

De acuerdo con los perfiles obtenidos, se puede inferir que en presencia de los CBA, la solubilidad de la AmB, que es un fármaco insoluble en agua a valores de pH cercanos la neutralidad, incrementa y que la magnitud del incremento depende de la característica del CBA. Mientras que los perfiles obtenidos para los materiales con diferente longitud de PCL no presentan diferencias importantes, tras su conjugación con DSPE se evidencia un incremento notorio en su capacidad de solubilizar AmB. Una muestra de PEG-DSPE empleada con fines comparativos presenta la mayor solubilización de la AmB, sin embargo, es de anotar que esta sustancia actúa como un surfactante probablemente estabilizando agregados de AmB dispersos en medio acuoso.

3.2.2 Determinación del porcentaje de encapsulación

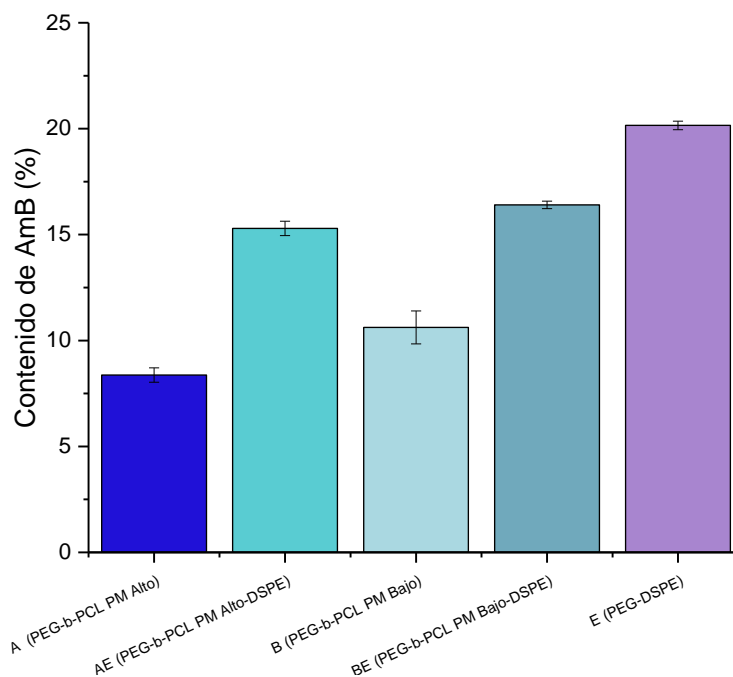
En aras de determinar la capacidad de cada uno de los materiales poliméricos de encapsular AmB, se prepararon formulaciones micelares a partir de cada CBA empleando el método de nanoprecipitación. Para ello se partió de una fase orgánica, la cual constó de AmB y el correspondiente CBA disueltos completamente en una mezcla de metanol y TFH. Esta solución se goteó sobre agua desionizada bajo constante agitación, posteriormente la fase orgánica se concentró dejando en dispersión partículas cargadas con AmB y agregados de este fármaco que se removieron por centrifugación y filtración. Las micelas cargadas con AmB se recuperaron por liofilización. Los porcentajes de encapsulación se determinaron por UV-vis obteniéndose los valores mostrados en la Tabla 3-4, estos valores también se comparan gráficamente en la Figura 3-5.

Tabla 3-4: Composición, código, porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación para copolímeros base y modificados con DSPE.

Composición Material Polimérico	Código Asignado	% Encapsulación	Eficiencia de encapsulación (%)
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₇₅	A	8,37 ± 0,34	30,81 ± 1,27
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₇₅ -DSPE	AE	15,29 ± 0,34	55,87 ± 1,23
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₆	B	10,62 ± 0,78	40,43 ± 1,75
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₆ -DSPE	BE	16,40 ± 0,18	58,86 ± 0,64
m(PEG) ₁₂₁ -DSPE	E	20,15 ± 0,20	70,43 ± 0,71

De acuerdo con los valores dados en la Tabla 3-3, se deduce que la capacidad de encapsulación se comporta de manera similar a los perfiles de solubilidad, tras la modificación de los copolímeros PEG-b-PCL con DSPE se incrementó de manera significativa la cantidad de AmB encapsulada y se mantiene la tendencia respecto al peso molecular del segmento hidrófobo (previamente descrito), los mayores porcentajes de encapsulación se obtuvieron para el copolímero con el menor peso molecular. En tanto la referencia PEG-DSPE presentó la mayor encapsulación.

Figura 3-5: Contenido de AmB para copolímeros base y modificados con DSPE.



Los comportamientos descritos ratifican que en presencia del DSPE se promueven interacciones favorables con la molécula de AmB lo que le permite a las micelas poliméricas encapsularla de manera más eficiente. Se observan diferencias significativas entre la capacidad de encapsulación de cada copolímero modificado con DSPE y el correspondiente precursor. Dada la naturaleza anfifílica de este tipo de fosfolípidos, se presumen que pueda interactuar con la AmB a través de fuerzas de Van der Waals que comprometen sus segmentos hidrocarbonados y los segmentos hidrófobos de la AmB, de

manera similar puede presentar interacciones polares tales como enlaces de hidrógeno entre los grupos fosfato del DSPE y la AmB (Figuras 3-6 y 3-7).

Figura 3-6: Estructura química de CAB de tipo PEG-*b*-PCL conjugado con DSPE.

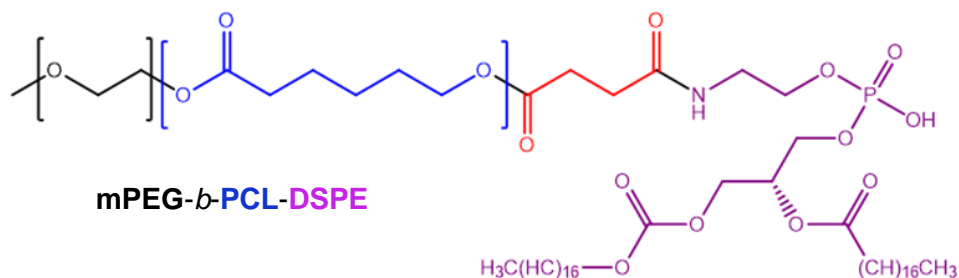
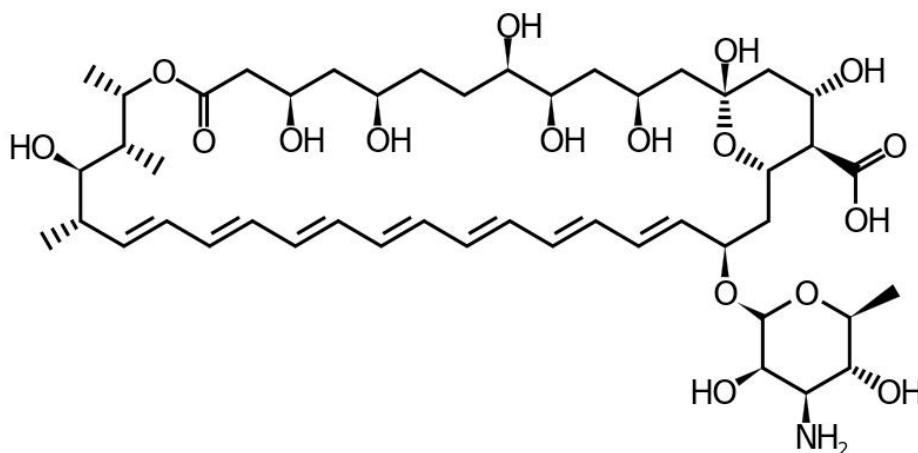


Figura 3-7: Estructura química de Anfotericina B (AmB).



El impacto de la magnitud de las interacciones entre las cadenas poliméricas conjugadas con DSPE y la AmB, puede ser interpretado en términos de la teoría de Flory-Huggins analizando el comportamiento del parámetro de interacción AmB-polímero (χ_{sp}) descrito en la ecuación (3.2) [63]:

$$\chi_{sp} = \frac{(\delta_S - \delta_P)^2 V_S}{RT} \quad (3.2)$$

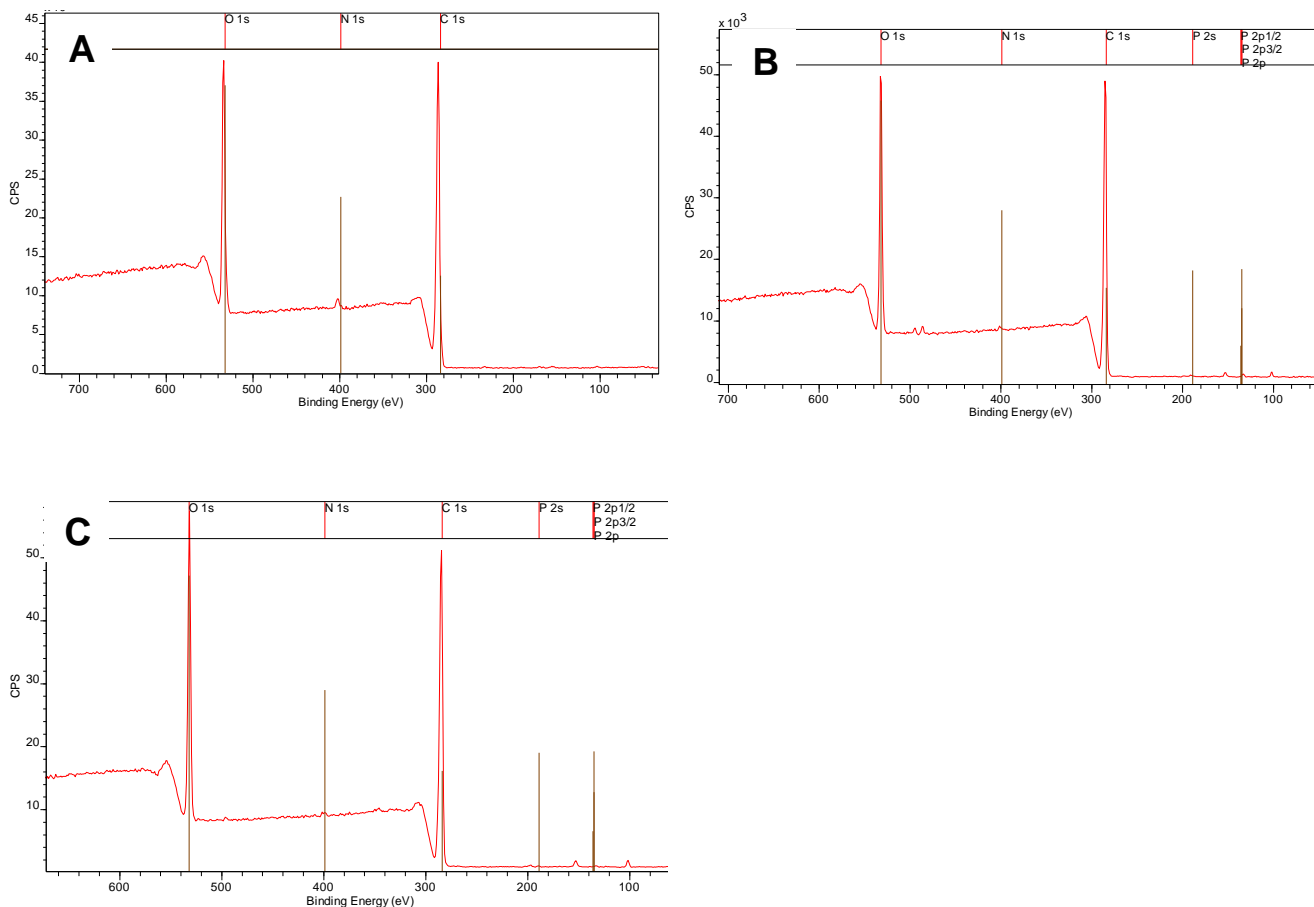
Donde, V_S es el volumen molar del soluto, R la constante universal de los gases, T la temperatura y δ_S y δ_P son los parámetros de solubilidad de Scatchard-Hildebrand del soluto y del segmento polimérico que forma el núcleo de la micela, respectivamente. Se

debe tener en cuenta que este parámetro según el modelo de Hansen [64] corresponde a la suma vectorial de tres parámetros relacionados con interacciones nopolares (fuerzas de dispersión), interacciones dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno ($\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2$). Debido a que tanto la AmB como el DSPE, pueden formar enlaces de hidrógenos, interacciones dipolo-dipolo y presentan dominios hidrófobos que favorecen interacciones no polares, se presume que presentan valores de parámetro de solubilidad cercanos, lo cual, de acuerdo con la ecuación 3.2, conduce a valores más pequeños de χ_{sp} que los polímeros no modificados, lo cual a su vez hace prever que se favorece la espontaneidad de la encapsulación de la AmB.

3.2.3 Caracterización de las formulaciones por espectrometría de fotoelectrones inducida por rayos X (XPS)

La muestra de copolímero BE (PEG-b-PCL de bajo peso molecular conjugado con DSPE), AmB y las correspondientes micelas cargadas con el fármaco se analizaron por XPS, obteniéndose los espectros que se presentan en la Figura 3-8. El espectro de cada una de las muestras presenta señales a energías de enlace características de cada uno de los elementos que las componen; en el caso de AmB, se observan señales a 532, 402 y 287 eV correspondientes a electrones del orbital 1s en los átomos de O, N y C, respectivamente. Así mismo, la muestra BE, además de las señales debidas a C, N y O, presenta una señal a 134 eV que corresponde a un electrón en el orbital 2p del fósforo. El espectro de las micelas cargadas con AmB presenta las señales descritas para uno de los componentes.

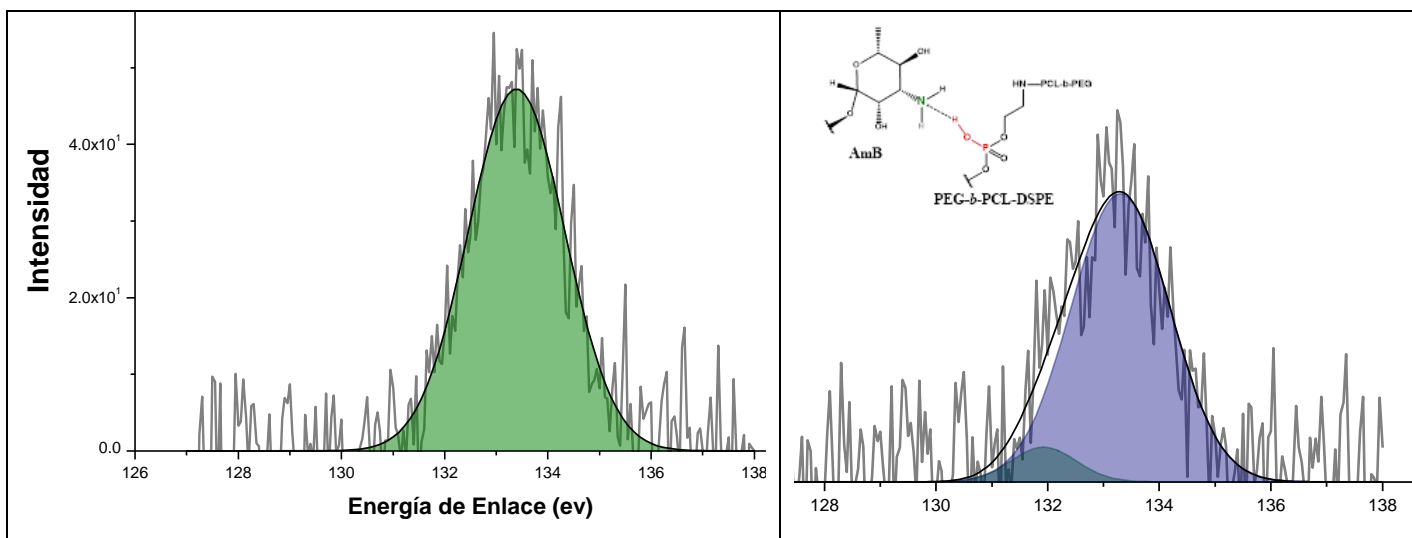
Figura 3-8: Espectro de fotoelectrones inducidos por rayos X de A. AmB, B. muestra BE y C. Formulación AmB/BE.



Con el fin de detectar posibles interacciones entre la AmB y el copolímero conjugado con DSPE, se comparó el espectro de alta resolución del fósforo en BE y el de las nanopartículas cargadas con AmB. La Figura 3-9 muestra los espectros y su ajuste a funciones gaussianas. Mientras el espectro del fósforo en BE se ajusta con un solo pico gaussiano, las micelas obtenidas a partir de este material y cargadas con AmB ajustan con dos picos, el más intenso centrado a 133 eV corresponde a la señal observada en BE, el segundo pico correspondiente a electrones con menor energía de enlace (132 eV) indica que en presencia de AmB para una pequeña fracción de los átomos de P, la energía de los orbitales 2p incrementa, sugiriendo un mayor apantallamiento de los electrones en este orbital que podría ser consecuencia del establecimiento de interacciones tipo enlace de hidrógeno y/o ácido base entre el grupo hidroxilo en el DSPE y el grupo amino en la AmB

quien actúa como donador de electrones, en la figura 3-8B se esquematiza el tipo de interacción que de acuerdo con los resultados de XPS se podría estar dando.

Figura 3-9: Espectro de alta resolución para los electrones 2p del fósforo A. BE y B. AmB/BE



3.2.4 Tamaño de partícula y potencial zeta de copolímeros modificados

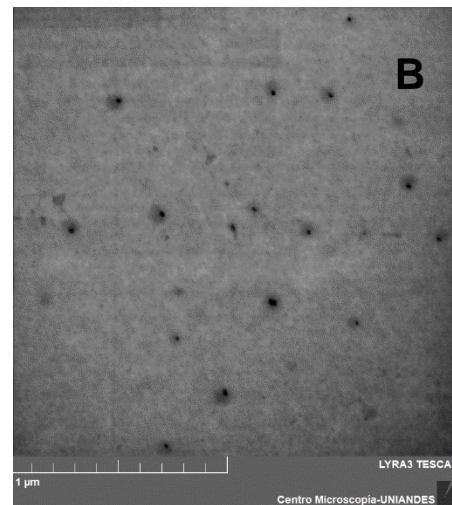
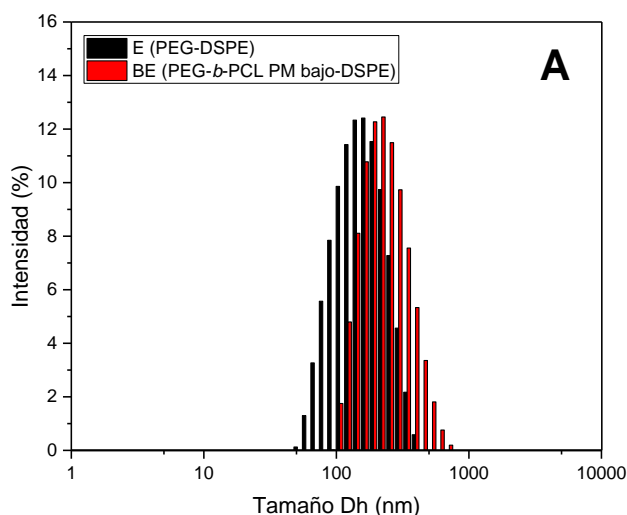
Los valores de diámetro hidrodinámico de las micelas poliméricas cargadas con AmB se estudiaron empleando dispersión dinámica de luz (DLS) y se obtuvieron los valores dados en la Tabla 3-5. Todas las muestras presentaron distribuciones unimodales como las que se muestran en la Figura 3-10. Se observó que el tamaño de las partículas obtenidas a partir de los CAB conjugados incrementa respecto a su precursor, lo cual podría deberse o bien al mayor contenido de fármaco encapsulado o a las repulsiones que se presentan en la corona de las micelas debidas a la presencia de grupos fosfato cargados.

Tabla 3-5: Promedio, Pdl para Diámetro hidrodinámico (Dh) y potencial Z de CAB A, B, AE, BE y E, a un pH de 6,9.

Muestra	Diámetro hidrodinámico (Dh) (nm)		Potencial Z (V)
	Promedio	Pdl	
A	198,1 ± 1,8	0,271	-4,19 ± 0,9
B	205,7 ± 2,3	0,334	-3,05 ± 1,3

AE	216,9 ± 2,1	0,267	-7,50 ± 1,98
BE	226,1 ± 5,9	0,250	-8,82 ± 0,06
E	149,0 ± 0,7	0,245	-10,40 ± 1,60

Figura 3-10: A. Diámetro hidrodinámico (nm) para CAB E y BE. **B.** Imagen TEM para partículas obtenidas por dilución directa de BE.



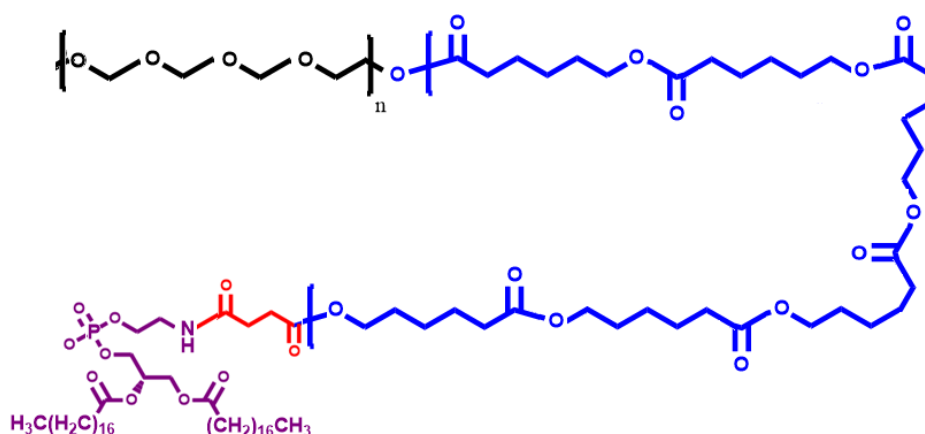
La imagen TEM del material polimérico BE evidenció la formación de nanoestructuras esféricas con distintos tamaños. La heterogeneidad en el tamaño observada a través de esta técnica puede explicarse por la concentración desigual del polímero después del secado de la muestra, así como por el estado sólido deshidratado de las partículas, lo que puede causar su agregación (Figura 3-10B).

Las dispersiones micelares cargadas con AmB fueron también caracterizadas a través de medidas de su potencial ζ , dando los valores que se listan en la Tabla 3-5. Mientras los copolímeros PEG-b-PCL exhiben valores cercanos a cero, tras su conjugación con DSPE, se tornan más negativos, siendo mayor el incremento para la muestra con PCL de menor peso molecular. Estos valores indican que en la superficie de las partículas que contienen DSPE se incrementa la cantidad de aniones. Las dispersiones coloidales con valores mayores de potencial zeta (negativos o positivos) tienden a tener mejor estabilidad contra la agregación [65]. En el caso de los copolímeros modificados con DSPE se presenta una

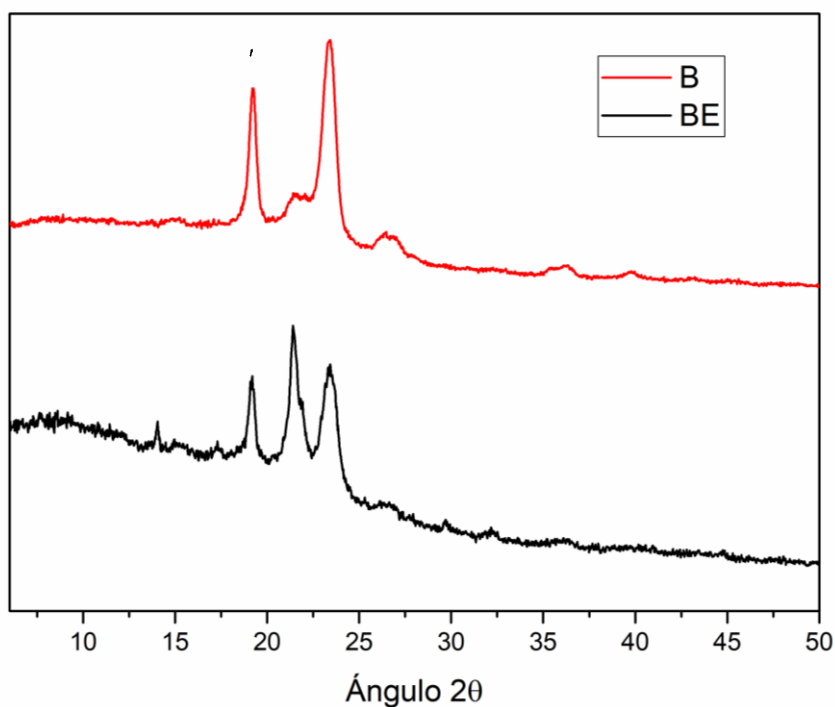
mayor repulsión entre las micelas. Este efecto podría conferirles a las nanopartículas que contienen DSPE mayor estabilidad coloidal.

La presencia de cargas negativas en la superficie podría deberse al plegamiento de los segmentos de PCL conjugado de tal modo que los grupos fosfato quedan expuestos a la interface con el agua, este fenómeno ha sido previamente descrito por otros autores [66] [67]. La Figura 3-11 esquematiza la estructura que de acuerdo al comportamiento del potencial ζ podrían tener las micelas.

Figura 3-11: Posible estructura individual-plegamiento de PCL en CAB



De acuerdo con la estructura propuesta, en presencia de DSPE, la PCL en las micelas poliméricas debería plegarse y por ende podrían generar arreglos cristalinos. Para demostrar esta hipótesis, se analizó por separado dos formulaciones liofilizadas obtenidas a partir de PEG-*b*-PCL de bajo peso molecular y el correspondiente material conjugado con DSPE y se obtuvieron los difractogramas que se presentan en la Figura 3-12. El perfil de difracción del PEG-PCL que exhibe picos de difracción asociados al PEG a valores de 2θ de 23° y 18° y un hombro pequeño a aproximadamente a 20° debido a nanodominios cristalinos de PCL, sugiere que, tras la liofilización, el PEG cristaliza, mientras que la PCL lo hace en una menor extensión, lo cual es una consecuencia de la presencia de la AmB. Por el contrario, en el perfil de las nanopartículas del mismo copolímero conjugado con DSPE se observa una intensificación del pico de difracción asociado a la PCL, sugiriendo que esta sustancia promueve el plegamiento de las cadenas de PCL y no afecta significativamente los microdominios del PEG. Estos resultados corroboran la estructura propuesta en la Figura 3-11.

Figura 3-12: Difractogramas de copolímeros B y BE

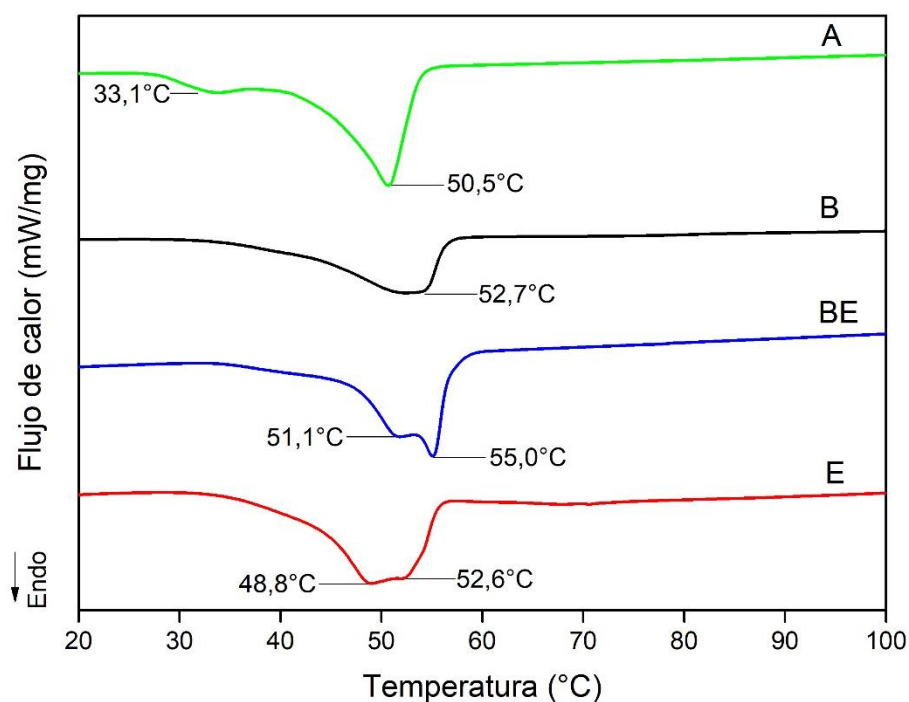
3.2.5 Caracterización de las propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de las nanopartículas poliméricas cargadas con AmB se caracterizaron empleando calorimetría diferencial de barrido [68]. Pese a que tanto el PEG como el PCL que son los componentes de los copolímeros a estudiar presentan su temperatura de fusión a valores cercanos (antes de 60°C), debido a interacciones con el fármaco pueden generarse algunas diferencias principalmente en la PCL.

Las formulaciones previamente liofilizadas se enfriaron hasta -20 °C y posteriormente se calentaron a 10 °C/min obteniéndose los termogramas mostrados en la Figura 3-13, de tal

modo que las propiedades determinadas (temperatura y entalpía de fusión) se encuentran relacionadas con la morfología de los copolímeros en las micelas poliméricas.

Figura 3-13: Termogramas DSC obtenidos para CAB A, B, BE y E



En el termograma correspondiente a la muestra A (PEG-b-PCL de alto peso molecular) se presenta dos picos endotérmicos, el primero más intenso a 50,5°C correspondiente a dominios de PEG, y uno de menor intensidad a 33,1°C que puede asignarse a arreglos cristalinos de PCL de espesor muy pequeño, corroborando que las micelas se componen de dominios segregados hidrófilo-hidrófobo. En el caso de la muestra B (PEG-b-PCL de bajo peso molecular) se presenta la fusión del PEG pero no se observa la fusión debida a la PCL, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por DRX. Por otro lado, cuando el copolímero es modificado con moléculas de DSPE (BE) se presentan dos arreglos

cristalinos distintos a los que se les atribuye picos de fusión en 51,1 y 55,0 °C, que en concordancia con los resultados de DRX podrían corresponder a los dominios de PEG y PCL.

De acuerdo con los resultados mostrados anteriormente, la entalpía de fusión para CAB B es menor a las obtenidas para los demás copolímeros, lo cual muestra que se requiere más energía para que la transformación de fase se lleve a cabo (Tabla 3-6).

En presencia de segmentos hidrofóbicos de PCL la modificación de CAB con moléculas como el DSPE no afecta la entalpía de fusión de forma considerable, este comportamiento se observa para ambas longitudes de segmento hidrófobo. Caso contrario se observa para el material de referencia E, para el que la ausencia de segmentos de PCL conlleva a un aumento en los picos de fusión lo que provoca que la energía necesaria para hacer que se dé un cambio de fase sea menor y por consiguiente se presente un aumento en la entalpía de fusión obtenida. Este comportamiento concuerda con el obtenido por Tinajero-Díaz quienes obtuvieron que la entalpía de fusión disminuye con el aumento de picos de fusión [69].

Tabla 3-6: Resultados de entalpías de fusión para CAB A, AE, B, BE y E

Código	Composición	ΔH_m (J/g)
A	m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₇₅	-86,9
AE	m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₇₅ -DSPE	-83,7
B	m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₆	-92,9
BE	m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₆ -DSPE	-89,2
E	m(PEG) ₁₂₁ -DSPE	-68,0

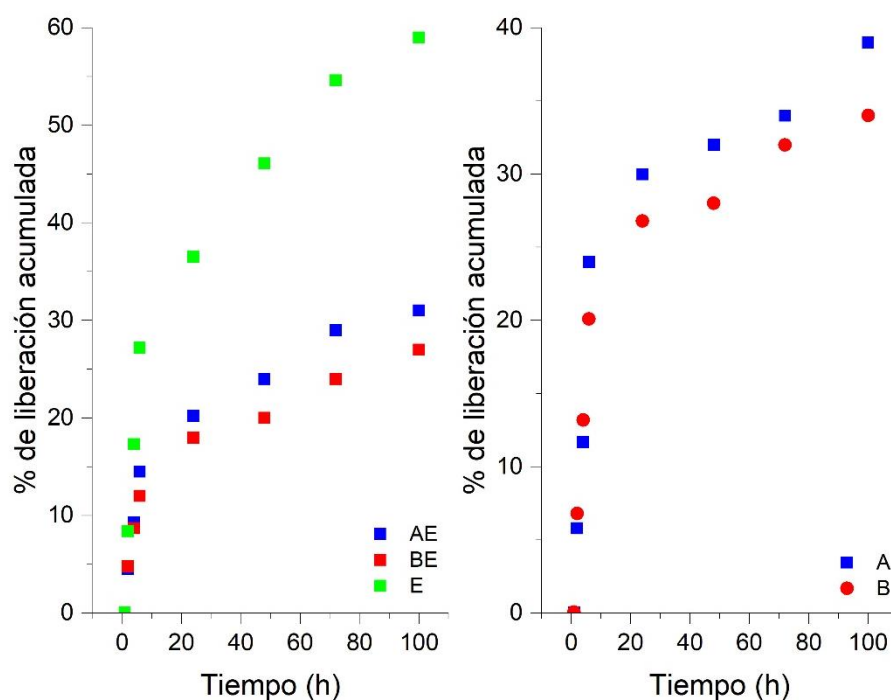
3.2.6 Estudio de liberación

Para las formulaciones micelares cuya composición se describe en la Tabla 3-3 se evaluó la cinética de liberación de la AmB. Las muestras liofilizadas se dispersaron en agua desionizada y fueron transferidas a un recipiente recubierto con una membrana de diálisis con un cutt-off de 10 kDa, este se sumergió en un medio de liberación que consistía en una mezcla Deoxicolato de sodio:Dimetilsulfóxido (2:1), seleccionado con el fin de garantizar condiciones “*sink*”. La liberación de la AmB se evaluó monitoreando periódicamente la concentración de AmB en el medio de liberación, empleado

espectroscopía UV a una longitud de onda de 406 nm. Los ensayos de liberación se realizaron por 100 horas, obteniéndose los perfiles que se presentan en la Figura 3-14.

De acuerdo a los perfiles mostrados para las formulaciones estudiadas, la liberación se da en dos etapas; durante las primeras seis horas se presenta una liberación rápida y posteriormente se observa una velocidad menor que sostiene hasta las 100 h que fue el tiempo máximo de muestreo.

Figura 3-14: Perfiles de liberación de CAB cargados con AmB, % de liberación acumulada versus tiempo (h).



De los perfiles mostrados en la Figura 3-13, se observó que los copolímeros que no tienen DSPE (A y B) liberan AmB de manera más rápida comparados con los que sí tienen esta biomolécula. El material polimérico E presenta una liberación más rápida de AmB desde las nanopartículas al medio de liberación y fue el que mayor concentración de AmB entregó al medio (27% luego de 6 horas), caso contrario se evidencia para los copolímeros AE y BE para los que se presume que el DPSE está inmerso en una matriz de PCL que restringe la liberación de moléculas de AmB, esto hace que los porcentajes de liberación obtenidos sean menores a los encontrados para los copolímeros A y B.

Para copolímeros con longitudes de segmento hidrofóbico menores los porcentajes de liberación fueron menores que los compuestos por segmentos hidrófobos más largos. Un mayor contenido de fármaco solubilizado en las micelas genera mayor interacción hidrofóbica o tipo π - π , esto incide en una liberación más lenta cuando las unidades de DSPE están presentes en la cadena del copolímero, lo cual retarda la salida de AmB al medio de liberación.

Por otra parte, con el fin de estudiar la presencia del DSPE en el desempeño de liberación de AmB desde cada uno de los sistemas micelares, se analizaron los resultados teniendo en cuenta distintos modelos matemáticos. El uso de estos modelos resulta ser muy útil, ya que permiten conocer el comportamiento de liberación del fármaco. La implementación de modelos de liberación a menudo contribuye a la dilucidación de los mecanismos que a su vez pueden ser útiles en entender cómo se da el control de liberación del fármaco [40].

Uno de los objetivos principales de controlar la liberación del fármaco es mantener la concentración plasmática dentro de la ventana terapéutica, lo que podría contribuir a disminuir posibles efectos adversos debidos a fluctuaciones bruscas de la concentración de fármaco por encima de la concentración mínima tóxica. Adicionalmente, un control de la liberación permite sostener los niveles plasmáticos del fármaco por un mayor tiempo, lo que trae como valor agregado una disminución en la frecuencia de administración, mejorando la adherencia a la terapia por parte del paciente [41].

Los datos correspondientes a cada resultado que se muestran en los perfiles de liberación de la Figura 3-9 se utilizaron para la evaluación de los modelos de liberación expuestos en la sección 1.5.1. Se graficaron los resultados obtenidos teniendo en cuenta la ecuación propuesta para cada modelo. Se tomaron los datos de coeficiente de correlación (R^2) y pendiente de la recta ó constante de velocidad (K) para la obtención de la Tabla 3-7.

Teniendo en cuenta que los perfiles muestran dos comportamientos diferentes, el primero caracterizado por una liberación rápida durante las 6 primeras horas del análisis seguido de una segunda etapa de liberación lenta a partir de las 24 horas, los resultados de los análisis se dividieron en dos grupos.

Tabla 3-7: Análisis para modelos de liberación de 0 a 6 horas.

Modelo	Parámetro	A	B	AE	BE	E
--------	-----------	---	---	----	----	---

		0h - 6h				
Orden 0	R ²	0,978	0,979	0,987	0,952	0,988
	K (%·h ⁻¹)	4,570	3,833	2,789	2,265	5,227
Orden 1	R ²	0,664	0,621	0,632	0,603	0,635
	k (h ⁻¹)	1,026	0,957	0,976	0,897	0,966
Korsmeyer-Peppas	R ²	0,843	0,814	0,823	0,799	0,825
	k (%·h ^{-0,5})	3,250	3,080	3,130	2,905	3,094
Higuchi	R ²	0,952	0,994	0,996	0,986	0,995
	k (h ⁻ⁿ)	6,077	7,411	10,234	12,310	5,460

Una vez practicado el ajuste de las curvas de liberación a los modelos matemáticos obtenidos para las primeras 6 horas de los ensayos de liberación es posible anotar que, para todos los sistemas micelares, el modelo de Higuchi es el que mejor se ajusta a los resultados.

Higuchi fue el primero en derivar una ecuación para describir la liberación de un fármaco desde una matriz insoluble como la raíz cuadrada de un proceso dependiente del tiempo basado en la difusión Fickiana [69]. El modelo simplificado se representa con la siguiente ecuación [41]:

$$f_t = K_H \sqrt{t}$$

Donde K_H es la constante de disolución de Higuchi y t es el tiempo.

Este modelo es empleado para describir la velocidad de liberación de un soluto, usualmente un fármaco, desde una matriz que suele ser un polímero [70]. Se ha demostrado que en el caso de las matrices hidrofílicas, el hinchamiento y la erosión del polímero ocurren simultáneamente, y ambos contribuyen en general a la liberación del fármaco [69].

Teniendo en cuenta que, en el caso del modelo de Korsmeyer-Peppas, los datos obtenidos no evidencian un ajuste satisfactorio, no se realizó el respectivo cálculo de n .

Transcurridas 24 horas del inicio del ensayo de liberación, se comienza a evidenciar una disminución en la velocidad con la que la AmB es entregada al medio (Tabla 3-8).

Tabla 3-8: Análisis para modelos de liberación de 24 a 100 horas.

Modelo	Parámetro	A	B	AE	BE	E
		24h - 100h				
Orden cero	R ²	0,957	0,959	0,964	0,986	0,926
	K (%·h ⁻¹)	0,116	0,101	0,147	0,123	0,299
Primer orden	R ²	0,971	0,958	0,951	0,986	0,938
	k (h ⁻¹)	0,003	0,003	0,006	0,006	0,006
Korsmeyer-Peppas	R ²	0,873	0,902	0,981	0,934	0,995
	k (%·h ^{-0.5})	0,170	0,172	0,312	0,287	0,345
Higuchi	R ²	0,910	0,938	0,980	0,966	0,989
	k (h ⁻ⁿ)	53,912	62,720	44,213	53,211	21,843

El estudio cinético muestra que, luego del tiempo mencionado y hasta las 100 horas del análisis, los perfiles de liberación se ajustaron bien al modelo de primer orden. Este modelo sugiere que la velocidad a la que el fármaco es liberado depende de la concentración del mismo en el material polimérico.

La ecuación de primer orden describe la disolución de un fármaco que no se encuentra encapsulado efectivamente en la matriz polimérica y está listo para disolverse desde la superficie transportadora [71]. Las formas farmacéuticas que siguen este perfil, liberan el fármaco de manera proporcional a la cantidad de principio activo remanente en su interior, de tal manera que la cantidad liberada por unidad de tiempo disminuye [72]. Todos los materiales estudiados exhibieron valores de K bajos lo cual concuerda con la reducción en la velocidad de liberación a tiempos prolongados.

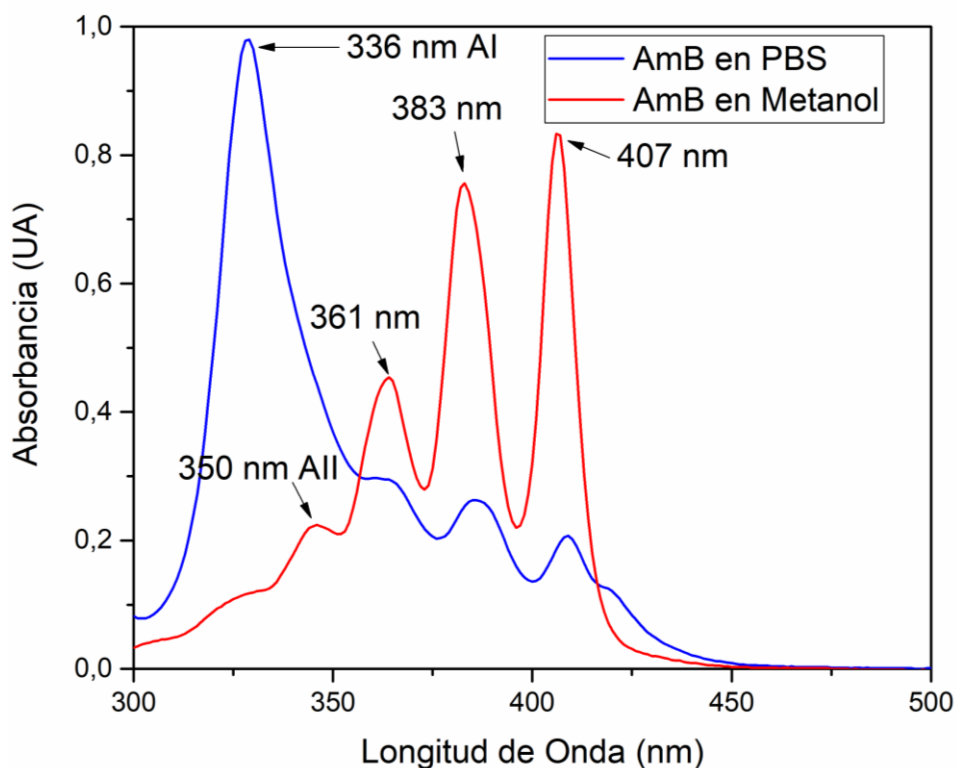
Por otra parte, con el fin de estudiar el efecto de la modificación de los CAB en la autoagregación de AmB se hicieron estudios de agregación.

3.2.7 Estudios de Agregación

La espectroscopía UV-vis es una técnica confiable para caracterizar el estado de agregación de AmB porque sus características espectrales dependen de los arreglos moleculares obtenidos por su autoagregación en presencia de surfactantes, solventes y biomoléculas. Para el estudio de la forma en la que la AmB se agrega, se tomaron espectros UV-vis de AmB disuelta en metanol y buffer de fosfatos a un pH de 7,4 (PBS), el mismo procedimiento se siguió con la formulación comercial de AmB (Fungizone ®) y con los materiales poliméricos estudiados.

El espectro de AmB disuelto en metanol, correspondiente al estado monomérico, exhibe λ_{\max} a 407, 383 y 361 nm. Por el contrario, en el espectro de AmB acuoso las bandas de absorción a 350 y 336 nm son indicativas de su forma agregada, mientras que la señal a $\lambda_{\max}= 407$ nm sugiere la coexistencia de monómeros de AmB, pero en una menor concentración, lo cual es una consecuencia de su naturaleza anfifílica y el hecho que presenta una concentración mínima de agregación de 1mg/L [29] (Figura 3-15).

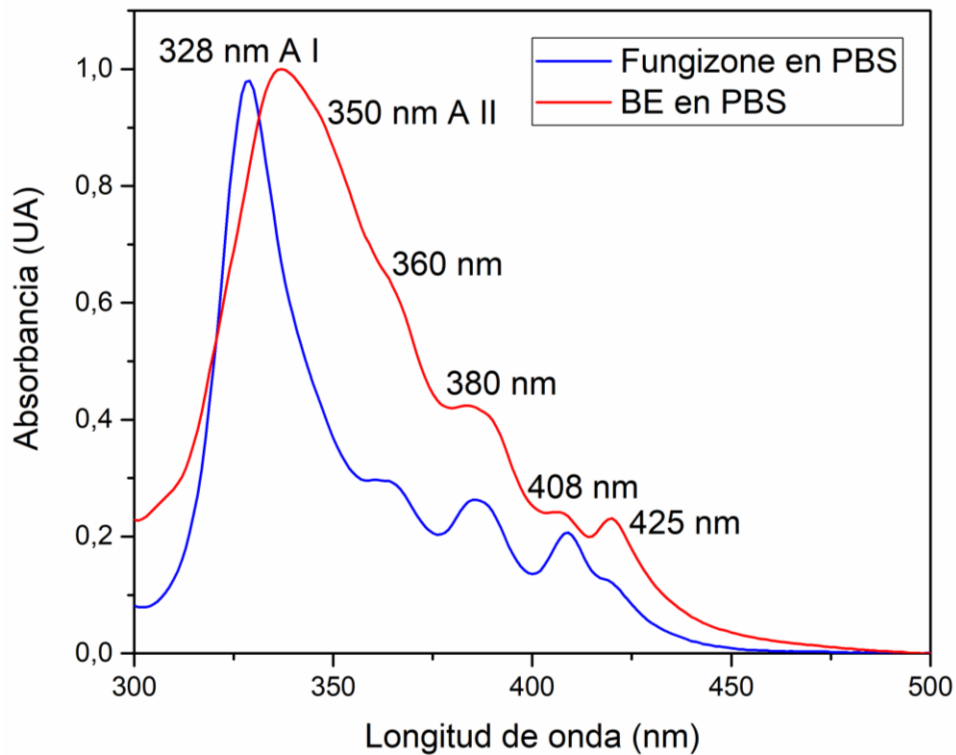
Figura 3-15: Espectros UV de AmB disuelta en PBS (azul) y metanol (rojo).



La comparación de los espectros UV de la formulación comercial (Fungizone ®) y el material polimérico BE disueltos en PBS se puede apreciar en la Figura 3-16. Para el CAB las bandas de absorción exhibidas en 360 nm, 380 nm, 408 nm y 425 nm se deben a contribuciones de formas monoméricas de AmB, mientras que las bandas mostradas en 350 nm y 328 nm dan cuenta de dos formaciones de agregados con ambientes químicos

diferentes. En el caso del espectro UV de la formulación comercial de AmB solo se aprecia un tipo de agregado y las contribuciones de distintas formas monoméricas de AmB son menos pronunciadas.

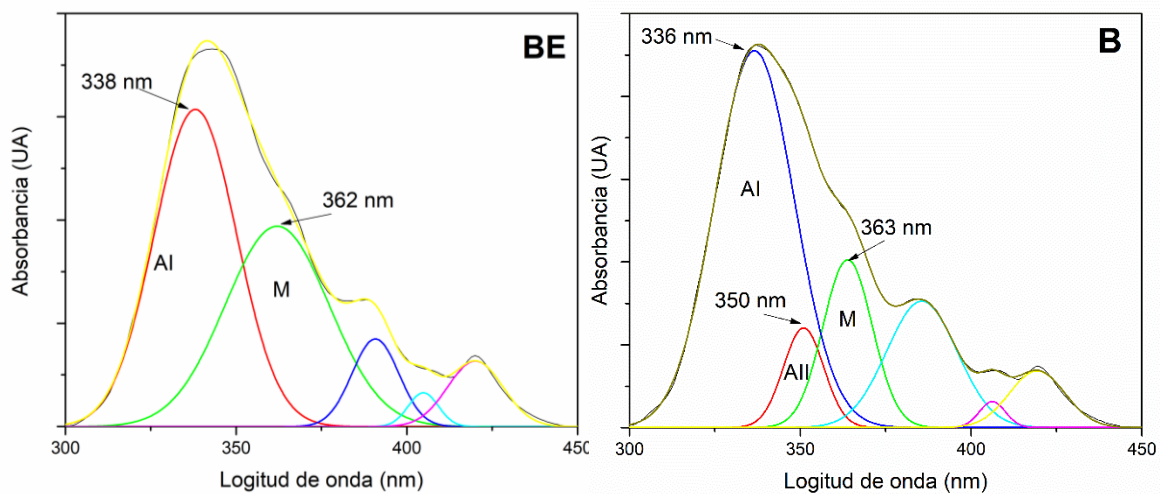
Figura 3-16: Espectros UV de Fungizone (azul) y BE (rojo) disuelto en PBS.

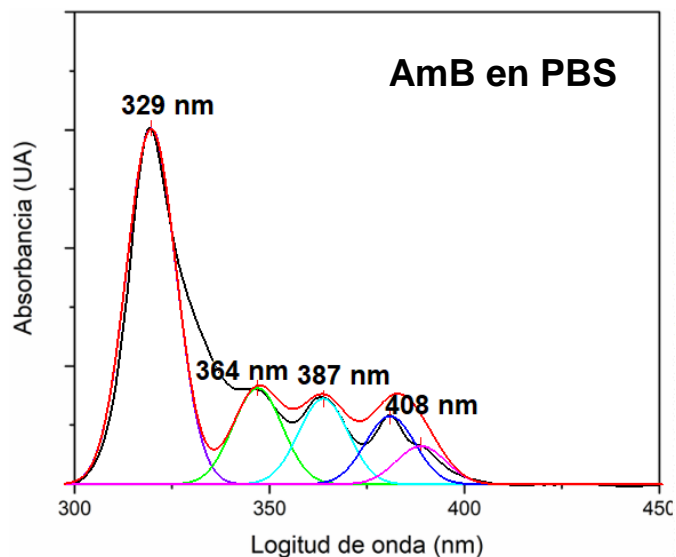


Estos resultados muestran que, en presencia de copolímeros como el BE, hay una disminución en la agregación de la AmB que podría deberse a un incremento en las interacciones que involucran segmentos hidrofóbicos existentes entre el fármaco y el copolímero.

Los espectros de AmB se ajustaron a picos Gaussianos como medida para estimar la cantidad relativa de cada tipo de arreglo que tienen los sistemas micelares unidos a la AmB (Figura 3-17).

Figura 3-17: Espectros UV-vis de AmB en presencia de BE (PEG-*b*-PCL bajo peso molecular), B (PEG-*b*-PCL-DSPE bajo peso molecular) y AmB en PBS.





El carácter tóxico de los agregados solubles en agua (inclusive los dímeros) fue estudiado por Espada y colaboradores, ellos encontraron que la forma menos tóxica de agregación es la compuesta por poliagregados no solubles de AmB [73]. Según Zielinska, la agregación procede a través de interacciones hidrófobas, mientras que las interacciones entre los grupos polares y su carácter anfótero tienen una contribución mínima [29]. La evaluación del estado de agregación de AmB en formulaciones antimicóticas permite una estimación de su toxicidad y efectividad.

En la figura 3-17 se muestran los espectros de AmB en presencia de dos materiales poliméricos diferentes. Para el caso del espectro UV de BE se necesitaron 5 picos Gaussianos para realizar el ajuste. En el caso de B fueron necesarios 6 picos. Los picos a 336 y 350 nm, correspondientes a agregados de dos tipos (AI y AII) que denotan moléculas de AmB rodeadas que dos ambientes químicos diferentes con distintas disposiciones y distancias intermoleculares. También se observan contribuciones de la forma monomérica alrededor de 360 nm.

En presencia de los copolímeros en bloque los agregados de AmB presentaron un desplazamiento a campos relativamente altos de longitud de onda en comparación a los picos obtenidos para AmB en PBS. Este resultado propone un incremento entre la distancia de moléculas de AmB involucradas en la formación de agregados.

Los agregados de tipo I (AI) denotan moléculas moléculas de AmB estrechamente unidas o empaquetadas, tanto para BE como para B este es el tipo predominante de agregado.

En presencia de DSPE los agregados de tipo II no se detectan, por el contrario, se observa un pico pronunciado en 362 nm (característico de AmB en su forma monomérica), similar al obtenido para B, lo cual demuestra que en presencia de CAB la AmB experimenta un incremento en las interacciones hidrofóbicas responsables de su disposición monomérica.

Teniendo en cuenta que una de las principales causas de toxicidad de la AmB tiene relación con el comportamiento no selectivo de este fármaco frente a moléculas de ergosterol y colesterol y que esta característica se evidencia en mayor medida cuando dicho fármaco se encuentra agregado, un sistema de administración capaz de encapsular y liberar AmB de forma monomérica es deseable [74].

Tomando como referencia las áreas de los picos de absorbancia dados por las formas agregadas (336 nm (AI) y 350 nm (AII)) y el área de todos los picos obtenidos de las figuras 3-11 y 3-12, es posible calcular el estado de agregación de la AmB en los sistemas micelares estudiados (Tabla 3-9).

Tabla 3-9: Estado de agregación de AmB basado en la relación de áreas para picos agregados y Área total del espectro UV-Vis en PBS.

Muestra	Relación (Área agregados/Área Total)
A	0,72
B	0,63
AE	0,65
BE	0,49
E	0,44
Fungizone	0,61

Es posible notar que de los CABs estudiados, la menor relación de áreas (0,49) correspondió al copolímeros que tienen fosfolípidos en su estructura (BE). Esto concuerda con el comportamiento mostrado en los espectros UV en los que solamente se evidencia una contribución debida a agregados de tipo I. Por el contrario, en ausencia de DSPE las

moléculas de AmB incrementaron su agregación lo cual se ve reflejado en la relación obtenida para los copolímeros A y B. Estos resultados confirman que la composición del copolímero tiene una estrecha relación con el estado de agregación mostrado por la AmB.

Como se acaba de explicar, el estado de agregación está directamente relacionado con la toxicidad de la AmB [73]. Por esta razón, se realizaron ensayos de concentración mínima inhibitoria a los materiales poliméricos de código: A, B, AE, BE y E.

3.2.8 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

El ensayo de concentración mínima inhibitoria es ampliamente usado para determinar la susceptibilidad de cepas contra agentes antifúngicos. Se define como la concentración más baja de antifúngico que es suficiente para inhibir el crecimiento microbiano [75]. Teniendo en cuenta esto, la eficacia de los sistemas micelares cargados con AmB y de la formulación comercial Fungizone® fue probada contra cepas clínicas y ATCC (Tabla 3-10). Los valores de concentración mínima inhibitoria fueron determinados visualmente y confirmados mediante el uso de resazurina (Anexo A).

Tabla 3-10: Valores de CMI para copolímeros cargados con AmB y la formulación comercial.

Cepa	Referencia	Formulación comercial	Código CAB				
		Fungizone®	A	B	AE	BE	E
CMI (µg/mL)							
<i>C. albicans</i>	SC5314	0,46	0,23	0,11	0,23	0,11	0,23
<i>C. glabrata</i>	ATCC 2001	0,93	0,46	0,11	0,23	0,11	0,23
<i>C. auris</i>	435-PUJ-HUSI	0,93	0,93	0,23	0,23	0,23	0,23
<i>C. auris</i>	537-PUJ-HUSI	3,75	0,93	0,23	0,93	0,23	0,93

En todas las cepas usadas el valor de CMI para los materiales poliméricos estudiados fue menor que el obtenido para la formulación comercial. Esto indica que el encapsulamiento de moléculas de AmB con copolímeros en bloque anfífilos compuestos por PEG, PCL y DSPE provocan que concentraciones muy bajas de este fármaco sean suficientes para inhibir el crecimiento del hongo.

Por otra parte, se evidencia que los materiales poliméricos que presentaron las CMI más bajas fueron los compuestos por copolímeros con segmentos hidrofóbicos de bajo peso molecular. Para el caso de copolímeros de alto peso molecular la injersión de moléculas como DSPE contribuyó a la disminución de la CMI en dos de las cuatro cepas estudiadas, muestra de esto es la disminución de 0,93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,23 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para la cepa *C. auris* 435-PUJ-HUSI.

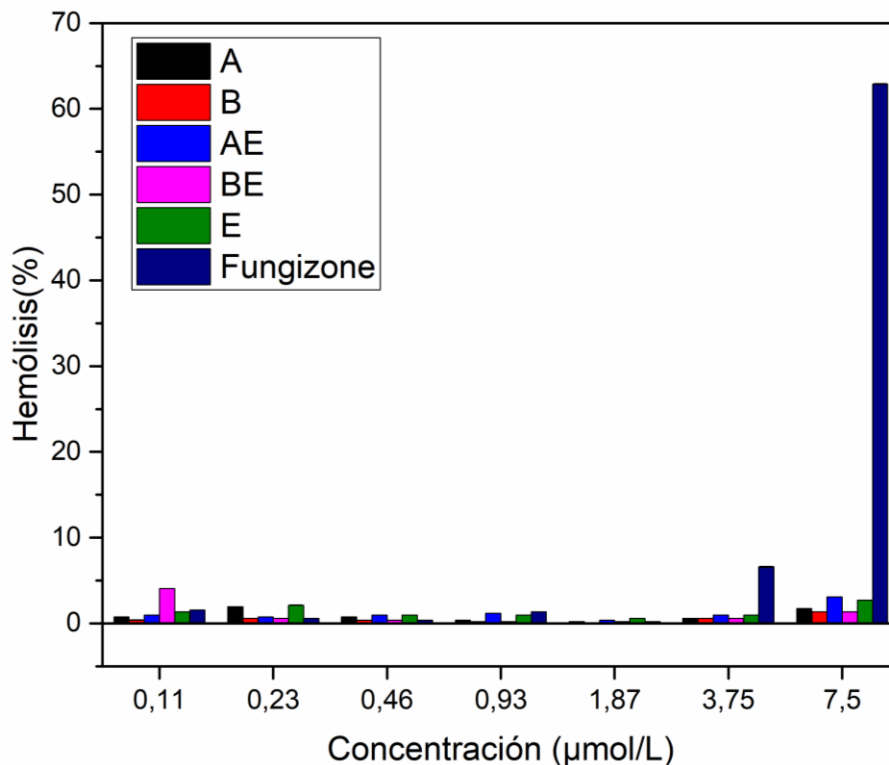
Los resultados de CMI obtenidos pueden ser explicados teniendo en cuenta los % de encapsulación y el comportamiento de liberación observados. Se pudo establecer que hay una relación directamente proporcional entre el % de encapsulación y la CMI. El material polimérico BE exhibió un % de encapsulación de 16,4% y luego de 48 horas se había liberado el 20%. Por su parte el CAB A luego de 48 horas había liberado 32% con un % de encapsulación de 8,4%. Esto conduce a una mayor cantidad de AmB disponible, en el caso del CAB BE, para actuar como agente antifúngico, lo que conlleva a un mejor desempeño de este material frente a cada una de las cepas estudiadas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en cuanto a CMI y con el fin de complementarlos, se realizaron ensayos de hemólisis a los materiales poliméricos cargados con AmB.

3.2.9 Estudio de Hemólisis

Los materiales poliméricos cargados con AmB fueron estudiados en cuanto a su comportamiento hemolítico comparado contra Fungizone®. Para esto, los GR fueron mezclados con diferentes cantidades de cada material (entre 0,11 y 7,5 $\mu\text{mol}/\text{L}$). Los resultados del estudio de Hemólisis se presentan en la Figura 3-18.

Figura 3-18: Perfiles hemolíticos obtenidos para Fungizone® y CAB cargados con AmB



Como se ha expuesto, la formación de complejos de colesterol está estrechamente relacionado con la formación de agregados de AmB y con un incremento de la toxicidad que afecta las células de los mamíferos. Como resultado de esto se promueve la formación de poros membranosos por los que sustancias esenciales para el correcto funcionamiento celular son desechadas.

Por encima de 3,75 µmol/L, la incidencia de la agregación presentada por la formulación comercial de AmB (Fungizone®), previamente mostrada en la sección 3.2.8, concuerda con los resultados de actividad hemolítica considerablemente alta. Por el contrario, cuando la AmB es encapsulada en micelas poliméricas, con el fin de controlar su liberación y modular su toxicidad, los porcentajes de hemólisis se ven disminuidos aún a concentraciones por encima de 3,75 µmol/L. La presencia o ausencia de moléculas de DSPE en los CAB parece no influir en la hemotoxicidad de los materiales estudiados.

En una etapa posterior de la investigación, se buscó comparar el desempeño de PEG-PCL conjugado con DSPE utilizando el mismo material material conjugado con otras dos moléculas lipídicas que de acuerdo a estudios previos desarrollados por el grupo de investigación y estudios computacionales en curso presentan interacciones favorables con la AmB. Para este estudio, se emplearon copolímeros compuestos por PEG-b-

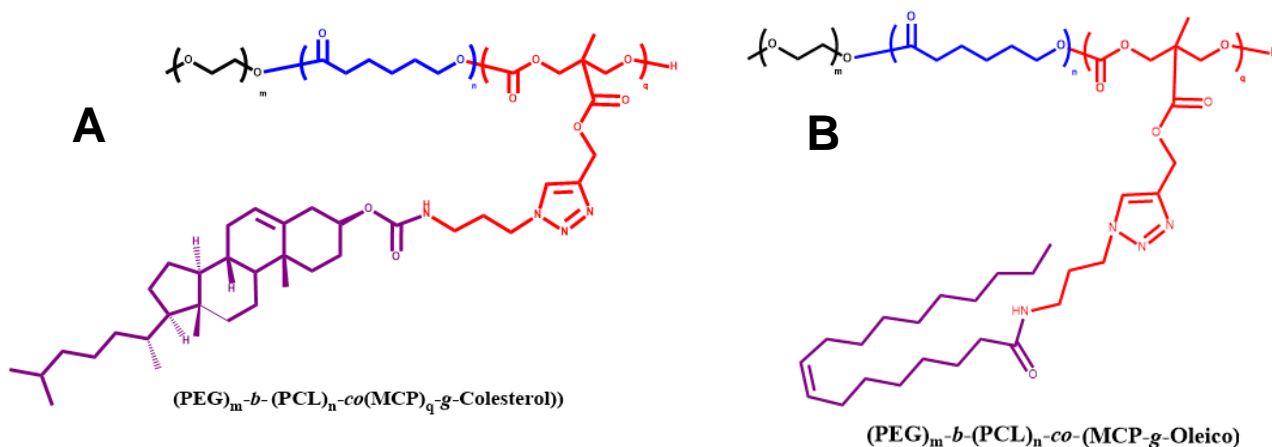
Poli(caprolactona-co-oleilometilcarbonato) y PEG-b-Poli(caprolactona-co-colesterilometilcarbonato), como se describe a continuación.

4. Caracterización de CAB decorados con colesterol y ácido oléico

En esta etapa del proyecto, se emplearon materiales sintetizados por el grupo de investigación de macromoléculas de la UNAL. Se emplearon copolímeros en bloque compuestos por segmentos hidrofílicos de PEG y dos longitudes distintas del segmento hidrofóbico PCL, estos se encontraban modificados en su cadena terminal mediante la adición de cantidades controladas del carbonato cíclico 5-metil-5-propargiloxycarbonil-1,3-dioxan-2-ona (MCP). La densidad de injerto se encuentra relacionado con el número de grupos propargilo que cuelgan de las cadenas poliméricas.

Por medio del uso de química click se controló el número de moléculas de colesterol y ácido oleico (1, 3 y 5) usados para modificar el extremo terminal de los CAB (Figura 4-1 y 4-2). Las reacciones empleadas para la obtención de CAB decorados con colesterol y ácido oleico se relacionan en el anexo B.

Figura 4-1: Estructura química de CAB PEG-*b*-PCL **A.** decorado con una molécula de colesterol **B.** decorado con una molécula de ácido oleico [62]



Con el fin de demostrar que los copolímeros decorados con biomoléculas (colesterol y ácido oleico) presentan interacciones hidrofóbicas favorables con la AmB, se estudió el efecto de injertar un número controlado de estas en el % de encapsulación de AmB, tamaño de partícula, potencial z, así como en el comportamiento térmico de los materiales poliméricos.

En la Tabla 4-1 se listan los CAB usados como vehículos nanoestructurados de AmB. Se consideraron variaciones en el segmento hidrófobo de los copolímeros, así como la densidad de injerto.

Tabla 4-1: Composición, código, % de encapsulación, eficiencia de encapsulación de CAB modificados con Colesterol y ácido oleico.

Composición Material Polimérico	Código Asignado	% Encapsulación	Eficiencia de encapsulación (%)
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₄₃ -co-(P(MCP) ₁ -g-(Colesterol) ₁)	A1C	13,75 ± 0,29	62,47 ± 1,31
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₄₂ -co-(MCP) ₃ -g-(Colesterol) ₃	A3C	9,42 ± 0,20	42,59 ± 0,91
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₄₃ -co-(MCP) ₅ -g-(Colesterol) ₅	A5C	9,00 ± 0,32	39,20 ± 1,43
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₄₃ -co-(P(MCP) ₁ -g-(Oleico) ₁)	A1O	13,07 ± 0,39	68,68 ± 2,07
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₄₂ -co-P((MCP) ₃ -g-(Oleico) ₃)	A3O	15,57 ± 0,16	82,98 ± 0,84
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₄₃ -co-P((MCP) ₅ -g-(Oleico) ₅)	A5O	16,30 ± 0,32	89,42 ± 1,74
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₃ -co-(P(MCP) ₁ -g-(Colesterol) ₁)	B1C	16,87 ± 0,40	63,66 ± 1,51
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₃ -co-(P(MCP) ₃ -g-(Colesterol) ₃)	B3C	13,85 ± 0,33	56,23 ± 1,34
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₃ -co-(P(MCP) ₅ -g-(Colesterol) ₅)	B5C	8,23 ± 0,22	29,03 ± 0,79
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₃ -co-(P(MCP) ₁ -g-(Oleico) ₁)	B1O	14,33 ± 0,37	64,59 ± 1,67
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₃ -co-(P(MCP) ₃ -g-(Oleico) ₃)	B3O	15,49 ± 0,34	58,00 ± 1,28
m(PEG) ₁₂₁ -b-(PCL) ₂₃ -co-(P(MCP) ₅ -g-(Oleico) ₅)	B5O	31,66 ± 1,04	123,49 ± 4,07*

Con el fin de determinar si los cambios estructurales realizados a los vehículos micelares tenían incidencia en el desempeño de los CAB decorados, se prepararon nanopartículas

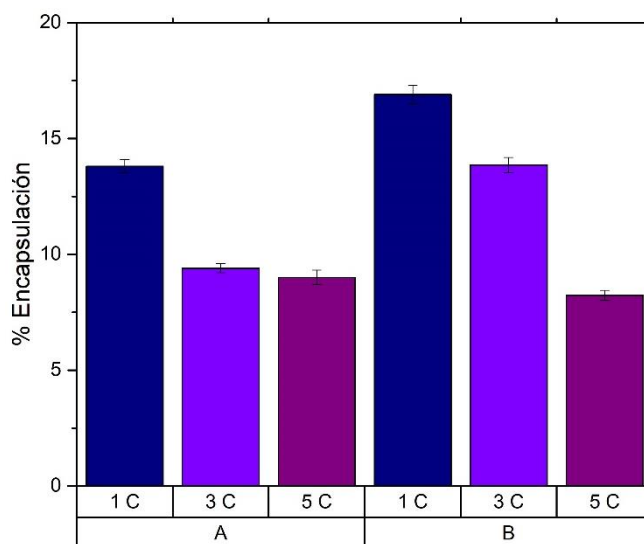
poliméricas cargadas con AmB tal como se describió en la sección 2.2 (Preparación de sistemas micelares) y se evaluó su porcentaje de encapsulación y eficiencia de carga.

4.1 Evaluación del porcentaje de encapsulación

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 4-1, se deduce que la estructura química de los materiales incidió en los porcentajes de encapsulación, presumiblemente a través del control de las interacciones AmB-polímero.

En el caso de los copolímeros conjugados con colesterol, tanto para copolímeros de tipo A como B, la eficiencia de encapsulación disminuyó con el incremento en el número de unidades. Esto podría deberse a un impedimento estérico que provocaría la disminución de interacciones hidrofóbicas responsables de la interacción entre moléculas de colesterol y AmB al interior de núcleo micelar. En otras palabras, solo una molécula de colesterol es suficiente para incrementar el porcentaje de encapsulación de CAB (Figura 4-2).

Figura 4-2: Porcentajes de encapsulación de AmB para CAB de ambas longitudes de segmento hidrófobo (A y B). 1 molécula de colesterol (1C), 3 moléculas de colesterol (3C) y 5 moléculas de colesterol (5C).



Caso contrario se observa en CAB decorados con Ácido Oleico, para estos, la adición consecutiva de unidades provocó un incremento en la capacidad del copolímero para encapsular AmB. Esto podría deberse al incremento en las interacciones hidrofóbicas existentes entre la subunidad polifenica de la molécula de AmB y el ácido oleico. Lo cual

también explicaría que para CAB compuestos por ácido oleico los % de encapsulación de fármaco fueron mejores que los obtenidos para CAB decorados con colesterol.

En el caso del CAB de código B5O, la eficiencia de encapsulación obtenida fue de 123,49%, es posible que se haya presentado la precipitación del copolímero lo cual provocaría un incremento tan abrupto en la eficiencia de carga de AmB.

Los porcentajes de encapsulación obtenidos para los CAB relacionados en la tabla 4-1 fueron, en su mayoría, mejores que los obtenidos en investigaciones recientes realizadas al interior del grupo de investigación en Macromoléculas, en las que copolímeros compuestos por mPEG-b-PCL injertados con moléculas hidrofóbicas como colesterol y retinol, mostraron porcentajes de encapsulación de entre 12,5 y 10,2%, respectivamente [8].

4.2 Tamaño de partícula y potencial z

Las micelas poliméricas cargadas con AmB fueron caracterizadas a través de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) a temperatura ambiente con el fin de determinar sus tamaños y distribuciones. El estudio del tamaño de los agregados obtenidos del autoensamblaje de copolímeros tribloque decorados con biomoléculas permitió obtener valores de diámetro hidrodinámico (Dh) y potencial z (Tabla 4-2).

Tabla 4-2: Resultados de tamaño de partícula promedio, índice de polidispersidad y potencial z de CAB modificados con colesterol y ácido oleico.

Muestra	Diámetro hidrodinámico (Dh) (nm)		Potencial Z (mV)
	Promedio	Pdl	
A1C	78,0 ± 4,2	0,277	-0,98 ± 0,51
A3C	70,8 ± 2,1	0,273	-1,28 ± 0,19
A5C	191,2 ± 3,8	0,498	-3,55 ± 0,439
A1O	84,6 ± 1,4	0,198	-4,71 ± 1,72
A3O	77,0 ± 0,76	0,176	- 2,94 ± 1,20
A5O	76,3 ± 2,1	0,202	-8,89 ± 1,31
B1C	68,8 ± 2,4	0,255	-6,05 ± 0,65
B3C	90,8 ± 3,7	0,440	-5,06 ± 0,89
B5C	78,9 ± 5,0	0,438	-3,17 ± 0,70
B1O	85,3 ± 0,9	0,213	-5,25 ± 0,30

B30	90,2 ± 2,5	0,456	-2,02 ± 1,24
B50	122,9 ± 1,9	0,203	-4,54 ± 1,93

Las micelas estudiadas mostraron diámetros que oscilaron entre 70 y 190 nm. Todos los materiales poliméricos decorados con colesterol y ácido oleico y cargados con AmB mostraron valores de diámetro de partícula menores a los exhibidos para los precursores A y B (mostrados en la Tabla 3-2), este comportamiento se presentó para CAB en copolímeros de alto y bajo peso molecular compuestos tanto por colesterol como por ácido oleico. Para estos copolímeros la presencia de moléculas de colesterol y ácido oleico provocan un incremento de las interacciones solvofóbicas lo cual conlleva a la formación de núcleos micelares de mayor hidrofobicidad.

Las distribuciones de tamaño de partícula obtenidas para los copolímeros estudiados fueron de tipo unimodal (Figuras 4-3 y 4-4).

Figura 4-3: Distribuciones de tamaño de partícula de CAB A y A1C

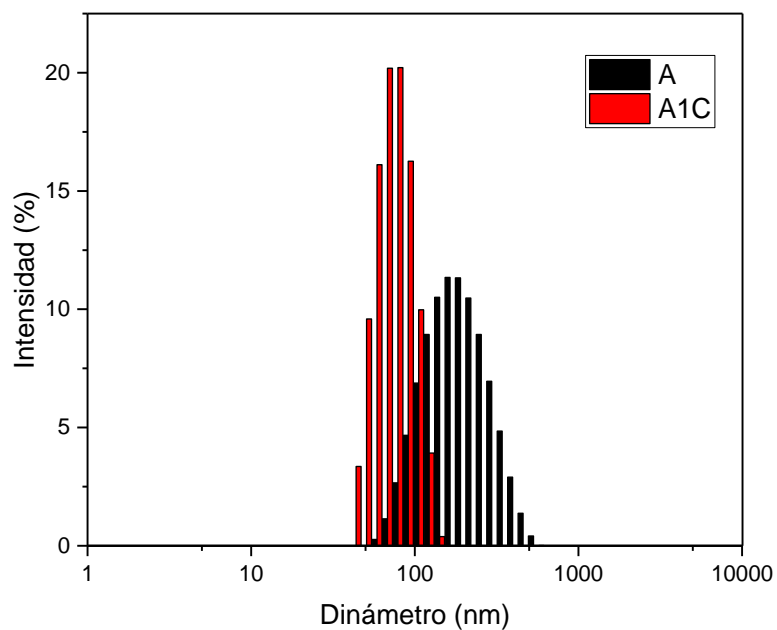
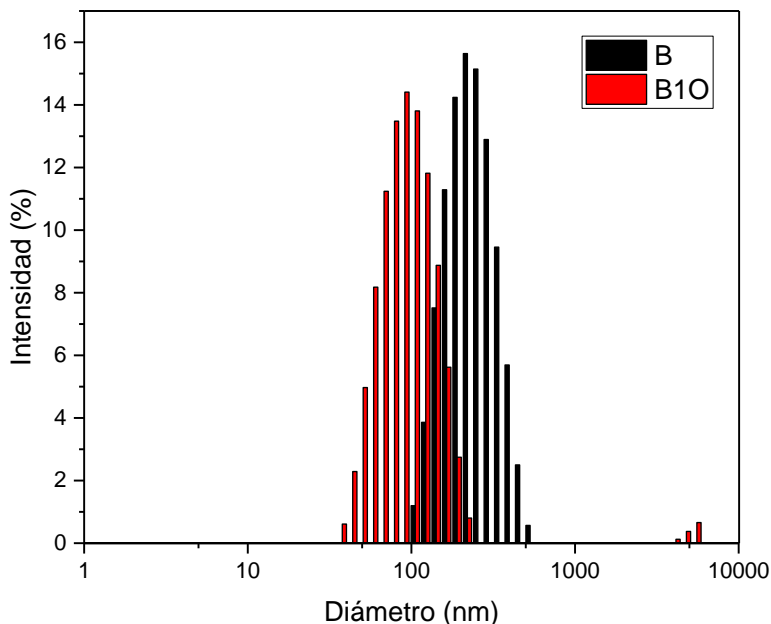


Figura 4-4: Distribuciones de tamaño de partícula de CAB B y B1O

4.3 Propiedades térmicas de CAB decorados

La técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) fue usada con el fin de estudiar el efecto de la modificación de los copolímeros tribloque en sus propiedades térmicas. Todos los materiales poliméricos cargados con AmB fueron enfriados desde temperatura ambiente hasta -60°C a una velocidad de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Luego, y por espacio de 10 min se mantuvo la temperatura a -60°C . Por último, se realizó un calentamiento hasta 150°C a una velocidad de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Mediante el uso de esta técnica fue posible obtener valores de entalpías de fusión (ΔH_m) y temperaturas de fusión (Tabla 4-3).

Tabla 4-3: Propiedades térmicas de los CAB modificados con colesterol y ácido oleico.

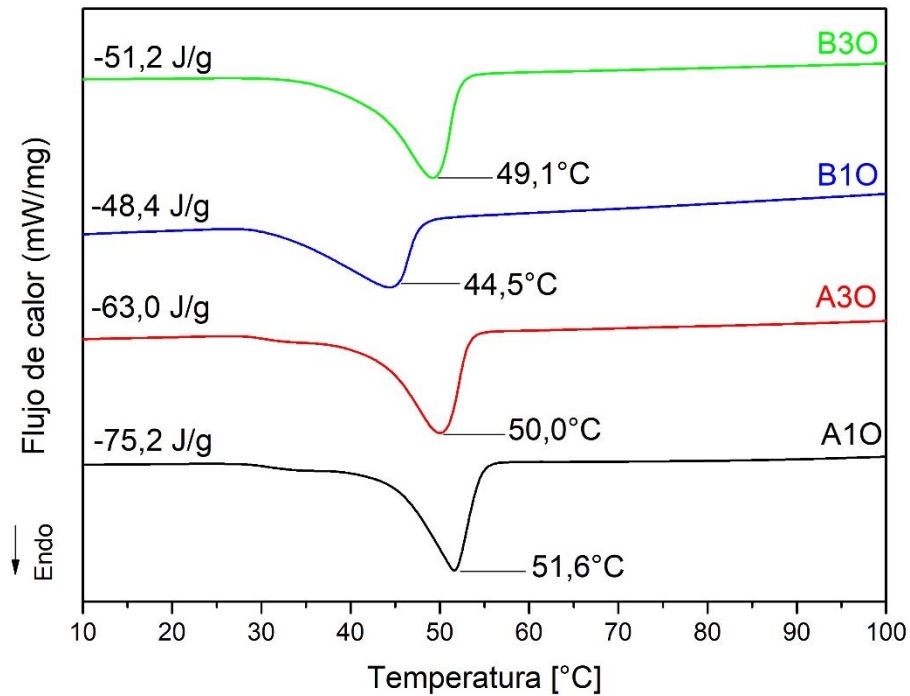
Código	Propiedades Térmicas	
	ΔH_m (J/g)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
A1C	-86,7	50,3
A3C	-83,6	50,4

A5C	-58,5	47,0
A1O	-75,2	51,6
A3O	-63,0	50,0
A5O	-53,5	47,2
B1C	-46,0	41,8
B3C	-64,6	49,1
B5C	-49,4	45,1
B1O	-48,4	44,5
B3O	-51,2	49,1
B5O	-52,0	46,1

Los termogramas obtenidos muestran 2 picos de fusión para los copolímeros A1O y A3O característicos de diferentes formas cristalinas de PCL (alrededor de 35°C) y PEG (alrededor de 50 °C). Para los termogramas de los CAB B1O y B3O se observa un pico amplio dado por la fusión de los dominios PEG y PCL, esto muestra el comportamiento térmico está influenciado por la longitud del segmento hidrofóbico (Figura 4-5).

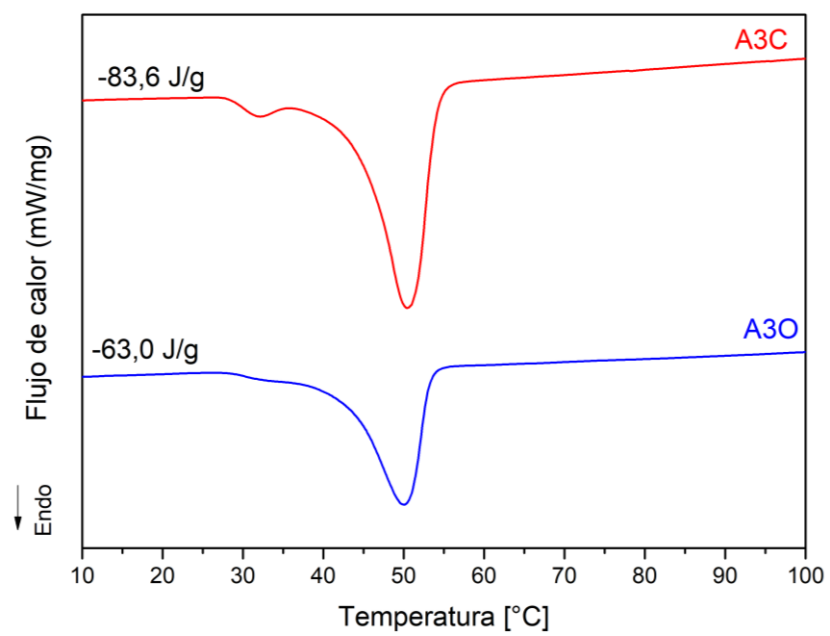
Mediante la integración de picos de fusión fue posible estimar las entalpías de fusión. En el copolímero B1O se observa una notable disminución de esta propiedad ($\Delta H_m = -48,4$ J/g) comparado con el obtenido para A1O ($\Delta H_m = -75,2$ J/g).

Figura 4-5: Termogramas de fusión para CAB A1O, A3O, B1O y B3O.



Mediante la integración de picos de fusión fue posible estimar las entalpías de fusión. La modificación de CAB con moléculas de ácido oleico provoca una disminución en el grado de cristalización de las micelas, muestra de esto es la notable reducción en el valor de ΔH_m para el copolímero A3O ($\Delta H_m = -63,0$ J/g) comparado con el obtenido para A3C ($\Delta H_m = -83,6$ J/g) (Figura 4-6).

Figura 4-6: Termogramas de fusión para CAB A3O y A3C.

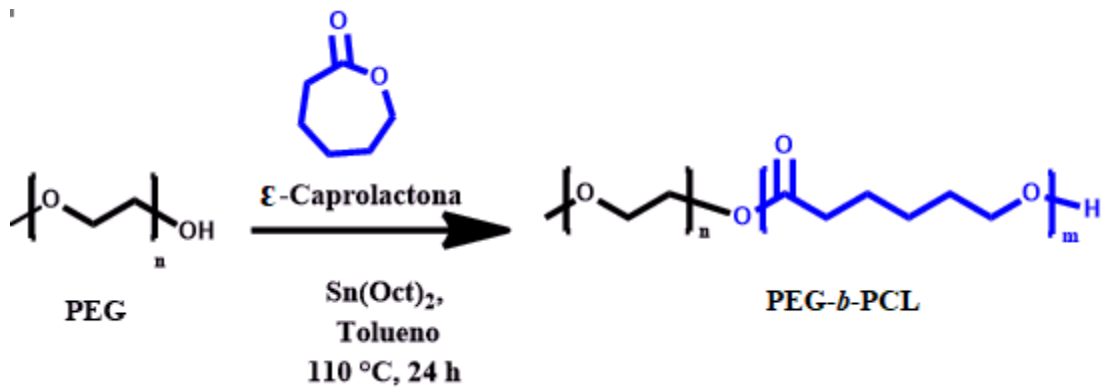


5. Conclusiones

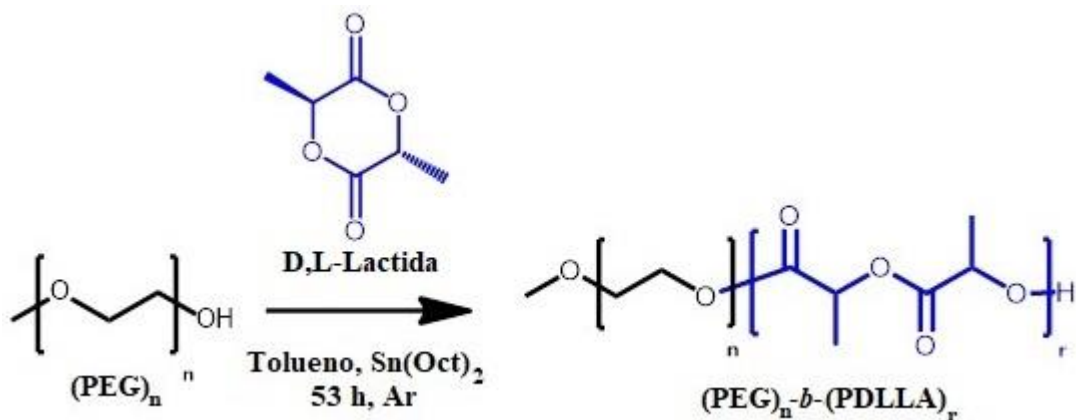
Los copolímeros compuestos por PEG y PCL son vehículos micelares prometedores para el transporte de fármacos como la AmB. Se comprobó que, luego de su modificación con DSPE, la encapsulación de dicho fármaco mejoró hasta lograr valores comparables con formulaciones comerciales como Fungizone®. Se demostró que la composición química influye en la rigidez de los copolímeros y, por ende, en su capacidad de encapsular AmB. Aunque los resultados obtenidos para copolímeros compuestos por PEG-DSPE mostraron los mejores porcentajes de encapsulación al ser un surfactante de bajo peso molecular, la estabilidad de las micelas no se ve favorecida. En presencia de CABs, la AmB experimenta un incremento en las interacciones hidrofóbicas lo que provoca una disminución en su agregación. Este comportamiento corrobora la disminución en su toxicidad demostrada a través de pruebas biológicas. La realización de dichas pruebas indicó que los nanoportadores mejoraron la actividad antifúngica de AmB contra la mayoría de las cepas de levadura probadas, se obtuvo una reducción de la CMI de hasta 10 veces en comparación con Fungizone®. Fue posible establecer relaciones entre la naturaleza de los sistemas micelares nanoestructurados y su desempeño en el transporte de AmB.

A. Anexo: Reacciones usadas para obtener PEG-*b*-PCL y PEG-*b*-PDLLA

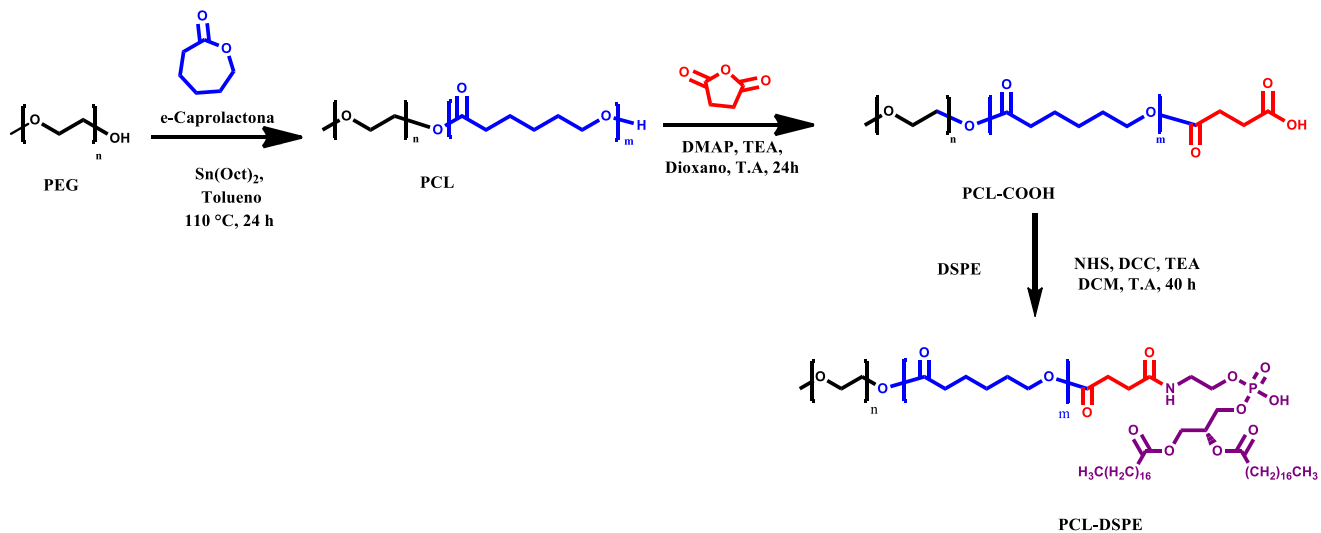
A1. Síntesis de copolímeros PEG-*b*-PCL



A2. Síntesis de copolímeros PEG-*b*-PDLLA

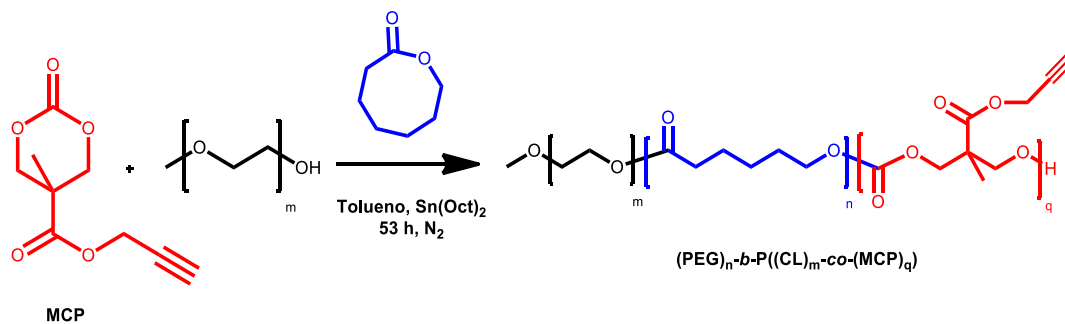


A3. Esquema de la síntesis vía ROP de los copolímeros PCL-1 y PCL-2 y su modificación con DSPE.

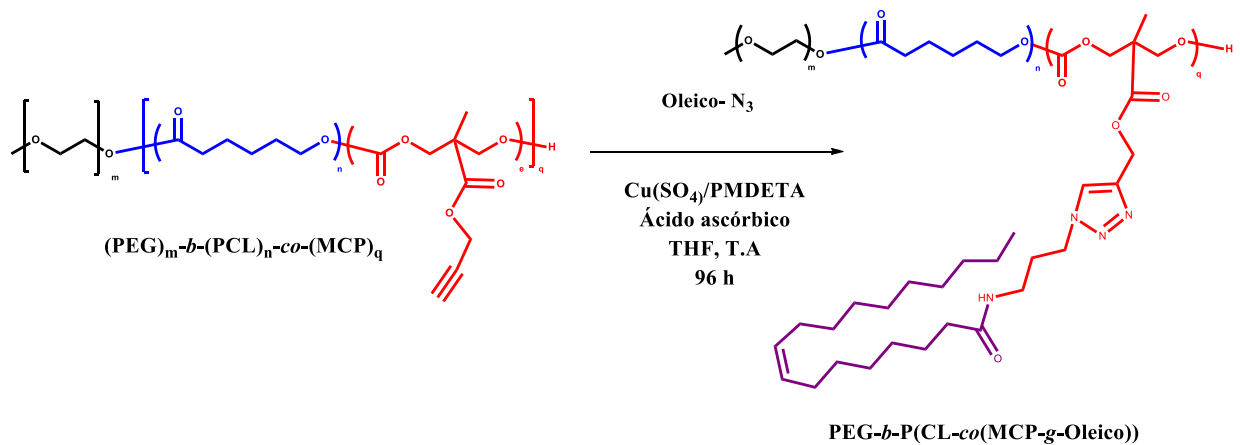


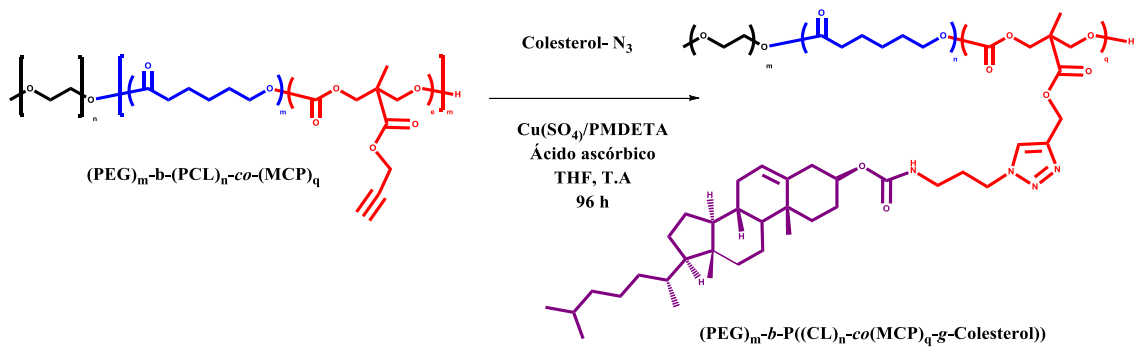
B. Anexo: Reacciones usadas para la obtención de CAB decorados con colesterol y ácido oleico

B1. Síntesis de copolímeros PEG-*b*-P(CL-*co*-MCP)



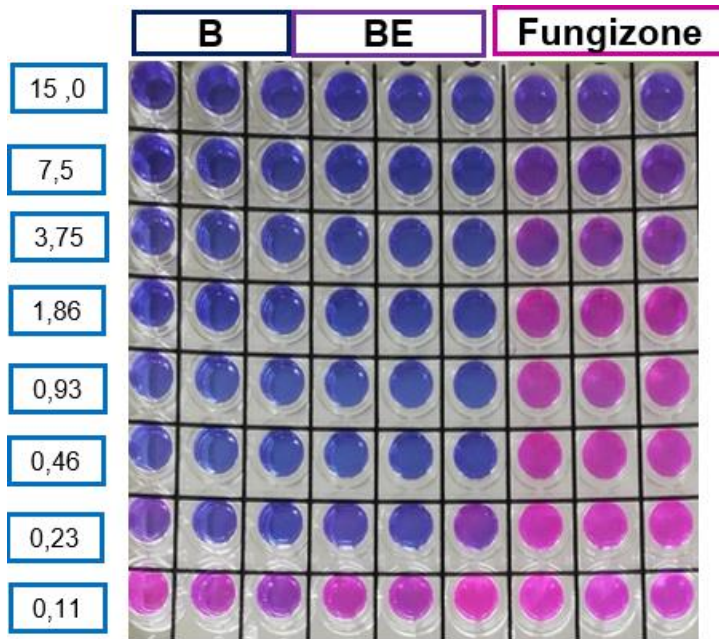
B2. Injerción de ácido oleico para formar copolímeros mPEG-*b*-P(CL)-*co*-(MCP-*g*-Oleico)

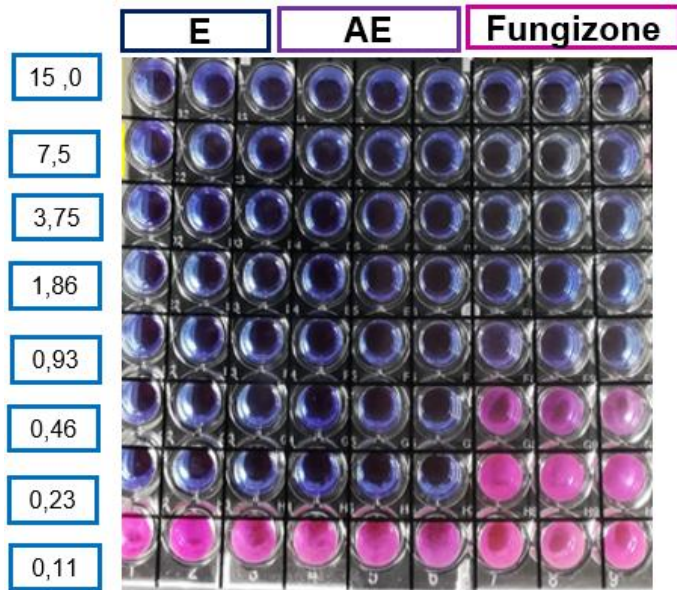


B3. Injerción de colesterol para formar copolímeros (PEG)-b-((PCL)-co-(MCP-g-Colesterol))

C. Fotos ensayos Concentración mínima inhibitoria

C1. Placa de 96 pozos para *C. auris* 537



C2. Pacla de 96 pozos para *C. glabrata*

Bibliografía

- [1] R. Stoodley, K. M. Wasan, and D. Bizzotto, "Fluorescence of amphotericin B-deoxycholate (Fungizone) monomers and aggregates and the effect of heat-treatment," *Langmuir*, vol. 23, no. 17, pp. 8718–8725, 2007.
- [2] D. M. Kamiński, "Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments," *Eur. Biophys. J.*, vol. 43, no. 10–11, pp. 453–467, 2014.
- [3] M. P. Haynes, P. L. G. Chong, H. R. Buckley, and R. A. Pieringer, "Fluorescence studies on the molecular action of amphotericin B on susceptible and resistant fungal cells," *Biochemistry*, vol. 35, no. 24, pp. 7983–7992, 1996.
- [4] Z. Tang *et al.*, "Polymeric nanostructured materials for biomedical applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 60, pp. 86–128, 2016.
- [5] G. Vandermeulen, L. Rouxhet, A. Arien, M. E. Brewster, and V. Pr at, "Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles," *Int. J. Pharm.*, vol. 309, no. 1–2, pp. 234–240, 2006.
- [6] T. Ren *et al.*, "Preparation and therapeutic efficacy of polysorbate-80-coated amphotericin B/PLA-b-PEG nanoparticles," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 20, no. 10, pp. 1369–1380, 2009.
- [7] J. C. Villamil, C. M. Parra-Giraldo, and L. D. Pérez, "Enhancing the performance of PEG-b-PCL copolymers as precursors of micellar vehicles for amphotericin B through its conjugation with cholesterol," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2019.
- [8] Y. J. Rodriguez, L. F. Quejada, J. C. Villamil, Y. Baena, C. M. Parra-giraldo, and L. D. Perez, "Development of Amphotericin B Micellar Formulations Based on Copolymers of Poly (ethylene glycol) and Poly (ϵ -caprolactone) Conjugated with Retinol."
- [9] C. Alvarez, D. H. Shin, and G. S. Kwon, "Reformulation of Fungizone by PEG-

- DSPE Micelles: Deaggregation and Detoxification of Amphotericin B,” *Pharm. Res.*, vol. 33, no. 9, pp. 2098–2106, 2016.
- [10] R. Gref and A. Domb, “The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 16, no. 95, pp. 215–233, 1995.
- [11] R. Herbrecht, S. Natarajan-Amé, Y. Nivoix, and V. Letscher-Bru, “The lipid formulations of amphotericin B,” *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 4, no. 8, pp. 1277–1287, 2003.
- [12] A. del Palacio, J. Villar, and A. Alhambra, “Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta,” *Rev. Iberoam. Micol.*, vol. 26, no. 1, pp. 2–7, 2009.
- [13] J. Pemán, “Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora,” *Enfermedades Infecc. y Microbiol. clínica*, vol. 30, no. 2, pp. 90–8, 2012.
- [14] M. Mesquita Da Costa *et al.*, “Cryptococcosis, A Risk for Immunocompromised and Immunocompetent Individuals,” *Open Epidemiol. J.*, vol. 6, pp. 9–17, 2013.
- [15] J. Lizarazo, P. Escandón, C. I. Agudelo, and E. Castañeda, “Cryptococcosis in Colombian children and literature review,” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 109, no. 6, pp. 797–804, 2014.
- [16] M. A. Pfaller and D. J. Diekema, “Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 1, pp. 133–163, 2007.
- [17] A. Lemke, A. F. Kiderlen, and O. Kayser, “Amphotericin B,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 68, no. 2, pp. 151–162, 2005.
- [18] F. Sangalli-Leite *et al.*, “Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst,” *Microbes Infect.*, vol. 13, no. 5, pp. 457–467, 2011.
- [19] T. M. Anderson *et al.*, “Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 10, no. 5, pp. 400–406, 2014.
- [20] P. Laskar, S. Samanta, S. K. Ghosh, and J. Dey, “In vitro evaluation of pH-sensitive cholesterol-containing stable polymeric micelles for delivery of camptothecin,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 430, pp. 305–314, 2014.
- [21] C. Luengo-Alonso *et al.*, “A novel performing PEG-cholane nanoformulation for

- Amphotericin B delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 495, no. 1, pp. 41–51, 2015.
- [22] Y. Kim, M. H. Pourgholami, D. L. Morris, and M. H. Stenzel, “Effect of cross-linking on the performance of micelles as drug delivery carriers: A cell uptake study,” *Biomacromolecules*, vol. 13, no. 3, pp. 814–825, 2012.
- [23] J. Miñones, J. Miñones, J. M. Rodríguez-Patino, O. Conde, and E. Iribarnegaray, “Miscibility of amphotericin B - Dipalmitoyl phosphatidyl serine mixed monolayers spread on the air/water interface,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 17, pp. 4189–4195, 2003.
- [24] R. Pérez, S. Villanueva, and R. Cosío, “El aceite de aguacate y sus propiedades nutricionales,” *e-Gnosis*, vol. 3, pp. 0–11, 2005.
- [25] A. E. Silva, G. Barratt, M. Chefon, and E. S. T. Egito, “Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B,” *Int. J. Pharm.*, vol. 454, no. 2, pp. 641–648, 2013.
- [26] P. Wasko, R. Luchowski, K. Tutaj, W. Grudzinski, P. Adamkiewicz, and W. I. Gruszecki, “Toward understanding of toxic side effects of a polyene antibiotic amphotericin B: Fluorescence spectroscopy reveals widespread formation of the specific supramolecular structures of the drug,” *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 5, pp. 1511–1520, 2012.
- [27] I. L. Diaz, C. Parra, M. Linarez, and L. D. Perez, “Design of Micelle Nanocontainers Based on PDMAEMA-b-PCL-b-PDMAEMA Triblock Copolymers for the Encapsulation of Amphotericin B,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 16, no. 5, pp. 1069–1078, 2015.
- [28] E. De Pablo, P. Ballesteros, and D. R. Serrano, “Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: the role of amphotericin B and drug targeting,” *Int. J. Pharm.*, 2017.
- [29] J. Zielińska, M. Wieczór, T. Bączek, M. Gruszecki, and J. Czub, “Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail,” *Nat. Publ. Gr.*, no. January, pp. 1–11, 2016.
- [30] J. P. Rao and K. E. Geckeler, “Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 7, pp. 887–913, 2011.
- [31] M. C. Chen, K. Sonaje, K. J. Chen, and H. W. Sung, “A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 36, pp. 9826–9838, 2011.

-
- [32] S. B. H. Fessi, F. Puisieux, J.Ph. Devissaguet, N. Ammoury, "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement," *Int. J. Pharm.*, vol. 55, pp. R1–R4, 1989.
- [33] C. C.-G. E. Marin, M. Briceño, "Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 3071–3091, 2013.
- [34] D. J. Mc Carthy, M. Malhotra, A. M. O'Mahony, J. F. Cryan, and C. M. O'Driscoll, "Nanoparticles and the blood-brain barrier: Advancing from in-vitro models towards therapeutic significance," *Pharm. Res.*, vol. 32, no. 4, pp. 1161–1185, 2015.
- [35] M. C. Urrejola *et al.*, "Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly)," *Int. J. Morphol.*, vol. 36, no. 4, pp. 1463–1471, 2018.
- [36] Y. Mai and A. Eisenberg, "Self-assembly of block copolymers," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 18, pp. 5969–5985, 2012.
- [37] G. Rojas, B. Vallejo, and J. Perilla, "Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico," *Rev. Ing. E Investig.*, vol. 28, no. 1, pp. 57–71, 2008.
- [38] I. Katime, V. Sáez, E. Hernández, and L. Sanz, "Liberación controlada de fármacos. micropartículas," *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 5, no. 2, pp. 87–101, 2004.
- [39] D. Ramos, M. Gómez, D. Fernández, and L. Nuñez, "Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral," *Rev. Cuba. Farm.*, vol. 34, no. 1, pp. 70–77, 2000.
- [40] M. Barzegar-Jalali *et al.*, "Kinetic analysis of drug release from nanoparticles," *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 1, pp. 167–177, 2008.
- [41] G. H. Son, B. J. Lee, and C. W. Cho, "Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles," *J. Pharm. Investig.*, vol. 47, no. 4, pp. 287–296, 2017.
- [42] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, and P. Chowdhury, "Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems," *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.*, vol. 67, no. 3, pp. 217–223, 2010.
- [43] A. R. Voltan, G. Quindós, K. P. M. Alarcón, A. M. Fusco-Almeida, M. J. S. Mendes-Giannini, and M. Chorilli, "Fungal diseases: Could nanostructured drug delivery

- systems be a novel paradigm for therapy?," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 11, pp. 3715–3730, 2016.
- [44] B. Gaba, M. Fazil, A. Ali, S. Baboota, J. K. Sahni, and J. Ali, "Nanostructured lipid (NLCs) carriers as a bioavailability enhancement tool for oral administration," *Drug Deliv.*, vol. 22, no. 6, pp. 691–700, 2015.
- [45] M. Liu, M. Chen, and Z. Yang, "Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy," *Drug Deliv.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [46] M. B. Chaudhari, P. P. Desai, P. A. Patel, and V. B. Patravale, "Solid lipid nanoparticles of amphotericin B (AmbiOnp): in vitro and in vivo assessment towards safe and effective oral treatment module," *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 354–364, 2016.
- [47] Z. Yang *et al.*, "Development of Amphotericin B-Loaded Cubosomes Through the SolEmuls Technology for Enhancing the Oral Bioavailability," *AAPS PharmSciTech*, vol. 13, no. 4, pp. 1483–1491, 2012.
- [48] M. Benincasa, S. Pacor, W. Wu, M. Prato, A. Bianco, and R. Gennaro, "Antifungal activity of amphotericin B conjugated to carbon nanotubes," *ACS Nano*, vol. 5, no. 1, pp. 199–208, 2011.
- [49] J. L. Italia, M. M. Yahya, D. Singh, and M. N. V. Ravi Kumar, "Biodegradable nanoparticles improve oral bioavailability of amphotericin B and show reduced nephrotoxicity compared to intravenous fungizone®," *Pharm. Res.*, vol. 26, no. 6, pp. 1324–1331, 2009.
- [50] X. Zhang *et al.*, "Preparation and self-assembly of amphiphilic triblock copolymers with polyrotaxane as a middle block and their application as carrier for the controlled release of Amphotericin B," *Polymer (Guildf.)*, vol. 50, no. 18, pp. 4343–4351, 2009.
- [51] M. L. Adams, D. R. Andes, and G. S. Kwon, "Amphotericin B encapsulated in micelles based on poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) derivatives exerts reduced in vitro hemolysis but maintains potent in vivo antifungal activity," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 3, pp. 750–757, 2003.
- [52] X. Tang *et al.*, "Enhanced Antifungal Activity by Ab-Modified Amphotericin B-Loaded Nanoparticles Using a pH-Responsive Block Copolymer," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–11, 2015.
- [53] Y. Wang *et al.*, "Biodegradable functional polycarbonate micelles for controlled

- release of amphotericin B,” *Acta Biomater.*, vol. 46, pp. 211–220, 2016.
- [54] C. H. Wang, W. T. Wang, and G. H. Hsiue, “Development of polyion complex micelles for encapsulating and delivering amphotericin B,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 19, pp. 3352–3358, 2009.
- [55] T. R. M. Tan, K. M. Hoi, P. Zhang, and S. K. Ng, “Characterization of a polyethylene glycol-amphotericin B conjugate loaded with free AMB for improved antifungal efficacy,” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, pp. 1–18, 2016.
- [56] M. J. Paquet, I. Fournier, J. Barwicz, P. Tancreède, and M. Auger, “The effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as viewed by ²H NMR,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 119, no. 1–2, pp. 1–11, 2002.
- [57] J. C. Villamil, C. M. Parra-Giraldo, and L. D. Pérez, “Enhancing the performance of PEG-b-PCL copolymers as precursors of micellar vehicles for amphotericin B through its conjugation with cholesterol,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 572, no. March, pp. 79–87, 2019.
- [58] G. Ramage and B. L. Wickes, “Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of,” *Society*, vol. 45, no. 9, pp. 2475–2479, 2001.
- [59] P. B. Fai and A. Grant, “A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides,” *Chemosphere*, vol. 74, no. 9, pp. 1165–1170, 2009.
- [60] E. M. Moctezuma, “La Teoría de Flory – Huggins en la Ingeniería de Soluciones y Mezclas de Polímeros,” *ContactoS*, vol. 68, pp. 54–62, 2008.
- [61] G. Odian, *Principles of Polymerization*, Cuarta Edi., vol. 37, no. 3. Staten Island, New York: John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- [62] A. Angarita, “Síntesis de copolímeros dibloque biodegradables conjugados con biomoléculas como plataforma de administración de fármacos,” Universidad Nacional de Colombia, 2020.
- [63] A. Lavasanifar, J. Samuel, and G. S. Kwon, “Poly(ethylene oxide)-block-poly(,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, pp. 169–190, 2002.
- [64] C. M. Hansen, “50 Years with solubility parameters - Past and future,” *Prog. Org. Coatings*, vol. 51, no. 1, pp. 77–84, 2004.
- [65] K. K. Gill, S. Nazzal, and A. Kaddoumi, “Paclitaxel loaded PEG5000-DSPE micelles as pulmonary delivery platform: Formulation characterization, tissue

- distribution, plasma pharmacokinetics, and toxicological evaluation,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 79, no. 2, pp. 276–284, 2011.
- [66] T. Elzein, H. Awada, M. Nasser-eddine, C. Delaite, and M. Brogly, “A model of chain folding in Polycaprolactone-b-Polymethyl Methacrylate diblock copolymers,” vol. 483, pp. 388–395, 2005.
- [67] A. Azam, K. E. Laflin, M. Jamal, R. Fernandes, and D. H. Gracias, “Self-folding micropatterned polymeric containers,” pp. 51–58, 2011.
- [68] A. K. Mohanty, U. Jana, P. K. Manna, and G. P. Mohanta, “Synthesis and evaluation of MePEG-PCL diblock copolymers: surface properties and controlled release behavior,” *Prog. Biomater.*, vol. 4, no. 2–4, pp. 89–100, 2015.
- [69] G. Singhvi and M. Singh, “Review: In-vitro Drug Release Characterisation Models,” *Int. J. Pharm. Stud. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 77–84, 2011.
- [70] D. R. Paul, “Elaborations on the Higuchi model for drug delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 418, no. 1, pp. 13–17, 2011.
- [71] J. Balcerzak and M. Mucha, “Analysis of Model Drug Release Kinetics from Complex Matrices of Polylactide-Chitosane,” *Prog. Chem. Appl. Chitin Its Deriv.*, vol. 15, pp. 117–126, 2010.
- [72] M. Pérez Guzmán, Y. Orobio Lerma, and Y. Baena Aristizábal, “Comparative study for in vitro release of metformin of two immediate-release multisource products, marketed in Colombia,” *Rev. Colomb. Ciencias Químico - Farm.*, vol. 42, no. 2, pp. 169–189, 2013.
- [73] R. Espada, S. Valdespina, C. Alfonso, G. Rivas, M. P. Ballesteros, and J. J. Torrado, “Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations,” *Int. J. Pharm.*, vol. 361, no. 1–2, pp. 64–69, 2008.
- [74] Y. Rodríguez Molina and L. Pérez Pérez, “Aproximaciones al diseño de copolímeros anfifílicos con potencial aplicación en la encapsulación y liberación de Anfotericina B,” Universidad Nacional de Colombia, 2019.
- [75] J. Xie, S. Singh-Babak, and L. Cowen, “Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Assay for Antifungal Drugs,” *Bio-Protocol*, vol. 2, no. 20, pp. 1–7, 2012.