



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

***Sistemas de vehiculización del  
antitumoral violaceína para uso  
terapéutico***

---

**Tesista: Lic. Ignacio Rivero Berti**

**Director/a: Dr. Guillermo Raúl Castro**

**Codirector/a: Dr. Prof. Nelson Durán Caballero**

**Año:2022**

El presente trabajo de Tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, gracias al financiamiento de la Universidad Nacional de La Plata, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

*El índice y las figuras poseen hipervínculos y puede utilizarse para navegar por el documento*

## ***Agradecimientos***

Al escribir estos agradecimientos me encuentro en la difícil situación de enumerar, hacer una lista, de las personas que contribuyeron a este trabajo.

Kropotkin decía que la labor humana, tanto intelectual como manual, estaba tan entrelazada, que esencialmente todo trabajo depende de todo el trabajo pasado y presente, y que, por lo tanto, tanto el concepto de propiedad como el de autoría eran absurdos. Establecer quien contribuyó y quien no, siempre es arbitrario.

Estos agradecimientos, son por lo tanto también, una lista arbitraria y necesariamente incompleta, si estás leyendo estas palabras, posiblemente hayas contribuido directa o indirectamente y por ello te estoy agradecido.

No obstante, hay algunas personas e instituciones sin las que este inusualmente largo periodo de tesis hubiese sido imposible.

Tengo que agradecer en primer lugar a Guiye, por abrirme las puertas de su laboratorio, sin pedirme más a cambio que mi voluntad de trabajar, espero haber honrado mi parte del acuerdo. Como suele decir él, el doctorado es una formación académica pero también humana, y él ha aportado generosamente a ambas.

A toda la gente del CINDEFI que me dio una mano cuando la necesité, espero poder contribuir con mi parte en los años que vienen.

A gente del Laboratorio de Nanobiomateriales, a aquellos que continúan trabajando allí, Manu, Tugce, Lucía, Flor, pero también a todos aquellos que dejaron una marca en su paso por él, Fede, Maxi, Berni, Carola, todos ellos me ayudaron con un mate, una charla o un consejo. En especial aquí tengo que agradecer a Germán que desinteresadamente compartió su experiencia y conocimientos conmigo y enriqueció profundamente este trabajo, pero también porque me animó cuando lo necesité.

A Boris, quien aportó su experiencia y trabajo en los cultivos celulares que aparecen en este trabajo de tesis, nunca me perdió la paciencia y por ello le estoy doblemente agradecido.

A Vera Álvarez, gran parte de los ensayos de caracterización de este trabajo son fruto de su generosidad.

A Sergio, que diseñó y construyó la impresora 3D usada en este trabajo y me instruyó en su uso.

A Claudia Adam y Celeste Onaindia que me proporcionaron los líquidos iónicos usados en uno de los capítulos.

A la gente del Lab. de Control de Calidad de Medicamentos de UNLP, que me ayudaron desinteresadamente en los primeros ensayos de este trabajo.

A Nelson que no solo me recibió en su laboratorio, sino que me abrió las puertas de su casa y a lo largo del tiempo que viví en Campinas se aseguró de que estuviese cómodo, y compartió conmigo su experiencia y consejos, con él estoy en deuda.

A la gente del IB y el IQ en UNICAMP, en particular a Marcelo Brocchi que me proporcionó espacio para trabajar en su laboratorio.

A la gente de CELFI-FIMET por haberme considerado para su curso de Oncología Traslacional, no solo fue una experiencia inolvidable, sino que también en solo dos semanas ampliaron de manera radical el panorama que tenía sobre mi propia investigación.

A CONICET, por financiar mi beca doctoral durante todo este tiempo.

Tengo que agradecer a mi familia entera, fueron y continúan siendo un soporte indispensable para mí. En especial mi madre que siempre me instó a formarme académicamente e hizo todo lo posible para que pueda hacerlo.

A lo largo de mis años en La Plata fui adoptando una familia que me banco en las malas y festejo conmigo en las buenas, a ellos les agradezco enormemente su cariño y apoyo.

A Celeste, quien posiblemente haya sido la persona que más me apoyó, se convirtió en mi remanso y es la que le da significado a todo esto.

A mis amigos de toda la vida.

A todos aquellos que no he nombrado pero que con su labor fundaron las bases en las que este trabajo se apoya.

# ÍNDICE

1	Resumen	1
2	Introducción general	2
2.1	Breve biología del cáncer, las quimioterapias	2
2.2	Violaceína, droga de estudio y modelo de droga hidrofóbica.	10
2.3	Formulación de Nuevos Componentes Activos (NCA)	15
2.4	Directivas de la tesis	20
3	Objetivos	22
3.1	Objetivo General	22
3.2	Objetivos Específicos	22
4	Sistema 1: Desarrollo de un sistema de vehiculización biopolimérico para la liberación de violaceína pH-dependiente	23
4.1	Introducción	23
4.2	Objetivos del capítulo	25
4.3	Materiales y métodos	25
4.4	Resultados	34
4.5	Discusión y conclusiones parciales	49
5	Sistema 2: Desarrollo de un sistema lipídico nanoparticulado receptor-dirigido conteniendo violaceína	51
5.1	Introducción	51
5.2	Objetivos del capítulo	54

5.3	Materiales y métodos	54
5.4	Resultados	62
5.5	Discusión y conclusiones parciales	79
6	Sistema 3: Desarrollo de un sistema enzimáticamente activo basado en nanopartículas lipídicas e inserción en una matriz 3D	81
6.1	Introducción	81
6.2	Objetivos del capítulo	84
6.3	Materiales y métodos	84
6.4	Resultados	93
6.5	Discusión y conclusiones parciales	113
7	Conclusiones finales y Perspectivas	114
8	Abreviaturas	118
9	Bibliografía	119
10	Listado de Figuras y Tablas	128
10.1	FIGURAS	128
10.2	TABLAS	132

# 1 RESUMEN

---

En el presente trabajo se detallan los resultados obtenidos fruto de la investigación para la vehiculización del pigmento de origen bacteriano violaceína, con el objetivo de crear sistemas terapéuticos antitumorales. La sección siguiente constituye una breve introducción al campo de aplicación de estos sistemas (el cáncer), así como información específica del funcionamiento de la violaceína, las problemáticas asociadas a su administración y una descripción general de los sistemas de vehiculización empleados. La sección 3, contiene los objetivos de esta tesis.

En la sección 4, se describe un sistema pH-responsivo basado en los biopolímeros pectina y gelatina, con el objetivo de lograr una administración oral y una liberación del fármaco en colon.

En la sección 5, se muestra un sistema basado en nanopartículas lipídicas en el que se buscó obtener un direccionamiento activo hacia células que sobre expresen receptores de folato.

En la sección 6, se presenta un sistema con el objetivo de ser implantado, basado tanto en nanopartículas lipídicas como en biopolímeros, con dos adiciones; una enzima activa, con el doble propósito de actuar de manera terapéutica pero también estimular la liberación de violaceína y que el sistema se ha diseñado como una tinta para impresión 3D.

En la sección 7 se ofrecen las conclusiones finales respecto de los capítulos anteriores y las secciones 8, 9 y 10 contienen la Bibliografía, las abreviaturas y una tabla de figuras respectivamente.

## 2 INTRODUCCIÓN GENERAL

---

### 2.1 BREVE BIOLOGÍA DEL CÁNCER, LAS QUIMIOTERAPIAS

*“Si esta imagen —la del cáncer como nuestro desesperado y malévolo ‘doppelgänger’ contemporáneo— nos inquieta tanto, es porque describe, al menos parcialmente, una verdad. Una célula cancerosa es una pasmosa perversión de la célula normal. El cáncer es un invasor y colonizador fenomenalmente exitoso, en parte, porque explota las características mismas que nos hacen exitosos como especie o como organismo.”*

*Siddhartha Mukherjee - El emperador de todos los males: Una biografía del cáncer [1]*

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, en el 2020 hubo unos 19 millones de nuevos casos y casi 10 millones de muertes de ese mismo año pueden ser atribuidas a este conjunto de enfermedades. Adicionalmente, un 80% de los nuevos casos se dan en individuos mayores a 50 años de edad, por lo que a medida que la población mundial envejece, la prevalencia de estas enfermedades crece [2]. Además, el 70% de las muertes asociadas al cáncer se producen en países con PBI medios y bajos. En particular, Argentina se encuentra clasificada como



un país con incidencia media-alta (177-245 casos por cada 100.000 habitantes) y el cáncer representa la causa de una cada cinco muertes en el país [3].

El cáncer (neoplasia maligna) es un conjunto de enfermedades en las que una masa de células se multiplica anormalmente y pierde la inhibición de crecimiento celular por contacto. En este sentido, posee la potencialidad de invadir tejidos adyacentes y otros órganos en un proceso llamado comúnmente metástasis.[4]

En condiciones normales, el ciclo celular, es decir el proceso por el cual una célula crece, duplica su material genético y se divide para formar dos células hijas, esta estrictamente regulado por señales tanto intra como extracelulares. Los mecanismos de regulación del ciclo celular pueden de esta manera retrasar o detener completamente el ciclo en caso de que hay daños en el material genético o el entorno no sea el adecuado. Pero si una mutación o grupo de mutaciones ya sean estas espontaneas o causadas por un agente externo, interfiere con este riguroso control, está dado el primer evento para la formación de un tumor.

Una vez que una célula o grupo de células comienza a reproducirse fuera del control normal del ciclo celular, comienza a ocurrir una selección con características darwinianas, en un proceso con varias etapas en el cual la masa celular adquiere características que le permiten sobrevivir y expandirse. Hanahan y Weinberg (2000, 2011) llaman a estas características “características distintivas del cáncer” (*Hallmarks of cancer*) [5,6]. Y son estas propiedades las que posibilitan explicar la complejidad de la patología.

### 2.1.1 Características del cáncer

Inicialmente se propusieron seis características esenciales para la proliferación celular y capacidad metastásica de una neoplasia, a saber:

*El mantenimiento de la señalización proliferativa*, mientras que los tejidos normales controlan estrictamente las señales promotoras del crecimiento asegurando el normal funcionamiento del tejido, las células tumorales se independizan de estos controles. Esto puede ser atribuido a la síntesis de factores de crecimiento y consecuente acción autocrina sobre receptores de tirosina-quinasa o por la mutación de los intermediarios “downstream” en la cascada metabólica, por ejemplo, proteínas Ras, proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) u otros.

*La evasión de los represores del crecimiento*, además de mantener la señal de proliferación las células tumorales también deben eludir todos aquellos mecanismos que detienen el crecimiento celular. Las células tumorales no solo evaden las complejas redes de señales antiproliferativas intracelulares (como por ejemplo las proteínas TP53 y RB), sino también las señales externas, como los mecanismos inhibitorios de contacto celular.

*Resistencia a los programas de muerte celular*, esto es, no solo la inhibición de las vías que conducen a la apoptosis, sino también la modificación de los mecanismos de autofagia y el cambio del comportamiento hacia la necrosis.

*La inmortalidad replicativa*, es decir la capacidad de proliferar manera ilimitada sin senecer o morir, esta capacidad esta generalmente asociada a la producción de telomerasa.

*La inducción de la angiogénesis*, para que el tumor alcance un tamaño macroscópico ha de crear una vasculatura con el objetivo de poder sostener su alto consumo de nutrientes y alta producción de desechos. La estimulación de esta angiogénesis está normalmente asociada a la producción de señales como el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) entre otros.

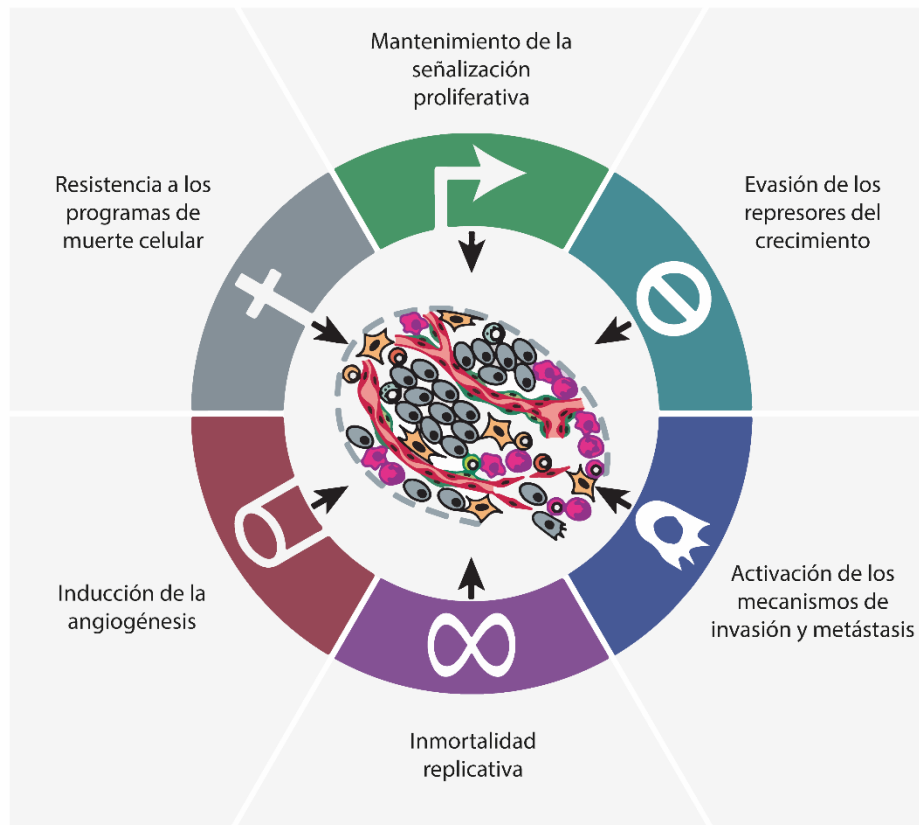
*La activación de los mecanismos de invasión y metástasis*. La colonización debido a la células tumorales requiere varios pasos, la invasión local, el acceso a la luz de un vaso sanguíneo o linfático, el tránsito por el mismo, y luego la extravasación a un tejido distante y el crecimiento en el mismo, el cual al principio genera pequeños nódulos (micrometástasis) y luego lesiones mayores.[5]

Recientemente, a estas características básicas se han añadido dos rasgos *habilitantes* para la generación de las características detalladas anteriormente, las cuales se detallan:

*La inestabilidad genómica*, que acelera la aparición de mutaciones adaptativas a las condiciones micro-ambientales del tejido circundante.

*La promoción de la inflamación* por las células tumorales, que paradójicamente promueve la tumorigénesis suministrando al tumor con factores de crecimiento, factores de angiogénicos, y otros factores que facilitan la invasión y metástasis. Además, a estos rasgos habilitantes se le agregan dos *propiedades emergentes*, la *reprogramación del metabolismo energético*, en las células tumorales el metabolismo de glucosa (*i.e.*, glicolisis) es estimulado incluso en condiciones aerobias. A su vez la glicolisis es

estimulada aún más debido a las condiciones de hipoxia, las cuales reinan en muchos tumores sólidos.[6] La Figura 2.1 engloba las características distintivas de cáncer.



**Figura 2.1: Características distintivas del cáncer, adaptado de Hanahan y Weinberg (2011)**

### 2.1.2 Quimioterapias

La quimioterapia es la administración de agentes químicos (fármacos) para el tratamiento de diferentes afecciones como las infecciones, aunque hoy por hoy el termino está relacionado prácticamente sólo al tratamiento del cáncer. La quimioterapia normalmente se administra en terapias combinadas (con cirugía o radioterapia), aunque puede ser administrada como monoterapia en algunos casos

(*quimioterapia primaria*). Por ejemplo, cuando la enfermedad se encuentra lo suficientemente avanzada para que no se considere la curación como objetivo, y en su lugar se busca detener la progresión del tumor y aliviar los síntomas patológicos asociados a éste.

Cuando la quimioterapia tiene como objetivo reducir el tamaño de un tumor, y de esta manera posibilitar que la resección quirúrgica sea más sencilla y eficaz, se denomina *quimioterapia neoadyuvante*.

No obstante, posiblemente, una de las funciones más importantes de la quimioterapia es evitar las recurrencias. Cuando el tumor primario es removido mediante una cirugía, puede dejar células con características tumorales en el paciente, las cuales pueden officar de “semilla” para la formación de nuevos tumores tanto a nivel local como sistémico. La *quimioterapia adyuvante* reduce sensiblemente la recurrencia de estos tumores y mejora la supervivencia de los pacientes. En estos casos la curación es posible mediante la quimioterapia siempre que la dosis, el agente quimioterapéutico y el programa sean adecuados [7].

### 2.1.3 Quimioterapéuticos

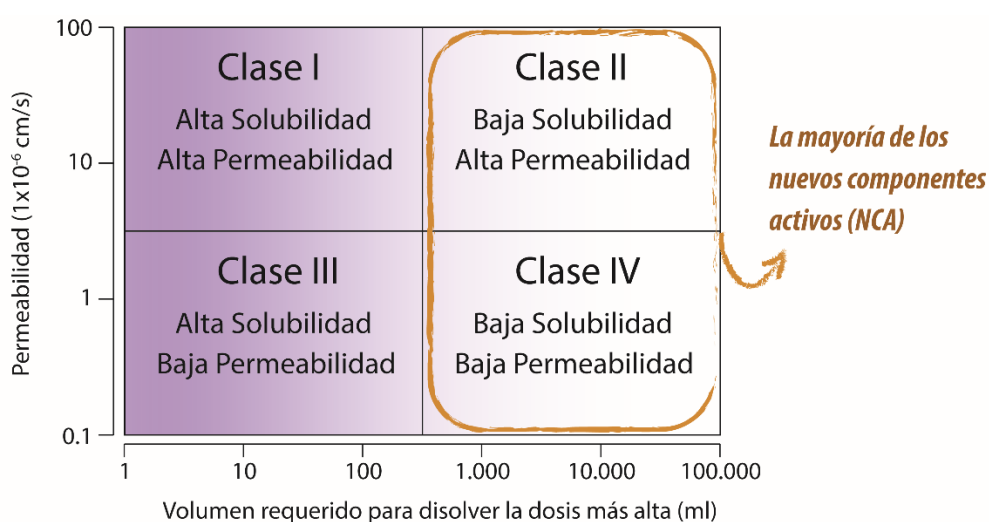
A pesar de importantes éxitos en las terapias, pocas categorías de medicamentos poseen un índice terapéutico más estrecho y un mayor potencial para causar efectos nocivos que los fármacos contra el cáncer. Incluso los fármacos dirigidos, tales como los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, trastuzumab) suelen tener efectos adversos severos y aun así se administran con fármacos citotóxicos convencionales [7]. La lógica detrás de muchos de estos fármacos es interferir con procesos asociados al ciclo celular,

y detenerlo o pervertirlo de manera de generar una respuesta apoptótica. Así, por ejemplo, los fármacos análogos de metabolitos interrumpen el proceso de replicación, los alcaloides obtenidos de la familia de plantas *Aposynaceae*, Género *Vinca* (*i.e.*, vincristina, vinblastina, y otros obtenidos de *Catharantus roseus*) alteran los husos mitóticos, las antraciclina obtenidas de cepas de *Streptomyces* como la doxorubicina bloquean topoisomerasas, etc.

Este estrecho índice terapéutico no tiene otra causa más que la profunda similitud que existe entre una célula tumoral y una célula normal en replicación activa. Es por ello que los fármacos citotóxicos suelen tener efectos adversos severos en tejidos con alta tasa de replicación, como las células madre de la médula ósea. Adicionalmente, como vimos anteriormente las células tumorales se ven sometidas a una selección con características darwinianas, por lo que un gran obstáculo de las quimioterapias es la aparición de poblaciones celulares resistentes [7].

No obstante, la creación de nuevos fármacos se ve obstaculizada, entre otras cosas, por la escasa solubilidad en agua de los nuevos componentes activos (NCA). Se estima, dependiendo de la fuente que entre el 50% y el 90% de los NCA en desarrollo y un 40% de los componentes activos actualmente en el mercado presentan esta misma dificultad [31] (**Figura 2.2**).

Esto se debe a que los compuestos con estas propiedades tienden a poseer mayor potencia (actividad de unión *in vitro*) debido a interacciones hidrofóbicas adicionales con sus objetivos (i.e. enzimas, receptores, canales) [32]. Estos compuestos suelen ser distintos a los fármacos convencionales debido a su baja solubilidad en agua, una de las principales causas de la mala farmacocinética (PK) y biodisponibilidad oral. Como resultado, tienen menos probabilidades de completar su desarrollo, lo que resulta en una menor tasa de aprobación por los entes reguladores.



**Figura 2.2: Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, un gran porcentaje de los nuevos componentes activos pertenecen a las categorías II y IV**

Considerando lo expresado anteriormente es que no solo es importante el desarrollo de nuevos fármacos citotóxicos, sino, como se detalla más adelante, nuevas formas de vehiculización que mejoren los perfiles farmacocinéticos, salteen mecanismos de resistencia y disminuyan la llegada de los fármacos citotóxicos a tejidos sanos.

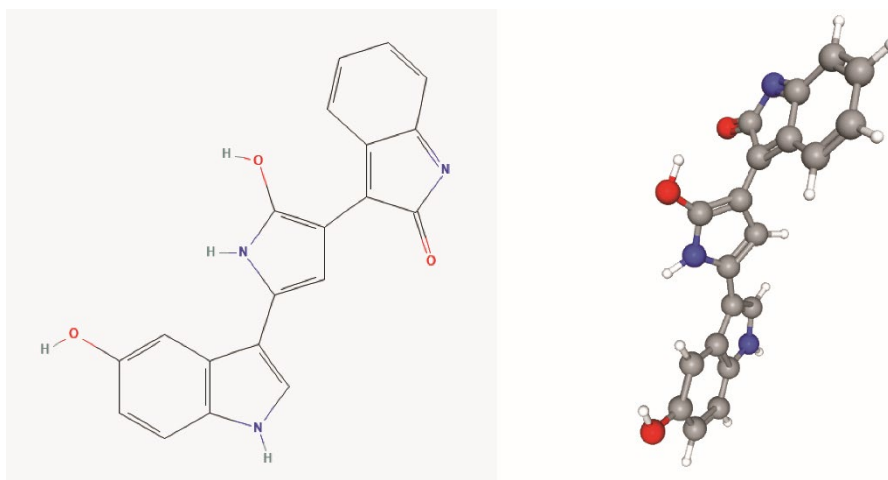
## 2.2 VIOLACEÍNA, DROGA DE ESTUDIO Y MODELO DE DROGA HIDROFÓBICA.

La violaceína es un pigmento bisindólico de origen bacteriano, producido por bacterias aisladas en diversos ambientes naturales y de diversos linajes filogenéticos. Como por ejemplo, cepas pertenecientes a los géneros *Chromobacterium*, *Janitobacterium*, *Collimonas*, *Duganella*, entre otros, de los cuales posiblemente la cepa más reconocida sea *Chromobacterium violaceum* [8].

La violaceína purificada (masa molecular 343,3) es un sólido a temperatura ambiente de color negro violáceo, insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol, moderadamente soluble en dioxano y acetona, y soluble en DMSO, metanol y acetato de etilo (XlogP3-aa= 2.7). Se descompone por encima de 290°C. El espectro UV-vis exhibe absorbancias máximas a 258, 372 y 575 nm en etanol. El espectro de emisión de fluorescencia en etanol a una longitud de onda de excitación de 575 nm muestra una banda de emisión a 675 nm.[9,10]



La importancia de la violaceína desde el punto de vista terapéutico radica en el abanico de actividades biológicas que presenta. A saber, tripanocida, inmunomoduladora, y antimicrobiana, entre muchas otras [11], y particularmente, la cual detallaremos en el presente trabajo de tesis, antitumoral.



**Figura 2.3:** estructura de la violaceína y un confórmero tridimensional de violaceína (PubChem).

### 2.2.1 Actividad antitumoral de la violaceína

Durante las últimas dos décadas, varios estudios han reportado la propiedad antitumoral de la violaceína [8,12]. Recientemente, un estudio ha demostrado que este pigmento no es genotóxico [13]. Se ha demostrado que algunos agentes citotóxicos a menudo inducen la muerte celular, en parte, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En particular, Leal y colaboradores (2015) han investigado si la violaceína afecta el estado redox celular [14]. Observaron que la violaceína era citotóxica tanto células de líneas celulares no tumorales como líneas tumorales, siendo estas últimas eran mucho más sensibles, pero esta citotoxicidad no estaba asociada a la

producción de ROS [14]. Se informaron resultados similares en células tumorales de ascitis de Ehrlich y Caco-2, pero estas presentaron una producción rápida de ROS debido a la aplicación de violaceína [15]. Estos hallazgos sugieren que *la violaceína afecta el estado redox de una manera específica respecto del tipo de célula.*

El grupo dirigido por el Prof. Durán fue el primero en reportar la propiedad anticancerígena de la violaceína en 2003 [16]. Desde entonces, diferentes grupos han investigado los mecanismos moleculares que respaldan la fuerte actividad antitumoral de este pigmento microbiano. Los siguientes párrafos señalan cómo la violaceína supera algunas de las características del cáncer reportadas hasta ahora: la sustentación de la señalización proliferativa, el retraso de la muerte celular y la activación de la metástasis y la invasión.

*La violaceína inhibe la señalización proliferativa.* Las células normales controlan estrictamente la síntesis y producción de factores de crecimiento y, en consecuencia, aseguran la homeostasis celular, mientras que las células cancerosas adquieren la capacidad de proliferar continuamente debido a mutaciones y sobre-activación de proteínas clave capaces de promover la progresión del ciclo celular, como las proteínas receptoras tirosina-quinasa, las rutas de proteína activada por mitógeno (MAP)-quinasa y los circuitos de señalización de PI3-quinasa que comprende su transductor de señal clave (AKT). Esta reportado que el tratamiento con violaceína altera muchos marcadores claves en la tumorigénesis humana, como MAP-K, ciclinas dependientes de quinasas, bloqueadores del ciclo celular como p53 y p21, y deacetilasas de histonas [17–23].

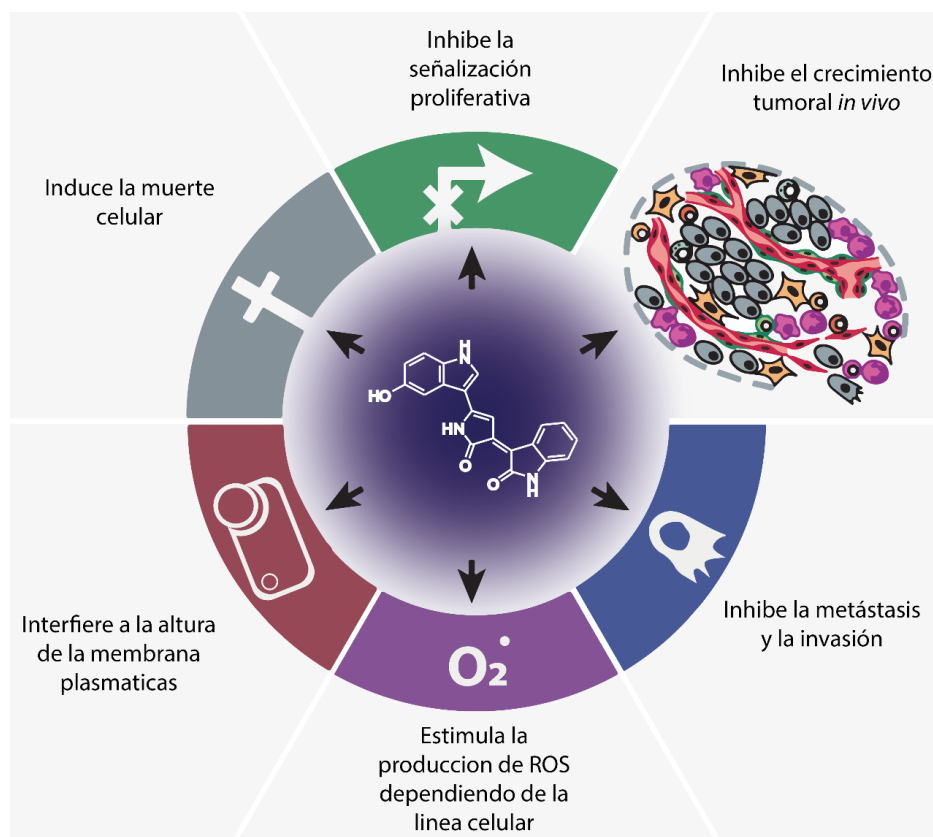
*La violaceína induce la muerte celular.* Y aunque se han descrito diferentes tipos de muerte celular, la apoptosis y la autofagia suelen ser las más exploradas. Los tumores

sólidos y hematopoyéticos sometidos al tratamiento con violaceína presentaron una disminución del número de mediadores antiapoptóticos (como DAPK1 y Bcl2) y un aumento del número de mediadores apoptóticos (como Bax y p53). Además la violaceína puede inhibir la autofagia, un mecanismo normalmente asociado a la supervivencia tumoral [21,24].

*La violaceína inhibe la metástasis y la invasión.* Las metaloproteinasas (MMP) juegan un papel esencial en los procesos metastásicos, ya que la metástasis requiere una remodelación de la matriz extracelular, ya que esta matriz depende de las MMP [25]. Platt y colaboradores (2014) demostraron que la violaceína era capaz de disminuir las formas activas de MMP-2 y MMP-9 [26]. Además, la violaceína puede disminuir la secreción de quimiocinas inflamatorias (CXCL12), las cuales son un modulador positivo de la migración celular y la metástasis del cáncer, Adicionalmente. Gonçaves y colaboradores (2016) también han descrito que la violaceína disminuye significativamente la capacidad de invasión de una línea celular de melanoma altamente metastásico (SKMEL-103) mediante el uso de un modelo de cultivo 3D desarrollado en matrigel, un fluido producido a partir de membrana basal utilizado para estimar el potencial migratorio de un cultivo de células tumorales [27].

*La violaceína establece fuertes interacciones con las membranas lipídicas.* Se ha demostrado que cantidades extremadamente pequeñas de violaceína alteran de manera significativa las propiedades fisicoquímicas de las membranas biológicas, alterando sus propiedades elásticas, interrumpiendo la correcta homeostasis y regulación de los lípidos de membrana y formando poros en células eucariotas y procariotas [18,28,29].

Además, la violaceína ha demostrado disminuir la viabilidad de decenas de líneas celulares tumorales establecidas de manera concentración-dependiente [9]. Además, se ha informado que la violaceína inhibe el crecimiento de células cancerosas de cabeza y cuello *in vitro* e *in vivo* [30].



**Figura 2.4:** La violaceína actúa inhibiendo muchas de las características del cáncer

### 2.2.2 Las problemáticas asociadas a la violaceína

No obstante, la violaceína es extremadamente insoluble en agua y fluidos biológicos lo que, como vimos anteriormente, no es exclusivo de este pigmento y limita la disponibilidad en los sitios de acción. En base a lo expresado anteriormente, la violaceína no sólo es una molécula de interés para el desarrollo de nuevas terapias sino también

constituye un buen modelo de estudio para otras drogas experimentales y no experimentales.

## 2.3 FORMULACIÓN DE NUEVOS COMPONENTES ACTIVOS (NCA)

A continuación, se introducirán algunas de las estrategias desarrolladas en el presente trabajo con el objetivo de generar formulaciones estables para la administración de violaceína.

En la preparación de las formulaciones de violaceína no sólo se han de tenido en cuenta las características del fármaco sino también, el sitio de acción, la ruta de administración, la cinética de liberación, la compatibilidad de los excipientes así como a las posibles condiciones fisiológicas a las que se van a ver estos expuestos [33]. Por esto, una descripción más detallada de los sistemas se encontrará en su capítulo experimental correspondiente (Capítulos 4, 5 y 6).

### 2.3.1 Biopolímeros en la liberación controlada de fármacos

Los biopolímeros son, como su nombre lo indica polímeros obtenidos de fuentes naturales, a menudo, son subproductos o desechos de procesos industriales no relacionados a la biomedicina y por esto suelen tener un bajo costo [34]. Los biopolímeros poseen una amplia diversidad química y estructural y por lo tanto un amplio espectro de hidrofobicidades, propiedades mecánicas y químicas, son biodegradables y muchos de ellos son biocompatibles y atóxicos. Pueden presentar además algunas propiedades adicionales beneficiosas como responsividad al pH o la temperatura, propiedades adhesivas, antimicrobianas o antioxidantes [33].

Un fármaco atrapado en una matriz polimérica puede abandonar la matriz por uno o más procesos, a saber, la degradación enzimática o no enzimática del polímero, erosión (esto es la solubilización del polímero y desprendimiento de la matriz), y/o la difusión del fármaco a través de la matriz. Estos fenómenos estarán a su vez influenciados por las condiciones ambientales en las que se encuentre la matriz polimérica (*e.g.*, temperatura, pH, fuerza iónica, tejido circundante, etc.). Es por ello, que han sido extensamente reportado el uso de biopolímeros en *sistemas de liberación controlada de fármacos (SLCF)* (es decir que el perfil de liberación de la molécula cargo responde a un cambio externo o “control”) y/o *sistemas de liberación sostenida de fármacos (SLSF)* (o sea, la liberación del fármaco desde la matriz se prolonga en el tiempo dentro de los rangos y concentraciones terapéuticas), mejorando la farmacocinética de administración de los fármacos y por lo tanto mejorando su perfil de efectos adversos [35].

Una descripción más detallada de los polímeros usados en el presente trabajo se presenta en la introducción de cada capítulo.

### 2.3.2 Emulsiones

Las emulsiones son posiblemente una de las maneras más sencillas de solubilizar una molécula con baja solubilidad en ambientes acuosos. Consisten básicamente en dos fases inmiscibles estabilizadas por un agente emulsionante. La estabilidad de este sistema heterogéneo es altamente dependiente del procedimiento técnico, del agente emulsionante seleccionado y el tamaño de la dispersión obtenida. Normalmente, se considera que aquellas emulsiones que alcanzan tamaños de partícula menores a un

micrómetro son preferibles, debido a que es menos probable que el sistema sea captado por el sistema retículo endotelial (RES) y por lo tanto su tiempo de circulación es extendido [36].

Debido a su simplicidad las emulsiones son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica, pero no por ello carecen de desventajas, las fugas de fármaco no son poco frecuentes, su estabilidad mecánica y térmica es muy limitada y su aclaramiento (en formulaciones parenterales) es difícil de modelar [37].

### 2.3.3 Sistemas nanoparticulados de liberación de fármacos

El ingreso de las nanociencias y la nanotecnología a la vehiculización de fármacos ha tenido un impacto incalculable. El desarrollo de nanopartículas con variadas propiedades y características ha mejorado sustancialmente la administración de muchas moléculas, y ha brindado soluciones para muchas de las problemáticas relacionadas a la seguridad y la eficiencia, y particularmente es de especial relevancia cuando hablamos de agentes citotóxicos [38]. Las nanopartículas, pueden proteger su carga de una degradación prematura, mejoran su biodisponibilidad, aumentan el tiempo de circulación plasmática y tienen una enorme relación superficie/ volumen lo que hace que tengan una gran superficie funcional donde se puedan adsorber compuestos [39].

En particular, en el caso de los tumores sólidos, las nanopartículas experimentan una ventaja adicional, debido a la tortuosidad y permeabilidad de la vascularización tumoral, las nanopartículas quedan retenidas en éste y por lo tanto direccionan su actividad terapéutica. A este tipo de direccionamiento se le conoce normalmente como *direccionamiento pasivo o efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR por su*

sigla en inglés). No obstante, un sistema que dependa exclusivamente del *EPR* difícilmente produzca demasiada acumulación en el tumor, con el inconveniente agregado de que algunos órganos sanos como el bazo o el hígado pueden experimentar efectos similares [40]. Por lo expresado, es común que los nuevos desarrollos hagan uso del *direccionamiento activo*, esto es, decorar la superficie de la nanopartícula con anticuerpos, ligandos u otras moléculas que puedan adherirse de manera específica a las células tumorales.

Mientras que existe una gran variedad de nanopartículas inorgánicas con infinidad de aplicaciones (por ejemplo, de óxido de hierro, metales nobles, silicatos, etc.), cuando el objetivo es la vehiculización de moléculas pequeñas, las nanopartículas de origen orgánico han tenido una mejor transferencia a las etapas clínicas, debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad [40]. Dentro de este último grupo, nos centraremos en las nanopartículas basadas en lípidos.

#### *2.3.3.1 Nanopartículas Sólidas lipídicas (SLN) y Vehículos Lipídicos Nanoestructurados (NLC)*

Inicialmente las *SLN* aparecen como una solución a los inconvenientes asociados a los vehículos lipídicos de la anterior generación (micelas, liposomas), es decir, su limitada estabilidad, las fugas de carga (fármaco), etc. [37]. Las *SLN* están basadas fundamentalmente en uno o más lípidos sólidos a temperatura ambiente, generalmente lípidos de cadena larga (*e.g.*, que pueden ser grasas, ceras, etc.) estabilizados por algún tipo de tensioactivo biocompatible en una escala nanométrica. Este último, puede ser un tensioactivo natural (como la lecitina de soja) o sintético pero biocompatible (como por ejemplo, los polisorbatos) [41]. Adicionalmente, se pueden usar tensioactivos

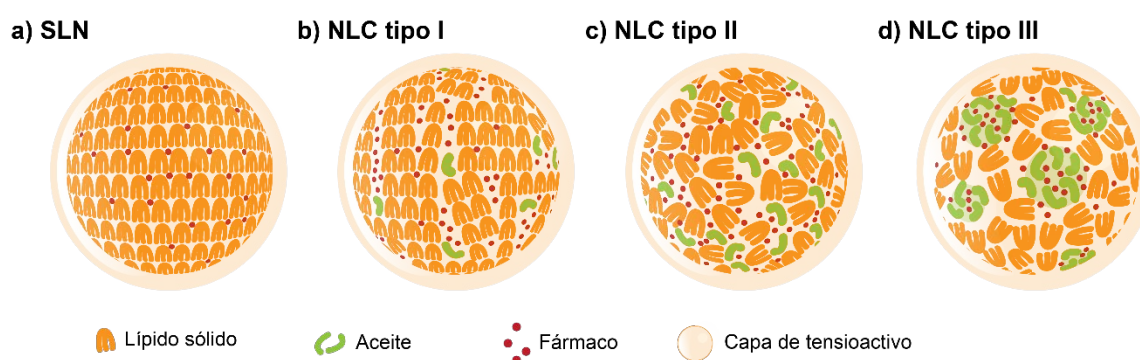


poliméricos, como los poloxámeros, polímeros poli(óxido de etileno) (PEO) y poli(óxido de propileno) (PPO) de la forma PEO-PPO-PEO. La cubierta hidrofílica en este caso (PEO) puede evitar la respuesta inmune y prolongar los tiempos de circulación sistémica. Debido a su biocompatibilidad, su fácil escalabilidad de producción y capacidad de cargar drogas hidrofóbicas, pero también hidrofílicas, las *SLN* han sido ensayadas para encapsular distintos tipos de agentes terapéuticos y varias de estas formulaciones se encuentran en etapas de ensayos clínicos [42]

En las *SLN* (**Figura 2.5.A**), el fármaco se encuentra entre capas lipídicas del núcleo o bien interaccionando con las cadenas carbonadas de manera directa. Sin embargo, los lípidos comienzan a cristalizar con el tiempo y debido a las grandes diferencias de energía libre ( $\Delta G$ ) entre las estructuras amorfas y cristalinas de los lípidos y las interacciones fármaco-lípido, en muchos casos el fármaco es expulsado de la red cristalina y por lo tanto la encapsulación disminuye sensiblemente con el tiempo [41]. A su vez, el reordenamiento cristalino de los lípidos en las *SLN* modifica las cinéticas de liberación del fármaco.

Los vehículos lipídicos nanoestructurados (*Nanostructured lipid carriers*, abreviados comúnmente como *NLC*) son a veces llamados *SLN* de segunda generación, y fueron desarrollados para solucionar el problema de la cristalización lipídica mediante la inclusión de un lípido líquido a temperatura ambiente (esto es, un aceite) en el seno de la fase lipídica. La fase lipídica resultante depende mucho de las proporciones de los lípidos usados, así como de su naturaleza, pero son generalmente clasificados como *imperfectos*, *amorfos* o *múltiples*. En los *NLC* imperfectos (**Figura 2.5.B**) una pequeña cantidad de aceite genera huecos (imperfecciones) en la red cristalina que mejoran la

encapsulación del fármaco e impiden su expulsión. En los *NLC* amorfos (**Figura 2.5.C**), la estructura cristalina no se concreta, ya sea por la geometría particular del aceite o por la proporción de ella usada y la droga se encuentra uniformemente distribuida en la matriz. Por último, en los *NLC* múltiples (**Figura 2.5.D**), la solubilidad del fármaco es mayor en el aceite que en el lípido sólido, y se forman gotículas en la matriz en las que predominan el fármaco y el aceite[41].



**Figura 2.5: Esquemización de SLN y diferentes tipos de NLC. Adaptado de Rivero Berti y colaboradores (2022) [41]**

## 2.4 DIRECTIVAS DE LA TESIS

En el presente trabajo se pretende abordar la vehiculización del pigmento bacteriano violaceína. La relevancia de la vehiculización radica por un lado en la generación de nuevas terapéuticas oncológicas, y por el otro en el diseño de estrategias para la formulación de fármacos con baja o nula solubilidad en medios acuosos.

El primer trabajo descrito en la sección 4 es el “Sistema 1: Desarrollo de un sistema de vehiculización biopolimérico para la liberación de violaceína pH-dependiente”. En el mismo, los biopolímeros pectina y gelatina fueron empelados para generar un vehículo

de administración oral de violaceína, que responda a los cambios de pH encontrados en el tracto digestivo.

El segundo sistema se aborda en la sección 5 es el “Sistema 2: Desarrollo de un sistema lipídico nanoparticulado receptor-dirigido conteniendo violaceína”. En el presente se diseñó una forma de administración parenteral de una nanopartícula con direccionamiento activo, utilizado como objetivo el receptor de folato FOLR1, el cual es sobre expresado en algunas líneas tumorales.

Por último, en la sección 6 se detalla el “Sistema 3: Desarrollo de un sistema enzimáticamente activo basado en nanopartículas lipídicas e inserción en una matriz 3D”. En el mismo se pretendió crear un sistema implantable, impreso en 3D, en el que la violaceína se libere localmente. En el sistema desarrollado además incluye una enzima con el doble propósito de estimular la liberación del fármaco y por su posible actividad terapéutica.

Los tres sistemas presentados fueron diseñados, caracterizados fisicoquímicamente con diversas técnicas, y luego su actividad citotóxica fue evaluada *in vitro*.

## 3 OBJETIVOS

---

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

**Estudiar y desarrollar vehículos eficientes para el transporte y liberación de violaceína con potencial utilización antitumoral y antineoplásico.**

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Comprender y familiarizarse con las propiedades intrínsecas de la violaceína.**
- **Evaluar su interacción con materiales factibles de ser utilizados en sistemas de vehiculización para su aplicación terapéutica.**
- **Desarrollar sistemas de vehiculización para violaceína a través de diferentes estrategias.**
- **Evaluar la encapsulación y propiedades de los sistemas mediante diversas técnicas fisicoquímicas.**
- **Ensayar *in vitro* las respuestas de líneas celulares a estos sistemas y comparar su citotoxicidad frente a la violaceína libre.**

## 4 SISTEMA 1: DESARROLLO DE UN SISTEMA DE VEHICULIZACIÓN BIOPOLIMÉRICO PARA LA LIBERACIÓN DE VIOLACEÍNA PH-DEPENDIENTE<sup>1</sup>

---

*“The worst thing you can do is nothing.” - Terry Pratchett, Snuff [43]*

*Engage! - Captain Jean Luc Picard, Star Trek*

### 4.1 INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se abordará el diseño de un sistema de vehiculización para ser administrado por vía oral. Con el objetivo de que la liberación de violaceína se produzca en mayor medida en el colon, se seleccionó para su construcción el biopolímero pectina por las propiedades que se detallan a continuación.

Las pectinas son biopolímeros probióticos producidos por plantas comúnmente utilizados en alimentos como espesantes, emulsionantes y gelificantes. Las pectinas, tienen muchas propiedades que pueden ser beneficiosas en usos terapéuticos, por ejemplo, su consumo disminuye el colesterol y los triglicéridos plasmáticos, son antioxidantes, y apoyan la supervivencia de los lactobacilos probióticos. En particular, se ha demostrado que su ingesta previene muchos tipos de cáncer, incluidos el de colon y el de próstata [44,45]. Principalmente para el cáncer de colon, se han descrito diversas

---

<sup>1</sup> Este capítulo fue publicado como Rivero Berti, I., Rodenak-Kladniew, B., Perez, A. A., Santiago, L., Duran, N., & Castro, G. R. (2019). “Development of biocarrier for violacein controlled release in the treatment of cancer”. *Reactive and Functional Polymers*, 136, 122-130.

actividades antitumorales de las pectinas, que van desde la potenciación de la respuesta inmunitaria hasta la actividad anti-mutagénica, regulación de oncogenes e inducción de varios microARN, inhibición del crecimiento tumoral, angiogénesis, etc. [44]. Las pectinas están compuestas por segmentos lineales de poli- $\alpha$ -1,4-D-ácido galacturónico con diversos grados de metoxilación, y zonas ramificadas compuestas por ramnogalacturonanos y otros sacáridos en diferentes proporciones según las fuentes vegetales de obtención. Los diferentes grados de metoxilación hacen que las pectinas tengan un amplio espectro de hidrofobicidad y puedan gelificar en presencia de iones divalentes (como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ ) o a bajos pHs en presencia de sacáridos [46]. Además, la administración oral de pectina en humanos posee efectos beneficiosos como la prevención del crecimiento excesivo de patógenos, la mejora del crecimiento de las criptas del colon, la disminución del pH intestinal y la inhibición de la expresión y mutación de galectina-3, todos los mecanismos involucrados en el desarrollo del cáncer de colon [45]. Adicionalmente, los geles formados por las pectinas tienen un comportamiento dependiente del pH, que hace que sean virtualmente insolubles en pH ácido (y por lo tanto no se solvaten) e indigestibles por las enzimas digestivas humanas, lo que les permite proteger al fármaco cargado en los tractos superiores del sistema digestivo, pero que una vez en el colon con un pH ligeramente alcalino y las enzimas correspondientes a la flora bacteriana se erosione fácilmente. Los resultados mencionados hacen de las pectinas una valiosa alternativa potencial para desarrollar diversas estrategias para la administración de fármacos en el colon. [46,47]

Por su parte, la gelatina es una proteína desnaturalizada producida por hidrólisis parcial del colágeno, la proteína más abundante en los mamíferos. Desde un punto de vista químico, la gelatina es una molécula zwitteriónica pero también posee grupos

hidrofóbicos en una proporción de 1:1:1. La naturaleza anfipática de la gelatina, además de su biocompatibilidad y biodegradabilidad por proteasas, la convierte en un vehículo prometedor para la liberación controlada de fármacos en el intestino [48].

Por otro lado, teniendo en cuenta los antecedentes de la violaceína para interaccionar con lípidos vistos en la sección 2.2.1, se utilizará polioxietileno(20) sorbitano (PS20), también conocido como Tween® 20 como agente emulsionante, un tensioactivo ampliamente utilizado por la industria farmacéutica [49].

Con las previas consideraciones, en el presente capítulo será desarrollado un sistema de vehiculización de violaceína con el objetivo ser liberado en el colon.

## 4.2 OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- **Estudiar maneras de llevar la violaceína a solución acuosa.**
- **Desarrollar un sistema basado en pectina para administración oral de violaceína para su liberación en colon.**
- **Caracterizar las propiedades del sistema en fluidos fisiológicos simulados.**
- **Caracterizar fisicoquímicamente al sistema mediante diversas técnicas.**
- **Evaluar su actividad biológica.**

## 4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.3.1 Materiales

La violaceína [(2E)-2-[5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-1,2-dihidro-3H-pirrol-3-iliden]-1,2-dihidro-3H-indol-3-ona] se obtuvo a partir de cultivos de *Chromobacterium*

*violaceum* con una metodología detallada en la bibliografía [50,51]. Brevemente, se preparó un cultivo de *C. violaceum* en caldo Luria Bertrani, luego de 48h a 37°C con agitación a 100 rpm se centrifugó el cultivo a 7600xg para obtener un precipitado celular (*i.e.*, “pellet”). El *pellet* celular se empleó para purificar violaceína mediante extracción con disolvente (Soxhlet), primero con cloroformo, posteriormente con éter etílico para eliminar fracciones de impurezas y para finalizar con etanol para extraer violaceína semi-purificada. En una etapa siguiente, la violaceína fue purificada mediante recristalización en metanol-agua. Las muestras resultantes se caracterizaron mediante espectroscopías de resonancia magnética nuclear (RMN) <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, ultravioleta-visible (UV-vis), de masas e infrarroja (FTIR) (datos no mostrados).

La pectina cítrica de bajo metoxilo (tipo 8001) fue amablemente donada por Gelfix S.A. (Buenos Aires, Argentina). El monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano (PS20, Tween® 20) fue adquirido en Anedra (Buenos Aires, Argentina). El MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] se adquirió de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). Todos los demás reactivos empleados fueron de grado analítico adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania) o similar.

#### 4.3.2 Preparación de la emulsión

Se disolvieron diferentes cantidades de violaceína en pequeños volúmenes de dimetilsulfóxido (DMSO) y se mezclaron con una solución acuosa del tensioactivo no iónico PS20. Las mezclas resultantes fueron sonicadas en un procesador ultrasónico (70 % de amplitud, 130 W, Cole-Parmer, EE.UU.) equipado con una punta de titanio de 6 mm a 0°C durante 15 min. Luego, la emulsión se almacenó a 5°C para análisis posteriores. La concentración final de DMSO en la emulsión fue inferior al 0,5 % (v/v).



#### 4.3.3 Caracterización espectrofotométrica de la emulsión

Las mediciones de fluorescencia y absorción UV-Vis de las muestras se realizaron en cubetas de cuarzo de paso óptico 10 mm y en placas negras de 96 pocillos (Thermo Scientific, EE.UU.), respectivamente, utilizando un lector de microplacas/cubetas (Infinite M200 PRO Tecan, Alemania).

#### 4.3.4 Estabilidad de la emulsión

Se evaluaron las emulsiones que contenían 500  $\mu\text{M}$  de violaceína y 0.1, 0.5 o 1.0% (p/v) de PS20 a 580 nm cada 24 h durante 144 h.

#### 4.3.5 Tamaño y potencia Z de la emulsión

La emulsión se observó por primera vez en un microscopio electrónico de transmisión TEM JEOL, JEM 1200 EX II sin dilución adicional. El tamaño de partícula promedio ( $Z_{av}$ ) y la distribución del tamaño de partícula en intensidad ( $\text{PSD}_i$ ) del sistema de violaceína-PS20 se determinaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) en un ángulo establecido de  $90^\circ$  en un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). La fuente de luz del instrumento empleada fue de  $\lambda = 632,8$  nm. La muestra original se diluyó diez veces en solución de NaCl 154 mM para reducir la absorbancia. Para estas mediciones se consideró un índice de refracción de violaceína de 1.804. El diámetro hidrodinámico de las partículas se obtuvo a partir del máximo de la curva Intensidad (%) frente al diámetro de partícula (nm). Para las mediciones de potencial  $\zeta$ , el instrumento determinó la distribución de la movilidad electroforética de las partículas mediante la técnica de velocidad de láser Doppler. Los valores de potencial  $\zeta$  se

calcularon según el modelo de Smoluchowski utilizando el software del equipo. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado a 25°C.

#### 4.3.6 Preparación de los microgeles

Se prepararon geles con diferente composición, para ello se utilizaron diferentes proporciones de Pectina (P) y Gelatina (G) dispersas en la emulsión previamente preparada. Estas dispersiones se gotearon mediante una bomba peristáltica en una solución de glutaraldehído al 1,0% (v/v) de CaCl<sub>2</sub> 500 mM con agitación continua durante 25 min. Posteriormente, los microgeles fueron lavados con agua destilada y secados a 50°C durante 12 h y posteriormente se almacenaron en un refrigerador a 5°C para su posterior análisis. Las formulaciones se expresan como P<sub>X</sub>G<sub>Y</sub> donde X e Y representan el porcentaje de pectina y gelatina en la formulación respectivamente. En algunos ensayos, el glutaraldehído estaba ausente en la formulación y se nombró con "sg". Además, el contenido de violaceína en las formulaciones se marcó con el sufijo "viol".

#### 4.3.7 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de atrapamiento de la violaceína fue calculada de la siguiente manera:

$$EE (\%) = \frac{m_{viol i} - (C_{viol gs} \times V_{gs})}{m_{viol i}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.1}$$

donde  $m_{viol i}$  es la masa inicial de violaceína,  $C_{viol gs}$  es la concentración de violaceína en la solución de gelificación y  $V_{gs}$  es el volumen de la solución de gelificación.

#### 4.3.8 Cinética de hidratación

Los viales que conteniendo los microgeles secos y tarados se incubaron en 1,0 ml de fluido gástrico simulado sin pepsina USP (SGFsp) pH=1,2, Líquido Intestinal Simulado sin pancreatina (USP 27) (ISFsp) pH=6,8 o ISFsp pH=7,4 con agitación a 37°C durante 5 h. Las muestras se retiraron del buffer, se lavaron con agua destilada y se secaron en papel absorbente para eliminar el exceso de líquido de la superficie y a continuación se tararon a cada hora. Cada muestra fue estudiada por triplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de incremento de peso.

#### 4.3.9 Cinética de liberación

Los experimentos de liberación cinética de Viol se realizaron en un aparato de disolución USP 2 *Paddle* a 37°C agitado a 100 rpm. Las muestras de perlas (P<sub>4</sub>G<sub>0</sub>, P<sub>4</sub>G<sub>0,5</sub>, P<sub>4</sub>G<sub>1</sub> y P<sub>4</sub>G<sub>2</sub>) se tararon y suspendieron en 300 ml de fluido gástrico simulado sin pepsina USP (SGFsp) a pH= 1,2 durante 2 h. Posteriormente, las perlas se filtraron, lavaron y se continuó el ensayo en 300 ml de Líquido Intestinal Simulado sin pancreatina (USP 27) (ISFsp) a pH= 6,8 durante 2 h. Finalmente, el pH se ajustó a 7,4 con NaOH 1,0 M hasta el final de los ensayos. Se tomaron muestras de 1,0 ml del vial y la concentración de violaceína se midió espectrofotométricamente a  $\lambda = 580$  nm cada hora. Los resultados se expresaron como porcentaje acumulativo de liberación (Q, %). Cada muestra fue analizada por triplicado

#### 4.3.10 Análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis SEM fue realizado en microgeles liofilizados ( $P_4G_1$  y  $P_4G_2$ , los cuales contenían o no Viol). Las muestras fueron cubiertas con oro mediante pulverización empleando un metalizador Balzers SCD 030 que permitió obtener un espesor de capa de metal de 15 a 20 nm. La superficie y la morfología de las microesferas se determinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (Philips SEM 505, Países Bajos) y se procesaron mediante un programa de digitalización de imágenes (Soft Imaging System ADDA II, SIS). Las imágenes SEM fueron analizadas por el software ImageJ® (NIH, EE. UU.). La rugosidad de la superficie se reflejó en la variación estándar de los valores de gris de los píxeles en una sección de la imagen de la microesfera completa. Primero, el software abrió los archivos de imagen SEM y los convirtió en una imagen de 8 bits. La barra de escala se ajustó con los píxeles de la imagen. Luego, se seleccionó una sección de 200 x 300  $\mu\text{m}$  en la imagen y se midió estadísticamente mediante una computadora equipada con el software. Los valores bajos de variación estándar indican superficies suaves en el análisis de histograma [52].

#### 4.3.11 Análisis del tamaño de los microgeles

Se adquirieron imágenes de los diferentes lotes de microgeles. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ® (NIH, EE. UU.) para obtener su dispersión y tamaño de partícula. Los resultados se expresaron como diámetro medio expresado en  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.12 Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad térmica de violaceína, pectina (P), gelatina (G) y microgeles de partículas P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> en presencia o ausencia de glutaraldehído en la solución gelificante (P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>G<sub>2</sub>g). Los datos de TGA se obtuvieron utilizando un analizador termogravimétrico (TGA-50 Shimadzu, Japón). Las muestras (5,0–10,0 mg) se tararon en una bandeja de aluminio y las mediciones se realizaron a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min con purga de nitrógeno.

#### 4.3.13 Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las propiedades térmicas de violaceína, pectina, gelatina y microgeles P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>G<sub>2</sub>g se determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC, Perkin Elmer Inc., Model Pyris 1, Waltham, MA, EE. UU.) en una atmósfera de nitrógeno. Los escaneos se llevaron a cabo a una velocidad de calentamiento de 10°C/min en el rango de temperatura de 0°C a 250°C.

#### 4.3.14 Análisis de difracción de rayos X (XRD)

Los patrones XRD se adquirieron en un difractómetro PANalytical X'Pert PRO equipado con una fuente de rayos X (Philips PW 1830, PAN analytic BV, Países Bajos) utilizando radiación CuK $\alpha$  a 40 kV y 40 mA. Los patrones de difracción se recogieron en el rango de 2 $\theta$  de 5° a 75° con un tiempo de adquisición de 1 s en cada paso de 0,02°.

#### 4.3.15 Estudios de citotoxicidad

La línea celular de cáncer colorrectal humano HCT116 (CCL-247) fue cultivada en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Invitrogen Co., EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10 % (Natocor, Córdoba, Argentina) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y mg/ml de estreptomina respectivamente; Gibco, Invitrogen Co., EE.UU.) en una incubadora humidificada a 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> 5 %. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] [53]. Se sembraron células HCT116 (4 x 10<sup>3</sup> cel./ml) en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h en condiciones estándar. Luego, las células se trataron con Viol (0-10 µM) en diferentes sistemas de administración durante 48 h. Debido a la muy limitada solubilidad de Viol en medios acuosos, el colorante se disolvió en un volumen mínimo de DMSO alcanzando una concentración final máxima en el vehículo de 0,05% (v/v). Además, la citotoxicidad de DMSO, PS20 y TGP (vehículos) se ensayaron individualmente (controles). Después de los tratamientos, se añadió a cada pocillo 100 µl de solución de MTT (500 µg/ml de MTT en PBS) y se incubaron a 37°C durante 3 h. Los cristales de formazán resultantes se disolvieron en 100 µl de DMSO y se analizó la absorbancia a  $\lambda = 560$  nm en un lector de microplacas (detector multimodo Beckman Coulter DTX 880, Ca., EE.UU.). La viabilidad celular se expresó como porcentaje del control no tratado (100% de supervivencia).

#### 4.3.16 Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo al menos dos veces por duplicado o triplicado. Los resultados se expresan como cambio relativo en comparación con los controles y se presentan como medias  $\pm$  desviación estándar. La significación estadística

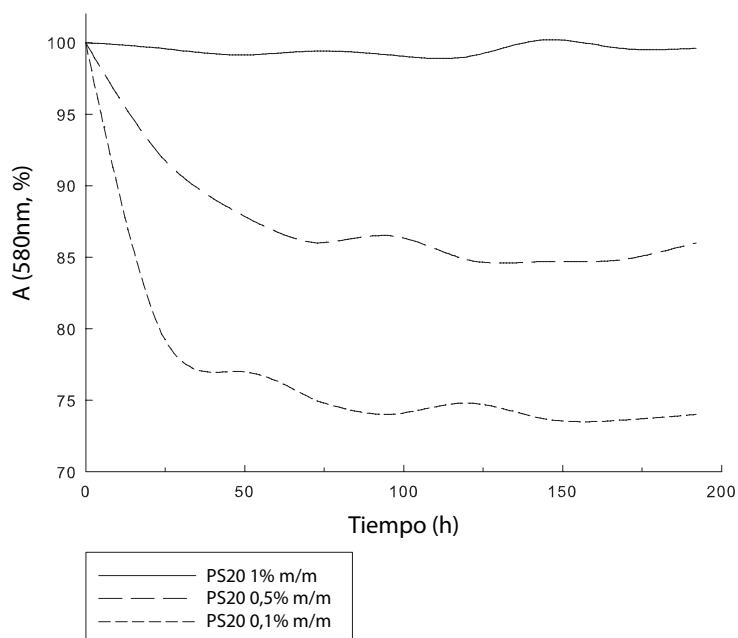
se determinó utilizando el ensayo estadístico t de *Student*. La significancia fue establecida en  $p < 0,05$ .

## 4.4 RESULTADOS

El primer desafío para desarrollar un dispositivo oral que contenga Viol en medio acuoso fue producir una formulación sin que se produzca precipitación en el tracto digestivo antes de llegar al colon, debido a que el colorante es soluble sólo en etanol, metanol, DMSO o DMF, pero poco soluble en medios acuosos. Para ello, se prepararon emulsiones utilizando diferentes concentraciones de tensioactivo como el monolaurato de polioxietileno(20)sorbitano (PS20) y estudiar su estabilidad.

### 4.4.1 Preparación y caracterización de la emulsión

La emulsión de Viol 100  $\mu\text{M}$  en PS20 1% m/m (8,1 mM) mostró una alta estabilidad durante al menos 200 h (**Figura 4.1**)



**Figura 4.1** Estabilidad de la emulsión de violaceína en diferentes concentraciones de PS20 (—, 1.0%; — — —, 0.5% - - - -, 0.1%).

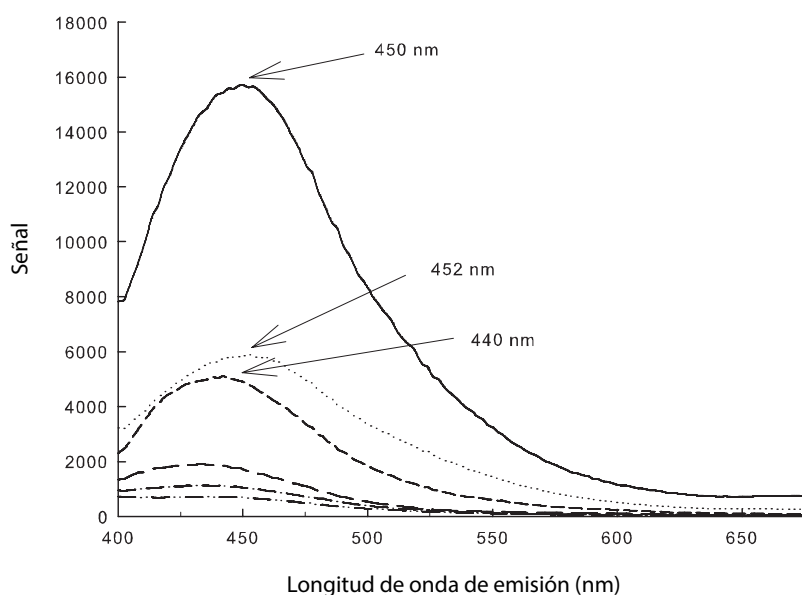
La densidad óptica de la emulsión en medio acuoso decayó cuando el PS20 disminuyó su concentración por debajo de 0,5% m/m (4,1 mM) y a su vez se observó



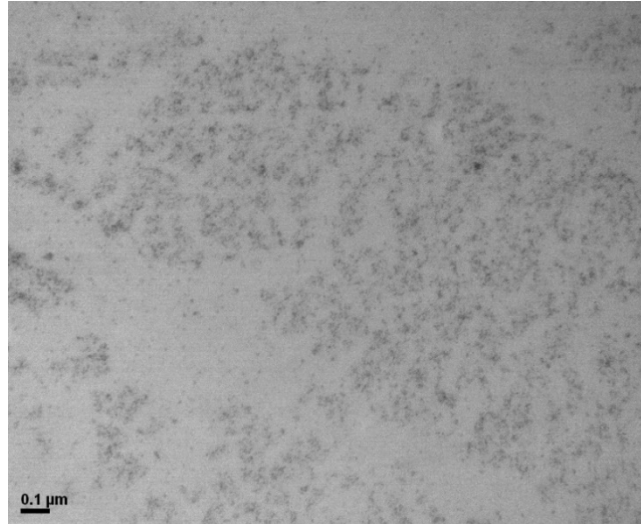
simultáneamente el crecimiento de un fino precipitado violeta en el fondo del vial, lo que indica la presencia de Viol libre insoluble precipitado de la suspensión.

En tanto, el máximo de emisión fluorescente de las emulsiones fue constante a  $\lambda = 447$  nm cuando la concentración de Viol disminuye de 100  $\mu\text{M}$  a 6,4  $\mu\text{M}$  en la emulsión manteniendo constante el PS20 de 8,1 mM.

Sin embargo, se observaron desplazamientos de los máximos de emisión fluorescente de los espectros en las emulsiones cuando se redujo la concentración de Viol en la solución manteniendo constante la relación Viol-PS20. En particular, los cambios hipsocrómicos máximos se encontraron a concentraciones de PS20 inferiores a 0,33 mM y especialmente cuando la concentración de PS20 fue de 65  $\mu\text{M}$ , muy cerca de la Concentración Micelar Crítica de PS20 (aproximadamente 60  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 4.2**).



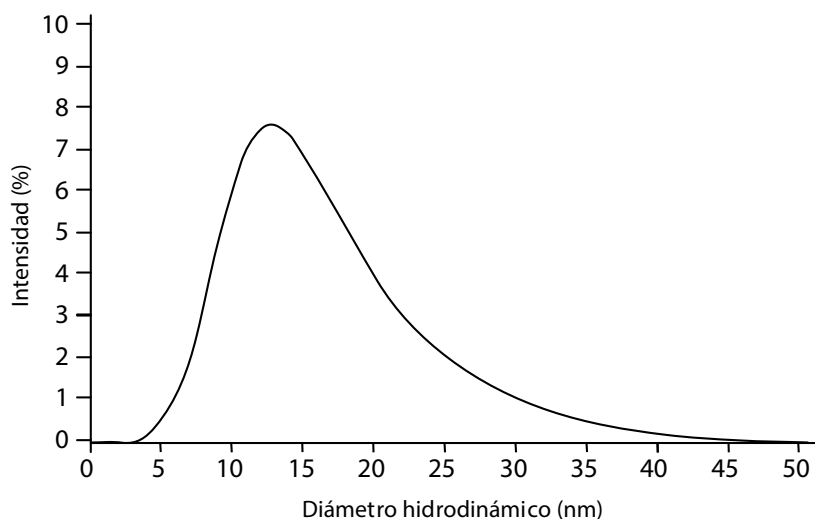
**Figura 4.2:** Espectros de emisión de diferentes concentraciones de PS20-Viol.



**Figura 4.3: Micrografía TEM de Viol-PS20 (100 mM: 8.0 mM).**

Estos resultados muestran fuertes cambios en las longitudes de onda máximas del pigmento, lo que indica una alta sensibilidad de la emulsión Viol a las condiciones ambientales.

Las imágenes de TEM de la emulsión Viol-PS20 muestra una dispersión electrodensa homogénea con un tamaño en el límite de resolución del microscopio (**Figura 4.3**). Las mediciones de DLS de la emulsión Viol-PS20 mostraron un pico de intensidad a 12,6 nm que representa más del 80% del volumen total de partículas (**Figura 4.4**).



**Figura 4.4: Distribución de tamaño de las micelas de la emulsión PS20-Viol**

Los valores de tamaño promedio Z ( $Z_{av}$ ) e índice de polidispersidad (PDI) de la emulsión fueron  $27,9 \pm 6,5$  nm y  $0,3 \pm 0,2$ , respectivamente. El hecho de que el pico de máxima intensidad de la emulsión Viol-PS20 (12,6nm) no coincida con el valor de  $Z_{av}$  indica la presencia de partículas de mayor tamaño, representando más del 20% del total de partículas. Este hecho además podría explicar el valor de PDI obtenido, que se encuentra en el rango de polidispersidad intermedia. Por otro lado, la muestra Viol-PS20 presentó valores de potencial  $\zeta$  y movilidad electroforética de  $-10.3 \pm 0.7$  mV y  $-0.84 \pm 0.05$  mm.cm/Vs, indicando una carga aniónica neta parcialmente superpuesta por la presencia de iones de sodio y cloruro utilizados en las diluciones. Por lo tanto, el efecto combinado de carga y tamaño de la muestra podría ser responsable de la estabilidad coloidal del sistema. Sin embargo, la administración oral de Viol-PS20 en emulsión implica el paso de la formulación a lo largo del tracto digestivo, hecho que la vuelve inestable con la probable consecuencia de la precipitación de Viol en el estómago y/o intestino delgado, y previo de llegar al colon. De hecho, la encapsulación de la emulsión

Viol-PS20 utilizando biopolímeros se persiguió considerando los cambios observados en los espectros de Viol mediados por diferentes condiciones ambientales, y con la idea de desarrollar una microcápsula para la posible administración oral de Viol. Pectina de bajo metoxilo fue seleccionada debido a su fácil entrecruzamiento con cationes multivalentes que producen geles estables, la resistencia a la degradación de ésta en los tramos superiores del intestino humano y su posterior degradación en los tramos inferiores debido a la flora del colon.

#### 4.4.2 Preparación y caracterización de los microgeles (matrices biopoliméricas)

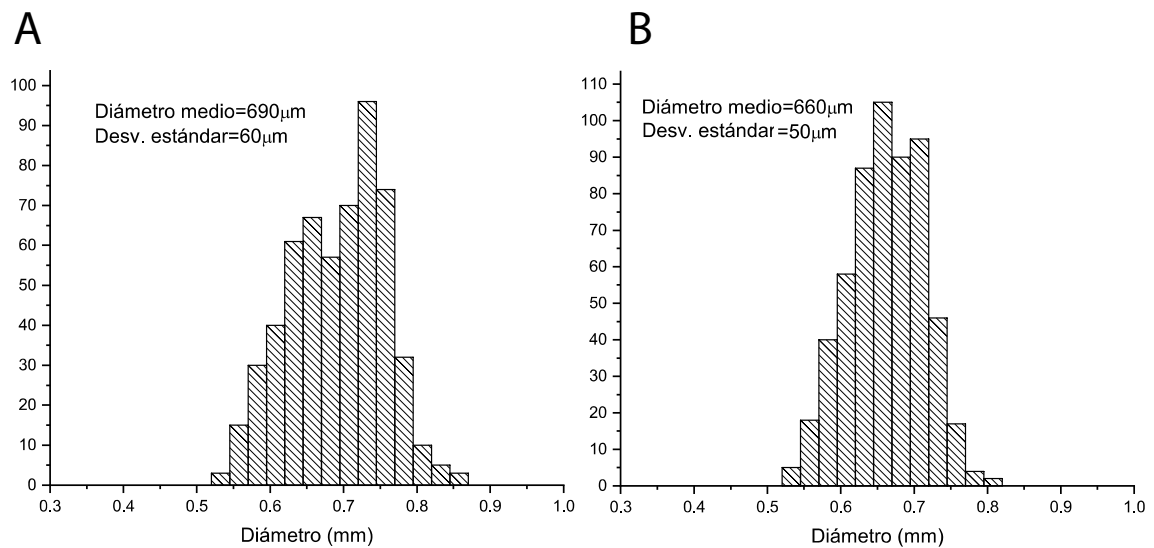
Se obtuvo una alta eficiencia de encapsulación de Viol en microcápsulas de pectina, sin embargo, la morfología de los geles fue irregular y la liberación de Viol en fluido intestinal simulado fue cercana al 90% en menos de 2h. Por estos resultados, se decidió incorporar diferentes concentraciones de gelatina en la formulación de pectina para reducir la liberación de Viol y mejorar la resistencia de la matriz biopolimérica. Los rendimientos de encapsulación de violaceína fueron superiores al 96% para la pectina y para todas las formulaciones de pectina-gelatina ( $P_xG_y$ ). Además, el aumento del contenido de gelatina en el gel disminuye la liberación de Viol de las microcápsulas y produce cambios en la morfología del gel de esferoide a forma de esfera, lo que hace que la estructura sea más adecuada para desarrollar modelos de liberación controlada, de manera reproducible y predecible.

FORMULACIÓN	LIBERACIÓN DE VIOLACEÍNA (% , 4 H).	MORFOLOGÍA	EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN (%)	TAMAÑO DE LOS MICROGELES (μM)
P <sub>4</sub> G <sub>0</sub>	95 ± 6	Tipo cabeza-cola	96.3 ± 0.9	
P <sub>4</sub> G <sub>0.5</sub>	60 ± 7	Esferoide	97.8 ± 1.8	
P <sub>4</sub> G <sub>1</sub>	32 ± 8	Esfera	97.3 ± 0.9	690 ± 60
P <sub>4</sub> G <sub>2</sub>	11 ± 2	Esfera	98.7 ± 0.6	660 ± 50

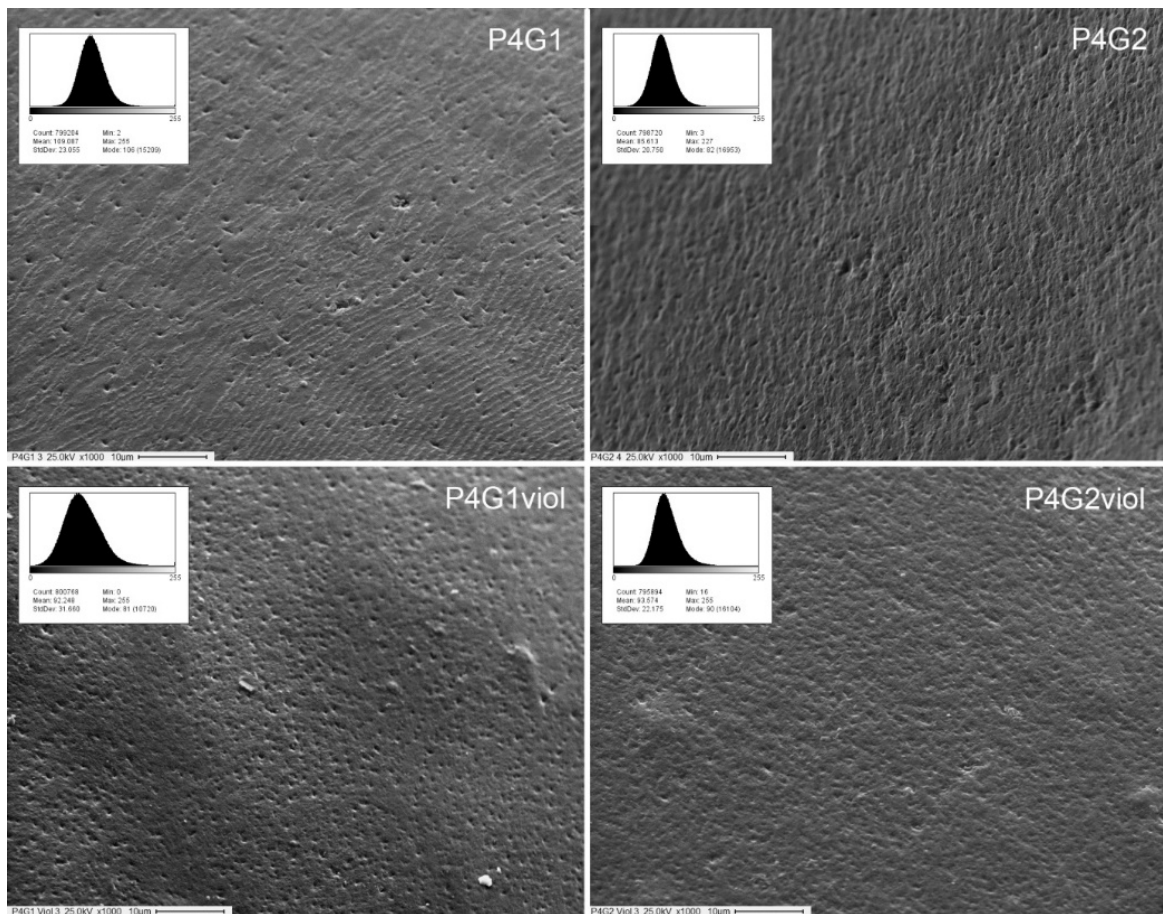
**Tabla 4.1: Propiedades de la liberación de violaceína, morfología, eficiencia de encapsulación y tamaño de las partículas de pectina-gelatina.**

Adicionalmente, la liberación de Viol de las formulaciones P<sub>4</sub>G<sub>1</sub> a P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> se redujo del 32% al 11% cuando la concentración de gelatina se elevó del 1,0% al 2,0% (**Tabla 4.1**). Además, las microesferas de PG que contenían del 1,0 % al 2,0 % de gelatina mostraron diámetros similares de 690 y 660 μm respectivamente (**Figura 4.5**). Esos valores mostraron diferencias estadísticamente significativas (p< 0.01). Además, P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> tiene una distribución más homogénea del tamaño de partícula que muestra un tipo de distribución similar a una campana de Gauss, mientras que P<sub>4</sub>G<sub>1</sub> muestra una distribución más amplia que se asemeja al tipo de distribución de Fisher.

Las micrografías de SEM de muestras P<sub>4</sub>G<sub>1</sub> y P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> analizadas por el programa *ImageJ* reveló una disminución de la rugosidad de 23,05 a 20,75 de los microgeles estimada por la desviación estándar producida por el aumento en el contenido de gelatina (**Figura 4.6**). Además, la inclusión de las emulsiones de Viol en las formulaciones de PG produjo un aumento alto en la DE de la formulación P<sub>4</sub>G<sub>1</sub>: 31.66, pero leve para P<sub>4</sub>G<sub>2</sub>: 22.17. En particular, la rugosidad producida por la incorporación de la emulsión de Viol a la matriz fue atenuada 6 veces por el aumento de gelatina en la formulación de 1,0% a 2,0%. La disminución de la rugosidad de la superficie en los sistemas de liberación controlada puede redundar en una mejor modelización de los sistemas.



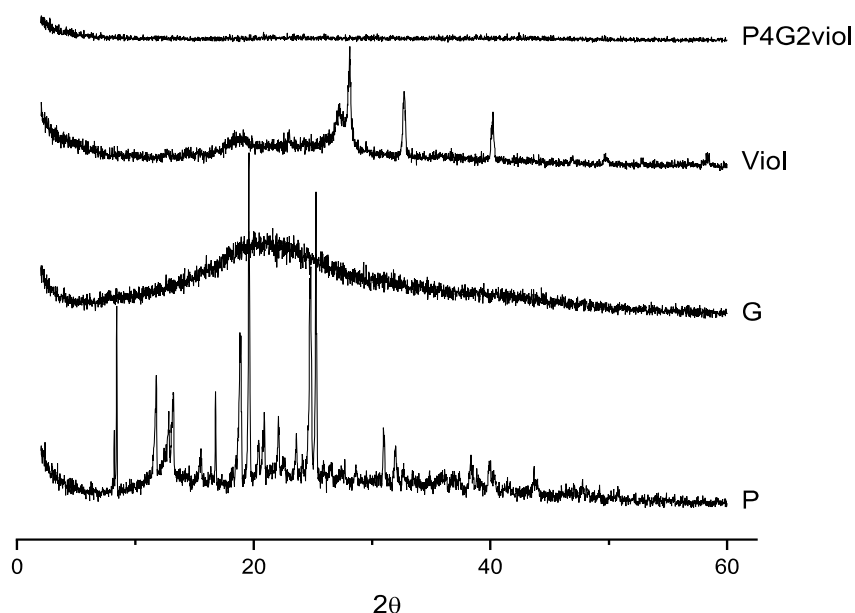
**Figura 4.5: Tamaño medio y distribución de P<sub>4</sub>G<sub>1</sub> (A) y P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> (B) El eje vertical representa el número de perlas contadas N= 563.**



**Figura 4.6: Imágenes de SEM P<sub>4</sub>G<sub>1</sub> y P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> con y sin violaceína. Los insertos muestran el histograma de grises obtenidos por el programa ImageJ.**

#### 4.4.3 Análisis fisicoquímico de las perlas

El análisis XRD de pectina, gelatina, Viol y la formulación P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> que contiene el pigmento mostró picos característicos para algunos componentes de la matriz, pero ninguno para la formulación, lo que sugiere que Viol se distribuye molecularmente dentro de la matriz o bien se encuentra dentro de la matriz en un estado amorfo. (Figura 4.7).

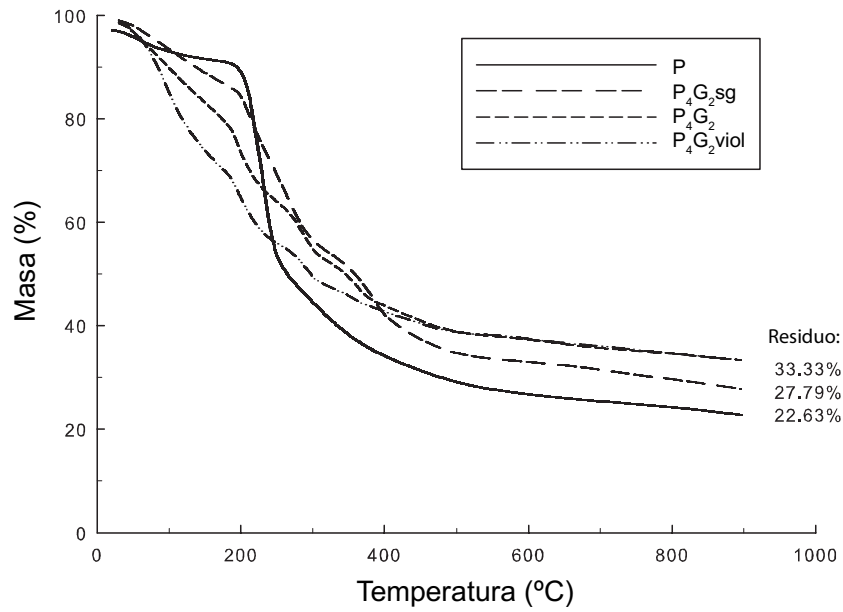


*Figura 4.7: Difracción de rayos X de pectina, gelatina, violaceína y la formulación P<sub>4</sub>G<sub>2</sub>viol.*

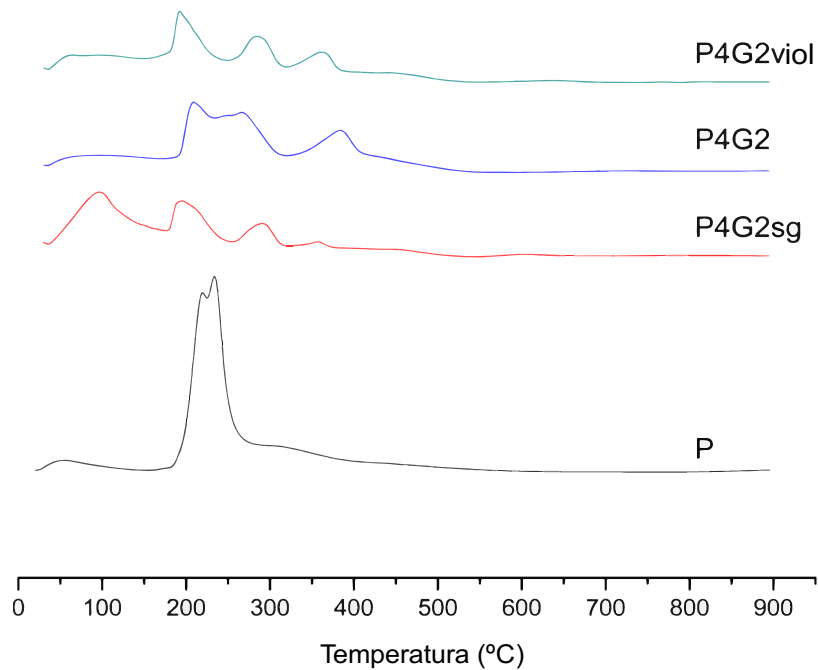
Este resultado es relevante debido a que la presencia de cristales de fármaco en cualquier formulación implica un cambio de estado físico durante los procesos de liberación del fármaco y accionar biológico con el consiguiente cambio de entalpía que es un detrimento para la biodisponibilidad del fármaco. El análisis TGA de las formulaciones de P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> mostró primero un paso de pérdida de masa antes de los 200°C debido a la pérdida de agua asociada con diferentes grados de interacción dentro de los componentes de la matriz y sumado a la eliminación de productos volátiles. La pectina pura sin tratar (P) mostró una rápida disminución de la masa en el rango de 200°C a



250°C y fue observado un residuo pirolítico del 22 % de la masa inicial debido a la descomposición oxidativa de los esqueletos del biopolímero.



**Figura 4.8:** Termogravimetría de microesferas de pectina (P)-gelatina (G), sin glutaraldehído (sg) y con violaceína (Viol).



**Figura 4.9:** Derivada del peso respecto de la temperatura para microesferas de pectina (P)-gelatina (G), sin glutaraldehído (sg) y con violaceína (Viol).

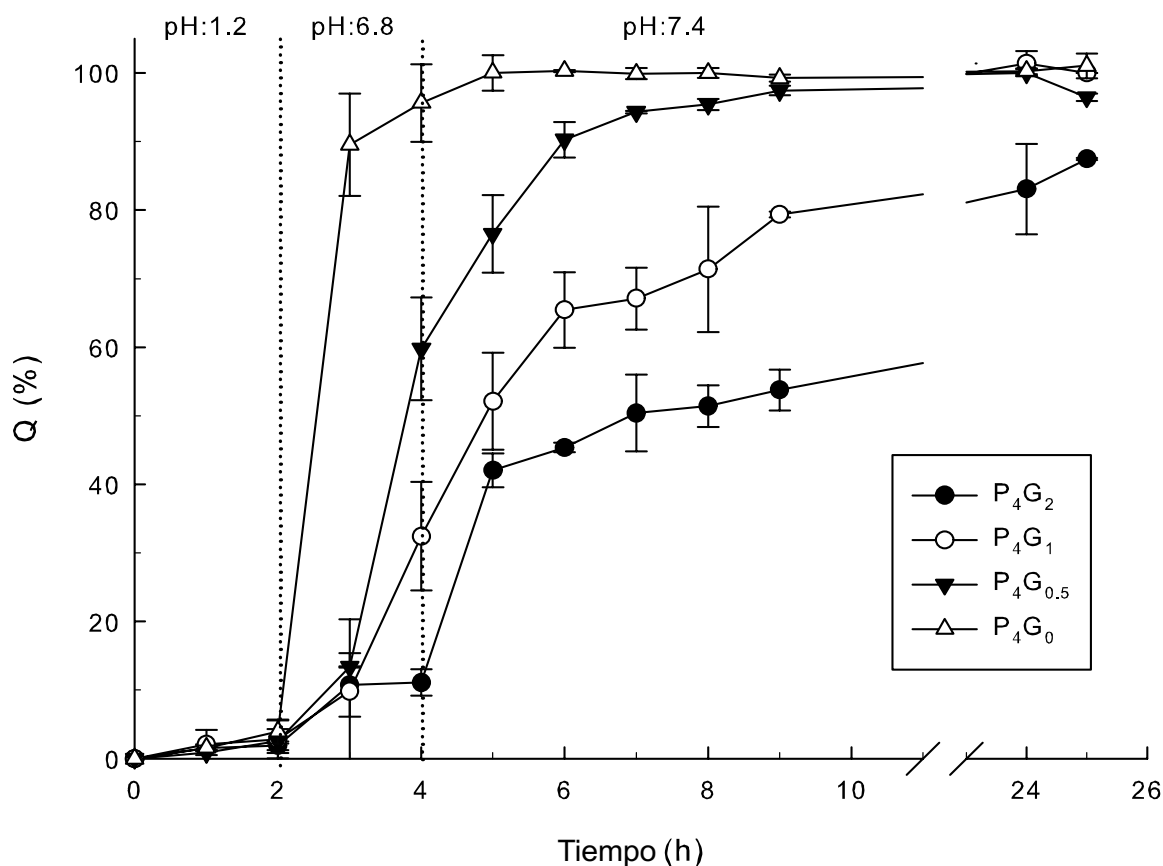
La mezcla gelificada de pectina y gelatina conteniendo calcio, pero sin glutaraldehído (P<sub>4</sub>G<sub>2</sub>sg) mostró un comportamiento térmico más complejo y una alta cantidad (27%) de masa residual al final del análisis (**Figuras 4.8 y 4.9**).

Los resultados obtenidos son consistentes con una disminución de la cristalinidad mostrada por XRD, pero representan un aumento en la estabilidad térmica general de la matriz polimérica. La adición de glutaraldehído a la solución gelificante (P<sub>4</sub>G<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>G<sub>2</sub>viol) desplazó todos los máximos de degradación a temperaturas más altas y aumentó el residuo pirolítico (33%) (**Figuras 4.8 y 4.9**). El aumento de la estabilidad térmica de la matriz con la temperatura puede explicarse porque el glutaraldehído es un reactivo bifuncional que reacciona entrecruzando las cadenas poliméricas formando una matriz más compacta.

El hinchamiento de las matrices conteniendo pectina depende en gran medida del grado de metoxilación y del pH [54]. Por esa razón, las formulaciones de P<sub>4</sub>G<sub>1</sub> y P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> se probaron en tres condiciones diferentes: buffer SGFsp (pH= 1,2), buffer SIFsp (pH= 6,8) y buffer SIFsp (pH= 7,4). La solvatación de ambas formulaciones en buffer SGF (pH= 1,2) fue de un aumento cercano al 150 % en el peso de las microcápsulas. Para los buffers SIFsp 6.8 y 7.4, se pueden observar dos procesos: (i) el proceso de solvatación se ve muy favorecido a un pH superior a 5-6 debido al pKa de los grupos carboxílicos de la pectina; (ii) el relajamiento de las cadenas poliméricas favorece la erosión del material, disminuyendo el peso de los microgeles. Sin embargo, el pH del buffer como la cantidad de gelatina en la matriz alteraron el equilibrio entre estos dos procesos. P<sub>4</sub>G<sub>1</sub> tuvo el mayor aumento de peso en el buffer 6,8 pero también la mayor erosión a pH 7,4. Mientras tanto, P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> no se encontró demasiado solvatado a pH 6,8 y 7,4. El papel de la

gelatina parece ser un refuerzo estructural de la matriz compuesta mediante el desplazamiento de las uniones puente de hidrógeno del agua y así evita la dispersión de cadenas poliméricas en la matriz.

En la **Figura 4.10** se puede observar la liberación de Viol desde las matrices PxGy en un esquema de cambio de pH que recrea el pasaje por el tracto digestivo, esto es 2h en SGFsp (pH=1,2), luego 2h en SIFsp (pH=6,8) y en SIFsp (pH=7,4) hasta el final del ensayo. En el primer tramo, a pH=1,2 la liberación de Viol no supera el 3% y no hay diferencias significativas entre las formulaciones ensayadas. Este hecho puede estar relacionado con la constante de equilibrio de la pectina ( $pK_a \approx 3,5$ ). La protonación de los grupos carboxílicos (*i.e.*, ácido galacturónico) disminuye la repulsión entre las cadenas, consecuentemente disminuye la hidratación y convierte la pectina en un polímero con características neutras, en donde preponderan los segmentos hidrofóbicos que retienen la Viol [55]. Además, la estabilidad del gel de pectina mejoró, posiblemente, por la interacción hidrofóbica de los grupos metoxilados de la pectina y los aminoácidos hidrofóbicos de la gelatina (es decir, leucina, isoleucina, metionina y valina), lo que reduce la solvatación del polímero, la separación de las cadenas y haciendo más compacto el biopolímero, lo que en consecuencia redujo la liberación del fármaco [56]. La adición de gelatina y glutaraldehído a la formulación de pectina tenía como objetivo proporcionar una alta estabilidad a la matriz concomitantemente con el retraso en la liberación del fármaco (**Figura 4.10**).



**Figura 4.10:** Perfiles cinéticos de liberación controlada de Viol a partir de microesferas con diferentes formulaciones a diferentes pH. Abreviaturas:  $P_4G_0$ , 4,0% pectina y 0% gelatina;  $P_4G_{0.5}$ , pectina al 4% y gelatina al 0,5%;  $P_4G_1$ , pectina al 4,0% y gelatina al 1,0%;  $P_4G_2$ , pectina al 4,0% y gelatina al 2,0%.

Este efecto se evidenció cuando las formulaciones se llevaron a pH= 6,8. La liberación de Viol desde las formulaciones fue del 95 % para  $P_4G_0$ , 60 % en  $P_4G_{0.5}$ , 32 % en  $P_4G_1$  y 11 % en  $P_4G_2$  después de 4h ( $p < 0.01$  de significancia para todas las formulaciones), lo que es indicativo del efecto de la gelatina en la formación del coacervado.

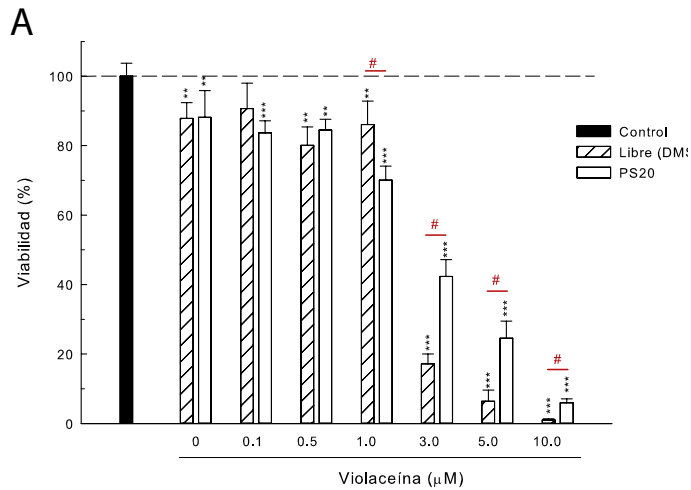
#### 4.4.4 Estudios de citotoxicidad de las formulaciones

La eficacia anticancerígena de las formulaciones que contenían Viol se evaluó mediante la viabilidad celular en células de cáncer colorrectal HCT116. Las células se

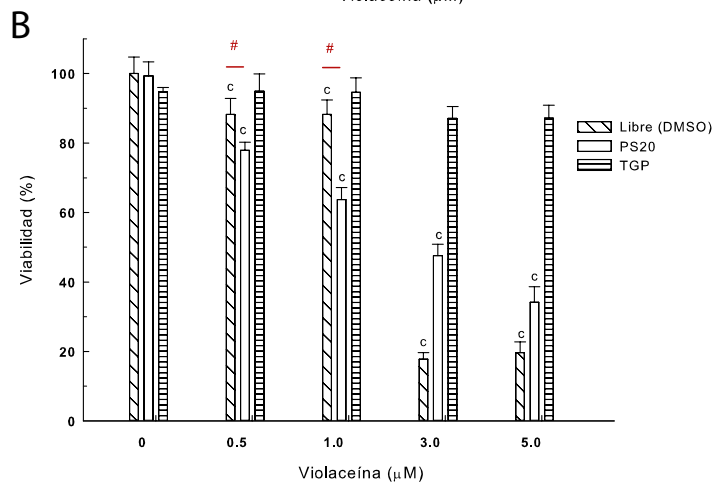
analizaron durante 48h con un rango de concentraciones de Viol (0–10  $\mu$ M) según información extraída de la bibliografía [57,58].

El efecto citotóxico de Viol se considera cuando hay una reducción superior al 30 % en la viabilidad celular siguiendo la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009 [59]. En nuestras condiciones experimentales, ninguno de los vehículos empleados (DMSO, PS20 y PS20-G<sub>4</sub>P<sub>2</sub>) fue citotóxico para las células HCT116. Sin embargo, Viol-DMSO y Viol-PS20 redujeron el crecimiento celular de forma dependiente de la dosis desde 1,0 y 0,5  $\mu$ M, respectivamente (**Figura 4.11.A**). Se observaron efectos citotóxicos significativos para la emulsión Viol-PS20 a 1,0  $\mu$ M, que inhibió la viabilidad celular en un 35 %, mientras que dicho efecto no se observó para Viol-DMSO a la misma concentración, donde el crecimiento celular HCT116 fue inhibido sólo en un 15 %.

**HCT-116**  
**MTT - 48 h**



**Figura 4.11: Efecto citotóxico en células de cáncer colorrectal HCT116 de la concentración de Viol disuelta en DMSO y emulsionada en PS20 (A) y esferas de pectina gelatina (B) a las 48h**



A partir de 3,0 µM de Viol, se observa una inhibición más intensa de la supervivencia celular para Viol-DMSO en comparación con Viol-PS20. Los valores  $IC_{50}$  (concentración que inhibe el 50 % de la viabilidad celular) para ambos sistemas de administración están entre 1,0 y 3,0 µM, lo que sugiere que Viol es tan eficaz como otros agentes quimioterapéuticos que se utilizan actualmente en el carcinoma colorrectal (por ejemplo, 5-FU y oxaliplatino) [60,61]. A su vez, la encapsulación de PS20 no afecta la actividad anticancerígena de Viol. Por otro lado, la matriz de Viol encapsulada con P<sub>4</sub>G<sub>2</sub> (TGP-Viol) no mostró actividad citotóxica en células cultivadas HCT116 en ninguna de las concentraciones ensayadas (**Figura 4.11.B**). Esto no es sorprendente considerando que

se espera que la Viol solo actúe una vez liberada de la matriz, ya sea por mediante la relajación de las cadenas de polímero debido al cambio de pH, o bien debido a la degradación de pectina por la flora intestinal en el colon [62].

#### 4.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PARCIALES

Se desarrolló un sistema novedoso y responsivo al pH para el suministro de violaceína al colon que combina emulsificación y formación de microgeles de pectina-gelatina. Se analizó la estabilidad de las emulsiones de Viol-PS20 y se encontró que concentraciones del tensioactivo no iónico de 1,0% sostenían la emulsión estable por más de 200h. La formación de microgeles poliméricos, a partir de Viol-PS20 con polímeros biodegradables no solo brinda una alta estabilidad a la matriz, sino que también evita la liberación de pigmento a lo largo del tracto digestivo durante la administración oral y transporta el Viol emulsionado al intestino grueso. Los análisis SEM de las superficies de la matriz PxGy mostraron una superficie altamente homogénea debido a la inclusión de la emulsión en las formulaciones. El análisis de rayos X indicó la ausencia de estructuras cristalinas de Viol en la formulación y los experimentos de TGA revelaron el efecto del glutaraldehído en el aumento de la estabilidad de las microesferas. Las formulaciones híbridas de pectina-gelatina demostraron una cinética de liberación controlada de Viol dependiente del pH y la concentración de gelatina en las formulaciones. Se encontró que la citotoxicidad de Viol en línea celular de cáncer de colon HCT116 depende solamente de la concentración de pigmento. Sin embargo, la matriz de pectina-gelatina mostró una citotoxicidad reducida en las líneas celulares, lo que indica el efecto protector del recubrimiento a lo largo del tracto digestivo hasta llegar al sitio de su degradación. La presencia de pectina o sus productos de degradación, podría

adicionalmente, proporcionar una actividad antitumoral sinérgica a Viol en el colon. En particular, la presencia de la emulsión Viol-PS20 en la formulación evita la precipitación del pigmento dentro del sistema digestivo aumentando su biodisponibilidad y reduce efectivamente la viabilidad de las células de cáncer de colon HCT116.



## 5 SISTEMA 2: DESARROLLO DE UN SISTEMA LIPÍDICO NANOPARTICULADO RECEPTOR-DIRIGIDO CONTENIENDO VIOLACEÍNA<sup>2</sup>

---

*“[...] Sus fármacos, decía, eran «balas mágicas»: balas por su capacidad de matar y mágicas por su especificidad. La expresión tenía una antigua resonancia alquímica y esta repicaría con insistencia a lo largo del futuro de la oncología.”*

*Siddhartha Mukherjee - El emperador de todos los males: Una biografía del cáncer [1]*

### 5.1 INTRODUCCIÓN

Con la experiencia en la preparación de emulsiones adquirida en el trabajo presentado en el capítulo anterior. Se evaluaron algunos tensioactivos novedosos, con la esperanza de generar sistemas de vehiculización más específicos y/o más potentes.

Los líquidos iónicos (IL) son sales orgánicas con puntos de fusión típicamente por debajo de los 100°C. Los IL poseen una amplia gama de propiedades, como baja presión de vapor, capacidades de disolución y buena estabilidad térmica.[63] Las diferentes combinaciones de cationes, aniones y sustituyentes pueden producir una miríada de IL

---

<sup>2</sup> Este capítulo fue publicado como Rivero Berti, I., Rodenak-Kladniew, B., Onaindia, C., Adam, C. G., Islan, G. A., Durán, N., & Castro, G. R. (2020). “Assessment of in vitro cytotoxicity of imidazole ionic liquids and inclusion in targeted drug carriers containing violacein.” *RSC advances*, 10(49), 29336-29346.

diferentes y, por lo tanto, es posible adaptar y ajustar sus propiedades fisicoquímicas. Propiedades como la solvatación, la viscosidad, la hidrofobicidad, las propiedades de los surfactantes, las interacciones iónicas y los aspectos biológicos como la citotoxicidad y la biodegradabilidad.[63] Debido a estas propiedades interesantes, muchos IL se han sintetizado en las últimas décadas y se consideran solventes “verdes” para la extracción, y aplicaciones de síntesis química, biocatálisis y biotecnología.[64] En un trabajo reciente, una nueva serie de *SAILs* (esto es, Líquidos iónicos tensioactivos o *surface-active ionic liquids*) basados en el catión 1-alkylimidazolium [CnHIm] (con una longitud de cadena alquílica de 7 a 16) que contiene mesilato ([CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>], S ) o trifluoroacetato ([CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>], F) como contraión fueron desarrollados y se estudiaron sus propiedades de auto-agregación en soluciones acuosas. Estos SAILs muestran propiedades de autoensamblaje espontáneo y un rango de concentraciones micelares críticas (CMC) de 104,3 mM a 0,4 mM según la relación catión-anión. Se informó que el aumento de la longitud del carbono alquílico en el catión de 7 a 16 redujo la CMC entre 100 y 150 veces para ambos contraiones analizados [65]. Estos nuevos tipos de IL con propiedades surfactantes podrían permitir adaptar la interacción con diferentes moléculas "a pedido". En particular, el SAIL de tipo [CnHIm]-S o [CnHIm]-F podría ayudar a desarrollar dispositivos de administración de fármacos de moléculas hidrófobas, como la violaceína.

Sin embargo, una de las principales preocupaciones sobre el uso de IL en el campo biológico (por ejemplo, en biomedicina, medicina, productos farmacéuticos) está relacionada con la toxicidad para las células de mamíferos debido a la falta de estudios racionales y sistemáticos. El enfoque principal para reducir y/o evitar los efectos tóxicos es utilizar cationes y aniones que sean biocompatibles. Los estudios recientes de IL en el campo farmacéutico se centran en la búsqueda y el desarrollo de tres aplicaciones

principales, como la administración de fármacos, los tensioactivos o codisolventes y como ingredientes farmacéuticos activos.[66] Desde 2012 al presente, se han informado muchas formulaciones de fármacos y profármacos elaborados con IL. Ejemplos de fármacos revisados recientemente formulados sobre diferentes IL son albendazol, aciclovir, ácido cinámico, danazol, ibuprofeno, lidocaína, metotrexato, penicilina, piperacilina, piroxicam y sulfacetamida [66,67]. Por lo que en el primer tramo de este capítulo nos enfocaremos en estudiar su citotoxicidad con el objetivo de descartar potenciales *SALLs* que presenten efectos tóxicos indeseables.

Además, con el objetivo de generar sistemas de vehiculización de *Viol* estables se incluirán estos *SALLs* en la generación de sistemas de nanopartículas lipídicas (SLN), descritas en la introducción general.

Adicionalmente, los nanotransportadores pueden proporcionar una cinética de liberación controlada y localizada del fármaco activo mediante el direccionamiento pasivo (es decir, permeabilidad y retención mejoradas) o activo (al recubrir el transportador con ligandos para receptores específicos).[68] Por ejemplo, el folato o la ferritina son comúnmente usados para proporcionar direccionamiento activo mediante la decoración de la superficie de las partículas, debido a la existencia de sobre expresión de los receptores respectivos en muchas líneas tumorales [69].

En particular, el folato es un agente de direccionamiento activo ampliamente informado para el tratamiento del cáncer, debido a que los receptores de folato (FOLR1) se sobre-expresan en una gran variedad de células cancerosas, tales como HCT116 y HeLa, y poseen niveles bajos o indetectables de expresión en células normales y algunas células cancerosas, como, por ejemplo, la línea celular A549. El receptor de folato se

distribuye ampliamente en la superficie de la membrana de las células tumorales, mientras que su expresión es muy limitada en tejidos y órganos normales. Por ejemplo, los receptores de folato muestran una alta expresión típicamente en tumores de cerebro, mama, cuello uterino, colorrectal, epitelial, renal, pulmonar y de ovario [70]. Los receptores de folato también tienen la ventaja de promover la endocitosis y, en consecuencia, la internalización de nanopartículas [71].

Por lo expuesto, en el presente capítulo, será evaluada la posibilidad de incorporar *SA/Is* a sistemas SLN conteniendo Viol; además se adicionará folato para generar un sistema con direccionamiento activo.

## 5.2 OBJETIVOS DEL CAPITULO

- Evaluar la citotoxicidad de un set de *SA/Is* y relacionarlas con su estructura
- Evaluar las interacciones de un *SA/IL* candidato con la violaceína
- Desarrollar un sistema de vehiculización de violaceína basado en *SA/Is* y folato
- Estudiar fisicoquímicamente el sistema mediante diversas técnicas
- Evaluar la citotoxicidad y capacidad de captación celular del sistema empleando líneas celulares que expresen o no el receptor de folato.

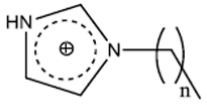
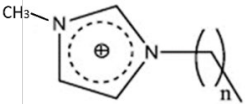
## 5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.3.1 Materiales

La Viol se produjo y purificó como fuera detallado en la sección 4.3. El miristato de miristilo lipídico (MM, Crodamol®MM, punto de fusión= 36–40°C) fue donado amablemente por CRODA® (Argentina). El poloxámero P188 (Kolliphor® P188) y el

perclorato de 3,3'-dioctadecicloxacarbocianina (DiOC<sub>18</sub>) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

Los *SAILs* estudiados en el presente capítulo fueron proporcionados por la Lic. Celeste Onaindia y la Dr. Claudia G. Adam del Instituto de Química Aplicada de la Universidad Nacional Litoral (Santa Fé, Argentina) y se muestran en la **Tabla 5.1**. La síntesis de *SAILs* fue detallada en las respectivas publicaciones previas al presente trabajo [72,73]

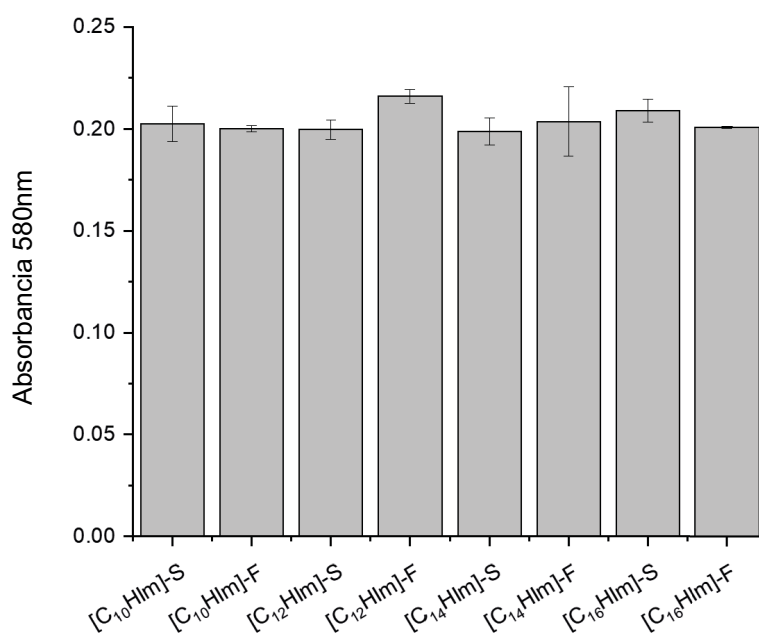
Estructura	Largo de la cadena lateral (n)	Contraión	Abreviatura
 <p>Side chain length (CL) = n+1</p> <p><b>[C<sub>n</sub>Him]</b></p>	9	[CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ], S	[C <sub>10</sub> Him]-S
	11		[C <sub>12</sub> Him]-S
	13		[C <sub>14</sub> Him]-S
	15		[C <sub>16</sub> Him]-S
	9	[CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ], F	[C <sub>10</sub> Him]-F
	11		[C <sub>12</sub> Him]-F
	13		[C <sub>14</sub> Him]-F
	15		[C <sub>16</sub> Him]-F
	15	[CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ], Ac	[C <sub>16</sub> Him]-Ac
 <p>Side chain length (CL) = n+1</p> <p><b>[C<sub>n</sub>mim]</b></p>	15	Bromuro, Br	[C <sub>16</sub> mim]-Br

**Tabla 5.1: *SAILs* sintetizados. Abreviatura: [C<sub>n</sub>Him], 1-alkylimidazol y [C<sub>16</sub>mim], 1-hexadecil-3-metilimidazol**

### 5.3.2 Estabilidad de la solución micelar

Fue analizada la capacidad de *SAILs* para mantener Viol en solución micelar. Se prepararon soluciones acuosas con una concentración de Viol 1.0 mM y *SAILs* 1.0 mM en un volumen final de 5,0 ml. El control se hizo con Viol disuelto en agua ultrapura (MiliQ, Millipore, Ma, EE.UU.). Las soluciones se filtraron a través de un filtro de celulosa de 0,22 μm y se determinó la concentración de Viol empelando una λ<sub>max</sub>= 580 nm a las

0h, 24h y 48h. Los datos se normalizaron por el máximo de  $A_{580}$  que corresponde a  $[(C_{16}Him)]-S$  a las 0 h (sin Viol retenido en el filtro). Además, se prepararon soluciones de Viol 10  $\mu M$  con todos los *SAILs* por triplicado y con el control adecuado y la absorbancia determinada a  $\lambda_{max}= 580$  nm para excluir los efectos de la polaridad micelar como fuente del cambio de absorbancia, en lugar de los cambios de concentración de Viol asociados con los *SAILs*. La prueba ANOVA no encontró diferencias significativas entre las soluciones en este control ( $p > 0.05$ ) (**Figura 5.1**).



**Figura 5.1: Control de absorbancia a 580nm para soluciones con la misma concentración de violaceína y diferentes *SAILs*, no se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ )**

### 5.3.3 Preparación de *SLN*

Las *SLN* cargadas con Viol se prepararon fundiendo 800 mg de MM en un baño de agua a 70°C y agregando Viol previamente disuelta en 200  $\mu L$  de DMSO (fase lipídica).

Luego, se vertieron sobre la fase lipídica 20,0 mL de una solución acuosa de Poloxámero P188 (3,0%, p/v), precalentada en el mismo baño de agua que el lípido (fase acuosa). Inmediatamente, la mezcla fue homogeneizada en un sonicador ultrasónico de 130 W con 80% de potencia (Cole-Parmer, EE.UU.) durante 20 min. Posteriormente, la suspensión lipídica fue enfriada a temperatura ambiente en un baño de agua.

En una segunda formulación (SLN-Viol-SAIL), el tensioactivo (Poloxámero® P188) se reemplazó parcialmente con SAIL. En una tercera (SLN-Viol-SAIL-FA) se añadió ácido fólico a la fase acuosa antes del procedimiento de mezclado. La composición química de las diferentes formulaciones se enumera en la Tabla 5.2

Sustancia	Fase lipídica		Fase acuosa (V <sub>f</sub> = 20 ml)		
	MM (mg)	Viol (μmol)	P188 (% w/v)	[C <sub>16</sub> Him]-S (% w/v)	FA (mg)
[SLN-Viol]	800	20	3.00	---	---
[SLN-Viol-SAIL]			2.95	0.05	3.0
[SLN-Viol-SAIL-FA]					

**Tabla 5.2: Composición de las formulaciones SLN que conteniendo violaceína. Abreviaturas: SAIL, [C<sub>16</sub>Him]-S y FA, ácido fólico**

Las tres formulaciones se prepararon de forma independiente por triplicado y su eficiencia de encapsulación se midió de la siguiente manera: inmediatamente después de enfriar la suspensión de SLN, se midió el volumen total y se centrifugaron 400 μl en un dispositivo Microcon® (10 kDa, Merck Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) a 3,000 xg por 15 minutos. La concentración de viol se midió por absorbancia a λ= 580 nm con una curva de calibración adecuada. La concentración de FA se determinó usando una curva de calibración a λ<sub>1</sub>=368 nm y λ<sub>2</sub>=283 nm. La eficiencia de encapsulación (EE, %) se calculó de la siguiente manera:

$$EE (\%) = \frac{m_0 - (C_{cf} \times V_f)}{m_0} \times 100$$

*Ecuación 5.1*

donde  $m_0$  es la masa de Viol inicial,  $C_{cf}$  es la concentración de Viol en la fracción eluida después de la centrifugación, y  $V_f$  el volumen final de suspensión después de la sonicación.

#### 5.3.4 Espectroscopia de correlación de fotones

El diámetro hidrodinámico promedio ( $D_H$ ), el índice de polidispersión (PDI) y el potencial Z ( $\zeta$ ) se determinaron mediante espectroscopía de correlación de fotones con un equipo Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Reino Unido) a 25 °C, después de una dilución adecuada con agua ultrapura (MiliQ, Millipore, Ma, EE.UU.). Todas las muestras fueron determinadas por triplicado. Los datos obtenidos fueron analizados por el software proporcionado por Malvern Panalytical.

#### 5.3.5 Análisis FTIR

Se utilizó reflectancia total atenuada-FTIR (ATR-FTIR) para obtener los espectros de todos los componentes y formulaciones en un espectrómetro Spotlight 400 - Perkin-Elmer (Waltham, MA, EE. UU.). Cada espectro fue escaneado 32 veces y registrado entre 550 y 4,000  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$  por triplicado.



### 5.3.6 Análisis XPS

El análisis de emisión de fotoelectrones de rayos X se realizó en muestras liofilizadas por duplicado en un equipo XPS K-Alpha (Thermo Scientific, Ma., EE.UU.).

### 5.3.7 Análisis XRD

Se realizó análisis de difracción de rayos X a muestras liofilizadas en equipo DRX7000 Shimadzu del Instituto Químico de la Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP, San Pablo, Brasil) utilizando un blanco de cobre, 40 kV, 30 mA, en un rango que va de  $2\theta = 5^\circ$  a  $50^\circ$  y a una velocidad de  $2^\circ/\text{min}$ .

### 5.3.8 Adquisición de imágenes Cryo-TEM

Las muestras fueron preparadas en rejilla de cobre Lacey Carbon Type 300 Malla (Ted Pella, USA), y fueron sometidas al procedimiento *Glow Discharge* en equipo easiGlow (Pelco, USA), con los siguientes parámetros: corriente de 15 mA; carga negativa; 25 segundos de descarga. La congelación en hielo amorfo (criopreparación) se realizó utilizando un equipo Vitrobot Mark IV (Thermo Fischer Scientific, Ma., EE.UU.) a temperatura ( $22^\circ\text{C}$ ) y humedad (100%) controlada. Las preparaciones de muestras se realizaron con los siguientes parámetros: tiempo de blot 3 segundos; blot force 0, blot wait 10 segundos con un solo blot. Luego, se aplicaron  $3,0\ \mu\text{L}$  de cada muestra a las rejillas y se sumergieron en etano líquido. Después de la inmersión, la rejilla se mantuvo en nitrógeno líquido hasta el análisis microscópico.

### 5.3.9 Adquisición de imágenes TEM

El análisis TEM se realizó con un microscopio Jeol-1200 EX II-TEM (Jeol, Columbia, MD, EE.UU.). Las dispersiones de nanopartículas se diluyeron 1:100 con agua ultrapura (Milli-Q®, Millipore, Ma, EE.UU.) y se esparcieron 10 µL de cada formulación sobre una rejilla de Cu de malla 400. Después de la incubación, el exceso de muestra se eliminó con papel de filtro. Se añadió una gota de ácido fosfotúngstico a la rejilla para mejorar el contraste y se incubó a 25°C durante 1 min antes de eliminar el exceso. Finalmente, la rejilla se secó a temperatura ambiente.

### 5.3.10 Estudios de citotoxicidad

Se cultivaron células A549 del epitelio basal alveolar humano de adenocarcinoma en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco Invitrogen Corporation, Ca., EE.UU.) conteniendo estreptomina (Gibco Invitrogen Co., EE. UU.) en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro].[53] Se sembraron células A549 (4,0 x 10<sup>3</sup> células/ml) en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 12 horas en condiciones estándar. Posteriormente, se trataron con diferentes líquidos iónicos imidazólicos durante 48 h. Debido a que algunos de los líquidos iónicos poseen una solubilidad limitada, se añadió un volumen mínimo de DMSO alcanzando una concentración final máxima en el vehículo de 0,05% (v/v). Después de los tratamientos, se añadieron 100 µL de solución de MTT (500 µg/mL de MTT en PBS) a cada pocillo y se incubaron a 37°C durante 3 h. Los cristales de formazán resultantes se disolvieron en 100 µl de DMSO y se analizó la absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas (Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector, CA, EE.UU.).

### 5.3.11 Estudios de citotoxicidad SLN

Una vez que se caracterizaron las *SLN*, se estudió su citotoxicidad mediante el ensayo MTT, como se describió anteriormente para *SA/LS*. En este caso, se estudiaron tres líneas celulares: HeLa (células de cáncer de cuello uterino humano), HCT-116 (células de carcinoma colorrectal humano) y las células A549 informadas anteriormente. Se realizaron controles para cada componente inactivo de la formulación (FA, MM y P188) para descartar cualquier toxicidad de estas sustancias. El tratamiento estadístico se realizó en el software Sigma Stat.

### 5.3.12 Captación celular

La captación celular se analizó mediante análisis de fluorescencia. Brevemente, las tres formulaciones se produjeron como se describió anteriormente, pero en lugar de la carga normal de Viol, se añadieron 0,75 µg/ml del colorante verde fluorescente 3,3'-diocetadeciloxacarbocianina perclorato (DiOC<sub>18</sub>,  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 484/501 nm). Se sembraron células HeLa, HCT116 y A549 con una densidad de 4,0 x10<sup>3</sup> células/ml en placas de 96 pocillos durante 24 h. Luego, las células se expusieron a MEM libre que contenía concentraciones crecientes de las formulaciones (0,05 a 0,50 mg de matriz lipídica/ml) durante 24 h. Se descartó el medio y las células se lavaron tres veces con 200 µl de buffer fosfato salino (*PBS*). Finalmente, se determinó la fluorescencia en un lector de microplacas (Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector, Ca., EE.UU.).

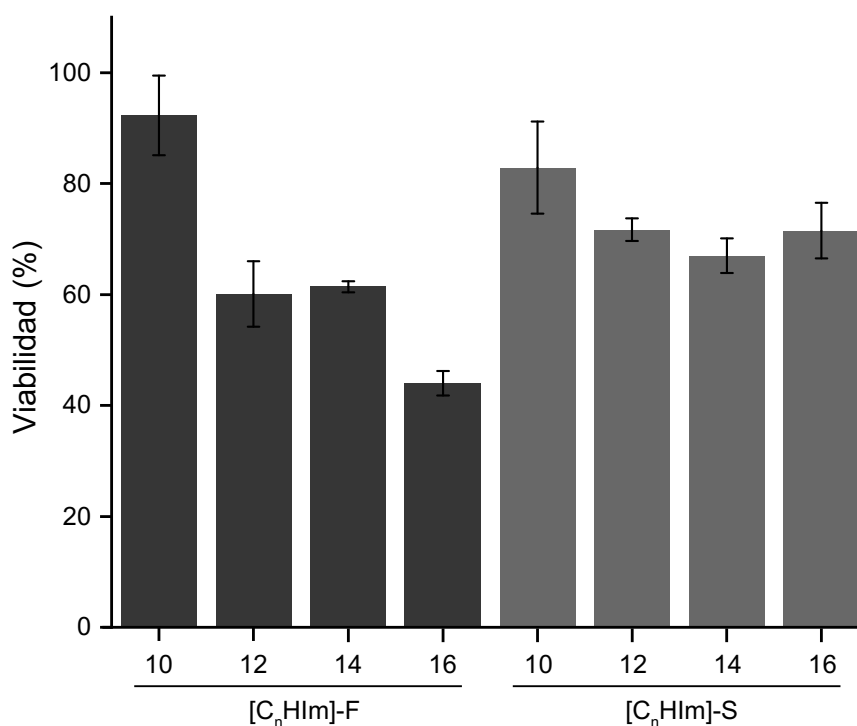
## 5.4 RESULTADOS

### 5.4.1 Selección de líquido iónico tensoactivo

El primer criterio para determinar la viabilidad de los *SA/Is* para el desarrollo potencial de dispositivos de administración de fármacos fue la citotoxicidad. El análisis de la citotoxicidad de los *SA/Is* se realizó en células A549 de carcinoma de pulmón humano, de manera similar a estudios previos con *SA/Is* [74,75] *SA/Is* que contienen diferentes longitudes de cadena lateral de alquilo de  $n= 10$  a 16 sintetizadas en el presente trabajo permiten una mejor comprensión del papel de la relación estructura-toxicidad y la selección de los mejores candidatos para la síntesis de formulaciones de administración de fármacos para *Viol*. Los ensayos de citotoxicidad de  $1,5 \times 10^{-3} \%$  (p/v) ( $36,9 \mu\text{M}$  a  $49,3 \mu\text{M}$ ) de *SA/Is* en células A549 se analizaron estadísticamente con un ANOVA de dos vías. Para el análisis de los resultados se consideraron dos factores: la variación de la longitud de la cadena alquílica en el anillo imidazólico ( $n$ ) y el efecto de los contraiones. Ambos factores y la interacción entre ellos tienen un efecto significativo citotoxicidad sobre A549 ( $p < 0.0001$ ). Los resultados indican que el aumento de la citotoxicidad de los *SA/Is* en las células A549 puede correlacionarse con el aumento de la longitud de la cadena lateral alifática, como se informara anteriormente.[74] Además, diferentes aniones también pueden cambiar la citotoxicidad en las células A549. Sin embargo, este efecto no es independiente del largo de cadena ( $n$ ). En este caso, el efecto

n es más fuerte en el anión trifluoroacetato (F,  $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ ) que en el sulfonato (S,  $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ )

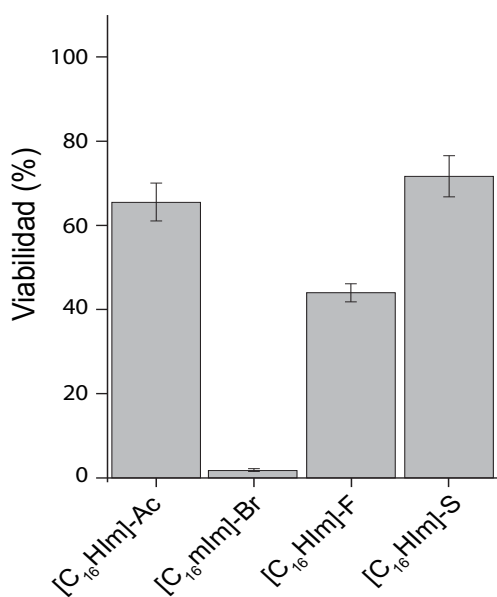
(Figura 5.2).



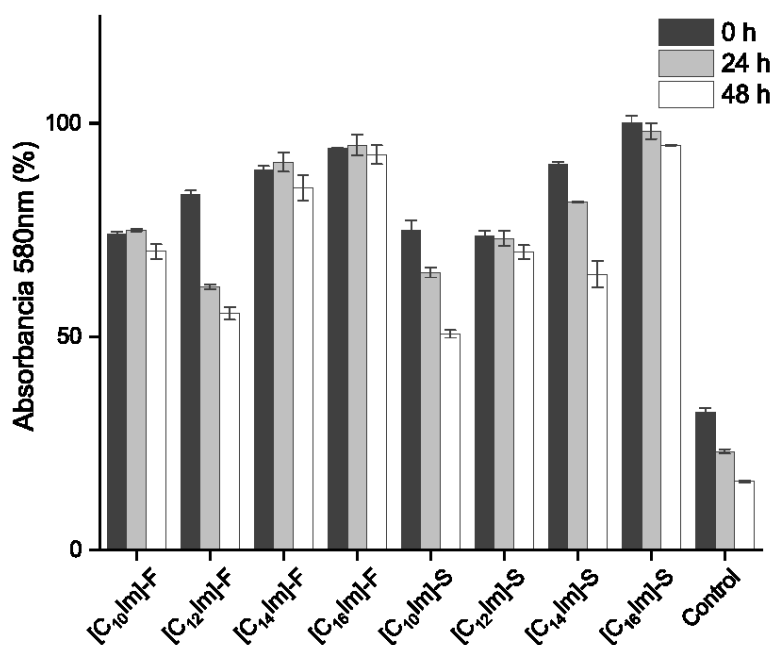
**Figura 5.2: Viabilidad de cultivos celulares A549 en presencia de [C<sub>n</sub>Him]-S y [C<sub>n</sub>Him]-F con n= 10 a 16.**

Por otro lado, los aniones F y S no poseen un impacto significativo en la estabilidad micelar y la solubilización de Viol ( $p > 0.05$ ). Además, ([C<sub>16</sub>Him]-F) y ([C<sub>16</sub>Him]-S) no muestran diferencias significativas entre ellos a las 24 h y 48 h ( $p > 0,05$ ), aunque sí a tiempo cero ( $p < 0,01$ ). Teniendo en cuenta estos resultados, se ensayaron dos SAILs adicionales para citotoxicidad e interacción con Viol, ambos con  $n = 16$ . Uno de ellos con acetato ( $[\text{CH}_3\text{CO}_2^-]$ , Ac) como contraión y el otro es de tipo [C<sub>16</sub>mim] con bromuro (Br<sup>-</sup>) como contraión. En estos casos, no solo se evaluó un nuevo contraión sino también el cambio del protón en el anillo de imidazol por un grupo metilo. No obstante, [C<sub>16</sub>mim]-Br mostró una elevada citotoxicidad en concentraciones de  $1,5 \times 10^{-3} \%$  (p/v) y aun

menores. Por otro lado se observó que  $[C_{16}Him]-Ac$  era insoluble en agua. Por estas razones, ambos SAILs fueron descartados para estudios posteriores (**Figura 5.3**).



**Figura 5.3:** Citotoxicidad de SAILS adicionales comparada con SAILS ya probados. Abreviatura:  $[C_{16}Him]$ , 1-hexadecilimidazol y  $[C_{16}mim]$ , 1-hexadecil-3-metilimidazol



**Figura 5.4:** Efecto de la longitud de las cadenas carbonadas laterales de alquilo y aniones sobre la estabilidad de las soluciones micelares de  $[Viol-([CnHim]-S)]$  y  $[Viol-([CnHim]-F)]$  a las 0, 24 y 48 h

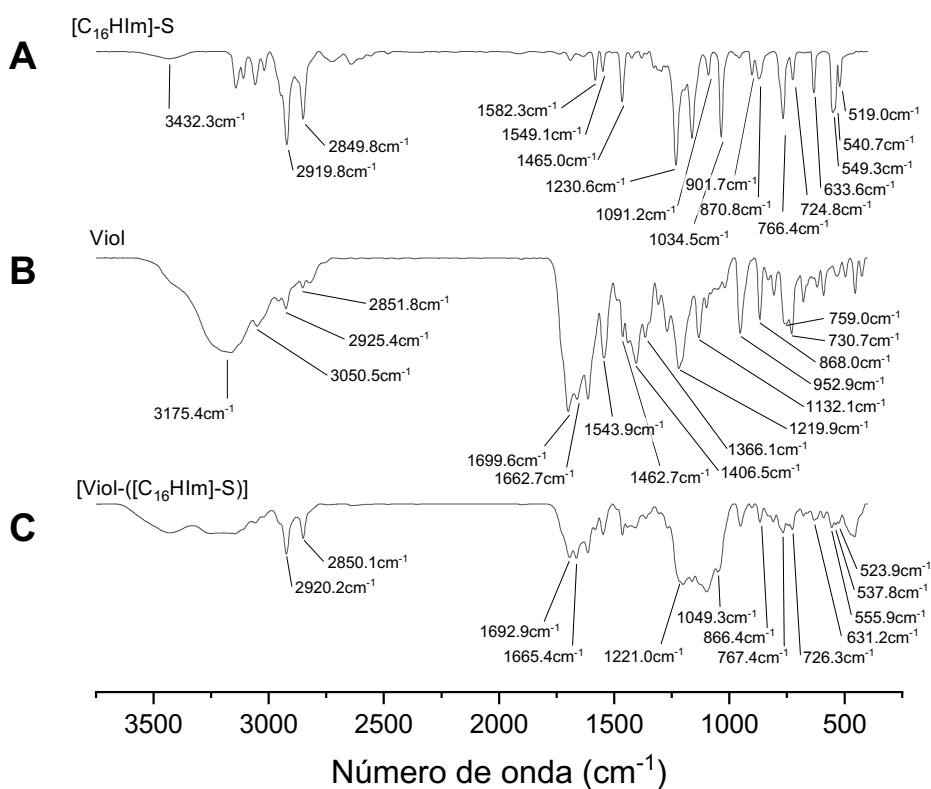
Además, las interacciones de *SAILs* con concentraciones de Viol estandarizadas parecieran depender en gran medida de la longitud de cadena *n* (**Figura 5.4**). No obstante, todos los *SAILs* ensayados son significativamente diferentes del control. Los *SAILs* que contienen cadenas laterales más largas pueden solubilizar más la Viol, y las micelas resultantes conteniendo Viol son más estables durante períodos de tiempo más prolongados ( $p < 0,0001$ ). Este efecto podría estar asociado con la naturaleza hidrofóbica de la longitud de la cadena lateral del alcano, que aumenta con *n* y potencia la interacción *SAIL-Viol*, interfiriendo con el contacto Viol-Viol mediado por los anillos de hidroxindol.

De acuerdo con los presentes resultados, el mejor candidato para desarrollar un sistema de administración de fármacos Viol fue [C<sub>16</sub>Him]-S, que combina una baja citotoxicidad con un 71,5 % de viabilidad celular empelando una concentración de 1,5 x10<sup>-3</sup> % (p/v) y una buena interacción con el 95,2 % de Viol retenido en la solución micelar durante al menos 48 h.

#### 5.4.2 análisis de Viol-*SAIL* mediante FTIR

Los espectros FTIR correspondientes a [C<sub>16</sub>Him]-S, Viol y el sistema formado por cantidad equimolecular de ambos componentes (*SAIL-Viol*) se muestran en la **Figura 5.5**. En el espectro [C<sub>16</sub>Him]-S, las bandas correspondientes a 633,6 cm<sup>-1</sup>, 766,4 cm<sup>-1</sup> y 901,7 cm<sup>-1</sup> se atribuyeron a la deformación CH fuera del plano y deformación del anillo en el plano del anillo imidazólico, respectivamente (**Figura 5.5.A**). Los máximos de 1091,2 cm<sup>-1</sup>, 1549,1 cm<sup>-1</sup>, 1582,3 cm<sup>-1</sup> se atribuyeron a vibraciones de estiramiento C-N y C=N. El grupo alquilo de [C<sub>16</sub>Him] muestra un máximo a 1465,0 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la flexión

C-H, uno a  $2849,8\text{ cm}^{-1}$  correspondiente un estiramiento simétrico de  $-\text{CH}_2$  y a  $2919,8\text{ cm}^{-1}$  a un estiramiento asimétrico de  $-\text{CH}_2$ . Por otro lado, las bandas agudas en  $1034,5\text{ cm}^{-1}$  y  $1230,6\text{ cm}^{-1}$  se atribuyeron a las vibraciones de estiramiento S=O y S-O en el contraión del *SAIL* ( $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ ). Finalmente, la banda amplia de  $3432,3\text{ cm}^{-1}$  se asignó a la vibración de estiramiento N-H de manera similar a lo informado en la bibliografía [76–79].



**Figura 5.5:** espectros de FTIR para  $[\text{C}_{16}\text{HIm}]\text{-S}$  (A), *Violaceína* (B) y una mezcla equimolar de ambos (C).

El espectro de Viol mostró un máximo elevado y ancho en  $3175,4\text{ cm}^{-1}$  probablemente atribuido a la presencia de agua en la muestra, superpuesta a la débil banda de estiramiento de  $-\text{OH}$  en la misma región (**Figura 5.5.B**). Las bandas



parcialmente superpuestas en  $730,7\text{ cm}^{-1}$  y  $759\text{ cm}^{-1}$  se atribuyeron al estiramiento y flexión C-H en benceno monosustituido. Las bandas de  $868,0\text{ cm}^{-1}$ ,  $952,9\text{ cm}^{-1}$ ,  $1132,1\text{ cm}^{-1}$  y  $1219,9\text{ cm}^{-1}$  se asignaron a diferentes vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de C-N y la banda de  $1366,1\text{ cm}^{-1}$  N-H superpuesta con el estiramiento de C-O, la banda de  $1406,5\text{ cm}^{-1}$  a la flexión C-H sobre alqueno,  $1462,7\text{ cm}^{-1}$ ,  $1543,9\text{ cm}^{-1}$  y  $1662,7\text{ cm}^{-1}$  bandas C=C estiramiento en el benceno aromático y banda fuerte en  $1699,6\text{ cm}^{-1}$  vibraciones de estiramiento del carbonilo. El pico amplio y complejo en frecuencias más altas comprende frecuencias de estiramiento N-H y O-H diferentes y muy superpuestas ( $2851,8\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925,4\text{ cm}^{-1}$ ,  $3050,5\text{ cm}^{-1}$  y  $3175,4\text{ cm}^{-1}$ ). [80–82]

Se observaron varios cambios en la mezcla equimolar [Viol-(C<sub>16</sub>Him-S)] y se obtuvo un espectro complejo (**Figura 5.5.C**). En el rango de frecuencias bajas ( $500\text{ cm}^{-1}$ - $670\text{ cm}^{-1}$ ), las intensidades son bajas y muestran una gran variedad de picos como se informara anteriormente [82]. Esta región mostró modos vibracionales intramoleculares de la vibración esquelética del anillo de imidazolio, dos picos en esta región mostraron cambios hipsocrómicos de  $549,3\text{ cm}^{-1}$  a  $555,9\text{ cm}^{-1}$  y de  $519\text{ cm}^{-1}$  a  $523,9\text{ cm}^{-1}$ , y dos cambios batocrómicos de  $540,7\text{ cm}^{-1}$  a  $537,8\text{ cm}^{-1}$  y de  $633,6\text{ cm}^{-1}$  en el *SAIL* puro a  $631,2\text{ cm}^{-1}$  en la mezcla [Viol-(C<sub>16</sub>Him-S)]. En la región de  $700$ - $900\text{ cm}^{-1}$  se observan picos fusionados correspondientes a la flexión de CH en los anillos descritos anteriormente tanto en [C<sub>16</sub>Him] como en Viol, el pico de  $724,8\text{ cm}^{-1}$  en [C<sub>16</sub>Him] y el pico de  $730,7\text{ cm}^{-1}$  en Viol aparecen como uno pico en  $726,3\text{ cm}^{-1}$ , de manera similar, el pico de  $766,4\text{ cm}^{-1}$  en [C<sub>16</sub>Him] y  $759,0\text{ cm}^{-1}$  en Viol aparecen como un pico en  $767,4\text{ cm}^{-1}$  en la mezcla, y  $870,8\text{ cm}^{-1}$  y  $868,0\text{ cm}^{-1}$  aparecen como un pico en  $866,4\text{ cm}^{-1}$ . Entre otras, las bandas de carbonilo en  $1662,7\text{ cm}^{-1}$  y  $1699,6\text{ cm}^{-1}$  en violaceína pura se movieron a  $1665,4\text{ cm}^{-1}$  y  $1692,9\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

Finalmente, los máximos correspondientes al contraíón del grupo sulfonato de *SAIL* (1034.5  $\text{cm}^{-1}$  y 1230.6  $\text{cm}^{-1}$ ) no aparecen fuertemente en la mezcla y los picos más cercanos a los que se pueden asignar en la mezcla son 1049.3  $\text{cm}^{-1}$  y un hombro a 1221,0  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente. No se observan desplazamientos relevantes en las bandas relacionadas con las cadenas alquílicas (2850,1  $\text{cm}^{-1}$  y 2920,2  $\text{cm}^{-1}$ ).

Todos estos datos tomados en su conjunto sugieren una fuerte interacción de apilamiento de tipo  $\pi$ - $\pi$  entre Viol y [C<sub>16</sub>Him]-S centrada en y entre anillos aromáticos, y el desplazamiento del contraíón [CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>].

#### 5.4.3 Análisis SLN

Teniendo en cuenta la baja estabilidad de los sistemas micelares, que dependen del medio ambiente (es decir, pH, T, I, etc.), es necesario desarrollar un vehículo farmacológico estable para los *SAILs*. Dado que [C<sub>16</sub>Him]-S fue seleccionado como portador principal para Viol, *SLN* parece una alternativa factible de encapsulamiento. Además, los *SLN* resultantes modificados con folato pueden permitir la orientación del sistema a células que sobre-expresen el receptor FOLR1, esto es, en algunas líneas tumorales. En las formulaciones finales de *SLN*, la relación fármaco/portador fue de 0,49 mg de Viol/100 mg de portador; y la relación fármaco/lípido fue de 0,86 mg de Viol/100 mg de lípido.

La eficiencia de encapsulación aumentó significativamente en aproximadamente un 8,0% ( $p < 0,05$ ) después de la inclusión de [C<sub>16</sub>Him]-S en la formulación de *SLN*. Esto puede explicarse por la afinidad intrínseca entre Viol y *SAIL* descrita previamente. Sin

embargo, las tres formulaciones poseen una eficiencia de encapsulamiento muy elevada (EE, %), lo que se puede asociar a la baja solubilidad de Viol en soluciones acuosas (**Tabla**

**5.3).**

<b>Formulación</b>	<b>Encapsulación de violaceína (%)</b>
[SLN-Viol]	91.0 ± 1.0
[SLN-Viol-([C <sub>16</sub> Him]-S)]	99.2 ± 0.5
[SLN-Viol-([C <sub>16</sub> Him]-S)-FA]	98.2 ± 0.6

**Tabla 5.3: Eficiencia de encapsulación de las partículas sólidas lipídicas en presencia de [C<sub>16</sub>Him]-S y ácido fólico (FA).**

#### 5.4.4 Caracterización fisicoquímica

##### 5.4.4.1 Espectroscopia de correlación de fotones

El diámetro hidrodinámico ( $D_H$ ), PDI y  $Z_{pot}$  ( $\zeta$ ) para cada formulación se muestran en la **Tabla 5.4**. Cada medición alcanzó los criterios de calidad sugeridos por el software. La adición de [C<sub>16</sub>Him]-S a la fase acuosa disminuye significativamente el diámetro hidrodinámico ( $D_H$ ) de la partícula ( $p < 0,0001$ ) de 203,1 nm en SLN-Viol a 173,8 nm en [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)], pero sin modificar el PDI ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, se observa un cambio mayor en  $Z_{pot}$  como es esperado por la inclusión de un componente catiónico. El P188 es un tensioactivo no iónico, lo que explica el  $Z_{pot}$  cercano a cero observado en SLN-Viol; la adición de un SAIL catiónico como [C<sub>16</sub>Him]-S aumenta en gran medida el  $Z_{pot}$  en SLN-Viol-SAIL ( $p < 0,0001$ ), lo que puede indicar que SAIL se encuentra en la superficie de la partícula.

El folato (FA) en [SLN-Viol-SAIL]-FA no parece modificar significativamente el  $Z_{pot}$  de SLN-Viol-SAIL, pero aumenta la PDI comparado con las otras formulaciones. La causa de éste aumento es un segundo pico de intensidad de un tamaño muy alto (5039 nm) en el gráfico de distribución de tamaños, probablemente debido a alguna agregación de partículas que puede haber ocurrido entre la preparación y la medición (datos no mostrados).

Formulación	Tamaño ( $D_H$ ) (nm)	PDI	$Z_{pot}$ (mV)
[SLN-Viol]	203.1	0.224	-2.9
[SLN-Viol-([C <sub>16</sub> Him]-S)]	173.8	0.241	39.9
[SLN-Viol-([C <sub>16</sub> Him]-S)-FA]	199.0	0.387	41.5

**Tabla 5.4: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Z de las formulaciones conteniendo violaceína determinadas por DLS.**

#### 5.4.4.2 Análisis XPS

Los resultados del análisis de superficie por determinados mediante XPS se muestran en la **Tabla 5.5**. SLN-Viol no presenta señal de nitrógeno, lo que indica que no hay Viol en la superficie de la partícula; por lo que el carbono y el oxígeno encontrados son atribuibles al tensioactivo P188 y al miristato de miristilo. SLN-Viol-SAIL muestra nitrógeno y azufre, lo que indica que [C<sub>16</sub>Him]-S se posiciona en la superficie de la partícula, de acuerdo con los datos de DLS. [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)]-FA muestra una disminución en el porcentaje de azufre, lo que puede ser explicado como un desplazamiento de mesilato (metanosulfonato, CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), por folato (FA).

Formulación	Composición (%)			
	C 1s	O 1s	N 1s	S 2p
[SLN-Viol]	83.7 ± 0.5	16.4 ± 0.5	---	---
[SLN-Viol-([C <sub>16</sub> Him]-S)]	85.5 ± 0.2	13.0 ± 0.7	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1
[SLN-Viol-([C <sub>16</sub> Him]-S)-FA]	84.9 ± 1.2	14.7 ± 0.6	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1

**Tabla 5.5: Análisis XPS de las diferentes formulaciones conteniendo violaceína.**

#### 5.4.4.3 Análisis FTIR

Las tres formulaciones de *SLN* mostraron los picos característicos de MM, a 719 cm<sup>-1</sup> para balanceo de -CH<sub>2</sub>, 1463 cm<sup>-1</sup> y 1473 cm<sup>-1</sup> para oscilación de tijereteo de -CH<sub>2</sub>, 1734 cm<sup>-1</sup> para vibración de estiramiento del grupo éster, 2849 cm<sup>-1</sup> para -CH<sub>2</sub> estiramiento simétrico, y 2917 cm<sup>-1</sup> para el estiramiento asimétrico de -CH<sub>2</sub> (**Figura 5.6**).[83]

Además, la formulación de *SLN-Viol* que contenía P188 mostró un pico amplio a 3448 cm<sup>-1</sup> atribuido a las vibraciones provenientes de los grupos hidroxilo. El pico en 952 cm<sup>-1</sup>, que podría atribuirse al estiramiento simétrico de C-O para *SLN-Viol*, mostró un cambio hipsocrómico a 954 cm<sup>-1</sup> y 956 cm<sup>-1</sup> para [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)] y [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)]-FA respectivamente.

Además, el estiramiento asimétrico de los grupos éter a 1102 cm<sup>-1</sup> para *SLN-Viol* mostró un desplazamiento hacia el azul a 1104 cm<sup>-1</sup> para [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)] y a 1106 cm<sup>-1</sup> para [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)]-FA respectivamente. Este último cambio puede explicarse por la intrusión en P188 y [C<sub>16</sub>Him]-S primero y FA después en [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)] y [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)]-FA respectivamente (**Figura 5.6**).

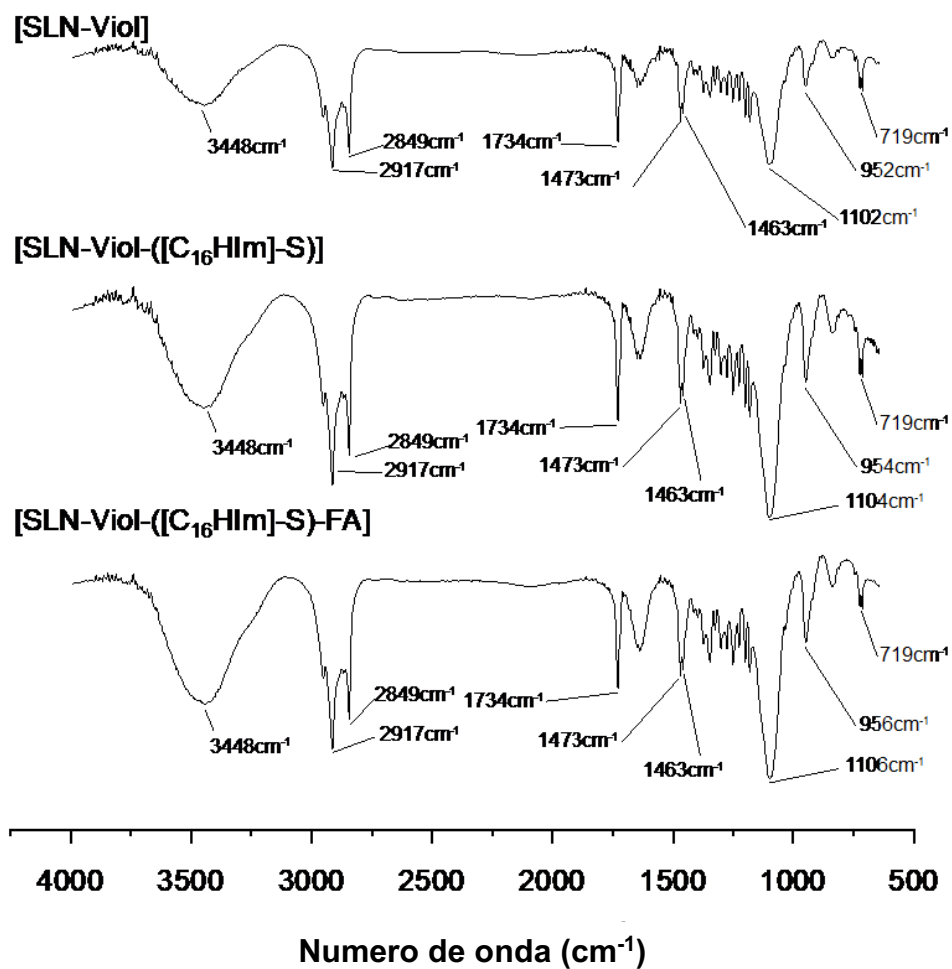


Figura 5.6: Espectros de FTIR de las diferentes formulaciones conteniendo violaceína

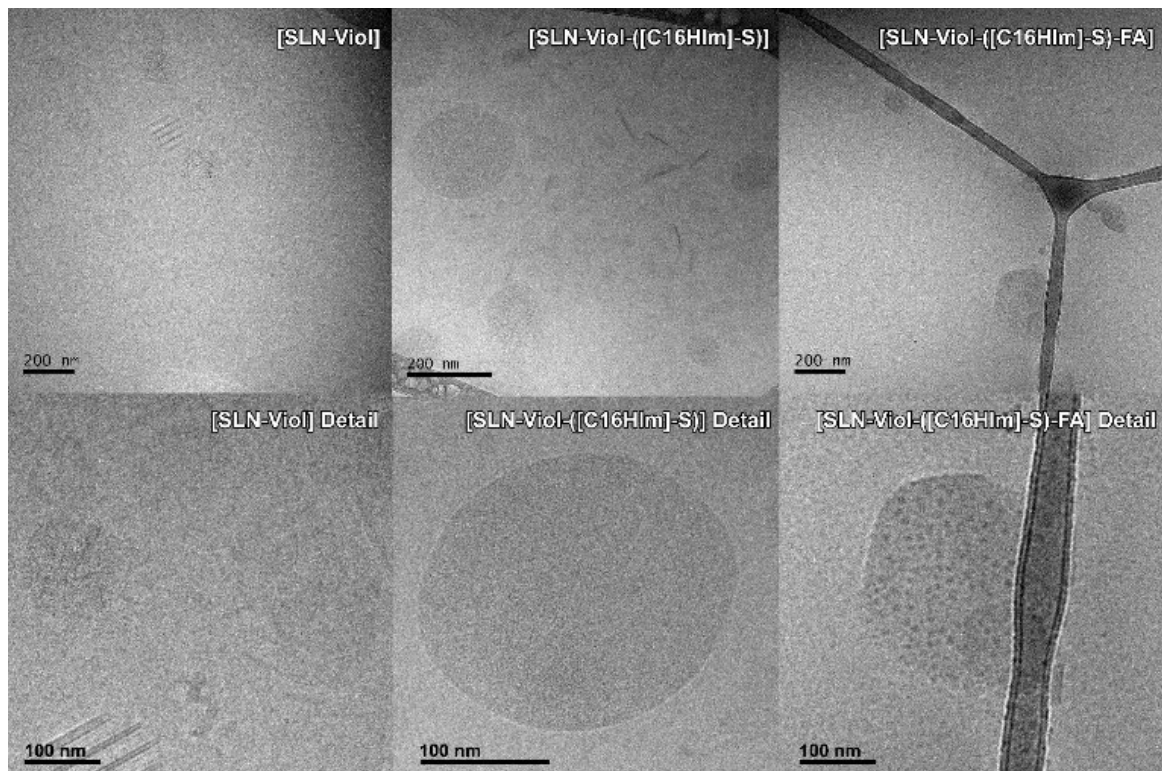
#### 5.4.4.4 Análisis XRD

Los patrones de difracción de las tres formulaciones mostraron picos a  $8,02^\circ$ ,  $19,43^\circ$ ,  $22,01^\circ$  y máximos parcialmente superpuestos a  $23,60^\circ$  y  $24,12^\circ$ . Los picos a  $8,02^\circ$ ,  $22,01^\circ$  y  $24,12^\circ$  también aparecen en los patrones de difracción MM, así como los picos a  $19,43^\circ$  y  $23,60^\circ$  en los patrones de difracción P188. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre las formulaciones ni picos de otros componentes. Todos estos datos sugieren que Viol molecularmente dispersa, mientras que la cristalinidad de MM y P188 dentro de las partículas permanece, como se informara anteriormente.[83]

## 5.4.5 Imágenes de microscopía

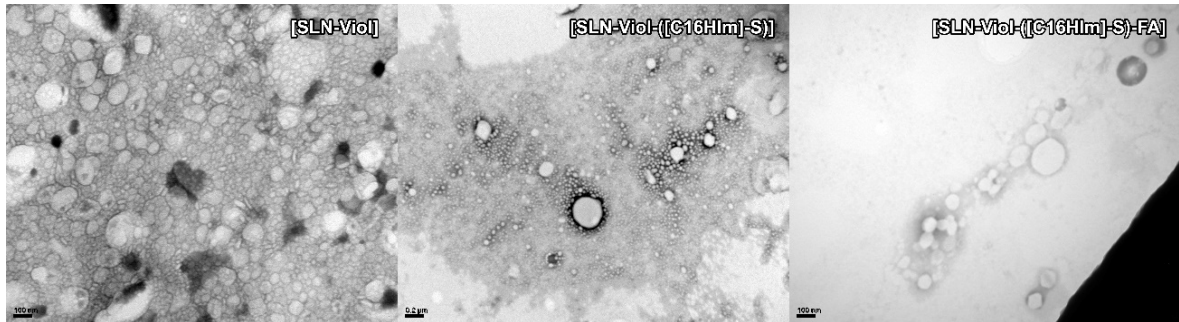
### 5.4.5.1 Análisis de imágenes Cryo-TEM y TEM

Las imágenes de Cryo-TEM (**Figura 5.7**) mostraron que SLN esféricas con un diámetro promedio de 155 nm (SD= 14, n= 14) para SLN-Viol, un promedio de 155 nm (SD= 68, n= 11) para [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)], y un promedio de 168 nm (SD= 60, n= 9) para [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)]-FA. Además, [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)]-FA mostró estructuras en forma de puntos, ausentes en formulaciones anteriores, lo que puede atribuirse a la presencia de folato en las SLN (**Figura 5.7**).



**Figura 5.7:** Micrografías de Cryo-TEM de las formulaciones ensayadas.

Las imágenes de TEM (**Figura 5.8**) se registraron para confirmar las observaciones de Crio-TEM. El uso de contraste en las imágenes de TEM permitió una mejor identificación de las estructuras en *SLN-Viol*, que son aproximadamente esféricas con tamaños en el rango de 100 nm a 200 nm, y alrededor de 160 nm en [*SLN-Viol*-([C<sub>16</sub>Him]-S)] (**Figura 5.8**).

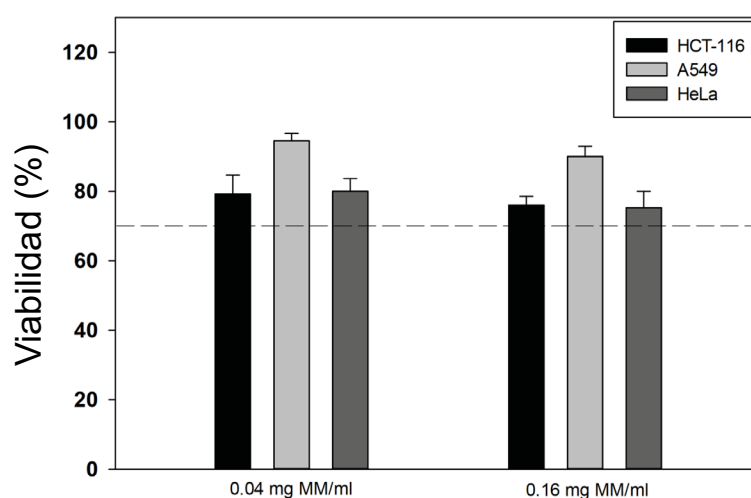


**Figura 5.8:** Micrografías de TEM para las formulaciones ensayadas.



#### 5.4.6 Estudios de toxicidad *in vitro*

La actividad citotóxica de las diferentes formulaciones lipídicas se evaluó en células A549, HCT116 y HeLa expuestas a Viol libre o encapsulada (0,0-4,0  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h, según se mencionara en el capítulo anterior. Se considera citotóxico cuando la disminución de la viabilidad celular es superior al 30 % ISO 10993–52,009.[59] En primer lugar, fue analizado el efecto de las nanopartículas sin violaceína en las tres líneas celulares. Las células se expusieron a 0,04 y 0,16 mg/ml de MM [SLN-([C<sub>16</sub>Him]-S)] (equivalentes a las necesarias para administrar Viol 1,0 y 4,0  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. Se encontró que 0.04 mg/mL [SLN-([C<sub>16</sub>Him]-S)] indujo una inhibición del crecimiento celular de 5,5, 21,8 y 20,0 % mientras que 0.16 mg/mL promovió una inhibición de 9,9, 24,0 y 24,8 % en Células A549, HCT116 y Hela, respectivamente (**Figura 5.9**). Estos resultados evidencian que las [SLN-([C<sub>16</sub>Him]-S)] en ausencia de Viol no son tóxicas en las líneas celulares ensayadas y en nuestras condiciones de cultivo.



**Figura 5.9:** Citotoxicidad del vehículo vacío sobre las tres líneas celulares ensayadas.

La línea celular HeLa mostro mayor sensibilidad a la Viol libre que las líneas A549 y HCT116, mostrando una pérdida de viabilidad mayor a 30% a partir de Viol 0,25  $\mu\text{M}$ ,

mientras que HCT116 y A549 requirieron una concentración cuatro veces superior de Viol (2,0  $\mu$ M) para obtener pérdidas de viabilidad celular similares (**Figura 5.10**).

La encapsulación de Viol en los tres sistemas diferentes, [SLN-Viol], [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)] y [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)-FA], mejoró su citotoxicidad en concentraciones más bajas en células A549 y HCT116, particularmente en células de carcinoma colorrectal, lo que sugiere que la encapsulación de SLN potencia la actividad anticancerígena de Viol aun a bajas concentraciones en las líneas celulares ensayadas. Sin embargo, a partir de 2,0  $\mu$ M, el tratamiento con Viol libre fue más citotóxico que Viol encapsulado en las tres líneas celulares ensayadas (**Figura 5.10**). Este fenómeno se observó previamente en células HCT116 expuestas a Viol emulsionado. [84]

Cuando se compararon los valores  $IC_{50}$  para nanopartículas cargadas con Viol, los datos no mostraron diferencias significativas entre las formulaciones, excepto para [SLN-Viol], [SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)] en células A549, en las que el valor  $IC_{50}$  fue significativamente mayor (**Tabla 5.6**). Como se observó para Viol libre, HeLa demostró ser la línea celular más sensible a las nanopartículas cargadas con Viol.

$IC_{50}$	Línea Celular		
	HeLa	HCT116	A549
<b>Viol</b>	0,71	1,51	1,30
<b>[SLN-Viol]</b>	0,75	1,44	1,66
<b>[SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)]</b>	0,63	1,64	2,23
<b>[SLN-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)-FA]</b>	0,74	1,33	1,51

**Tabla 5.6:**  $IC_{50}$  para las formulaciones y líneas estudiadas

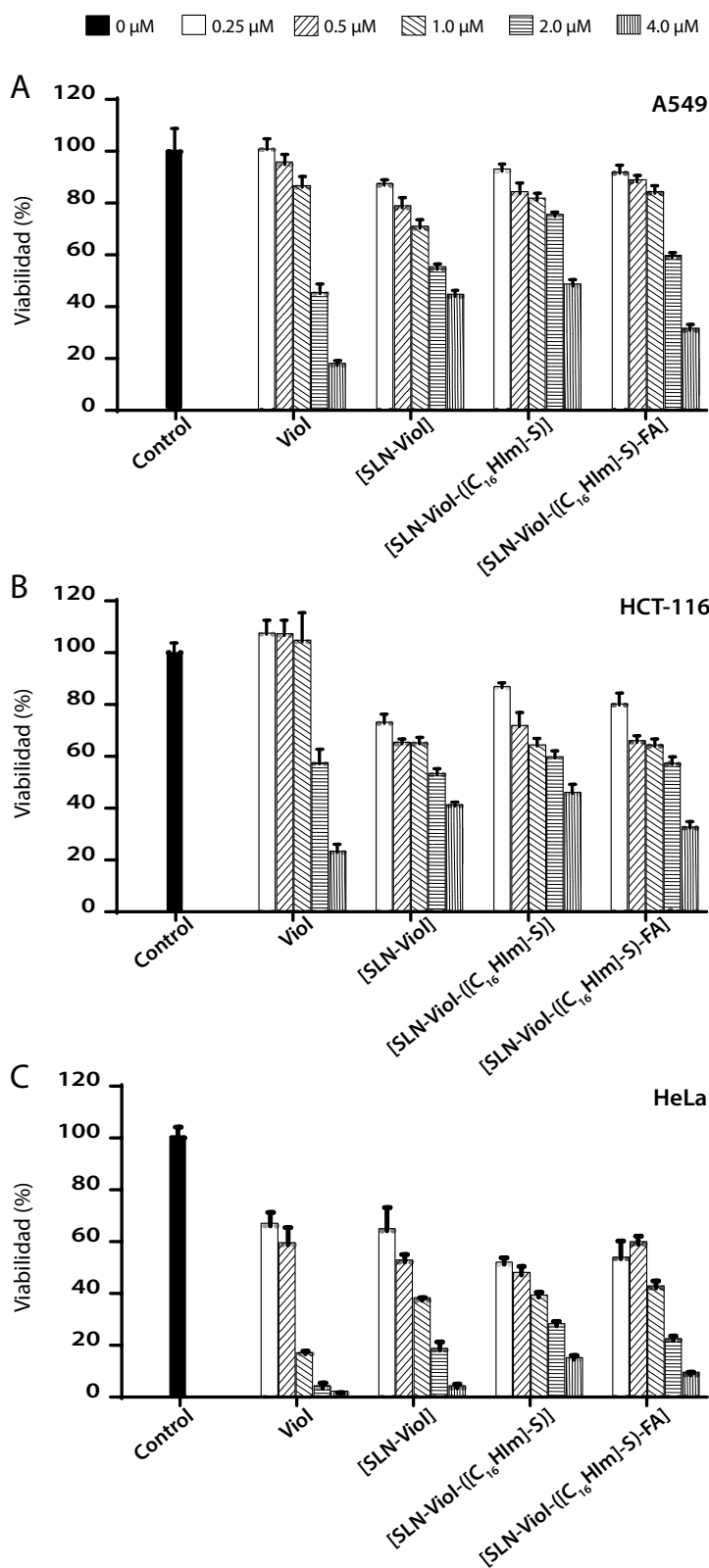
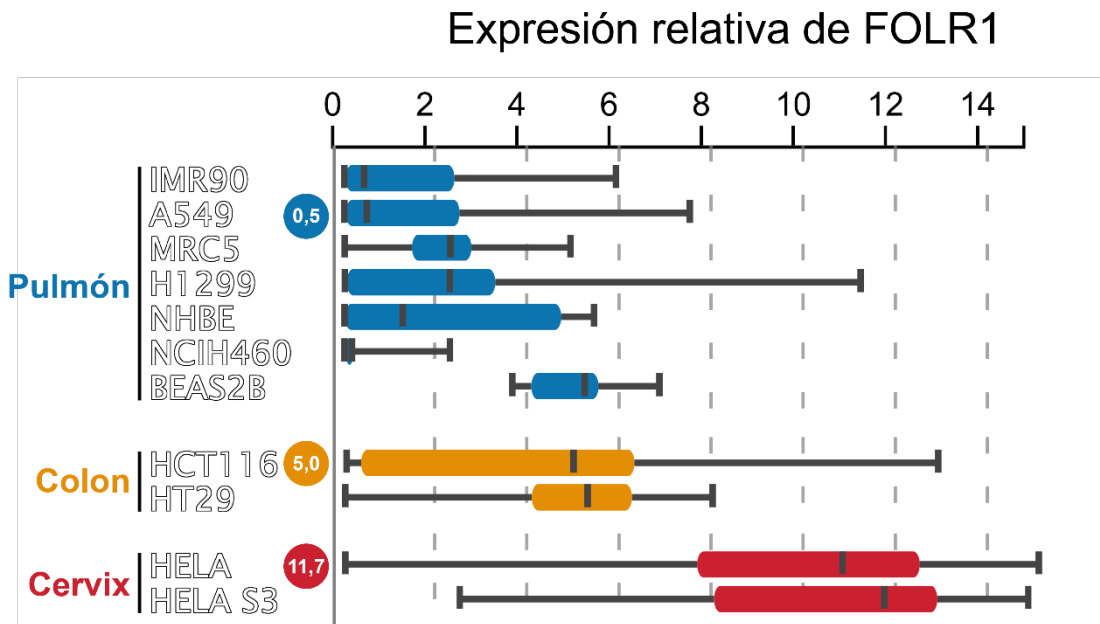


Figura 5.10: Viabilidad celular de A549 (A), HCT-116 (B) y HeLa (C) en presencia de 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1.0  $\mu\text{M}$ , 2.0  $\mu\text{M}$  and 4.0  $\mu\text{M}$  de violaceína y formulaciones con violaceína con concentraciones equivalentes.

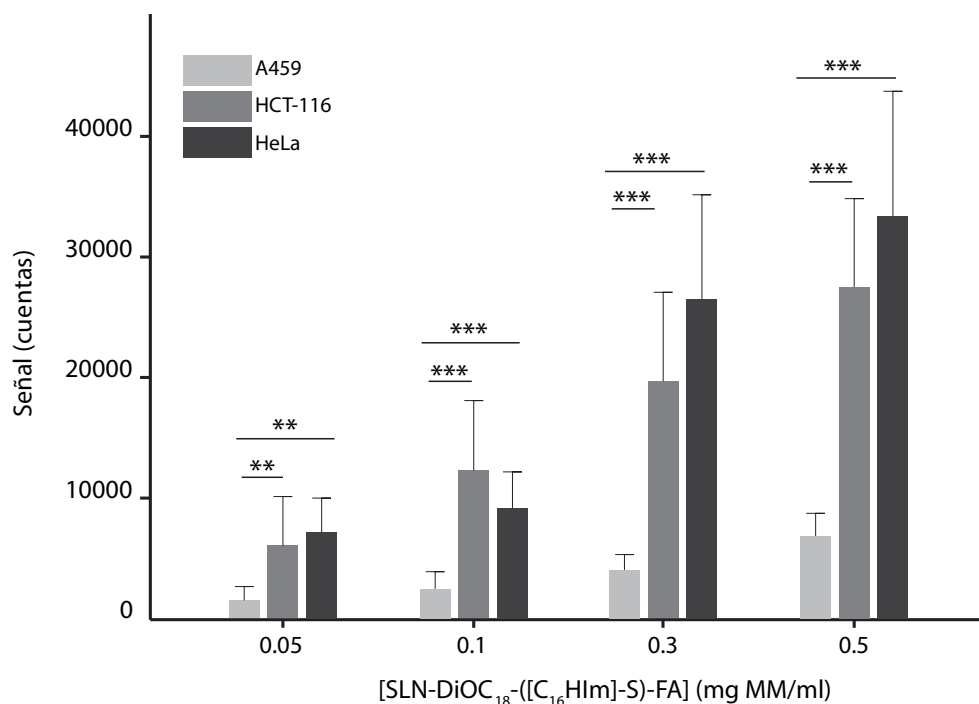
### 5.4.7 Captación celular

Se evaluó la capacidad de las células para captar nanopartículas marcadas con una sonda fluorescente en las líneas HeLa, A549 y HCT116. Estas tres líneas celulares poseen una expresión diferencial de los receptores de folato FOLR1, con valores (en unidades arbitrarias) de 0,5 para A549, 5,0 para HCT116 y 11,7 para HeLa, según la base de datos ARCHS<sup>4</sup>[85] (**Figura 5.11**).



**Figura 5.11:** Expresión diferencial de FOLR1 en líneas celulares de pulmón, colon y cervix, según la base de datos ARCHS<sup>4</sup>[81].

La incorporación de las nanopartículas [SLN-DiOC<sub>18</sub>-([C<sub>16</sub>HIm]-S)-FA] en las células fue dependiente de la concentración de las nanopartículas y de la expresión del receptor de folato de la línea celular respectiva, siendo hasta 5 veces mayor en las líneas que sobre expresan el receptor frente a aquellas que no lo hacen (**Figura 5.12**). Lo que propone algún método activo de captación mediado por el receptor.



**Figura 5.12: Captación de formulaciones marcadas con DIOC18 en distintas líneas celulares**

## 5.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PARCIALES

Los líquidos iónicos tensioactivos derivados de 1-alkylimidazolio y diferentes contraiones se estudiaron para determinar su capacidad para interactuar con Viol y permanecer en solución, así como su toxicidad para la línea celular A549.

Por otro lado, se demostró que los contraiones *SAIL* juegan un papel muy importante en la estabilidad micelar y en la citotoxicidad. La síntesis de *SAILs* con un delicado equilibrio de componentes hidrofílicos-hidrofóbicos permitirá la disolución de moléculas poco solubles en agua como la Viol sin comprometer la citotoxicidad celular. La conjunción de la cadena lateral de alquilo del grupo imidazol y el contraión en los *SAILs* estudiados resultó en la selección de  $[C_{16}Him]-S$  para desarrollar una solución micelar de Viol. Sin embargo, la inestabilidad de la

estructura micelar de [Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)] requirió el desarrollo de un nuevo tipo de formulación para ser potencialmente utilizada con fines terapéuticos.

Las nanopartículas lipídicas sólidas fueron una buena opción de transporte para Viol, debido a la baja solubilidad en agua del pigmento, y la alta estabilidad de las *SLN*. Se desarrollaron de esta manera sistemas con una alta eficiencia de encapsulación, Además, las *SLN* son nanodispositivos de administración de fármacos muy versátiles, debido a que la composición química de los transportadores se puede adaptar para transportar moléculas con diversas propiedades biofísicas y se pueden adaptar a células específicas con los receptores adecuados. En este caso, se demostró que la captación de las nanopartículas puede ser selectiva respecto de la expresión del receptor de folato FOLR1. Los presentes resultados sugieren que la formulación [*SLN*-Viol-([C<sub>16</sub>Him]-S)-FA] es un sistema novedoso, prometedor y eficaz con potencial para la administración dirigida de Viol en particular y otros fármacos hidrofóbicos contra las células cancerosas que sobre-expresan el receptor de folato.

## 6 SISTEMA 3: DESARROLLO DE UN SISTEMA ENZIMÁTICAMENTE ACTIVO BASADO EN NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E INSERCIÓN EN UNA MATRIZ 3D<sup>3</sup>

---

*“El lector, al llegar a este punto, se habrá dado cuenta de sobra de que éste no es un tratado de química. Mis pretensiones no llegan a tanto, ‘ma voix est faible, et même un peu profane’”*

*Primo Levi - Il sistema periodico*

### 6.1 INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo, y habiendo incluido exitosamente Viol en un sistema nanoparticulado, se intentará desarrollar un sistema implantable a partir de dicho vehículo. Como se ha descrito previamente, las terapias oncológicas requieren normalmente la combinación de diferentes estrategias terapéuticas, y en caso de los tumores sólidos, es de preferencia, cuando fuera posible, la cirugía con extirpación del tumor, y aquellos ganglios linfáticos que hayan sido comprometidos. Luego de la cirugía puede suceder que permanezcan células tumorales remanentes y el uso de la quimioterapia disminuye las chances de recidiva debido a ello. [86] En estos casos, los

---

<sup>3</sup> Este capítulo fue aceptado y se encuentra en edición como Rivero Berti, I., Rodenak-Kladniew, B., Katz, S.F., Arrua, C.E., Álvarez, V.A., Durán, N., Castro, G.R. (2022) “Enzymatic active release of violacein present in nanostructured lipid carrier by lipase encapsulated in 3D-bioprinted chitosan-hydroxypropyl methylcellulose matrix with anticancer activity.” *Frontiers in Chemistry - Green and Sustainable Chemistry*. En edición

dispositivos implantables para la liberación de estos agentes quimioterapéuticos pueden colocarse en el sitio donde se encontraba el tumor luego de la extirpación. Esto posee al menos dos ventajas inmediatas, la primera, la liberación es sitio-específica (o también denominada locoregional) reduciendo los efectos adversos de la circulación sistémica del fármaco, reduciendo las dosis de fármaco y por lo tanto mejorando la calidad de vida del paciente. La segunda, garantiza la adherencia del paciente al tratamiento [87].

La impresión 3D puede añadir a este tipo de implantes algunas ventajas más, relacionadas a la medicina personalizada. Entre ellas, se pueden mencionar que las matrices se pueden producir y ajustar mediante modelado del implante a formas similares a la cavidad dejada por el tumor extirpado, se puede personalizar la superficie difusiva del implante y la dosis de fármaco.

Para este fin fueron seleccionados dos biopolímeros para el desarrollo del implante 3D: quitosano (Chi) e (hidroxipropil) metilcelulosa (HPMC) debido a sus ventajas. Chi se compone de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina mediante uniones  $\beta$  distribuidas al azar. Chi posee una carga positiva residual, lo que posibilita que el biopolímero sea mucoadhesivo y adhesivo celular, propiedades muy relevantes para mejorar la unión de los geles de biopolímero a las superficies celulares. Este hecho posibilita que aumente la permeabilidad de los tejidos y el tiempo de residencia del fármaco. Además, Chi muestra actividades antimicrobianas y antioxidantes. Chi es no tóxico, es biocompatible y biodegradable por las enzimas de los mamíferos, lo que convierte al biopolímero en un excelente candidato para aplicaciones biomédicas en forma de geles, nanopartículas, fibras y películas [88]. Sin embargo, las propiedades mecánicas de Chi, por si solas, no



son adecuadas para la confección de una tinta 3D, por lo que su utilización con fines biomédicos requiera de mezclas o formación de coacervados con otras moléculas, generalmente polímeros.

La celulosa es el biopolímero más abundante en la naturaleza y está compuesta por unidades lineales de  $\beta$ -D-glucosa de diferentes longitudes, pero su limitada solubilidad reduce las aplicaciones en una variedad de campos. La HPMC es un derivado de metilcelulosa que contiene propilenglicol éter. Además, HPMC es un polímero no tóxico, considerado generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la FDA (*i.e.*, *Food and Drug Administration*, EE.UU.), y aprobado como aditivo alimentario por la UE [89].

Adicionalmente, se incluirá en las matrices una lipasa, de manera de regular la liberación de la Viol desde los transportadores lipídicos, en el presente caso transportadores lipídicos nanoestructurados (*NLC*). Par este fin se empleará la lipasa de *Mucor meihei*, la cual presenta actividad optima a temperaturas que van entre 37°C y 40°C, es activa aun en presencia de tensioactivos y el pH optimo es dependiente de la cepa, que ha sido reportado desde el rango alcalino (es decir, pH comprendidos entre 8,0 y 8,8) al ácido (es decir, pH= 5.0–5.4) [90]. Ambas condiciones simultáneas son relevantes para el tratamiento del cáncer dado que los tumores sólidos muestran altas temperaturas en comparación con el tejido normal cercano debido a las altas tasas metabólicas, y también un entorno ácido debido a la producción exacerbada de ácidos láctico y acético [91]. Además de estimular la liberación de la violaceína desde las *NLC*, la lipasa puede poseer actividad antitumoral intrínseca al interactuar con la membrana de las células tumorales y/o restituir una función regulatoria de las esterasas [92].

En el presente capítulo, y por lo expuesto, se desarrollará un sistema de liberación de Viol, implantable, diseñado mediante impresión 3D y con la inclusión de una lipasa, con el doble propósito de estimular la liberación y mejorar la capacidad antitumoral.

## 6.2 OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- **Integrar una lipasa a los sistemas de vehiculización lipídica previamente desarrollados.**
- **Incluir estos nanosistemas en una matriz polimérica imprimible por extrusión y generar objetos 3D.**
- **Evaluar la liberación de violaceína desde estos objetos a diferentes pHs.**
- **Caracterizar fisicoquímicamente los materiales mediante diversas técnicas.**
- **Evaluar la citotoxicidad de estos sistemas.**

## 6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.3.1 Materiales

Violaceína [3-(1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-one] se produjo a partir de *Chromobacterium violaceum* siguiendo protocolos anteriores detallados en capítulos previos y artículos publicados [73,84].

El *p*-nitrofenilpalmitato (pNPP), la lipasa, de *Mucor miehei* polvo liofilizado (Lip), el Poloxámero 188 (Kolliphor® P188), el quitosano (Poli(D-glucosamina) de peso molecular medio (Chi-MMW) (190-310 kDa), y la (hidroxipropil) metilcelulosa (HPMC) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina). El lípido sólido miristato de miristilo (MM, Crodamol® MM, punto de fusión= 36–40 °C) y el aceite (Crodamol® GTCC-

LQ, un triglicérido con ácidos grasos saturados, punto de fusión=  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) fueron amablemente donados por CRODA<sup>®</sup> (Argentina). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico adquiridos a Merck o similar vendedor.

### 6.3.2 Medida de la actividad lipasa

La actividad de la lipasa se determinó mediante la liberación del compuesto coloreado *p*-nitrofenol del sustrato *p*-nitrofenilpalmitato (pNPP) según la bibliografía [93]. En breve, en una placa de 48 pocillos, pNPP 500  $\mu\text{M}$  predisuelto en una mezcla 1:4 de acetonitrilo:isopropanol conteniendo 0,1% (m/v) Triton X100 se dispersó en un buffer 10 mM, ácido cítrico/ citrato pH=3,0, ácido acético/acetato pH=5,5, buffer MES pH=6,5, fosfato pH=7.4 o buffer TRIS pH=8,8, aditivado con 0,2% (m/v) de goma arábiga con un volumen final de 1.00 ml. Se añadió una muestra de lipasa y se determinó la absorbancia de la solución a  $\lambda = 405\text{nm}$  a  $37^{\circ}\text{C}$  cada minuto durante 20 minutos para establecer la concentración de *p*-nitrofenol liberado. Posteriormente, la actividad de la lipasa se expresó como  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol liberado por segundo.

### 6.3.3 Vehículo lipídico nanoestructurado (NLC) y NLC con lipasa

Los NLC fueron preparados por el método de ultrasonificación, similar a la metodología utilizada para preparar las SLN en el capítulo anterior [94]. En resumen, se fundió en un baño a  $70^{\circ}\text{C}$  una fase lipídica que conteniendo 400 mg del lípido sólido miristato de miristilo (MM), 100  $\mu\text{l}$  de aceite (Crodamol<sup>®</sup> GTCC-LQ) y 20  $\mu\text{mol}$  de Viol. Posteriormente, se añadieron a la fase lipídica 20 ml de una solución acuosa al 4% (m/v) de P188 y ajustado con buffer ácido acético/acetato 10mM a pH= 5.0, y posteriormente

la mezcla fue sonicada en un procesador ultrasónico (130 W, Cole-Parmer, EE.UU.) a 70% de amplitud durante 15 minutos.

Para determinar la Viol no encapsulada en las *NLC*, se analizaron muestras de 500  $\mu\text{L}$  de las formulaciones de *NLC*-Viol mediante el empleo de filtros de corte de 100 kDa (Amicon® Ultra-0.5mL, Merck Millipore, Irlanda), y la absorbancia de la solución filtrada medida a  $\lambda = 580\text{nm}$ .

Para las formulaciones con lipasa (Lip), se incubaron 5,00 ml de dispersión *NLC* con lipasa suficiente para producir una actividad de 2,0  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol/seg a 5°C durante 12 horas con una agitación de 150 rpm mediante agitador magnético.

#### 6.3.4 Medida del tamaño de partícula

Para la determinación del diámetro hidrodinámico promedio ( $D_H$ ), el índice de polidispersión (PDI) y el potencial Z (Z-pot,  $\zeta$ ) para *NLC*-Viol y *NLC*-Viol-Lip, las muestras se diluyeron 1/100 en agua ultrapura (MiliQ, Millipore, Ma, EE.UU.) y se analizaron en un Zetasizer Nano. (Malvern Instruments, UK) a 25°C por triplicado.

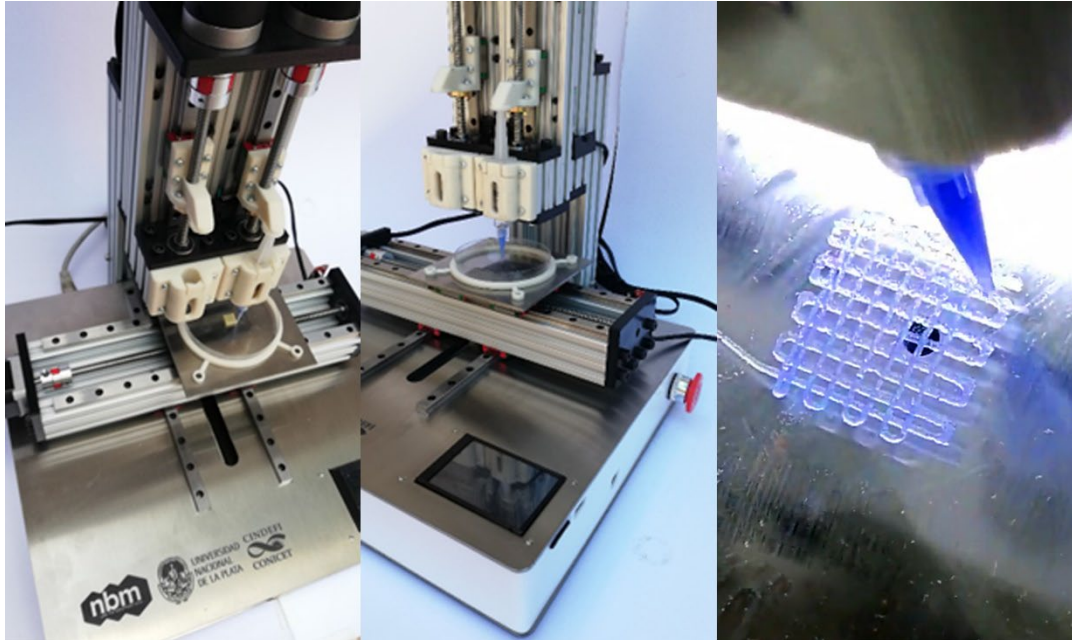
Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los sistemas nanoparticulados se adquirieron en un microscopio Jeol-1200 EX II-TEM (Jeol, Columbia, MD, EE.UU.). Las suspensiones de *NLC* se diluyeron 1/100 en agua ultrapura o buffer de fosfato 10 mM de pH = 7,4 y se esparcieron 10  $\mu\text{l}$  en una rejilla de Cu de malla 400. El exceso de muestra se eliminó mediante absorción con papel de filtro. Para mejorar el contraste se añadió una gota de ácido fosfotúngstico y se eliminó el exceso a las muestras previa adquisición de la imagen.

### 6.3.5 Preparación de tinta biopolimérica y extrusión

Se hidrató una cantidad ponderada (200 mg) de quitosano de peso molecular medio en 1,00 ml de ácido acético al 10% hasta formar una pasta homogénea, posteriormente se añadieron y mezclaron con 1.5 ml de formulación *NLC* con o sin Lip, por último, se añadieron 500mg de HPMC y la tinta se mezcló hasta alcanzar la homogeneidad nuevamente y se cargó en una jeringa esterilizada de 5 ml con cierre Luer (TERUMO®, Filipinas). Posteriormente, la jeringa se centrifugó durante 20 minutos a 6000 xg para eliminar las burbujas de aire de la tinta 3D.

A continuación, se adosó a la jeringa una punta de plástico cónica (Fhis Dispensing, China) con un orificio de salida de 0,41 mm antes de la extrusión.

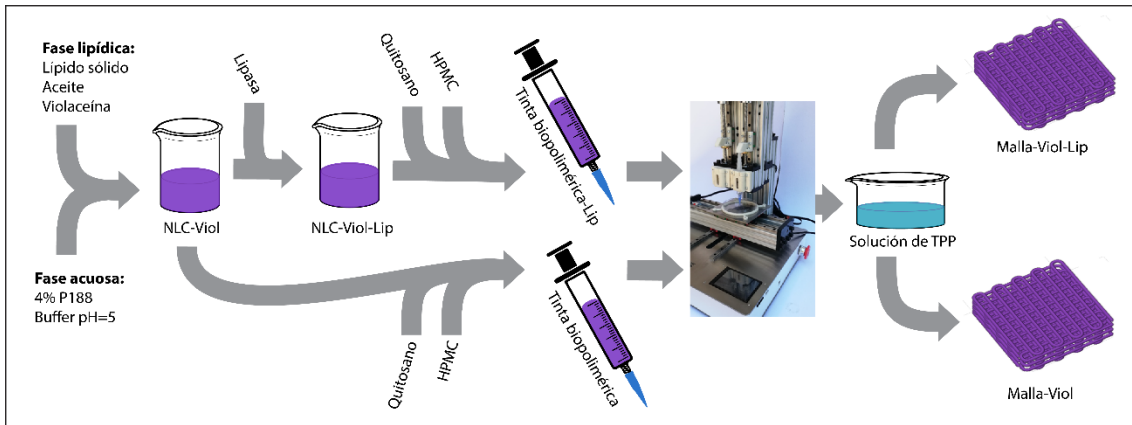
Las mallas 3D se produjeron por extrusión en una bioimpresora 3D diseñada en nuestro laboratorio. Brevemente, la impresora 3D consta de una extrusora que empuja con precisión la tinta fuera de la jeringa, un sistema de posicionamiento para los movimientos en tres ejes y un controlador. El extrusor está compuesto por un sócalo para la jeringa y un motor paso a paso bipolar Nema 17 con sistema planetario de alta precisión, el movimiento en los tres ejes lo proporcionan tres motores paso a paso bipolar Nema 17 acoplados con tornillos THSL de 8 mm y tuercas antiretroceso. La electrónica de código abierto utilizada contiene un procesador ATmega2560 de 16 MHz que se comanda con Marlin como firmware.



***Figura 6.1: Fotos de la bioimpresora 3D desarrollada en el laboratorio, en la última foto se muestra un detalle de una impresión en progreso.***

Las mallas 3D producidas por este método se sumergieron durante 10 minutos en una solución de tripolifosfato (TPP) 3,0% (m/v) como agente de entrecruzamiento, y luego fueron lavadas con agua ultrapura (MiliQ, Millipore, Ma, EE. UU.), con posterioridad se guardaron a 5°C para su posterior caracterización. Muestras de solución de TPP y agua ultrapura utilizada para el lavado se emplearon para determinar la concentración de Viol excedente en las soluciones.

La **Figura 6.2** muestra un flujo de trabajo simplificado de preparación de NLC y producción de mallas 3D.



**Figura 6.2:** Flujo de trabajo simplificado para la producción de las mallas.

### 6.3.6 Eficiencia de encapsulación de las mallas

La eficiencia de encapsulación (EE, %) se ensayó en las mallas preparadas con *NLC-Viol* (Malla-Viol) así como en las mallas preparadas con *NLC-Viol-Lip* (Malla-Viol-Lip). Las determinaciones de EE (%) se realizaron mediante dos métodos. En un método indirecto se midió Viol en la solución de TPP y el agua utilizada para lavar las mallas 3D y luego restar la Viol en esas soluciones a la cantidad inicial de pigmento, usando la siguiente ecuación:

$$EE_{indirect}(\%) = \frac{mViol_i - (cViol_{TPP_{sol}} \times V_{TPP_{sol}}) - (cViol_{ww} \times V_{ww})}{mViol_i} \times 100\% \quad \text{Ecuación 6.1}$$

donde  $mViol_i$  es la cantidad inicial de Viol añadida a la preparación,  $cViol_{TPP_{sol}}$  es la concentración de violaceína en la solución de TPP,  $cViol_{ww}$  es la concentración de Viol en el agua ultrapura después del lavado, y  $V_{TPP_{sol}}$  y  $V_{ww}$  los volúmenes de esas soluciones.

Por otro lado, el método directo de determinación de Viol consistió en agregar 3,0 ml de etanol a una masa establecida de Malla-Viol o Malla-Viol-Lip y sonicar por 30 min en un baño ultrasónico, se eliminó el etanol y se agregó etanol fresco a la malla 3D sonicada y fue llevada al baño ultrasónico por una segunda vez. Luego se calculó la eficiencia mediante la siguiente ecuación:

$$EE_{direct}(\%) = \frac{c_{Viol_1} \times V_1 + c_{Viol_2} \times V_2}{m_{Viol_i}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 6.2}$$

donde  $m_{Viol_i}$  es la cantidad inicial de Viol añadida a la preparación,  $c_{Viol_1}$  y  $c_{Viol_2}$  son la concentración de Viol en la primera y segunda extracción con etanol, y  $V_1$  y  $V_2$  son los volúmenes de esas soluciones.

### 6.3.7 Liberación de violaceína desde las mallas

Se tararon cuatro mallas y fueron incubadas en 30,0 ml de buffer fosfato 10 mM (pH= 7,4) a 37°C, por duplicado. Cada hora se tomaron muestras de 1,00 ml del medio y se reemplazó el mismo volumen con buffer fresco. Posteriormente, las muestras se filtraron con filtros de corte de 100 kDa (Amicon® Ultra-0,5 ml, Merck Millipore, Irlanda) y se determinó la absorbancia de la solución filtrada a  $\lambda = 580$  nm para evaluar la concentración de Viol. Los resultados se expresaron como porcentaje de la carga total de Viol liberada en relación al tiempo de incubación. Luego, los perfiles de liberación se compararon con los modelos de liberación descritos en la **Tabla 6.1**.



Nombre del modelo	Ecuación
Primer orden	$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{k_i t}{2.303}$
Higuchi	$Q_t = K_H \sqrt{t}$
Korsmeyer-Peppas	$\frac{Q_t}{Q_0} = K_k t^n$
Hixon and Crowell	$\sqrt[3]{Q_0} - \sqrt[3]{Q_t} = K_s t$
Baker-Lonsdale	$\frac{3}{2} \left\{ 1 - \left( 1 - \left[ \frac{Q_t}{Q_0} \right]^{\frac{2}{3}} \right) \right\} - \frac{Q_t}{Q_0} = K_b t$

**Tabla 6.1: Modelos usados para ajustar las curvas de liberación de violaceína**

### 6.3.8 Caracterización fisicoquímica de las mallas 3D

#### 6.3.8.1 Adquisición de espectros FTIR

Para la adquisición de espectros FTIR, las muestras fueron liofilizadas y los espectros se obtuvieron en un espectrómetro Thermo Scientific Nicolet, modelo 6700, (CT, EE.UU.) con un accesorio ATR (reflectancia total atenuada) para todas las mediciones. Los escaneos se realizaron 32 veces para cada muestra en el rango de 600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  y con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 6.3.8.2 Difracción de rayos X

Los difractogramas de las muestras liofilizadas se obtuvieron en un instrumento Analytical Expert utilizando radiación Cu-K ( $\theta = 1,54 \text{ \AA}$ ) de  $2\theta = 10^\circ$  a  $70^\circ$  en modo continuo con un tamaño de paso de  $0,07^\circ$ .

### 6.3.8.3 Análisis térmico

Para el análisis termogravimétrico (TGA) se utilizó un instrumento Shimadzu TGA-50. Los ensayos se realizaron de 20°C a 900°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min en atmósfera de N<sub>2</sub>. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizó en un instrumento Perkin Elmer Inc., Model Pyris 1, (Waltham, MA, EE. UU.) en atmósfera de nitrógeno. Una velocidad de calentamiento de 10°C. min<sup>-1</sup> en el rango de temperatura de 0°C a 250°C. Todas las muestras fueron previamente liofilizadas.

### 6.3.9 Adquisición de imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM)

Para el análisis SEM, las mallas impresas en 3D se liofilizaron y luego se cubrieron con una capa de oro de 15-20 nm de espesor utilizando un metalizador Balzers SCD 030. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio electrónico de barrido Philips SEM 505 (Países Bajos) y se procesaron en un programa de digitalización de imágenes (Soft Imaging System ADDA II, SIS). Posteriormente se realizó un análisis de las imágenes en el software ImageJ® (NIH, EE.UU.) y donde se estimó la rugosidad de la superficie mediante la desviación estándar de los valores de gris en el histograma de la imagen [95].

### 6.3.10 Estudios de citotoxicidad

Se cultivaron células A549 epiteliales de adenocarcinoma de pulmón y células HCT116 de carcinoma colorrectal humano en Medio Mínimo Esencial (*Minimal Essential Medium, MEM*, HyClone, EE. UU.) en 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] [53].

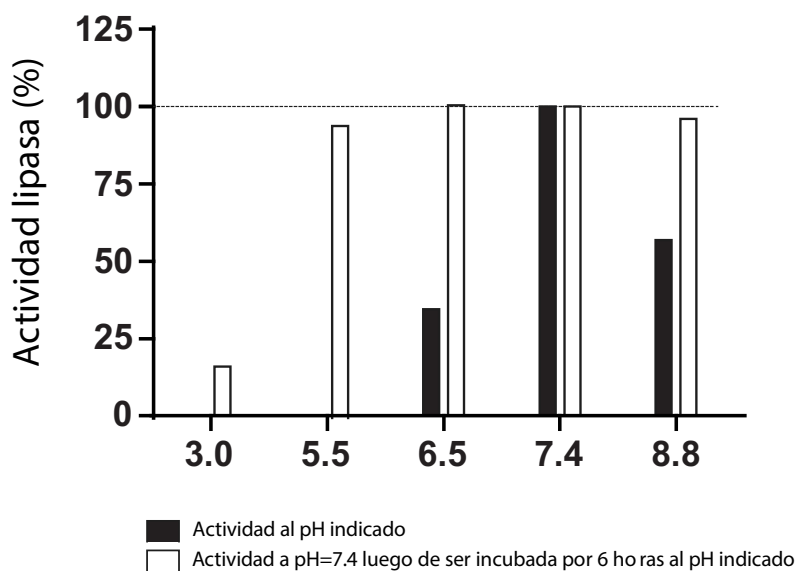
Se sembraron células A549 y HCT116 ( $4,0 \times 10^3$  células/ml) en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h en condiciones estándar. Luego, las células se expusieron a 0,5  $\mu$ M, 2  $\mu$ M o 4,0  $\mu$ M de Viol libre (disuelta en DMSO, concentración final de DMSO por debajo del 0,05 %, v/v), o cantidades equivalentes ( $\mu$ M de Viol o mg/ml de MM) de *NLC* y *NLC-Lip* con y sin Viol durante 24 h. El medio fue descartado y se incubó con 0,1 ml de solución de MTT (0,5 mg/mL de MTT en MEM) durante 3 h. El formazán resultante fue disuelto en 0,1 ml de DMSO. Las microplacas se agitaron durante 5 min y se midió la absorbancia a  $\lambda = 560$  nm en un lector de microplacas (Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector, Ca., USA). Una reducción de la viabilidad celular en más del 30 % se consideró un efecto citotóxico [96]. Para los ensayos de Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se utilizaron medios acondicionados. Es decir, se incubaron por 48 h las mallas con y sin Viol y con y sin Lip en MEM suplementado como fuera descrito previamente. Luego, los medios fueron incubados con células A549 y HCT116 durante 24 h. Posteriormente, se realizó la colorimetría MTT como fuera descrito anteriormente.

## 6.4 RESULTADOS

### 6.4.1 Actividad lipasa y evaluación de las NLC

La actividad lipasa se evaluó a diferentes pH. Entre los pH evaluados, a pH=7.4 la lipasa presenta la mayor actividad, tomándose esta como referencia para el resto de las actividades, que se expresaron como porcentaje de la misma. Para evaluar la estabilidad de la enzima al mismo pH, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se evaluó su actividad a pH=7.4 y 37°C (**Figura 6.3**). En particular, nos interesa el comportamiento de la lipasa a pH= 5,5. Si bien con el protocolo utilizado no se ha

detectado actividad a ese pH, se recupera el 95% de actividad cuando el pH es nuevamente desplazado a 7,4. Basándonos en este resultado, se decidió que los pH alrededor de 5,5 eran los mejores candidatos para preparar y almacenar la *NLC* para que la lipasa estuviera inactiva en el almacenamiento y pudiera recuperar su actividad a pH alrededor de 7,4.



**Figura 6.3:** En negro actividad de la lipasa relativa a la actividad a pH=7,4 y 37°C. En blanco, estabilidad de la lipasa medida como actividad de la lipasa a pH=7,4 y 37°C tras 6 horas de incubación a temperatura ambiente al pH indicado.

La eficiencia de encapsulación de Viol en *NLC*-Viol estuvo cercana al 100 % debido a que la concentración de Viol en la solución filtrada estaba por debajo del límite de detección. Lo mismo se observó para la formulación después de la adición de lipasa *NLC*-Viol-Lip.

#### 6.4.2 Tamaño y Zpot de NLC

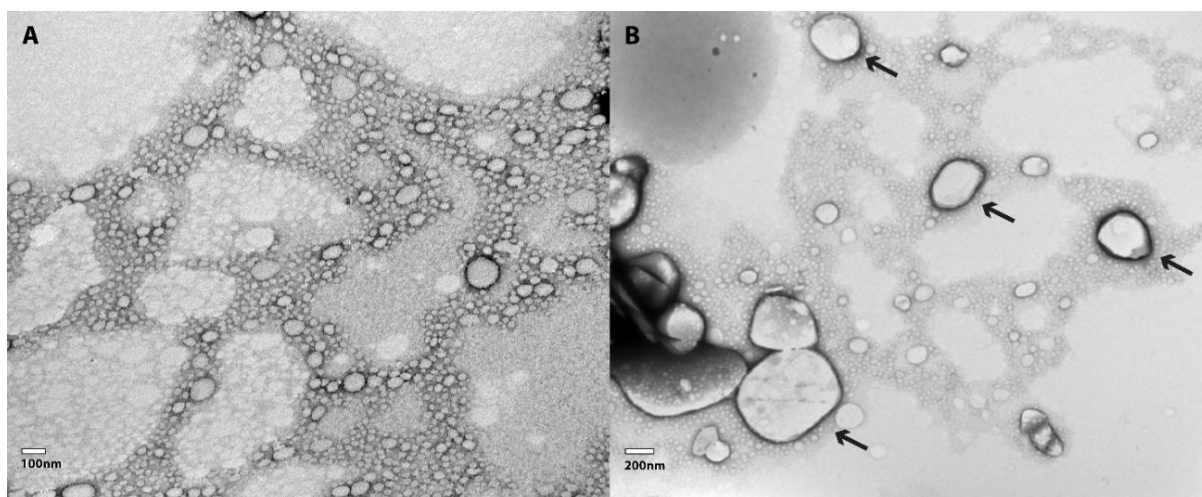
El diámetro hidrodinámico promedio ( $D_H$ ), PDI y  $Z_{pot}$  ( $\zeta_{pot}$ ) se muestran en la **Tabla 6.2**. La adición de lipasa no altera significativamente el tamaño medio de partícula ( $p > 0,05$ ), pero sí altera significativamente el PDI ( $p < 0,05$ ). El Z-pot es cercano a cero, como cabría esperar por el hecho de que el tensioactivo utilizado para estabilizar NLC, P188, posee carga neutra. El cambio de Z-pot entre formulaciones es significativo ( $p < 0,05$ ) pero muy pequeño.

	$D_H$ (nm)	PDI	Z-pot
<i>NLC-Viol</i>	154,3	0,241	-9,78
<i>NLC-Viol-Lip</i>	151,5	0,319	-8,08
<i>p-value (n=3)</i>	0,7584	0,0170	0,0342

**Tabla 6.2:** Diámetros hidrodinámicos ( $D_H$ ), índice de polidispersión (PDI) y Z-pot para las formulaciones con (*NLC-Viol-Lip*) y sin lipasa (*NLC-Viol*).

Las imágenes de TEM para *NLC-Viol-Lip* antes y después de una incubación de 6 h en un buffer de fosfato de pH= 7,4 se muestran en la **Figura 6.4**. Antes de la incubación (**Figura 6.4A**), *NLC-Viol-Lip* mostró un diámetro promedio de 93,6 nm basado en 36 mediciones de micrografías. Después de la incubación (**Figura 6.4B**) se observan agregados (flechas en la **Figura 6.4B**). Estos agregados pueden explicarse debido a que la actividad de la lipasa probablemente desestabiliza la estructura de las nanopartículas

al catalizar la desesterificación y, por lo tanto, puede producir agregados de lípidos fuera de las nanopartículas.



**Figura 6.4:** Imágenes de TEM para las NLC-Viol-Lip antes (A) y después (B) de incubarse a pH7.4

### 6.4.3 Preparación y extrusión de la tinta 3D

Se ensayaron diferentes proporciones de Chi y HPMC para crear una viscosidad y elasticidad adecuada para poder imprimir. Las proporciones finales contabilizadas en la sección de Materiales producen una tinta final de biopolímero con un 6,6% (p/p) Chi y un 16,6% (p/p) de HPMC, es decir, una proporción 2:5 entre Chi:HPMC. Para proporciones más bajas de HPMC, la impresión no retuvo su forma, mientras que para proporciones más altas de HPMC no se produjo la reticulación posterior con TPP, esto puede ser consecuencia debido a que las cadenas de Chi estén demasiado separadas entre ellas, apantalladas por la presencia de HPMC.

La velocidad máxima de impresión que no produjo errores en la continuidad de la tinta desarrollada fue de 400 mm/min. Para el diámetro de la boquilla utilizada (0,41 mm) se encontró óptima una altura de capa de 0,33 mm (80%), en razón que alturas de

capa inferiores a esa provocaron que la boquilla dañara la capa inferior y los tamaños de capa más grandes impidieron la correcta adhesión de la capa en desarrollo sobre la capa inferior.

Los dos métodos utilizados para estimar EE(%) dieron resultados diferentes (**Tabla 6.3**). Sin embargo, incluso la estimación más baja, 88,8 % para Malla-Viol-Lip, sigue siendo muy buena teniendo en cuenta que la carga se puede perder en varias de las etapas experimentales (*i.e.*, sonicación, mezcla, *crosslinking* y lavado).

Muestra	Viol/Matrix ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) (directa)	Eficiencia de encapsulación (%)	
		Indirecta	Directa
Malla-Viol	$4,67 \times 10^{-4}$	97,2	90,3
Malla-Viol-Lip	$4,59 \times 10^{-4}$	95,8	88,8

**Tabla 6.3: Eficiencia de encapsulación de las mallas**

#### 6.4.4 Liberación de violaceína desde las mallas

Los dos perfiles de liberación Viol de matrices con lipasa (Malla-Viol-Lip) y sin lipasa (Malla-Viol) mostraron una evidente diferencia a pH= 7,4 (**Figura 6.5**). Dicha diferencia es atribuida a que lipasa estimula fuertemente la liberación de Viol de la matriz polimérica, alcanzando un 60% de liberación después de 2 horas de incubación. Mientras que solo el 20% de Viol se ha liberado de la matriz sin lipasa en las mismas condiciones experimentales. La liberación cinética de Viol de Malla-viol y Malla-viol-Lip se analizó con distintos modelos cinéticos estructurados típicos (**Tabla 6.1**). La mejor correlación de liberación de Viol se encontró con el modelo Korsmeyer-Peppas (para Malla-Viol y Malla-Viol-Lip,  $R^2= 0.95$ ). Además, Malla-Viol ajusto a los modelos de Baker-Lonsdale ( $R^2= 0.95$ ) y Higuchi ( $R^2= 0.94$ ) (**Tabla 6.4**).

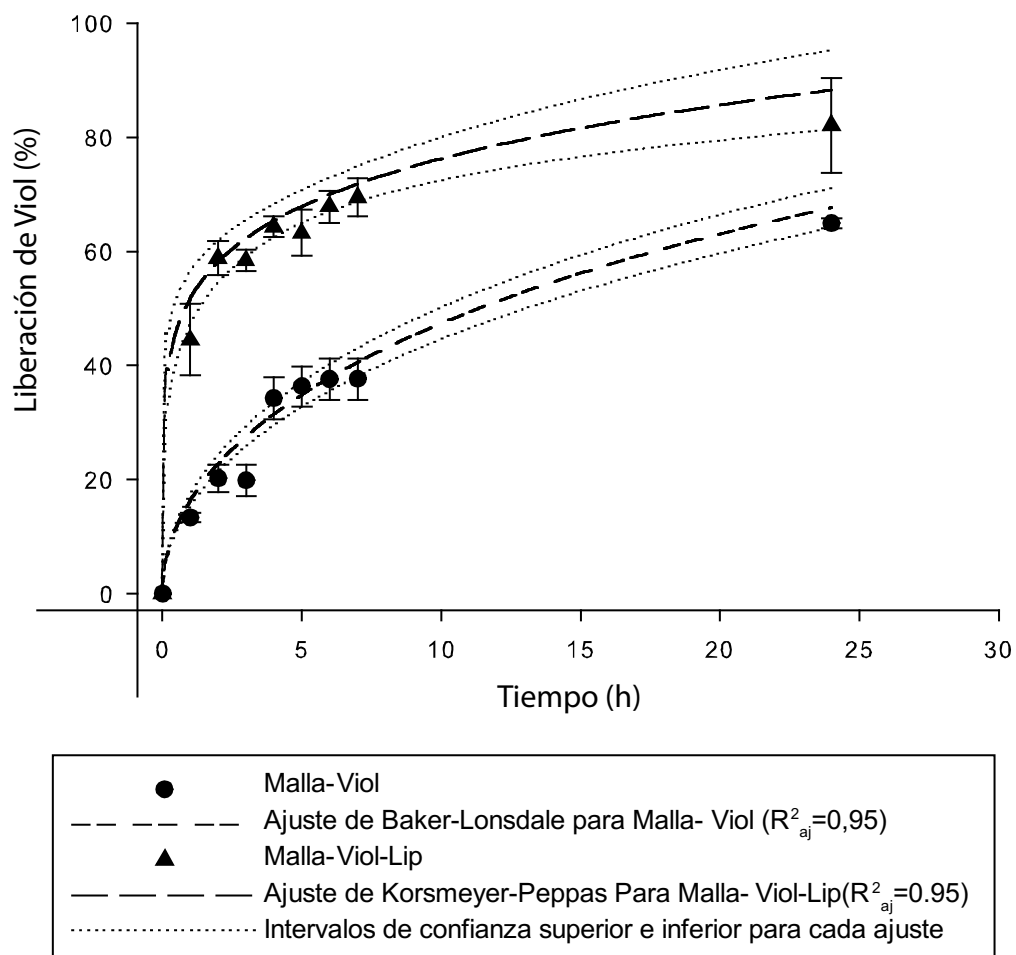
El parámetro "n" (ver **Tabla 6.1**) en el modelo de Korsmeyer Peppas es indicativo del mecanismo involucrado en la liberación del fármaco. En este caso, Malla-Viol ajustado con un  $n= 0,17$  y Malla-Viol-Lip con un  $n=0,46$ , ambos casos se encuentran por debajo de la condición  $n < 0,5$ , para lo cual el modelo de Korsmeyer-Peppas predice una liberación en la que predomina el componente difusivo, según las leyes de Fick. [97]

Por otro lado, las liberaciones de Viol de las matrices Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se realizaron a  $pH= 5,0$ . Y como es de esperarse, cuando la lipasa está inactiva, no se encontraron diferencias significativas entre la liberación de Viol desde ambas matrices (**Figura 6.6**). Sin embargo, la liberación fue más rápida que en el buffer de  $pH= 7,4$ , con alrededor del 65 % del fármaco liberado en las primeras dos horas, esto es de esperar y atribuible a que la solubilidad del quitosano aumenta considerablemente a un  $pH$  más ácido. [98].

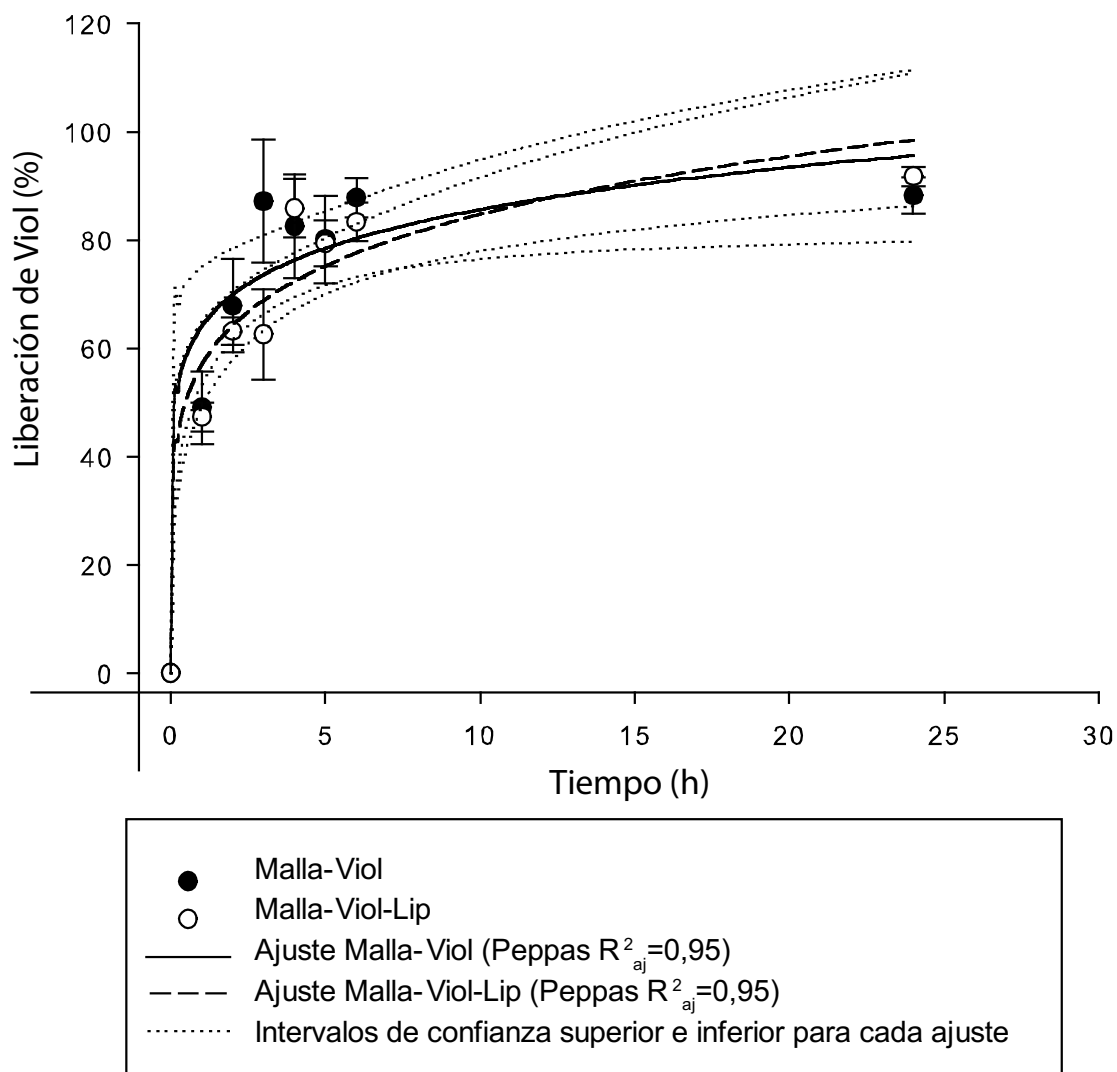
Modelo ( $pH= 7,4$ )	Ajuste al modelo ( $R^2_{aj}$ )	
	Malla-Viol	Malla-Viol-Lip
Primer orden	0,83	0,69
Higuchi	0,94	0,29
Korsmeyer-Peppas	<b>0,95</b>	<b>0,95</b>
Hixon and Crowell	0,72	0,42
Baker-Lonsdale	<b>0,95</b>	0,89

**Tabla 6.4: Valores de  $R^2$  ajustados para la liberación de Viol desde Malla-Viol y Malla-Viol-Lip a  $pH=7,4$**





**Figura 6.5:** Liberación de violaceína desde la malla (●), y la malla conteniendo lipasa (▲) a pH=7,4. Ajuste de Baker-Lonsdale para Malla-Viol y ajuste de Korsmeyer-Peppas para Malla-Viol-Lip.

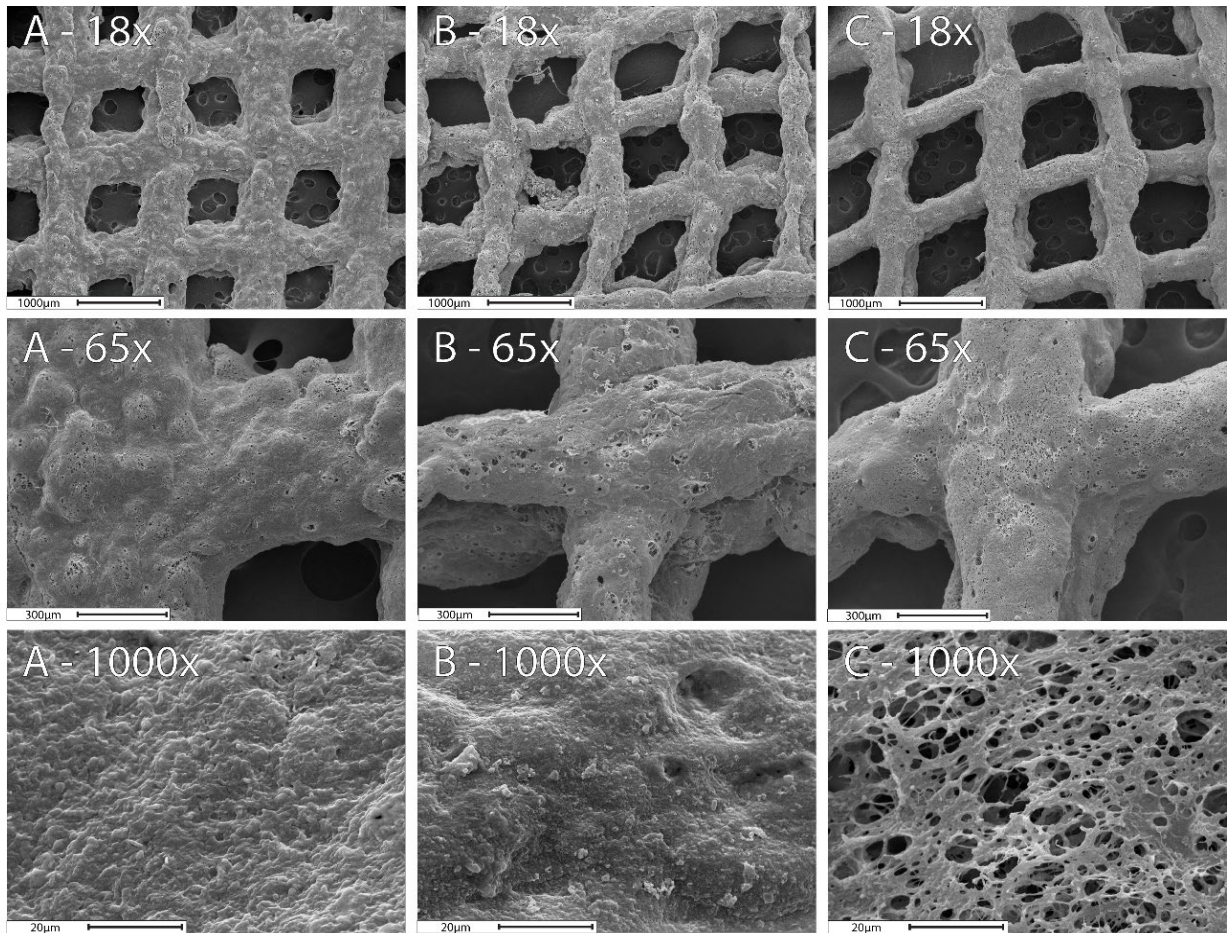


**Figura 6.6:** liberación de violaceína desde la malla (●), y la malla conteniendo lipasa (○) a pH= 5,0. Ajuste de Korsmeyer-Peppas para cada liberación Malla-Viol ( $R^2_{aj}=0.90$ ), Malla-Viol-Lip ( $R^2_{aj}=0.87$ )

## 6.4.5 Caracterización fisicoquímica de las mallas

### 6.4.5.1 Imágenes de SEM

Las imágenes SEM muestran que al exponer las impresiones 3D en búfer fosfato 10mM pH= 7,4 durante 24 h, la estructura se relaja y los espacios de malla se expanden. Para medir esto se determinó el área de los espacios dejados por la malla o rejilla, utilizando el software ImageJ (**Tabla 6.5**) Las mallas antes de la liberación del fármaco no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los valores obtenidos, y por lo tanto, se presentan como un solo grupo. Sin embargo, las mallas con y sin Lip presentaron diferencias respecto del tratamiento (antes y después) y entre ellas ( $p < 0.05$ ). Este relajamiento en la estructura polimérica también se puede observar en la microestructura (**Figura 6.7**), a mayores aumentos (x1,000), particularmente en Malla-Viol-Lip donde la matriz polimérica presenta orificios en su superficie. Este hecho también ha sido evidenciado en la estimación de rugosidad con el histograma de grises (**Tabla 6.5**) en donde se analizaron áreas equivalentes de los aumentos x1,000. Malla-viol y Malla-viol-lip antes de la liberación de la droga poseen superficies más suaves (DesvEst=35.45) que Malla-viol o Malla-viol-Lip después de la liberación (DesvEst =40.13 y 48.25, respectivamente).



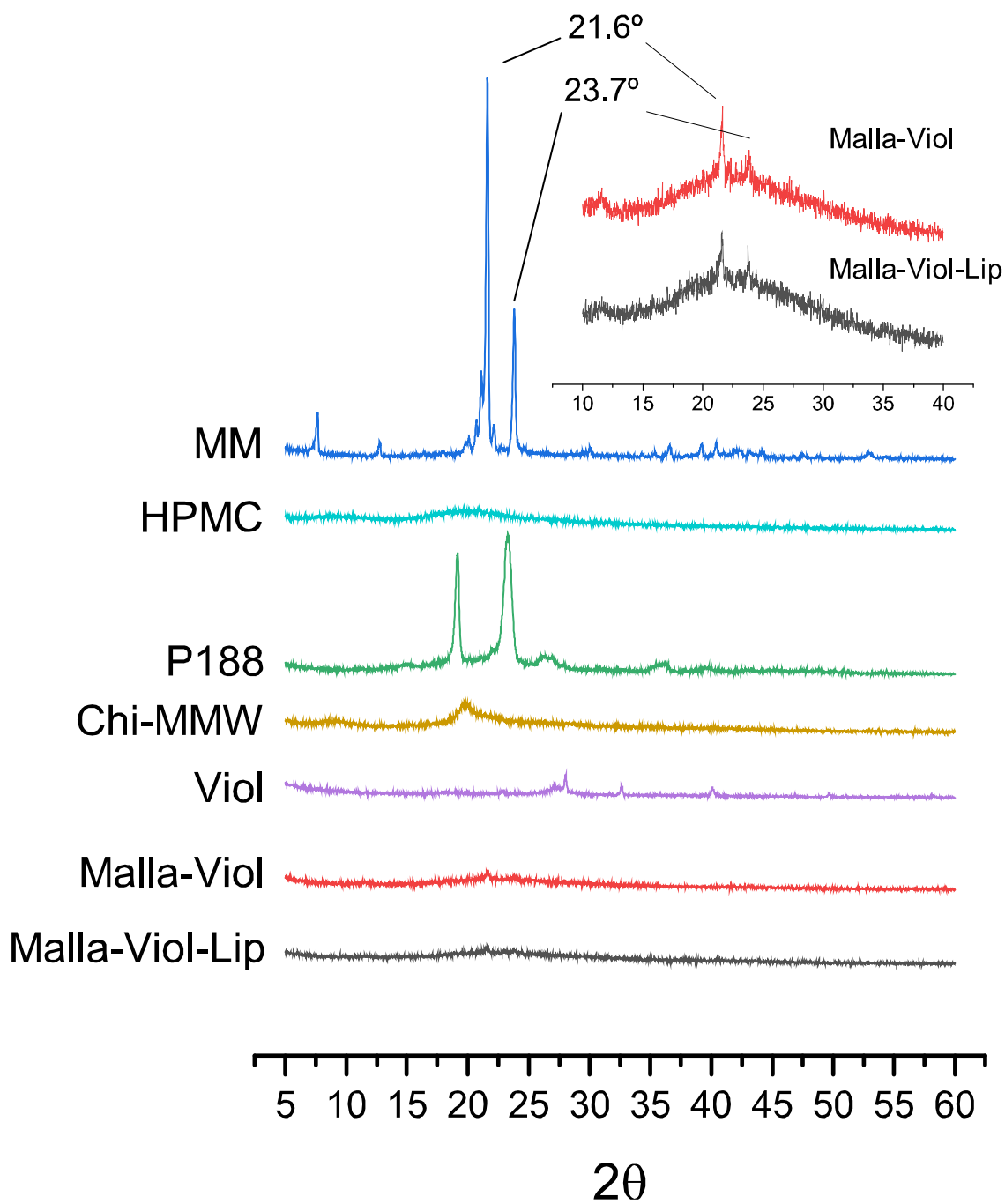
**Figura 6.7:** Imágenes de SEM antes y después de liberación en pH7.

Muestras	Área del espacio de la malla promedio ( $\mu\text{m}^2$ )	Raíz cuadrada del área del espacio de la malla (lado) ( $\mu\text{m}$ )	Desviación estándar del histograma de grises
Mallas antes de la liberación	283,03 (n= 12)	532.0	35.45
Malla-Viol luego de la liberación	424,59 (n= 10)	651.6	40.13
Malla-Viol-Lip luego de la liberación	660,55 (n= 8)	812.7	48.25

**Tabla 6.5: Datos obtenidos a partir de las imágenes de SEM y el software ImageJ(R).**

#### 6.4.5.2 Difractogramas

La **Figura 6.8** muestra los difractogramas XRD para ambas mallas 3D después de 24 h de incubación en buffer de liberación a pH=7,4, así como de sus componentes puros. P188 mostró un alto grado de cristalinidad en estado puro, con dos máximos intensos y característicos a  $19,1^\circ$  y  $23,3^\circ$  y un pico más amplio y tenue entre  $25,5^\circ$  y  $27,0^\circ$ ; tal como se describe en la bibliografía [99]. Chi-MMW mostró un pico pequeño a  $19,7^\circ$  y un pico ancho tenue a  $9^\circ$ , mientras que HPMC mostró un pico ancho entre  $15^\circ$  y  $25^\circ$ . Sin embargo, ninguno de estos picos aparece en las mezclas, sugiriendo un estado amorfo para los polimeros. Malla-viol y Malla-viol-lip muestran un pequeño pico compuesto a  $21,6^\circ$  y  $23,7^\circ$  (**Figura 6.8 recuadro**), estos máximos también aparecen y son característicos del difractograma de MM, aunque en mucha mayor intensidad, lo que indica que una porción de MM permanece cristalina después de la preparación de NLC.

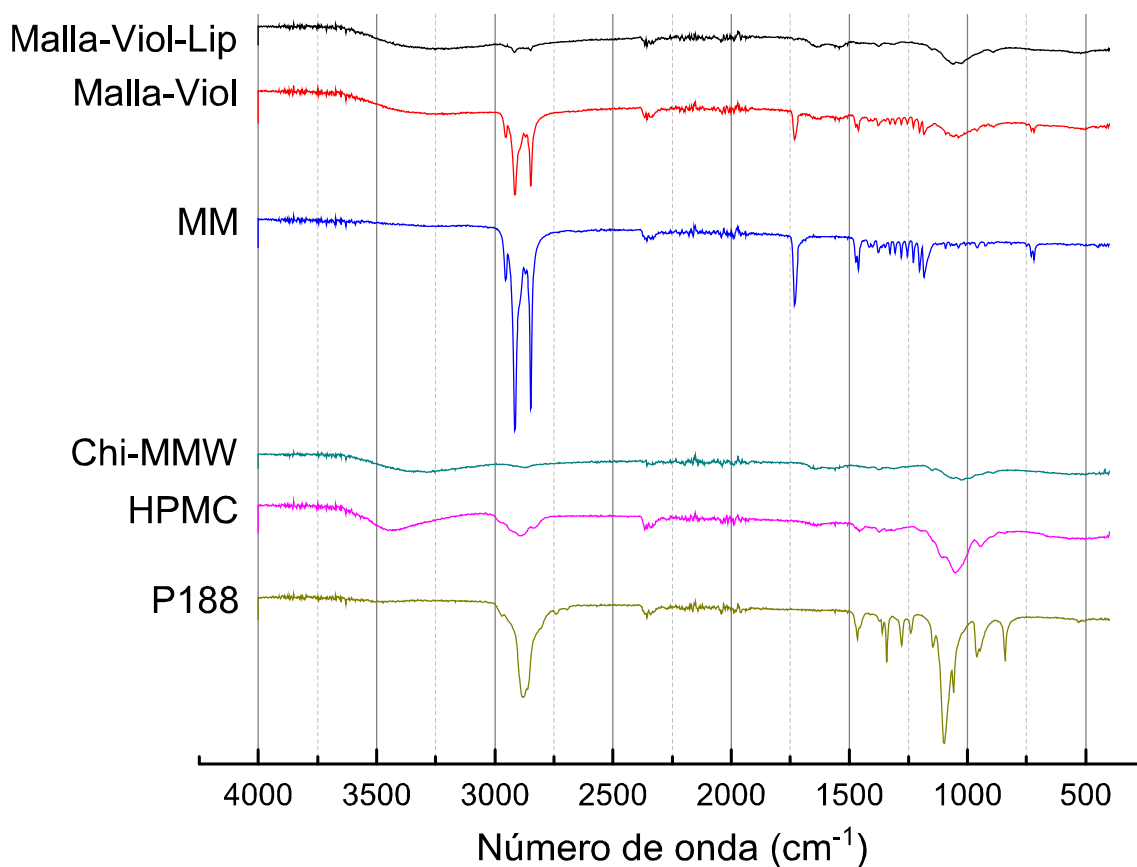


**Figura 6.8.** Difractogramas para Malla-Viol-Lip, Malla-Viol, MM (miristato de miristilo), Chi-MMW (quitosano de peso molecular medio), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y P188 (Poloxámero P188). Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se incubaron para la liberación de Viol en buffer fosfato (pH= 7,4) durante 24 h antes de realizar el análisis. El recuadro es un detalle para Malla-Viol-Lip y Malla-Viol entre 10° y 40°.

### 6.4.5.3 Espectros FTIR

La **Figura 6.9** muestra los espectros FTIR para ambas mallas 3D después de 24 h de incubación en buffer de liberación pH= 7,4, así como sus componentes principales. P188 mostró un máximo intenso a  $2877,32\text{ cm}^{-1}$  atribuido al estiramiento C-H, un pico más pequeño a  $1342,23\text{ cm}^{-1}$  atribuido a la flexión de OH en el plano y un pico agudo a  $1099,24\text{ cm}^{-1}$  y un pico más pequeño a  $960,39\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas del C-O del éter [100]. El espectro de HPMC muestra un pico amplio entre  $3100$  y  $3600\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a vibraciones de estiramiento O-H, y  $2894,67\text{ cm}^{-1}$  y  $1049,10\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a estiramiento C-H y C-O respectivamente [101]. Chi-MMW también presentó una amplia banda de vibración de estiramiento O-H entre  $3100\text{ cm}^{-1}$  y  $3600\text{ cm}^{-1}$ , pero se superpuso parcialmente a una banda ancha debido a enlaces N-H asimétricos/simétricos. La banda de  $2871,53\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó al estiramiento axial C-H, mientras que la banda de  $1641\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó al estiramiento  $\text{-C=O}$  en los grupos acetamida y la de  $1556\text{ cm}^{-1}$  a las amidas transecundarias. [102,103], adicionalmente, la banda de  $1019\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó al estiramiento de amina primaria C-N [103]. MM mostró tres picos agudos a  $2848,39\text{ cm}^{-1}$ ,  $2915,88\text{ cm}^{-1}$  y  $2954,45\text{ cm}^{-1}$ , atribuidos al estiramiento simétrico y asimétrico de los enlaces C-H en los grupos  $\text{-CH}_2$  y al estiramiento asimétrico de los enlaces C-H en los grupos  $\text{-CH}_3$ , respectivamente. Otro pico agudo relevante se encontró a  $1731,8\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las vibraciones de estiramiento del éster carbonilo [104]. Finalmente, ambas mallas 3D mostraron un pico ancho complejo entre  $1150\text{ cm}^{-1}$  y  $900\text{ cm}^{-1}$ , forma superposición de picos de P188, HPMC y Chi-MMW en esa banda del espectro, y una banda ancha entre  $3000\text{ cm}^{-1}$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$  de Vibraciones OH y NH en HPMC y Chi-MMW. Sin embargo, la malla 3D que contenía Lip (Malla-Viol-Lip), mostró picos más débiles

2848.39 $\text{cm}^{-1}$  y 2915.88 $\text{cm}^{-1}$ , bandas presentadas por MM, además Malla-viol-Lip no mostró el pico característico en 1731.8 $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo éster  $-\text{C}=\text{O}$ , mientras que apareció en la malla 3D sin lipasa (Malla-viol). Todo esto considerado, apunta a una pérdida en el contenido de MM en Malla-Viol-Lip debido a la actividad de la lipasa en la malla 3D.



**Figura 6.9:** Espectros FTIR para Malla-Viol-Lip, Malla-Viol, MM (miristato de miristilo), Chi-MMW (qitosano de peso molecular medio), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y P188 (Poloxámero P188). Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se incubaron en buffer de liberación ( $\text{pH}=7,4$ ) durante 24 h antes de realizar el análisis.

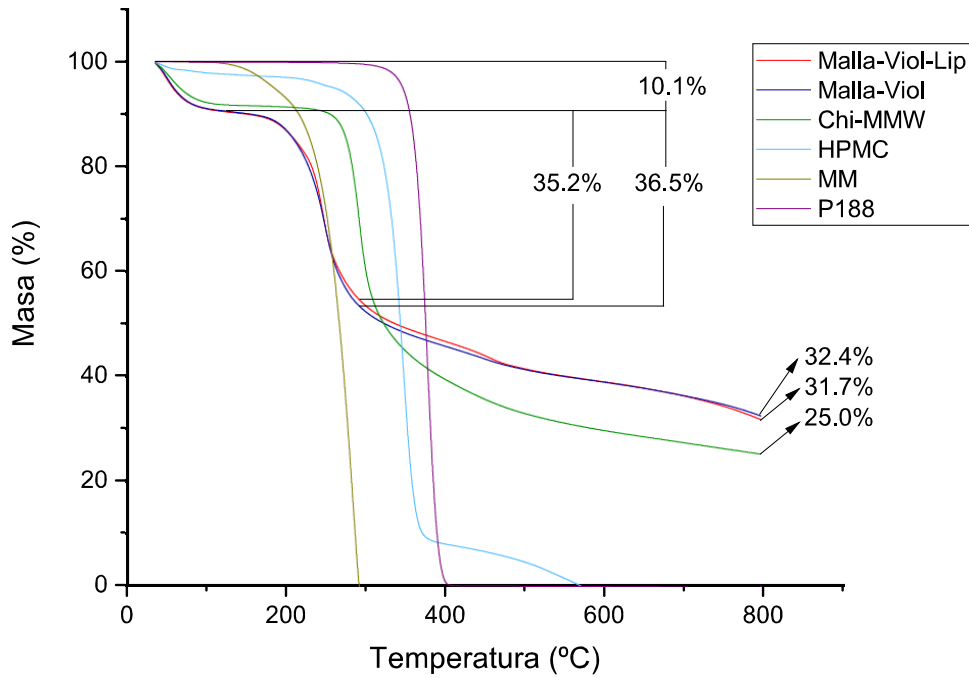


#### 6.4.5.4 *Análisis termogravimétrico*

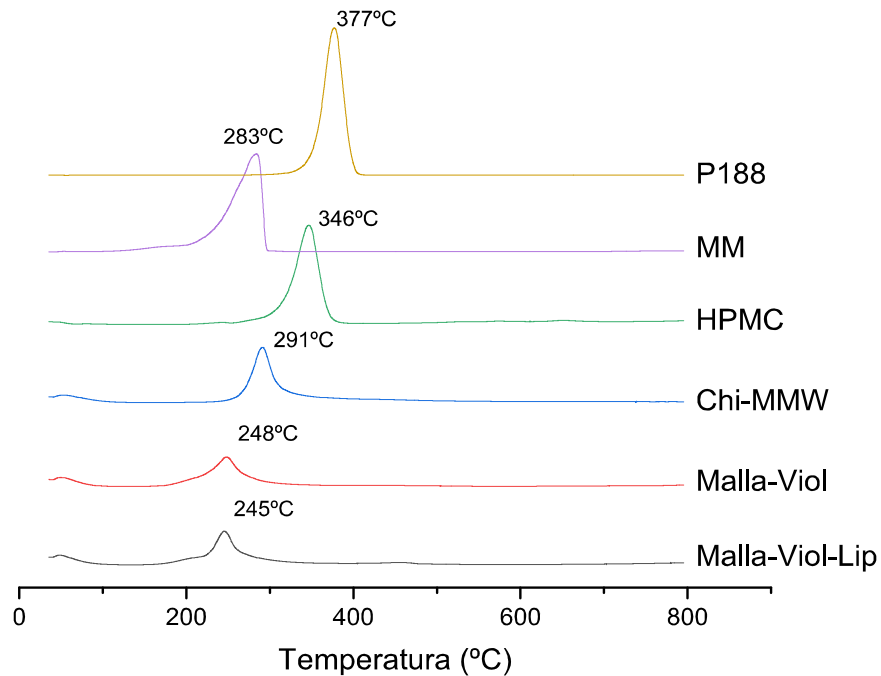
Se estudió la estabilidad térmica de las mallas 3D tras su liberación. La muestra **Figura 6.10** el porcentaje de pérdida de masa frente a la temperatura. Ambas mallas 3D pierden el 10% de su peso entre 0°C y 125°C, lo que se debe al agua remanente en las muestras; de manera similar, Chi y HPMC pierden un 9% y un 3% de su peso, respectivamente.

La pérdida de peso máxima de HMPC fue observada a 346°C, mientras que antes de 400°C perdió más del 90% de su masa. Este proceso normalmente se atribuye a la descomposición de los ésteres de celulosa y la volatilización de los residuos resultantes [105]. Por otro lado, la pérdida de peso de Chi-MMW más allá de los 250°C se debe a la continuación de la degradación, deacetilación y despolimerización [106]. El máximo de pérdida de peso de MM se encontró a 283°C y se atribuye normalmente a la volatilización de la sustancia y no a su degradación [107].

Entre 125°C y 290°C Malla-Viol y Malla-Viol-Lip perdieron un 36,5% y un 35,2% de su masa respectivamente, este paso coincide con la pérdida aguda de masa de MM. Además, tras finalizar el ensayo, Malla-Viol tiene un remanente del 32,4% de su peso, Malla-Viol-Lip un 31,7% y Chi-MMW un 25,0%. Dado que cualquier otro de los constituyentes permanece a esta temperatura, las mallas presentan una mayor estabilidad térmica respecto de los materiales puros. Este hecho puede reflejar interacciones entre los componentes de las mallas. Se proporciona una figura complementaria que muestra la derivada del porcentaje (%) en peso frente a la temperatura (**Figura 6.11**)



**Figura 6.10:** Análisis termogravimétrico para Malla-Viol-Lip, Malla-Viol, MM (miristato de miristilo), Chi-MMW (qitosano de peso molecular medio), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y P188 (Poloxámero P188). Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se incubaron en buffer fosfato (pH= 7,4) durante 24 h antes de realizar el análisis.



**Figura 6.11:** Derivada del porcentaje en peso respecto de la temperatura para Malla-Viol-Lip, Malla-Viol, MM (miristato de miristilo), Chi-MMW (qitosano de peso molecular medio), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y P188 (Poloxámero P188). Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se incubaron en buffer fosfato (pH= 7,4) durante 24 h antes de realizar el análisis.

#### 6.4.5.5 *Análisis calorimetría diferencial de barrido*

La **Figura 6.12** muestra el flujo de calor de las muestras de malla 3D y sus componentes principales frente a la temperatura, donde "superior" en el eje Y es un proceso exotérmico y "inferior" indica un proceso endotérmico.

MM muestra un pico intenso y agudo a 41.7°C, correspondiente a su temperatura de fusión ( $T_m$ ), con un área bajo el pico, es decir, una entalpía de fusión ( $\Delta H_m$ ) de -205 J/g, ambos resultados son consistentes con la bibliografía [108]. El pequeño "hombro" en el pico puede atribuirse a una transición de pleiomorfismo. De manera similar, la  $T_m$  para P188 es de 53,4°C [99] y un  $\Delta H_m = -145$  J/g. El amplio pico endotérmico entre 50°C y 100°C en HPMC y Chi-MMW se puede atribuir a la pérdida de agua laxa de la muestra [109].

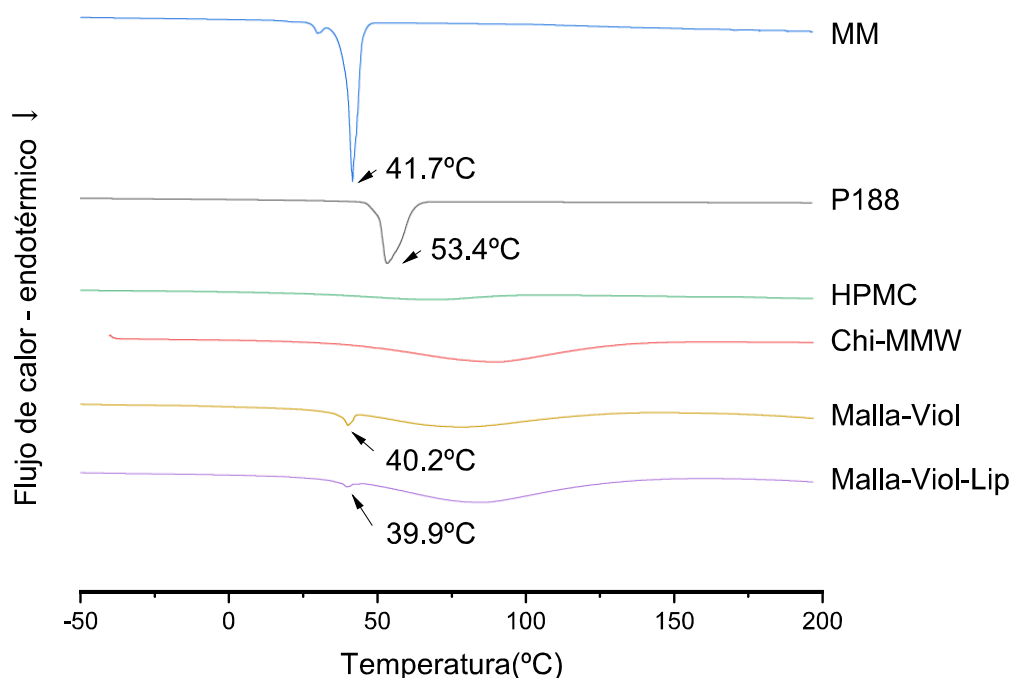
El análisis DSC para las mezclas Malla-Viol y Malla-Viol-Lip mostró un pico agudo y pequeño cerca de la  $T_m$  de MM, a 40,2°C y 39,9°C, respectivamente. Esta depresión de  $T_m$  puede explicarse mediante la ecuación de Gibbs-Thomson[110]:

$$\ln \frac{T_m}{T_0} = - \frac{2\gamma V_s}{r \Delta H} \dots\dots\dots \text{Ecuación 6.3}$$

donde  $T_m$  representa el punto de fusión de la nanopartícula lipídica,  $T_0$  el punto de fusión del lípido "bulk",  $\gamma$  la energía interfacial,  $\Delta H$  la entalpía de fusión,  $V_s$  el volumen molar y  $r$  el radio de la nanopartícula. Según esta ecuación, a medida que disminuye el radio de la nanopartícula, también disminuye su punto de fusión.

Además, se observa un pico más grande y ancho antes de los 100°C. El pico pequeño (cerca de  $T_m$  del lípido) de Malla-Viol-Lip fue más pequeño, mientras que el pico grande

y ancho (correspondiente a la deshidratación) fue más grande, lo que puede indicar un cambio en el contenido de agua y lípidos de las mallas ·d después de la liberación del fármaco.



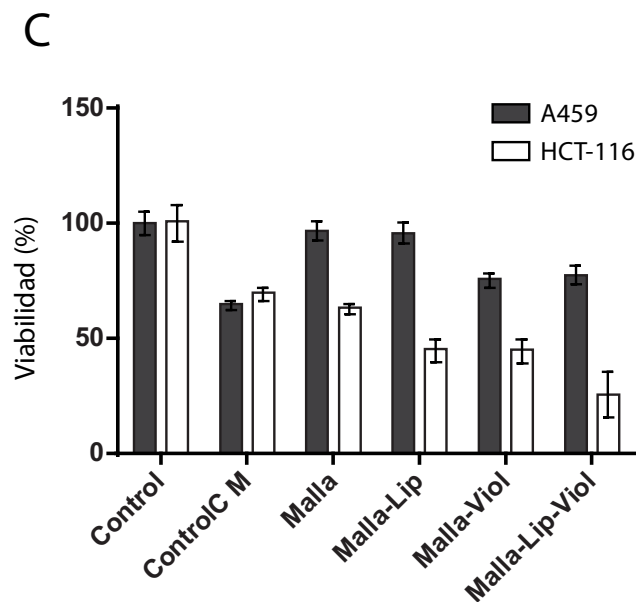
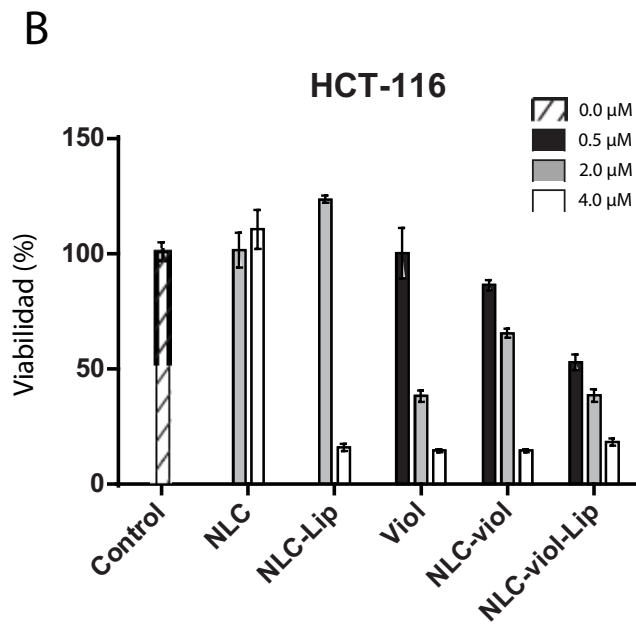
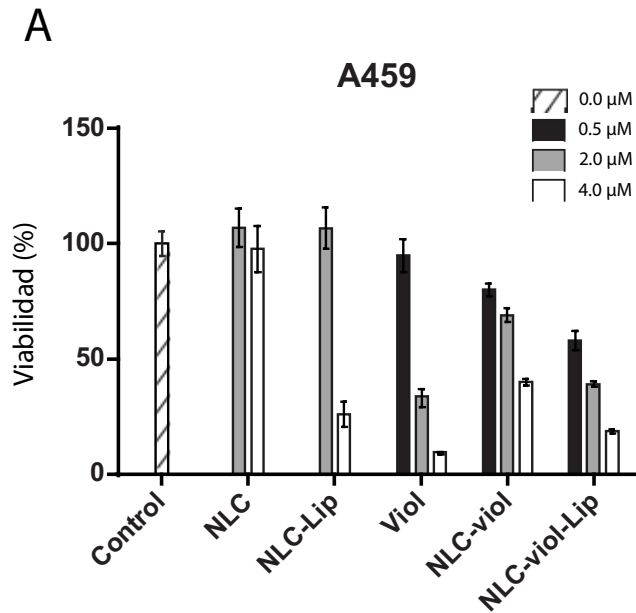
**Figura 6.12:** Termogramas DSC para Malla-Viol-Lip, Malla-Viol, MM (miristato de miristilo), Chi-MMW (quitosano de peso molecular medio), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y P188 (Poloxámero P188). Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se incubaron en buffer fosfato (pH=7,4) durante 24 horas antes de realizar el análisis. El eje Y representa el flujo de calor (exotérmico está arriba).

#### 6.4.6 Ensayos de citotoxicidad

La **Figura 6.13 A y B** muestran la citotoxicidad para diferentes formulaciones de NLC y Viol libre. A 0,5  $\mu\text{M}$  (en negro), NLC-viol mostró un mayor efecto citotóxico que Viol libre. Por el contrario, el efecto citotóxico fue mayor en Viol libre a 2,0  $\mu\text{M}$  (en gris). Esto se observó para ambas líneas celulares ensayadas. Este fenómeno ya fue descrito en los capítulos anteriores donde Viol fue nano-vehiculizado (partes 4.4.4 y 5.4.6) [73,84].

Además, para ambas líneas celulares analizadas, NLC-Viol-Lip mostró más citotoxicidad a 2,0  $\mu\text{M}$  (en gris) que NLC-viol ( $p < 0,05$ ), aunque a esta concentración la lipasa y el NLC vacío no muestran ningún efecto. Este efecto sinérgico podría explicarse por el aumento de fármaco libre debido a la degradación de las nanopartículas, sin embargo, otros efectos podrían contribuir a este resultado. Recientemente, Viol fue descrita como un disruptor de membrana en un intento de explicar sus diversos efectos biológicos [29], si este fuera el caso, la actividad de la lipasa y la actividad de la violaceína podrían estar coincidiendo en el sitio de acción. Además, se encontró que la actividad de la lipasa está suprimida o ausente en algunos tumores de mama, colorrectales y pulmonares; y la restitución de esta actividad lipasa puede tener un correlato de efecto supresor de este tipo de tumores [111].

La **Figura 6.13 C** muestra el ensayo de citotoxicidad para las líneas celulares A549 y HCT116 cuando se incubaron en un medio que estuvo en contacto con mallas impresas en 3D. El control-CM representa un medio sin tratamiento, es decir, sin malla impresa en 3D, el cual fue incubado el mismo intervalo de tiempo que los medios tratados. Este procedimiento se realizó para tomar en cuenta el “envejecimiento” del medio, HCT116 presentó una reducción de la viabilidad celular ( $p < 0,005$ ) en este medio envejecido. La matriz polimérica sola sin Viol ni lipasa (Malla) no redujo aún más la viabilidad en comparación con el Control-CM ( $p > 0,5$ ). Sin embargo, tanto el efecto de la lipasa (Malla-Lip) como el de la violaceína (Malla-viol) fueron significativos ( $p < 0,005$ ). Adicionalmente, el mayor efecto citotóxico sobre la línea celular HCT116 se encontró con Malla-Lip-Viol, siendo mayor que Malla-Lip o Malla-Viol ( $p < 0.05$  en ambos casos).



**Figura 6.13 Viabilidad celular para formulaciones de NLC y Viol libre para la línea celular A549 (A) y la línea celular HCT-116 (B). Viabilidad celular en medios condicionados con las mallas 3D (C).**

## 6.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES PARCIALES

En el presente capítulo se desarrolló una plataforma novedosa para el suministro de fármacos hidrofóbicos para el tratamiento de tumores sólidos utilizando una violaceína, como molécula no polar típica. Las principales ventajas de la plataforma son la versatilidad del sistema basado en: a) desarrollar la composición de un transportador lipídico nanoestructurado adecuado a las propiedades fisicoquímicas del fármaco; b) la incorporación de lipasa en el fármaco NLC que puede controlar la cinética de la liberación del fármaco y la cantidad del fármaco; c) la inclusión de la NLC-fármaco-enzima en una matriz 3D biodegradable que se puede adaptar en función de las características del tumor; d) la matriz 3D que contiene el medicamento podría colocarse en el sitio del tumor evitando la dispersión del medicamento en el cuerpo y/o la inactivación y/o los efectos secundarios indeseables; e) la matriz 3D que contiene quitosano, un polímero mucoadhesivo y adhesivo celular puede estimular el contacto con las células tumorales; f) la presencia de lipasa y quitosano en la formulación podría producir un efecto aditivo facilitando la entrada del fármaco al interior de las células ya que ambos componentes podrían actuar sobre las membranas celulares acabando de hidrolizar los lípidos de membrana, alterando la homeostasis celular e interfiriendo en los mecanismos de transporte celular.

## 7 CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

---

En el presente trabajo de tesis doctoral se han logrado desarrollar tres sistemas de vehiculización para la violaceína, una prometedora molécula con actividad antitumoral y además un buen modelo de estudio para drogas poco solubles en agua.

El primer sistema se diseñó con vistas de una potencial administración oral, basado en biopolímeros y con responsividad al pH, para la liberación del antitumoral principalmente en el colon. El sistema probó retrasar la liberación de violaceína en pH estomacales o del intestino delgado mientras que su liberación se acelera en pH neutro o levemente superiores. Además, demostró su actividad antitumoral sobre células de adenocarcinoma que se utilizaron como modelo (HCT116).

Para el segundo sistema se extrajeron algunas conclusiones de la relación estructura-toxicidad de los *SA/Ls*. Uno de ellos se utilizó para producir vehiculización basada en lipídicos. Este sistema no solo demostró actividad sobre líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal (HCT116), cáncer de pulmón (A549) y cáncer de útero (HeLA) sino que además gracias a la adición de folato se comprobó que su captación era dependiente de la expresión de receptor de folato FOLR1 reportada.

El tercer sistema de alguna manera utiliza algunas de las experiencias aprendidas en los dos anteriores. Por un lado, la violaceína se encapsuló en sistemas lipídicos usados en el segundo sistema, pero además el expertise ganado en biopolímeros en el primer sistema se utilizó para crear una matriz compleja fácil de imprimir en 3D por el método de extrusión. El sistema demostró su actividad *in vitro* en las líneas utilizadas en los ensayos anteriores. Además, a este sistema se le adicionó una actividad enzimática que



modifica el patrón de liberación de la droga pero que también tiene potencial actividad terapéutica.

Es necesario aclarar, que estos sistemas, aunque novedosos, para poder alcanzar etapas clínicas de evaluación requieren de ensayos que escapan a los límites de la presente tesis y algunos de cuyos resultados fueron obtenidos a lo largo de la pandemia SARS-CoV-2. Por otro lado, la farmacodinamia de la Viol no está completamente dilucidada, pero en este sentido, la investigación es activa y frecuentemente nuevos resultados aparecen y nos ayudan a completar el cuadro de su funcionamiento biológico, tanto en su rol terapéutico como su rol industrial y ecológico.

Finalmente cabe destacar que a lo largo del desarrollo de esta tesis se han concretado artículos de revistas con referato internacional, artículos de revisión y capítulos de libro relacionados, lo cuales se detallan a continuación:

1. Bayón, B., **Rivero Berti, I.**, Gagnetten, A. M., & Castro, G. R. (2018). Biopolymers from wastes to high-value products in biomedicine. In *Waste to wealth* (pp. 1-44). Springer, Singapore.
2. **Rivero Berti, I.**, Rodenak-Kladniew, B., Perez, A. A., Santiago, L., Duran, N., & Castro, G. R. (2019). Development of biocarrier for violacein controlled release in the treatment of cancer. *Reactive and Functional Polymers*, *136*, 122-130.
3. **Rivero Berti, I.**, Rodenak-Kladniew, B., Onaindia, C., Adam, C. G., Islan, G. A., Durán, N., & Castro, G. R. (2020). Assessment of in vitro cytotoxicity of imidazole ionic liquids and inclusion in targeted drug carriers containing violacein. *RSC Advances*, *10*(49), 29336-29346.
4. Muraca, G., **Rivero Berti, I.**, Sbaraglini, M. L., Fávoro, W. J., Durán, N., Castro, G. R., & Talevi, A. (2020). Trypanosomatid-caused conditions: State of the art of therapeutics and potential applications of lipid-based nanocarriers. *Frontiers in Chemistry*, *8*, 1077.
5. Horue, M., **Rivero Berti, I.**, Cacicedo, M. L., & Castro, G. R. (2021). Microbial production and recovery of hybrid biopolymers from wastes for industrial applications-a review. *Bioresource Technology*, *340*, 125671.
6. **Rivero Berti, I.**, Islan, G. A., & Castro, G. R. (2021). Enzymes and biopolymers. The opportunity for the smart design of molecular delivery systems. *Bioresource Technology*, *322*, 124546.

7. **Rivero Berti, I.,** & Castro, G. R. (2022). Bio-Based/Biodegradable Containers for Encapsulation. In *Micro-and Nano-containers for Smart Applications* (p. 79-103). Springer, Singapore.
8. **Rivero Berti, I.,** & Castro, G. R. (2022). Nanobiocatalyst for drug delivery. In *Nanomaterials for Biocatalysis* (pp. 437-462). Elsevier, Países Bajos.
9. **Rivero Berti, I.,** Singh, T., Boztepe, T., Leon, I. E., Nadda, A. K., & Castro, G. R. (2022). Design of Nanostructured Lipid Carriers and Hybrid Lipid Nanoparticles. In *Concepts and Design of Materials Nanoarchitectonics* (p. 381-416). Royal Society of Chemistry, Londres, U.K.
10. **Rivero Berti I.,** Rodenak-Kladniew B.E., Katz S.F., Arrua E.C., Alvarez V.A., Duran N., Castro G.R. (2022). Enzymatic active release of violacein present in nanostructured lipid carrier by lipase encapsulated in 3D-bioprinted chitosan-hydroxypropyl methylcellulose matrix with anticancer activity. *Frontiers in Chemistry*. Page 756. En prensa (Manuscript ID: 914126. ISSN: 2296-2646).

## 8 ABREVIATURAS

---

A549	línea de células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas.
Chi-MMW	quitosano de peso molecular medio
DesvEst	desviación estándar
D <sub>H</sub>	diámetro hidrodinámico promedio
DiOC <sub>18</sub>	perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina, sonda fluorescente
DLS	dispersión dinámica de la luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	calorimetría diferencial de barrido
EE%	eficiencia de encapsulación porcentual
FA	ácido fólico
FOLR1	receptor de folato
FTIR	análisis de espectro infrarrojo transformado de Fourier
HCT116	línea celular de cáncer colorrectal humano
HeLa	línea celular de cáncer de cuello uterino (cérvix) humano
HPMC	(hidroxipropil) metilcelulosa
IL	líquidos iónicos
ISFsp	Líquido Intestinal Simulado sin pancreatina
Lip	Lipasa de <i>Mucor mehei</i>
MM	miristato de miristilo (cera solida a temperatura ambiente)
NLC	vehículos lipídicos nanoestructurados (nanostructured lipid carriers)
P188	poloxamero P188, también Kolliphor® P188, o Pluronic® F68
PDI	índice de polidispersión
pNPP	<i>p</i> -nitrofenilpalmitato
PS20	monolaurato de polioxietileno(20)sorbitano, Tween® 20
PXGY	Perlas compuestas con x% de pectina e y% de gelatina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAILS	líquidos iónicos tensioactivos (surface active ionic liquids)
SEM	microscopía electrónica de barrido
SGFsp	fluido gástrico simulado sin pepsina USP
SLN	Nanopartículas solidas lipídicas (solid lipid nanoparticles)
TEM	microscopía electrónica de transmisión
TGA	análisis termogravimétrico
T <sub>m</sub>	temperatura de fusión
TPP	Tripolifosfato
Viol	Violaceína
Viol-PS20	emulsión formada por Violaceína y PS20
XPS	análisis de emisión de fotoelectrones de rayos X
XRD	difracción de rayos X
Zpot o ζ	potencial Z
ΔH <sub>m</sub>	variación de entalpía de fusión

## 9 BIBLIOGRAFÍA

---

*“Todo se entrelaza: ciencia e industria, saber y aplicación. Los descubrimientos y las realizaciones prácticas que conducen a nuevas invenciones, el trabajo intelectual y el trabajo manual, la idea y los brazos. Cada descubrimiento, cada progreso, cada aumento de la riqueza de la humanidad, tiene su origen en la conjunción del trabajo manual e intelectual del pasado y del presente.*

*Entonces, ¿con qué derecho alguien se apropia de la menor parcela de ese inmenso todo y dice: “Esto es sólo mío y no de todos”?* “

*Piotr Alekséyevich Kropotkin – La conquista del pan*

1. Mukherjee, S. *El emperador de todos los males: Una biografía del cáncer*; DEBATE; Penguin Random House Grupo Editorial España, 2014; ISBN 9788499924588.
2. Ferlay, J.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A Soerjomataram, I.; Bray, F. Global Cancer Observatory: Cancer Today Available online: <https://gco.iarc.fr/today> (accessed on Nov 14, 2021).
3. Ministerio de Salud de la Nación; Instituto Nacional del Cáncer Estadísticas - Mortalidad | Argentina.gob.ar Available online: <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad> (accessed on Nov 14, 2021).
4. WHO Cancer Available online: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed on May 2, 2022).
5. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, *100*, 57–70.
6. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011, *144*, 646–674.
7. Wellstein, A. Principios generales en la farmacología contra el cáncer. In *Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica*, 13e; Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C., Eds.; McGraw-Hill Education: New York, NY, 2019.
8. Justo, G.Z.; Durán, N. Action and function of Chromobacterium violaceum in health and disease: Violacein as a promising metabolite to counteract gastroenterological diseases.

*Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2017, 31, 649–656.

9. Durán, N.; Nakazato, G.; Durán, M.; Rivero Berti, I.; Castro, G.R.; Stanistic, D.; Brocchi, M.; Fávoro, W.J.; Ferreira-Halder, C. V.; Justo, G.Z.; y colab. Multi-target drug with potential applications: violacein in the spotlight. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2021, 37, 1–20.
10. Durán, N.; Menck, C.F.M. Chromobacterium violaceum : A Review of Pharmacological and Industiral Perspectives. *Crit. Rev. Microbiol.* **2001**, 27, 201–222, doi:10.1080/20014091096747.
11. Durán, N.; Nakazato, G.; Durán, M.; Rivero Berti, I.; Castro, G.R.; Stanistic, D.; Brocchi, M.; Fávoro, W.J.; Ferreira-Halder, C. V.; Justo, G.Z.; y colab. Multi-target drug with potential applications: violacein in the spotlight. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2021, 37, 1–20.
12. Durán, N.; Justo, G.Z.; Durán, M.; Brocchi, M.; Cordi, L.; Tasic, L.; Castro, G.R.; Nakazato, G. Advances in Chromobacterium violaceum and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnol. Adv.* 2016, 34, 1030–1045.
13. Alem, D.; Marizcurrena, J.J.; Saravia, V.; Davyt, D.; Martinez-Lopez, W.; Castro-Sowinski, S. Production and antiproliferative effect of violacein, a purple pigment produced by an Antarctic bacterial isolate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, 36, 1–11, doi:10.1007/s11274-020-02893-4.
14. Leal, A.M.D.S.; De Queiroz, J.D.F.; De Medeiros, S.R.B.; Lima, T.K.D.S.; Agnez-Lima, L.F. Violacein induces cell death by triggering mitochondrial membrane hyperpolarization in vitro Signaling and cellular microbiology. *BMC Microbiol.* **2015**, 15, 1–8, doi:10.1186/s12866-015-0452-2.
15. Bromberg, N.; Dreyfuss, J.L.; Regatieri, C. V.; Palladino, M. V.; Durán, N.; Nader, H.B.; Haun, M.; Justo, G.Z. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, 186, 43–52, doi:10.1016/j.cbi.2010.04.016.
16. Melo, P.S.; Justo, G.Z.; De Azevedo, M.B.M.; Durán, N.; Haun, M. Violacein and its  $\beta$ -cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. *Toxicology* **2003**, 186, 217–225, doi:10.1016/S0300-483X(02)00751-5.
17. Queiroz, K.C.S.; Milani, R.; Ruela-de-Sousa, R.R.; Fuhler, G.M.; Justo, G.Z.; Zambuzzi, W.F.; Duran, N.; Diks, S.H.; Spek, C.A.; Ferreira, C. V.; y colab. Violacein Induces Death of Resistant Leukaemia Cells via Kinome Reprogramming, Endoplasmic Reticulum Stress and Golgi Apparatus Collapse. *PLoS One* **2012**, 7, e45362, doi:10.1371/journal.pone.0045362.
18. Lu, L.; Jing, L.; Ying, W.; XiaoYang, P.; Man, X.; ShuWen, Z.; LüJiaPing Antitumor effect of violacein against HT29 by comparative proteomics. *Sci. Agric. Sin.* **2017**, 50, 1694–1704.
19. Linger, R.M.A.; Cohen, R.A.; Cummings, C.T.; Sather, S.; Migdall-Wilson, J.; Middleton, D.H.G.; Lu, X.; Barón, A.E.; Franklin, W.A.; Merrick, D.T.; y colab. Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer. *Oncogene* **2013**, 32, 3420–3431, doi:10.1038/onc.2012.355.
20. Verma, A.; Warner, S.L.; Vankayalapati, H.; Bearss, D.J.; Sharma, S. Targeting Axl and Mer kinases in cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2011, 10, 1763–1773.
21. Gonçalves, P.R.; Rocha-Brito, K.J.P.; Fernandes, M.R.N.; Abrantes, J.L.; Durán, N.; Ferreira-Halder, C. V. Violacein induces death of RAS-mutated metastatic melanoma by impairing autophagy process. *Tumor Biol.* **2016**, 37, 14049–14058, doi:10.1007/s13277-

016-5265-x.

22. Kodach, L.L.; Bos, C.L.; Durán, N.; Peppelenbosch, M.P.; Ferreira, C. V.; Hardwick, J.C.H. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 508–516, doi:10.1093/carcin/bgi307.
23. Mojib, N.; Nasti, T.H.; Andersen, D.T.; Attigada, V.R.; Hoover, R.B.; Yusuf, N.; Bej, A.K. The antiproliferative function of violacein-like purple violet pigment (PVP) from an Antarctic Janthinobacterium sp. Ant5-2 in UV-induced 2237 fibrosarcoma. *Int. J. Dermatol.* **2011**, *50*, 1223–1233, doi:10.1111/j.1365-4632.2010.04825.x.
24. Corazzari, M.; Fimia, G.M.; Lovat, P.; Piacentini, M. Why is autophagy important for melanoma? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Semin. Cancer Biol.* **2013**, *23*, 337–343.
25. Conlon, G.A.; Murray, G.I. Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J. Pathol.* **2019**, *247*, 629–640.
26. Platt, D.; Amara, S.; Mehta, T.; Vercuysee, K.; Myles, E.L.; Johnson, T.; Tiriveedhi, V. Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediated CXCR4 expression: Potential anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *455*, 107–112, doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.124.
27. Platt, D.; Amara, S.; Mehta, T.; Vercuysee, K.; Myles, E.L.; Johnson, T.; Tiriveedhi, V. Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediated CXCR4 expression: Potential anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *455*, 107–112, doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.124.
28. de Souza, K.D.; Perez, K.R.; Durán, N.; Justo, G.Z.; Caseli, L. Interaction of violacein in models for cellular membranes: Regulation of the interaction by the lipid composition at the air-water interface. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *160*, 247–253, doi:10.1016/j.colsurfb.2017.09.027.
29. Gupta, R.; Mitra, S.; Chowdhury, S.; Das, G.; Priyadarshini, R.; Mukhopadhyay, M.K.; Ghosh, S.K. Discerning perturbed assembly of lipids in a model membrane in presence of violacein. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2021**, *1863*, 183647, doi:10.1016/j.bbamem.2021.183647.
30. Masuelli, L.; Pantanella, F.; La Regina, G.; Benvenuto, M.; Fantini, M.; Mattera, R.; Di Stefano, E.; Mattei, M.; Silvestri, R.; Schippa, S.; y colab. Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by Janthinobacterium lividum, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 3705–3717, doi:10.1007/s13277-015-4207-3.
31. *Water-Insoluble Drug Formulation, Third Edition*; Liu, R. (Ron), Ed.; 3rd ed.; CRC Press, 2018;
32. Lombardino, J.G.; Lowe, J.A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 853–862.
33. Rivero Berti, I.; Castro, G.R. Bio-Based/Biodegradable Containers for Encapsulation. In *Micro- and nano-containers for Smart Applications*; Springer, Singapore, 2022; pp. 79–103.
34. Bayón, B.; Berti, I.R.; Gagneten, A.M.; Castro, G.R. Biopolymers from Wastes to High-Value Products in Biomedicine. In *Waste to Wealth*; Singhania, R.R., Agarwal, R.A.,

- Kumar, R.P., Sukumaran, R.K., Eds.; Springer Singapore: Singapore, 2018; pp. 1–44 ISBN 978-981-10-7431-8.
35. Prajapati, S.K.; Jain, A.; Jain, A.; Jain, S. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. *Eur. Polym. J.* 2019, *120*, 109191.
  36. Constantinides, P.P.; Tustian, A.; Kessler, D.R. Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1243–1255, doi:10.1016/j.addr.2003.12.005.
  37. Jaiswal, P.; Gidwani, B.; Vyas, A. Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2016, *44*, 27–40.
  38. Haider, M.; Abdin, S.M.; Kamal, L.; Orive, G. Nanostructured lipid carriers for delivery of chemotherapeutics: A review. *Pharmaceutics* 2020, *12*, 288.
  39. Kumari, A.; Singla, R.; Guliani, A.; Yadav, S.K. Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI J.* **2014**, *13*, 265.
  40. Izci, M.; Maksoudian, C.; Manshian, B.B.; Soenen, S.J. The Use of Alternative Strategies for Enhanced Nanoparticle Delivery to Solid Tumors. *Chem. Rev.* 2021, *121*, 1746–1803.
  41. Rivero Berti, I.; Singh, T.; Boztepe, T.; Leon, I.E.; Nadda, A.K.; Castro, G.R. Design of Nanostructured Lipid Carriers and Hybrid Lipid Nanoparticles. In *RSC Nanoscience and Nanotechnology*; Royal Society of Chemistry, 2022; Vol. 2022-Janua, pp. 381–416.
  42. Search of: lipid nanoparticles - List Results - ClinicalTrials.gov Available online: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=lipid+nanoparticles&cntry=&state=&city=&dist=> (accessed on Jun 23, 2022).
  43. Pratchett, T. *Snuff: (Discworld Novel 39): from the Bestselling Series That Inspired BBC's the Watch*; Discworld Novels; Transworld Publishers Limited, 2019; ISBN 9780857526496.
  44. Butt, A.S.; Nisar, N.; Mughal, T. A review: Therapeutics potentials of phytochemical drugs and their loading in pH specific degradable nano-drug carrier targeting colorectal cancer. *J. Pak. Med. Assoc.* 2018, *68*, 607–614.
  45. Zhang, W.; Xu, P.; Zhang, H. Pectin in cancer therapy: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2015, *44*, 258–271.
  46. Islan, G.A.; De Verti, I.P.; Marchetti, S.G.; Castro, G.R. Studies of ciprofloxacin encapsulation on alginate/pectin matrixes and its relationship with biodisponibility. In *Proceedings of the Applied Biochemistry and Biotechnology*; Springer, 2012; Vol. 167, pp. 1408–1420.
  47. Islan, G.A.; Dini, C.; Bartel, L.C.; Bolzán, A.D.; Castro, G.R. Characterization of smart auto-degradative hydrogel matrix containing alginate lyase to enhance levofloxacin delivery against bacterial biofilms. *Int. J. Pharm.* **2015**, *496*, 953–964, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.10.050.
  48. Elzoghby, A.O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. *J. Control. Release* 2013, *172*, 1075–1091.
  49. Eskandani, M.; Hamishehkar, H.; Dolatabadi, J.E.N. Cyto/genotoxicity study of polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (tween 20). *DNA Cell Biol.* **2013**, *32*, 498–503, doi:10.1089/dna.2013.2059.



50. Mendes, A.S.; de Carvalho, J.E.; Duarte, M.C.T.; Durán, N.; Bruns, R.E. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1963–1969, doi:10.1023/A:1013734315525.
51. Rettori, D.; Durán, N. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *14*, 685–688, doi:10.1023/A:1008809504504.
52. Ya-Wu Wang; Qiong Wu, and; Chen\*, G.-Q. Gelatin Blending Improves the Performance of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Films for Biomedical Application†. **2004**, doi:10.1021/BM049342D.
53. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
54. Islan, G.A.; Bosio, V.E.; Castro, G.R. Alginate lyase and ciprofloxacin co-immobilization on biopolymeric microspheres for cystic fibrosis treatment. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 1238–1248, doi:10.1002/mabi.201300134.
55. Han, W.; Meng, Y.; Hu, C.; Dong, G.; Qu, Y.; Deng, H.; Guo, Y. Mathematical model of Ca<sup>2+</sup> concentration, pH, pectin concentration and soluble solids (sucrose) on the gelation of low methoxyl pectin. *Food Hydrocoll.* **2017**, *66*, 37–48, doi:10.1016/j.foodhyd.2016.12.011.
56. Sriamornsak, P.; Kennedy, R.A. A novel gel formation method, microstructure and mechanical properties of calcium polysaccharide gel films. *Int. J. Pharm.* **2006**, *323*, 72–80, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.05.045.
57. Martins, D.; Costa, F.T.M.; Brocchi, M.; Durán, N. Evaluation of the antibacterial activity of poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. *J. Nanoparticle Res.* **2011**, *13*, 355–363, doi:10.1007/s11051-010-0037-9.
58. Kodach, L.L.; Bos, C.L.; Durán, N.; Peppelenbosch, M.P.; Ferreira, C. V.; Hardwick, J.C.H. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 508–516, doi:10.1093/carcin/bgi307.
59. *Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro. (ISO 10993-5:2009)*; 2009;
60. Kodach, L.L.; Bos, C.L.; Durán, N.; Peppelenbosch, M.P.; Ferreira, C. V.; Hardwick, J.C.H. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 508–516, doi:10.1093/CARCIN/BGI307.
61. Richard, S.; Martinez Marnignac, V. Sensitization to oxaliplatin in HCT116 and HT29 cell lines by metformin and ribavirin and differences in response to mitochondrial glutaminase inhibition. *J. Cancer Res. Ther.* **2015**, *11*, 336–340, doi:10.4103/0973-1482.157317.
62. Liu, L.S.; Fishman, M.L.; Hicks, K.B. Pectin in controlled drug delivery - A review. *Cellulose* **2007**, *14*, 15–24.
63. Fredlake, C.P.; Crosthwaite, J.M.; Hert, D.G.; Aki, S.N.V.K.; Brennecke, J.F. Thermophysical Properties of Imidazolium-Based Ionic Liquids. *J. Chem. Eng. Data* **2004**, *49*, 954–964, doi:10.1021/je034261a.

64. Rolin, C. Pectin. In *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives*; Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Eds.; Academic Press, Inc., 1993; pp. 257–294 ISBN 0-12-746253-8.
65. Adam, C.G.; Fortunato, G.G. Synthesis and Self-Assembly Properties of New Surface-Active 1-Alkylimidazolium Ionic Liquids in Aqueous Media. *J. Surfactants Deterg.* **2019**, *22*, 501–513, doi:10.1002/jsde.12260.
66. Adawiyah, N.; Moniruzzaman, M.; Hawatulaila, S.; Goto, M. Ionic liquids as a potential tool for drug delivery systems. *Medchemcomm* 2016, *7*, 1881–1897.
67. Shamshina, J.L.; Barber, P.S.; Rogers, R.D. Ionic liquids in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2013, *10*, 1367–1381.
68. Islan, G.A.; Cacicedo, M.L.; Rodenak-Kladniew, B.; Duran, N.; Castro, G.R. Development and Tailoring of Hybrid Lipid Nanocarriers. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *23*, 6643–6658, doi:10.2174/1381612823666171115110639.
69. Zwicke, G.L.; Ali Mansoori, G.; Jeffery, C.J. Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Rev.* **2012**, *3*, 18496, doi:10.3402/nano.v3i0.18496.
70. Yoo, H.S.; Park, T.G. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate. *J. Control. Release* **2004**, *100*, 247–256, doi:10.1016/j.jconrel.2004.08.017.
71. Kularatne, S.A.; Low, P.S. Targeting of nanoparticles: folate receptor. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *624*, 249–265, doi:10.1007/978-1-60761-609-2\_17.
72. Adam, C.G.; Bravo, M.V.; Mancini, P.M.E.; Fortunato, G.G. Solvatochromic dipolarity micro-sensor behaviour in binary solvent systems of the (water + ionic liquid) type: application of preferential solvation model and linear solvation energy relationships. *J. Phys. Org. Chem.* **2014**, *27*, 841–849, doi:10.1002/POC.3346.
73. Rivero Berti, I.; Rodenak-Kladniew, B.; Onaindia, C.; Adam, C.G.; Islan, G.A.; Durán, N.; Castro, G.R. Assessment of in vitro cytotoxicity of imidazole ionic liquids and inclusion in targeted drug carriers containing violacein. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 29336–29346, doi:10.1039/d0ra05101b.
74. Chen, H.L.; Kao, H.F.; Wang, J.Y.; Wei, G.T. Cytotoxicity of imidazole ionic liquids in human lung carcinoma A549 cell line. *J. Chinese Chem. Soc.* **2014**, *61*, 763–769, doi:10.1002/jccs.201300632.
75. Madria, N.; Arunkumar, T.A.; Nair, N.G.; Vadapalli, A.; Huang, Y.W.; Jones, S.C.; Reddy, V.P. Ionic liquid electrolytes for lithium batteries: Synthesis, electrochemical, and cytotoxicity studies. *J. Power Sources* **2013**, *234*, 277–284, doi:10.1016/j.jpowsour.2013.02.002.
76. Feng, W. quan; Lu, Y. heng; Chen, Y.; Lu, Y. wei; Yang, T. Thermal stability of imidazolium-based ionic liquids investigated by TG and FTIR techniques. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2016**, *125*, 143–154, doi:10.1007/s10973-016-5267-3.
77. Lin-Vien, D.; Colthup, N.B.; Fateley, W.G.; Grasselli, J.G. *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*; Elsevier Science, 1991; ISBN 9780080571164.
78. Ramasamy, R. Vibrational Spectroscopic Studies of Imidazole. *Armen. J. Phys.* **2015**, *8*, 51–55.
79. Zanchet, L.; da Trindade, L.G.; Lima, D.W.; Bariviera, W.; Trombetta, F.; de Souza, M.O.;

- Martini, E.M.A. Cation influence of new imidazolium-based ionic liquids on hydrogen production from water electrolysis. *Ionics (Kiel)*. **2019**, *25*, 1167–1176, doi:10.1007/s11581-018-2803-0.
80. Aruldass, C.A.; Masalamany, S.R.L.; Venil, C.K.; Ahmad, W.A. Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 5164–5180, doi:10.1007/s11356-017-8855-2.
  81. Narayanan, S.; Prasad, T.; Nair, I.C. A novel exploitable feature of *Chromobacterium violaceum*: experimental evidence for Phenol degradation. *Nov. Int. J. Biotechnol. Biosci.* **2012**, *1*, 1–11.
  82. Yamada, T.; Tominari, Y.; Tanaka, S.; Mizuno, M. Infrared Spectroscopy of Ionic Liquids Consisting of Imidazolium Cations with Different Alkyl Chain Lengths and Various Halogen or Molecular Anions with and without a Small Amount of Water. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 3121–3129, doi:10.1021/acs.jpcc.7b01429.
  83. Islan, G.A.; Tornello, P.C.; Abraham, G.A.; Duran, N.; Castro, G.R. Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *143*, 168–176, doi:10.1016/j.colsurfb.2016.03.040.
  84. Rivero Berti, I.; Rodenak-Kladniew, B.; Perez, A.A.; Santiago, L.; Duran, N.; Castro, G.R. Development of biocarrier for violacein controlled release in the treatment of cancer. *React. Funct. Polym.* **2019**, *136*, 122–130, doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2019.01.001.
  85. Lachmann, A.; Torre, D.; Keenan, A.B.; Jagodnik, K.M.; Lee, H.J.; Wang, L.; Silverstein, M.C.; Ma'ayan, A. Massive mining of publicly available RNA-seq data from human and mouse. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–10, doi:10.1038/s41467-018-03751-6.
  86. Fornaro, L.; Masi, G.; Loupakis, F.; Vasile, E.; Falcone, A. Palliative treatment of unresectable metastatic colorectal cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* **2010**, *11*, 63–77.
  87. Ahmed, K.K.; Tamer, M.A.; Ghareeb, M.M.; Salem, A.K. Recent Advances in Polymeric Implants. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20*, 1–10.
  88. Shariatnia, Z.; Jalali, A.M. Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *115*, 194–220, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.034.
  89. Siepman, J.; Peppas, N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 163–174.
  90. Takó, M.; Kotogán, A.; Papp, T.; Kadaikunnan, S.; Alharbi, N.S.; Vágvölgyi, C. Purification and properties of extracellular lipases with transesterification activity and 1,3-regioselectivity from *rhizomucor miehei* and *rhizopus oryzae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27*, 277–288, doi:10.4014/jmb.1608.08005.
  91. Rahim, M.A.; Jan, N.; Khan, S.; Shah, H.; Madni, A.; Khan, A.; Jabar, A.; Khan, S.; Elhissi, A.; Hussain, Z.; y colab. Recent advancements in stimuli responsive drug delivery platforms for active and passive cancer targeting. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 1–52.
  92. Chandra, P.; Enespa; Singh, R.; Arora, P.K. Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 1–42.
  93. Romero, C.M.; Pera, L.M.; Loto, F.; Vallejos, C.; Castro, G.; Baigori, M.D. Purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its application in ester

- synthesis. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2012**, *1*, 25–31, doi:10.1016/j.bcab.2011.08.013.
94. Rodenak-Kladniew, B.; Islan, G.A.; de Bravo, M.G.; Durán, N.; Castro, G.R. Design, characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *154*, 123–132, doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.021.
  95. Wang, Y.W.; Wu, Q.; Chen, G.Q. Gelatin blending improves the performance of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) films for biomedical application. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 566–571, doi:10.1021/bm049342d.
  96. Doktorovová, S.; Souto, E.B.; Silva, A.M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - A systematic review of in vitro data. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *87*, 1–18.
  97. Ritger, P.L.; Peppas, N.A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Control. Release* **1987**, *5*, 37–42, doi:10.1016/0168-3659(87)90035-6.
  98. Kou, C.H.; Han, J.; Han, X.L.; Zhuang, H.J.; Zhao, Z.M. Preparation and characterization of the adriamycin-loaded amphiphilic chitosan nanoparticles and their application in the treatment of liver cancer. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 7833–7841, doi:10.3892/ol.2017.7210.
  99. He, X.; Pei, L.; Tong, H.H.Y.; Zheng, Y. Comparison of spray freeze drying and the solvent evaporation method for preparing solid dispersions of baicalein with pluronic F68 to improve dissolution and oral bioavailability. *AAPS PharmSciTech* **2011**, *12*, 104–113, doi:10.1208/s12249-010-9560-3.
  100. Lal, S.; Datta, M. Organoclay Pluronic F68 – Montmorillonite, as a sustained release drug delivery vehicle for propranolol hydrochloride. *Eur. Chem. Bull.* **2014**, *3*, 593–604.
  101. Furqan, M.; Iqbal, F.; Tulain, R. Microwave radiation induced synthesis of hydroxypropyl methylcellulose-graft-(polyvinylalcohol-co-acrylic acid) polymeric network and its in vitro evaluation. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **2017**, *74*, 527–541.
  102. Acosta-Ferreira, S.; Castillo, O.S.; Madera-Santana, J.T.; Mendoza-García, D.A.; Núñez-Colín, C.A.; Grijalva-Verdugo, C.; Villa-Lerma, A.G.; Morales-Vargas, A.T.; Rodríguez-Núñez, J.R. Production and physicochemical characterization of chitosan for the harvesting of wild microalgae consortia. *Biotechnol. Reports* **2020**, *28*, e00554, doi:10.1016/j.btre.2020.e00554.
  103. Peng, J.; Wang, X.; Lou, T. Preparation of chitosan/gelatin composite foam with ternary solvents of dioxane/acetic acid/water and its water absorption capacity. *Polym. Bull.* **2020**, *77*, 5227–5244, doi:10.1007/s00289-019-03016-2.
  104. Castro, S.R.; Ribeiro, L.N.M.; Breikreitz, M.C.; Guilherme, V.A.; Rodrigues da Silva, G.H.; Mitsutake, H.; Alcântara, A.C.S.; Yokaichiya, F.; Franco, M.K.K.D.; Clemens, D.; y colab. A pre-formulation study of tetracaine loaded in optimized nanostructured lipid carriers. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–15, doi:10.1038/s41598-021-99743-6.
  105. Hasanin, M.S.; El-Sakhawy, M.; Ahmed, H.Y.; Kamel, S. Hydroxypropyl methylcellulose/graphene oxide composite as drug carrier system for 5-fluorouracil. *Biotechnol. J.* **2022**, *17*, 2100183 (2022). ethylcellulose/graphene oxide composite as drug carrier system for 5-fluorouracil. *Biotechnol. J.* **2022**, *17*, 2100183, doi:10.1002/biot.202100183.
  106. de Britto, D.; Campana-Filho, S.P. Kinetics of the thermal degradation of chitosan.

*Thermochim. Acta* **2007**, 465, 73–82, doi:10.1016/j.tca.2007.09.008.

107. Xu, S.; Du, M.; Zhang, Z.; Shao, M.; Zhang, G.; Zhou, L. Synthesis, properties and thermokinetics of a kind of diesters as phase change materials. *Sol. Energy* **2022**, 235, 180–186, doi:10.1016/J.SOLENER.2022.02.043.
108. Aydn, A.A.; Okutan, H. High-chain fatty acid esters of myristyl alcohol with even carbon number: Novel organic phase change materials for thermal energy storage - 1. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2011**, 95, 2752–2762, doi:10.1016/j.solmat.2011.04.015.
109. El Maghraby, G.M.; Alomrani, A.H. Synergistic enhancement of itraconazole dissolution by ternary system formation with pluronic F68 and hydroxypropylmethylcellulose. *Sci. Pharm.* **2009**, 77, 401–417, doi:10.3797/scipharm.0901-08.
110. Han, F.; Li, S.; Yin, R.; Liu, H.; Xu, L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, 315, 210–216, doi:10.1016/j.colsurfa.2007.08.005.
111. Sun, H.; Jiang, L.; Luo, X.; Jin, W.; He, Q.; An, J.; Lui, K.; Shi, J.; Rong, R.; Su, W.; y colab. Potential tumor-suppressive role of monoglyceride lipase in human colorectal cancer. *Oncogene* **2013**, 32, 234–241, doi:10.1038/onc.2012.34.

## 10 LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

---

### 10.1 FIGURAS

Figura 2.1: Características distintivas del cáncer, adaptado de Hanahan y Weinberg (2011).....	6
Figura 2.2: Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, un gran porcentaje de los nuevos componentes activos pertenecen a las categorías II y IV.....	9
Figura 2.3: estructura de la violaceína y un conformero tridimensional de violaceína (PubChem).....	11
Figura 2.4: La violaceína actúa inhibiendo muchas de las características del cáncer	14
Figura 2.5: Esquemización de SLN y diferentes tipos de NLC. Adaptado de Rivero Berti y colaboradores (2022) [41].....	20
Figura 4.1 Estabilidad de la emulsión de violaceína en diferentes concentraciones de PS20 (—, 1.0%; —, 0.5% - - -, 0.1%).....	34
Figura 4.2: Espectros de emisión de diferentes concentraciones de PS20-Viol.....	35
Figura 4.3: Micrografía TEM de Viol-PS20 (100 mM: 8.0 mM).....	36
Figura 4.4: Distribución de tamaño de las micelas de la emulsión PS20-Viol .....	37
Figura 4.5:Tamaño medio y distribución de P4G1 (A) y P4G2 (B) El eje vertical representa el número de perlas contadas N= 563.....	40
Figura 4.6:Imágenes de SEM P4G <sub>1</sub> y P4G <sub>2</sub> con y sin violaceína. Los insertos muestran el histograma de grises obtenidos por el programa ImageJ. ....	41

Figura 4.7: Difracción de rayos X de pectina, gelatina, violaceína y la formulación P <sub>4</sub> G <sub>2</sub> viol. ....	42
Figura 4.9: Termogravimetría de microesferas de pectina (P)-gelatina (G), sin glutaraldehído (sg) y con violaceína (Viol). ....	43
Figura 4.9: Derivada del peso respecto de la temperatura para microesferas de pectina (P)-gelatina (G), sin glutaraldehído (sg) y con violaceína (Viol).....	43
Figura 4.10: Perfiles cinéticos de liberación controlada de Viol a partir de microesferas con diferentes formulaciones a diferentes pH. Abreviaturas: P <sub>4</sub> G <sub>0</sub> , 4,0% pectina y 0% gelatina; P <sub>4</sub> G <sub>0,5</sub> , pectina al 4% y gelatina al 0,5%; P <sub>4</sub> G <sub>1</sub> , pectina al 4,0% y gelatina al 1,0%; P <sub>4</sub> G <sub>2</sub> , pectina al 4,0% y gelatina al 2,0%.....	46
Figura 4.11: Efecto citotóxico en células de cáncer colorrectal HCT116 de la concentración de Viol disuelta en DMSO y emulsionada en PS20 (A) y esferas de pectina gelatina (B) a las 48h.....	48
Figura 5.1: Control de absorbancia a 580nm para soluciones con la misma concentración de violaceína y diferentes SAILS, no se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) .....	56
Figura 5.2: Viabilidad de cultivos celulares A549 en presencia de [CnHim]-S y [CnHim]-F con n= 10 a 16.....	63
Figura 5.3: Citotoxicidad de SAILS adicionales comparada con SAILS ya probados. Abreviatura: [C <sub>16</sub> Him], 1-hexadecilimidazol y [C <sub>16</sub> mim], 1-hexadecil-3-metilimidazol..	64
Figura 5.4: Efecto de la longitud de las cadenas carbonadas laterales de alquilo y aniones sobre la estabilidad de las soluciones micelares de [Viol-([CnHim]-S)] y [Viol-([CnHim]-F)] a las 0, 24 y 48 h.....	64

Figura 5.5: espectros de FTIR para [C <sub>16</sub> HIm]-S (A), Violaceína (B) y una mezcla equimolar de ambos (C). .....	66
Figura 5.6:Espectros de FTIR de las diferentes formulaciones conteniendo violaceína .....	72
Figura 5.7: Micrografías de TEM para las formulaciones estudiadas. <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
Figura 5.8: Micrografías de Cryo-TEM para las formulaciones estudiadas. .... <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
Figura 5.9: Citotoxicidad del vehículo vacío sobre las tres líneas celulares ensayadas. ....	75
Figura 5.10: Viabilidad celular de A549 (A), HCT-116 (B) y HeLa (C) en presencia de 0.25 µM, 0.5 µM, 1.0 µM, 2.0 µM and 4.0 µM de violaceína y formulaciones con violaceína con concentraciones equivalentes. ....	77
Figura 5.11: Expresión diferencial de FOLR1 en líneas celulares de pulmón, colon y cérvix, según la base de datos ARCHS <sup>4</sup> [81]. ....	78
Figura 5.12: Captación de formulaciones marcadas con DIOC18 en distintas líneas celulares.....	79
Figura 6.1: Fotos de la bioimpresora 3D desarrollada en el laboratorio, en la última foto se muestra un detalle de una impresión en progreso.....	88
Figura 6.2:Flujo de trabajo simplificado para la producción de las mallas. ....	89
Figura 6.3: En negro actividad de la lipasa relativa a la actividad a pH=7,4 y 37°C. En blanco, estabilidad de la lipasa medida como actividad de la lipasa a pH=7,4 y 37°C tras 6 horas de incubación a temperatura ambiente al pH indicado.....	94



Figura 6.4: Imágenes de TEM para las NLC-Viol-Lip antes (A) y después (B) de incubarse a pH7.4 .....	96
Figura 6.5: Liberación de violaceína desde la malla (●), y la malla conteniendo lipasa (▲) a pH=7,4. Ajuste de Baker-Lonsdale para Malla-Viol y ajuste de Korsmeyer-Peppas para Malla-Viol-Lip.....	99
Figura 6.6: liberación de violaceína desde la malla (●), y la malla conteniendo lipasa (○) a pH= 5,0. Ajuste de Korsmeyer-Peppas para cada liberación Malla-Viol ( $R^2_{aj}=0.90$ ), Malla-Viol-Lip ( $R^2_{aj}=0.87$ ) .....	100
Figura 6.7: Imágenes de SEM antes y después de liberación en pH7. ....	102
Figura 6.8. Difractogramas para Malla-Viol-Lip, Malla-Viol, MM (miristato de miristilo), Chi-MMW (quitosano de peso molecular medio), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y P188 (Poloxámero P188). Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se incubaron para la liberación de Viol en buffer fosfato (pH= 7,4) durante 24 h antes de realizar el análisis. El recuadro es un detalle para Malla-Viol-Lip y Malla-Viol entre 10° y 40°.....	104
Figura 6.9: Espectros FTIR para Malla-Viol-Lip, Malla-Viol, MM (miristato de miristilo), Chi-MMW (quitosano de peso molecular medio), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y P188 (Poloxámero P188). Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se incubaron en buffer de liberación (pH= 7,4) durante 24 h antes de realizar el análisis. ....	106
Figura 6.10: Derivada del porcentaje en peso respecto de la temperatura para Malla-Viol-Lip, Malla-Viol, MM (miristato de miristilo), Chi-MMW (quitosano de peso molecular medio), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y P188 (Poloxámero P188). Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se incubaron en buffer fosfato (pH= 7,4) durante 24 h antes de realizar el análisis.....	108

Figura 6.11: Análisis termogravimétrico para Malla-Viol-Lip, Malla-Viol, MM (miristato de miristilo), Chi-MMW (quitosano de peso molecular medio), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y P188 (Poloxámero P188). Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se incubaron en buffer fosfato (pH= 7,4) durante 24 h antes de realizar el análisis. .... 108

Figura 6.12: Termogramas DSC para Malla-Viol-Lip, Malla-Viol, MM (miristato de miristilo), Chi-MMW (quitosano de peso molecular medio), HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa) y P188 (Poloxámero P188). Malla-Viol y Malla-Viol-Lip se incubaron en buffer fosfato (pH=7,4) durante 24 horas antes de realizar el análisis. El eje Y representa el flujo de calor (exotérmico está arriba)..... 110

Figura 6.13 Viabilidad celular para formulaciones de NLC y Viol libre para la línea celular A549 (A) y la línea celular HCT-116 (B). Viabilidad celular en medios condicionados con las mallas 3D (C). .... 112

## 10.2 TABLAS

Tabla 4.1:Propiedades de la liberación de violaceína, morfología, eficiencia de encapsulación y tamaño de las partículas de pectina-gelatina..... 39

Tabla 5.1: SAILs sintetizados. Abreviatura: [CnHim], 1-alkilimidazol y [C16mim], 1-hexadecil-3-metilimidazol ..... 55

Tabla 5.2:Composición de las formulaciones SLN que conteniendo violaceína. Abreviaturas: SAIL, [C<sub>16</sub>Him]-S y FA, ácido fólico ..... 57

Tabla 5.3: Eficiencia de encapsulación de las partículas sólidas lipídicas en presencia de [C<sub>16</sub>Him]-S y ácido fólico (FA)..... 69

Tabla 5.4: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Z de las formulaciones conteniendo violaceína determinadas por DLS.....	70
Tabla 5.5: Análisis XPS de las diferentes formulaciones conteniendo violaceína.....	71
Tabla 5.6: IC <sub>50</sub> para las formulaciones y líneas estudiadas.....	76
Tabla 6.1: Modelos usados para ajustar las curvas de liberación de violaceína .....	91
Tabla 6.2: Diámetros hidrodinámicos (DH), índice de polidispersión (PDI) y Z-pot para las formulaciones con (NLC-Viol-Lip) y sin lipasa (NLC-Viol). .....	95
Tabla 6.3: Eficiencia de encapsulación de las mallas.....	97
Tabla 6.4: Valores de R <sup>2</sup> ajustados para la liberación de Viol desde Malla-Viol y Malla- Viol-Lip a pH=7,4.....	98
Tabla 6.5: Datos obtenidos a partir de las imágenes de SEM y el software ImageJ(R). .....	103