

Beatriz Arauzo Gimeno

Aerosoles biocompatibles a partir  
de polvo seco: Nuevo enfoque en  
el suministro de fármacos por vía  
inhalatoria.

Biocompatible aerosols from dry  
powder: A new approach in  
inhaled drugs delivery.

Director/es

Santamaría Ramiro, Jesús  
Lobera González, María Pilar

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

AEROSOLES BIOCOMPATIBLES A PARTIR DE  
POLVO SECO: NUEVO ENFOQUE EN EL  
SUMINISTRO DE FÁRMACOS POR VÍA  
INHALATORIA.  
BIOCOMPATIBLE AEROSOLS FROM DRY  
POWDER: A NEW APPROACH IN INHALED DRUGS  
DE IIVFRY

Autor

Beatriz Arauzo Gimeno

Director/es

Santamaría Ramiro, Jesús  
Lobera González, María Pilar

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente

2022





**Universidad Zaragoza**

**“Aerosoles biocompatibles a partir de polvo seco: Nuevo enfoque en el suministro de fármacos por vía inhalatoria”**

*“Biocompatible aerosols from dry powder: A new approach in inhaled drugs delivery”*

This thesis dissertation is submitted to the Department of Chemical & Environmental Engineering at the University of Zaragoza (Spain) in fulfilment of the requirements needed for obtaining the degree of Doctor.

**Beatriz Arauzo Gimeno**

**Zaragoza, 2022**



Departamento de Ingeniería  
Química y Tecnologías  
del Medio Ambiente  
**Universidad Zaragoza**

**INMA**  
INSTITUTO DE NANOCIENCIA  
Y MATERIALES DE ARAGÓN







Departamento de Ingeniería  
Química y Tecnologías  
del Medio Ambiente  
Universidad Zaragoza

**Dr. Jesus Santamaria Ramiro**, full professor and **Dra. María Pilar Lobera González**, associate professor, both in the University of Zaragoza in the Department of Chemical & Environmental Engineering and members of the Institute of Nanoscience and Materials of Aragon (INMA).

Inform that,

The Doctoral thesis entitled:

**“Biocompatible aerosols from dry powder:  
A new approach in inhaled drugs delivery”**

Has been written by **Ms. Beatriz Arauzo Gimeno** under our supervision in the Department of Chemical & Environmental Engineering and in the Institute of Nanoscience and Materials of Aragon

And,

We authorize and approve the presentation of this dissertation.

And for the record, we sign this document in Zaragoza on 17 June 2022.

---

Fdo. Jesús Santamaría Ramiro

---

Fdo. M. Pilar Lobera González





Departamento de Ingeniería  
Química y Tecnologías  
del Medio Ambiente  
Universidad Zaragoza

**Dr. Jesús Santamaría Ramiro**, Catedrático de Universidad y la **Dra. María Pilar Lobera González**, Profesora Contratada Doctora, ambos profesores de la Universidad de Zaragoza en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente y miembros del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA).

CERTIFICAN

que la presente memoria titulada,

**“Aerosoles biocompatibles a partir de polvo seco: Nuevo enfoque  
en el suministro de fármacos por vía inhalatoria”**

Ha sido desarrollada y escrita bajo su dirección por **Dña. Beatriz Arauzo Gimeno** en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente en el Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA). En consecuencia, autorizamos y aprobamos su presentación.

Para que así conste, firmamos este documento en Zaragoza a 17 de junio de 2022.

---

Fdo. Jesús Santamaría Ramiro

---

Fdo. M. Pilar Lobera González



*A mis padres,  
por ver siempre el lado bueno de las cosas*



*“El azar afortunado suele ser casi siempre  
el premio del esfuerzo perseverante”*

*Santiago Ramón y Cajal.*



## Agradecimientos / Acknowledgements

Durante mi estancia en Dublín leí, “*la primera y más simple de las emociones que se descubre en la mente humana es la curiosidad*” y así es, pues fue la curiosidad por la investigación lo que me hizo comenzar hace cuatro años esta Tesis Doctoral.

Todo el camino recorrido para llegar hasta este punto no habría sido posible sin las personas que me han acompañado, animado y ayudado a lo largo de todos estos años. Con estas primeras líneas me gustaría dar las gracias a todos los que han formado parte de este aprendizaje y crecimiento tanto a nivel científico como personal.

Para comenzar, me gustaría dar las gracias a mis directores de Tesis. Jesús, gracias por adentrarme en el mundo de la nanotecnología y por darme la oportunidad de aportar mi granito de arena a la investigación. Pilar, gracias por todo el tiempo invertido y por tus ánimos tanto en los momentos buenos como en los menos buenos. Os agradezco enormemente la confianza depositada en mí, así como vuestros consejos y disposición constante para que siguiese avanzando.

Una parte de esta Tesis Doctoral se ha desarrollado en el CIBA, por lo que me gustaría dar las gracias tanto a Manuel Arruebo como a Gracia Mendoza, por enseñarme a trabajar con células y bacterias, por darme la posibilidad de adquirir experiencia dentro del mundo *bio*. Del mismo modo, gracias a Pilar Martín y a Ana, por estar conmigo durante mi primer contacto con ratones.

Naturalmente, no me puedo olvidar del resto de doctores del grupo, que de una forma u otra han formado parte de esta etapa: Paco, Silvia, Pili, Reyes, Víctor, Gema, José Luis, Emilio, María y Teresa. Gracias a Nuria por toda tu paciencia y ayuda ante el más mínimo problema surgido en el laboratorio, por escuchar mis inquietudes; A Javi, por todas las horas invertidas juntos integrando picos del UPLC, por tener siempre esa actitud positiva. Y a Marta, por hacer la burocracia mucho más amena.

Igualmente, gracias a todos los técnicos del LMA que han participado en gran medida en esta Tesis, Gala, Marta, Mariano, Laura e Isabel, siempre dispuestos a ayudarme ante cualquier imprevisto.

Durante estos años he tenido la suerte de poder realizar tres estancias, donde he conocido a personas magníficas, al mismo tiempo que el trabajo desarrollado en sus grupos de investigación. Por ello, en primer lugar, me gustaría dar las gracias tanto a la Prof. Eva Martín como al Prof. José Luis Pedraz, por darme la oportunidad de trabajar en sus grupos de investigación, por toda la ayuda prestada durante y después de mis estancias. A Álvaro y Antonio, por acercarme aún más al mundo de la ingeniería química con la pasión que os genera la ciencia, gracias por todas las video-llamadas

para resolver mis innumerables dudas. A Tania, por sus numerosas clases magistrales sobre pulmonar; Y a Myriam, por estar siempre dispuesta a enseñarme Vitoria. Eventually, I would like to thank Dr. Carsten Ehrhardt for giving me the opportunity of working in his group in the Trinity College of Dublin. Thank you so much all the people I met there, especially Laura, Jessie and Johannes, for the laughter about our customs, I enjoyed a lot those months and I am sure that my experience in Dublin hadn't be the same without you.

Tengo que admitir que estos años serán inolvidables gracias a todos los doctorandos con los que he pasado infinidad de horas en el laboratorio, pero también de risas, cervezas y cafés al sol. Una mención especial: A Cris, por todos los buenos momentos, fuera y dentro del laboratorio; A Marta por sus bailoteos con cadena 100; A Roberta por su cariño y dulzura; Y a Isa y Sara, por enseñarme tanto en mis inicios. Quiero daros las gracias por haber compartido esta experiencia conmigo, por estar siempre disponibles para resolver cualquier duda, por haber estado al pie del cañón todo este tiempo, y por hacer los días más llevaderos. También quiero dar las gracias a Arturo, por nuestros desvaríos y locuras sobre ciencia, por ser el más guay del laboratorio; A Cristóbal, por ayudarme a apretar infinidad de tornillos; Y a Gabriela, por la energía tan positiva que transmite. Igualmente, gracias tanto a todos los que estaban cuando llegue, Fer, Kike, Laura, Martín, Alberto, Mari Carmen, Kike, María y Diego; como a los que están ahora, Kissia, Guille, Ainhoa, Raúl, Mónica, Ángeles, Javi, Nacho, Miguel, Ramiro, Sergio, Fatou, Ana e Isabel.

A mis amigas de toda la vida, Sofía, Inés y Eugenia, porque el destino es caprichoso y sé que en poco tiempo seremos las cuatro grandes Doctoras. No queda nada, ya podemos ver la meta. Y a María. Gracias por vuestra amistad, por escuchar mis problemas y aconsejarme siempre de la mejor manera posible, por estar siempre ahí.

Finalmente, quiero dar las gracias a las personas más importantes de mi vida. Gracias a mis padres, porque si hoy estoy aquí es gracias a vosotros. Por enseñarme que todo lo que conlleva un esfuerzo merece la pena. Igualmente, gracias a mis hermanos, Pablo y Javier, porque sois mi mayor ejemplo, porque nunca ha faltado una palabra de ánimo cuando el viento soplaba en contra, por ayudarme a seguir *remando*. Gracias a mis abuelos por su esfuerzo en intentar entender lo que he hecho todos estos años; A mi tío Alberto, siempre disponible para ayudarme a lidiar con la informática; A Charo, porque sé que estarías orgullosa de mi. Y, por último, a Xabier, por ser a felicidade. Porque a brisa do mar e ti fostes o meu lugar de paz todos estes anos.

Gracias a todos, de corazón.





# SUMMARY AND THESIS OUTLINE

Resumen y esquema de la tesis

---



## RESUMEN Y ESQUEMA DE LA TESIS

La presente Tesis Doctoral, titulada “*Aerosoles biocompatibles a partir de polvo seco: Nuevo enfoque en el suministro de fármacos por vía inhalatoria*”, se ha desarrollado en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza (España), dentro del grupo de investigación Películas y Partículas Nanoporosas (NFP), del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA). La investigación que se expone a continuación ha sido desarrollada durante cuatro años, 2018 - 2022, bajo la codirección de la Dra. M. Pilar Lobera y el Prof. Jesús Santamaría, y ha estado financiada por un contrato de Personal Investigador Predoctoral en formación del Gobierno de Aragón.

La vía pulmonar ha demostrado ser una vía de administración muy prometedora para la administración directa y localizada de fármacos en los pulmones. El sistema respiratorio posee un epitelio alveolar con alta superficie, gran permeabilidad, actividad enzimática baja y ausencia de efecto de primer paso hepático. Todo ello permite un aumento de la biodisponibilidad del fármaco en los pulmones, con la consiguiente reducción de la dosis total empleada en comparación con otras vías de administración (oral o intravenosa) y, por tanto, una disminución de los efectos adversos derivados de la medicación. Sin embargo, el problema principal que presenta es que, para lograr una concentración adecuada en los pulmones, se requiere una formulación que pueda ser aerosolizada de forma eficiente y, un sistema de inhalación que produzca un aerosol útil del fármaco con un tamaño de partícula adecuado a la región que se quiera alcanzar. Esto sigue representando un desafío considerable, hasta el punto de que hoy en día no está resuelto el diseño de formulaciones biocompatibles, ni de dispositivos de inhalación para la administración eficaz de fármacos en fase aerosol.

Recientemente, nuestro grupo ha patentado una novedosa tecnología que permite el suministro de aerosoles de partículas biocompatibles y biodegradables a partir de material en polvo seco susceptibles de ser empelados como vectores para la administración de fármacos y biomoléculas

por vía pulmonar. Desarrollar formulaciones y procedimientos que permitan hacer realidad ese escenario es el objetivo central de esta tesis.

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado micropartículas basadas en polímeros naturales biodegradables para la liberación localizada y directa de antibióticos en el sistema pulmonar. Las micropartículas desarrolladas se han obtenido en forma de polvo seco con un tamaño  $\leq 5 \mu\text{m}$ , que se considera adecuado para administración por vía inhalatoria. Su potencial para la aplicación como terapia inhalatoria se ha evaluado mediante la realización de experimentos de generación de aerosoles particulados.

La Tesis se divide en ocho capítulos con el objetivo de facilitar la lectura, comprensión y análisis del trabajo realizado.

- En el [Capítulo 1](#) se introduce el sistema respiratorio pulmonar, las principales infecciones respiratorias y los antibióticos empleados como tratamiento. Además, se explica brevemente los mecanismos que afectan a la deposición pulmonar de las partículas. Se describen los principales vectores empleados en biomedicina para la administración de fármacos por vía inhalatoria, reflejando las ventajas de esta vía de administración y el potencial asociado al uso de polímeros naturales. Finalmente, se proporciona una breve descripción de los principales dispositivos de inhalación actualmente en uso, y las formulaciones basadas en antibióticos autorizadas para su uso.
- El [Capítulo 2](#) recoge la metodología empleada para la generación de las distintas partículas poliméricas desarrolladas. Se describen los protocolos seguidos para la realización de los ensayos *in vitro* en líneas celulares de pulmón, evaluación de la actividad antimicrobiana y estudio de la deposición de las partículas en el sistema respiratorio.
- En el [Capítulo 3](#) se describe el dispositivo de generación de aerosoles por actuación neumática desarrollado y patentado por la Universidad de

Zaragoza y empleado para la aerosolización de las partículas generadas. En concreto se evalúa su posible aplicación biomédica a partir de tres formulaciones comerciales para inhalación en forma de polvo seco.

- El **Capítulo 4** estudia el proceso de obtención de partículas a partir del polímero quitosano mediante la técnica de electropulverización. Se obtienen partículas de quitosano con dos pesos moleculares diferentes, y se encapsula el antibiótico ciprofloxacino. Se realiza la caracterización físico-química de las partículas y se evalúa su actividad *in vitro* en dos líneas celulares de pulmón (A549 y Calu-3) y su actividad antimicrobiana frente a dos bacterias planctónicas modelo (*S. aureus* y *P. aeruginosa*). Finalmente se realizan ensayos de aerosolización de esa formulación con el generador de aerosoles.
- En el **Capítulo 5** se presenta el método de gelificación/precipitación para la producción de micropartículas de dextrano, empleando el antibiótico ciprofloxacino. Estas micropartículas se caracterizan por distintas técnicas como XPS, XRD, FTIR o EDX. Los ensayos *in vitro* realizados se engloban en tres grupos. En primer lugar, ensayos con células pulmonares para comprobar la biocompatibilidad de las micropartículas. Seguidamente, los ensayos con bacterias planctónicas y biofilms. En el tercer grupo, se agrupan los ensayos *in vitro* realizados para evaluar la deposición pulmonar de las partículas y los ensayos de generación de aerosoles.
- El **Capítulo 6** estudia el proceso para la generación de micropartículas de alginato con sulfato de colistina a partir de la técnica de atomización. Tras la obtención de las partículas en forma de polvo seco, se caracterizan físico - químicamente por técnicas análogas a los capítulos anteriores. Se evalúa su biocompatibilidad en dos líneas celulares de pulmón (A549 y Calu-3) y se estudia su actividad antimicrobiana frente a un modelo de bacteria Gram-negativa (*P. aeruginosa*). Por último, se analiza la capacidad de las micropartículas para ser empleadas como tratamiento inhalatorio.

- En el **Capítulo 7** se estudia la obtención de micropartículas basadas en el antibiótico azitromicina en forma de polvo seco puro mediante electropulverización. Se realiza un estudio del efecto producido en el tamaño de las micropartículas al añadir el fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina. Del mismo modo que en los capítulos anteriores, se procede a la caracterización físico-química tras la optimización mediante XRD, DSC, FTIR, XPS o microscopia SEM. Se estudia su biocompatibilidad hacia tres líneas celulares procedentes de pulmón y su actividad antimicrobiana tanto en biofilms como en dos modelos de bacterias planctónicas. Por último, se realizan diversos estudios *in vitro* de deposición pulmonar y generación de aerosoles.
- El **Capítulo 8** contiene las conclusiones generales de esta Tesis Doctoral.

Por último, se incluyen tres **Anexos**:

- **Anexo I**, contiene la descripción de las técnicas y equipos de caracterización empleados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.
- **Anexo II**, describen los modelos matemáticos empleados para estudiar la cinética de liberación de los distintos antibióticos.
- **Anexo III**, lista de las publicaciones (artículos científicos y contribuciones a congresos) así como de las estancias realizadas durante el periodo de investigación.

Cabe destacar que el desarrollo de las micropartículas de alginato se ha realizado en colaboración con la Universidad de Salamanca (USAL) donde se realizó una estancia de investigación predoctoral de tres meses de duración, bajo la supervisión de la Prof. Eva Martín del Valle. Los estudios *in vitro* con líneas celulares de pulmón y con bacterias se han desarrollado en conjunto en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA) y en el Trinity Science Biomedical Institute (TSBI) del Trinity College Dublin, Irlanda. En este último

caso durante la realización de una estancia de investigación de cuatro meses, bajo la supervisión del Prof. Carsten Ehrhardt. Finalmente, los ensayos *in vitro* basados en la simulación de la deposición pulmonar de las partículas se han llevado a cabo en la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco (UPV) a Vitoria, durante la realización de dos estancias de dos semanas de duración cada una bajo la supervisión del Prof. José Luis Pedraz.

## SUMMARY AND THESIS OUTLINE

This Doctoral Thesis, entitled "*Biocompatible aerosols from dry powder: A new approach in the delivery of drugs by inhalation*", has been developed in the Department of Chemical Engineering and Environmental Technologies at the University of Zaragoza (Spain), within the Nanoporous Films and Particles (NFP) group of the Institute of Nanoscience and Materials of Aragon (INMA). The research has been developed over four years, 2018-2022, under the co-direction of Dr. Pilar Lobera and Prof. Jesús Santamaría, and has been financed by a contract for Predoctoral Research Staff in training from the Government of Aragon.

Inhalation is a very promising route for the delivery of many drugs to the lungs since the treatment is localized and directly administered. The respiratory system has an alveolar epithelium with high surface and permeability, low enzyme activity, and no hepatic first-pass effect. All of these features increase the drug bioavailability in the lungs, also the dose used is reduced compared to other routes of administration (oral or intravenous) and the adverse effects in patients derived from the treatment consequently decrease. However, there are important challenges that remains. Thus, this administration route requires of an adequate formulation, which could be efficiently aerosolized. Likewise, the design of the inhalation device is critical in order to generate high respirable fraction of the drug. For that reason, nowadays intense research efforts are devoted to the development of biocompatible formulations and of alternative inhalation devices to deliver aerosol drugs.

Recently, our group at the University of Zaragoza has patented an innovative technology that allows the administration of biocompatible particles as an aerosol from dry powder formulations. These particles could be used as carriers to directly deliver drugs and biomolecules to the lungs by inhalation. Developing both, new formulations and procedures capable of realizing this objective is the focus of this Thesis.

In this Doctoral Thesis, different microparticles based on natural biodegradable polymers had been designed and synthesized for the direct release of antibiotics in the pulmonary system. The microparticles had been obtained as a dry powder with a size under 5  $\mu\text{m}$ , that is considered suitable for inhalation administration. Its potential for inhalation therapy applications has been evaluated in experiments of particulate aerosols generation.

This Doctoral Thesis has been structured in eight chapters to facilitate the reading, understanding and analysis of the work:

- **Chapter 1** introduces the pulmonary respiratory system, the main respiratory infections and the antibiotics used as a treatment for these diseases. In addition, the main mechanisms that affect the pulmonary deposition of the particles are briefly explained. Also, the main vectors used in biomedicine for the administration of drugs by inhalation are described, and the advantages of this route of administration and of the use of natural polymers are presented. Finally, a short description of some widely used inhalation devices and antibiotic-based formulations authorized for use is provided.
- **Chapter 2** presents the methodology used for the generation of the different polymeric particles developed. The protocols followed to carry out *in vitro* tests on lung cell lines, evaluation of antimicrobial activity and study of particle deposition in the respiratory system are also described.
- **Chapter 3** describes the pressure - pulse aerosol generation system used for the aerosolization of the particles prepared. Its potential application as a device for inhaled drug administration was evaluated using three commercial formulations currently in use for inhalation of drugs in dry powder form.
- **Chapter 4** studies the process to obtain inhalable particles based on chitosan polymer using the electrospray technique. Particles with two

different chitosan molecular weights were obtained and the antibiotic ciprofloxacin was encapsulated in them. The physical-chemical characterization of the particles was carried out and then, *in vitro* activity was studied with two lung cell lines (A549 and Calu-3) and two model planktonic bacteria (*S. aureus* and *P. aeruginosa*). At last, aerosolization assays are performed with these microparticles.

- Chapter 5 presents the gelation/precipitation method for the production of dextran microparticles containing ciprofloxacin as an antibiotic. The microparticles were characterised by different techniques such as XPS, XRD, FTIR and EDX. The *in vitro* assays are organized in three groups. In the first, lung cell lines were used to study the biocompatibility of microparticles. Then, a second group of experiments measured their activity against planktonic bacteria and biofilms. In the third group, several *in vitro* lung deposition tests were performed.
- Chapter 6 is devoted to the process for the production of alginate microparticles containing colistin sulfate using the atomization technique. After obtaining the particles as dry powder form, they were characterized physically and chemically using techniques similar to those in previous chapters. Then, their biocompatibility was evaluated in two lung cell lines (A549 and Calu-3) and its antimicrobial activity against a model of Gram-negative (*P. aeruginosa*) bacteria is studied. Finally, the potential of the microparticles to be aerosolized for use in inhalation treatments was studied.
- Chapter 7 shows studies the use of electrospray processes to obtain azithromycin microparticles as a pure dry powder. The effect of adding dipalmitoylphosphatidylcholine as a surfactant was studied. The particles were characterized by physical and chemical techniques like XRD, DSC, FTIR, XPS and SEM microscopy. Then, the biocompatibility of the particles was analysed in three lung cell lines and their antimicrobial activity was tested. As in previous formulations, aerosolization experiments were also carried out with these particles.

- Chapter 8 contains the general conclusions obtained from this Doctoral Thesis.

Finally, the Thesis contains three [Appendices](#) are included:

- [Appendix I](#), describes the characterization techniques and equipment used during the development of this Doctoral Thesis.
- [Appendix II](#), explains the mathematical models used to study the release kinetics of the different antibiotics.
- [Appendix III](#), contains the publications (scientific articles and contributions to congresses) and the national and international research stays arising from this work.

It should be mentioned that the development of the alginate microparticles were studied in collaboration with the University of Salamanca (USAL) during a three-month predoctoral research stay in the group of Prof. Eva Martín del Valle. *In vitro* studies with lung cell lines and bacteria were carried out in the Aragon Biomedical Research Center (CIBA) and also at the Trinity Science Biomedical Institute (TSBI) of Trinity College Dublin (Ireland), where a four month stay research was spent in the group of Prof. Carsten Ehrhardt. *In vitro* tests of the simulation of the pulmonary deposition of the particles have been done at the School of Pharmacy at the University of the Basque Country (UPV) in Vitoria, in two separate stays of two weeks each, under the supervision of Prof. José Luis Pedraz.

○



# Índice

Agradecimientos / Acknowledgements .....	i
Resumen y esquema de la tesis .....	vii
Summary and thesis outline.....	xii
Índice.....	xvii
Listado de símbolos y acrónimos.....	xxiii
<b>CAPÍTULO 1. Introducción general y objetivos .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Sistema respiratorio .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Anatomía del tracto respiratorio .....	3
1.1.2 Enfermedades respiratorias .....	4
1.1.3 Principales antibióticos empleados como tratamiento en enfermedades pulmonares.....	8
<b>1.2 Terapias inhaladas.....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Ventajas e inconvenientes de la vía de administración inhalatoria.....	16
1.2.2 Mecanismos y factores que afectan a la biodisponibilidad de las partículas inhaladas .....	17
<b>1.3 Micro y nanomateriales como vectores para el tratamiento de enfermedades pulmonares por vía inhalatoria .....</b>	<b>24</b>
1.3.1 Sistemas de administración de fármacos basados en polímeros naturales .....	28
<b>1.4 Dispositivos de inhalación.....</b>	<b>32</b>
1.4.1 Inhaladores de polvo seco (DPIs) .....	35
1.4.2 Antibióticos administrados con inhaladores de polvo seco .....	37
<b>1.5 Retos de la administración pulmonar y el desarrollo de nuevos dispositivos de inhalación.....</b>	<b>42</b>
<b>1.6 Objetivos .....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO 2. Materiales, métodos e instrumentación .....</b>	<b>45</b>
<b>2.1 Métodos de producción de micropartículas.....</b>	<b>47</b>
2.1.1 Electropulverización.....	48
2.1.2 Atomización.....	54
2.1.3 Gelificación y precipitación.....	59
<b>2.2 Estudios en células pulmonares .....</b>	<b>62</b>

2.2.1 Materiales .....	62
2.2.2 Cultivo celular .....	63
2.2.3 Viabilidad celular .....	63
2.2.4 Cultivo celular de interfaz líquido - aire (ensayos ALI) .....	65
2.2.5 Captación celular .....	68
<b>2.3 Ensayos de actividad antimicrobiana .....</b>	<b>70</b>
2.3.1 Materiales .....	70
2.3.2 Cultivos bacterianos .....	71
2.3.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y de la Concentración Mínima Bactericida (MBC) .....	71
2.3.4 Morfología bacteriana .....	73
2.3.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana en biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	74
<b>2.4 Estudios <i>in vitro</i> de administración pulmonar de fármacos .....</b>	<b>76</b>
2.4.1 Materiales .....	77
2.4.2 Tamaño físico de partícula .....	77
2.4.3 Diámetro de partícula aerodinámico .....	78
<b>CAPÍTULO 3. Dispositivo de generación de aerosoles de suspensión neumática con posible aplicación biomédica .....</b>	<b>87</b>
<b>3.1 Introducción .....</b>	<b>89</b>
<b>3.2 Descripción del generador de aerosoles de suspensión neumática. 91</b>	
3.2.1 Equipo de generación de aerosoles UNIZAR. Descripción de sus componentes .....	92
3.2.2 Principio de funcionamiento del generador de aerosoles UNIZAR .....	94
<b>3.3 Utilización del dispositivo de generación de aerosoles para la administración de fármacos por vía inhalatoria .....</b>	<b>95</b>
3.3.1 Fármacos comerciales .....	95
3.3.2 Aerosolización de las formulaciones comerciales con el dispositivo de generación de aerosoles UNIZAR .....	100
3.3.3 Comparación del generador de aerosoles UNIZAR con un inhalador de polvo seco comercial .....	107
<b>3.4 Ejemplo de modo de utilización .....</b>	<b>112</b>
3.4.1 Ejemplo de utilización 1. Bolsa de gases como reservorio de dosis controlada de fármaco .....	112
3.4.2 Ejemplo de utilización 2. Producción de una corriente continua de aerosol con una elevada concentración de fármaco .....	115
<b>3.5 Conclusiones .....</b>	<b>116</b>

<b>CAPÍTULO 4. Partículas poliméricas de quitosano cargadas con ciprofloxacino .....</b>	<b>119</b>
<b>4.1 Introducción.....</b>	<b>121</b>
<b>4.2 Optimización de la producción de partículas basadas en el polímero quitosano por electropulverización .....</b>	<b>122</b>
4.2.1 Efecto del disolvente .....	122
4.2.2 Influencia del peso molecular, concentración y caudal de alimentación .....	127
4.2.3 Encapsulación del antibiótico ciprofloxacino (CPX).....	131
<b>4.3 Caracterización de las micropartículas de quitosano (MPs) .....</b>	<b>134</b>
4.3.1 Caracterización físico-química .....	134
4.3.2 Cinética de liberación del antibiótico ciprofloxacino .....	138
<b>4.4 Ensayos <i>in vitro</i>: citotoxicidad en células pulmonares y estudio de la actividad antimicrobiana en <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> .....</b>	<b>142</b>
4.4.1 Ensayos de citotoxicidad celular.....	143
4.4.2 Actividad antimicrobiana en <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> .....	145
<b>4.5 Propiedades aerodinámicas y generación de aerosoles .....</b>	<b>150</b>
4.5.1 Generación de aerosoles .....	151
4.5.2 Tamaño efectivo de partículas en un proceso de inhalación.....	154
<b>4.6 Conclusiones.....</b>	<b>156</b>
<b>CAPÍTULO 5. Desarrollo de partículas de dextrano como portadores de ciprofloxacino .....</b>	<b>159</b>
<b>5.1 Introducción.....</b>	<b>161</b>
<b>5.2 Generación de micropartículas basadas en el polímero dextrano por gelificación/precipitación.....</b>	<b>163</b>
5.2.1 Concentración de polímero.....	163
5.2.2 Tiempo de gelificación/precipitación .....	164
5.2.3 Efecto de la agitación, disolvente y temperatura .....	166
5.2.4 Incorporación del antibiótico ciprofloxacino .....	169
<b>5.3 Caracterización de las micropartículas basadas en dextrano .....</b>	<b>171</b>
5.3.1 Caracterización físico-química .....	171
5.3.2 Estudio de la cinética de liberación del antibiótico ciprofloxacino ....	176
<b>5.4 Ensayos <i>in vitro</i> en células pulmonares .....</b>	<b>179</b>
5.4.1 Ensayos de citotoxicidad celular.....	179
5.4.2 Estudios de captación celular e interfase aire-líquido (ALI) .....	181
<b>5.5 Actividad antimicrobiana, biofilms y bacterias planctónicas .....</b>	<b>183</b>
5.5.1 Biofilms .....	183

5.5.2 Bacterias planctónicas .....	185
<b>5.6 Propiedades aerodinámicas y generación de aerosoles.....</b>	<b>189</b>
5.6.1 Diámetro aerodinámico.....	190
5.6.2 Generación de aerosoles.....	193
5.6.3 Tamaño efectivo de partículas en un proceso de inhalación .....	194
<b>5.7 Conclusiones .....</b>	<b>196</b>

## **CAPÍTULO 6. Producción de partículas de alginato como vectores de sulfato de colistina .....**

<b>6.1 Introducción.....</b>	<b>201</b>
<b>6.2 Propiedades de las disoluciones y geles de alginato.....</b>	<b>203</b>
<b>6.3 Optimización del proceso de generación de micropartículas basadas en alginato por atomización.....</b>	<b>207</b>
6.3.1 Ratio presiones aire/líquido (RP).....	208
6.3.2 Proceso de secado.....	210
6.3.3 Modificación de la tensión superficial .....	211
6.3.4 Concentración de alginato .....	213
6.3.5 Tamizado.....	215
6.3.6 Carga del antibiótico sulfato de colistina (CLS) en las micropartículas de alginato .....	216
<b>6.4 Caracterización de las micropartículas basadas en alginato .....</b>	<b>216</b>
6.4.1 Caracterización físico - química.....	216
6.4.2 Estudio de la cinética de liberación del antibiótico sulfato de colistina .....	225
<b>6.5 Ensayos in vitro en células pulmonares y actividad antimicrobiana .....</b>	<b>227</b>
<b>6.6 Generación de aerosoles.....</b>	<b>232</b>
<b>6.7 Conclusiones .....</b>	<b>235</b>

## **CAPÍTULO 7. Obtención de partículas basadas en el antibiótico azitromicina.....**

<b>7.1 Introducción.....</b>	<b>241</b>
<b>7.2 Optimización del proceso de electropulverización .....</b>	<b>243</b>
7.2.1 Disolvente.....	243
7.2.2 Caudal de alimentación.....	246
7.2.3 Concentración de fármaco.....	247
7.2.4 Influencia del fosfolípido DPPC .....	248
<b>7.3 Caracterización de las micropartículas de azitromicina.....</b>	<b>251</b>

7.3.1 Caracterización físico - química .....	251
7.3.2 Estudio de la cinética de disolución de las micropartículas .....	256
<b>7.4 Ensayos <i>in vitro</i> en células pulmonares .....</b>	<b>259</b>
7.4.1 Ensayos <i>in vitro</i> en células pulmonares .....	259
7.4.2 Estudios de captación celular e interfase aire - líquido (ALI).....	261
<b>7.5 Actividad antimicrobiana, biofilms y bacterias planctónicas .....</b>	<b>263</b>
7.5.1 Biofilms .....	263
7.5.2 Bacterias planctónicas.....	265
<b>7.6 Propiedades aerodinámicas y generación de aerosoles .....</b>	<b>269</b>
7.6.1 Diámetro aerodinámico .....	269
7.6.2 Generación de aerosoles .....	272
7.6.3 Diámetro efectivo de partículas en un proceso de inhalación .....	275
<b>7.7 Conclusiones.....</b>	<b>277</b>
<b>CAPÍTULO 8. Conclusiones generales/general conclusions</b>	<b>279</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>287</b>
<b>I. Equipos y técnicas de caracterización.....</b>	<b>289</b>
<b>II. Modelos matemáticos de liberación.....</b>	<b>308</b>
<b>III. Publicaciones, congresos y estancias.....</b>	<b>312</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>315</b>



## LISTADO DE SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

ALG	Alginato
$\#/cm^3$	Partículas/ $cm^3$
AA	Ácido Acético
ALI	Interfase Aire-Líquido
AZT	Azitromicina
CF	Carga de Fármaco
CLS	Sulfato de Colistina
CPC	Contador de Núcleos de Condensación
CPX	Ciprofloxacino
CS	Quitosano
$d_{\text{aer}}$	Diámetro Aerodinámico
DCM	Diclorometano
DLS	Dispersión Dinámica de la Luz
DMMA	Diámetro Masa Medio Aerodinámico
$d_p$	Diámetro de Partícula
DPI	Inhalador de Polvo Seco - <i>Dry Powder Inhaler</i>
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina (1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfocolina)
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DSMO	Dimetilsulfóxido
DXT	Dextrano
EE	Eficacia de Encapsulación
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FFP	Fracción Fina de Partículas

<b>FQ</b>	Fibrosis Quística
<b>FR</b>	Fracción Respirable
<b>FTIR</b>	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier
<b>G'</b>	Módulo de Almacenamiento de Energía
<b>G''</b>	Módulo de Pérdida de Energía
<b>Gp-p</b>	Glicoproteína-p
<b>GSD</b>	Diámetro Geométrico Estándar
<b>ICPR</b>	Comisión Internacional de Protección Radiológica
<b>KRB</b>	Buffer Krebs- Ringer Bicarbonato
<b>MBC</b>	Concentración Máxima Bactericida
<b>MIC</b>	Concentración Mínima Inhibitoria
<b>MPs</b>	Micropartículas
<b>MPs de ALG</b>	Micropartículas de Alginato
<b>MPs de ALG@CLS</b>	Micropartículas de Alginato con Sulfato de Colistina
<b>MPs de AZT</b>	Micropartículas de Azitromicina
<b>MPs de AZT con DPPC</b>	Micropartículas de Azitromicina con Dipalmitoilfosfatidilcolina
<b>MPs de CS PMA</b>	Micropartículas de Quitosano de Peso Molecular Alto
<b>MPs de CS PMA con CPX</b>	Micropartículas de Quitosano de Peso Molecular Alto con Ciprofloxacino
<b>MPs de CS PMB</b>	Micropartículas de Quitosano de Peso Molecular Bajo
<b>MPs de CS PMB con CPX</b>	Micropartículas de Quitosano de Peso Molecular Bajo con Ciprofloxacino
<b>MPs de DXT</b>	Micropartículas de Dextrano
<b>MPs de DXT@CPX</b>	Micropartículas de Dextrano con Ciprofloxacino
<b>NGI</b>	<i>Next Generation Impactor</i>

<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>OD</b>	Densidad Óptica
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPC</b>	Contador Óptico de Partículas
<b>P<sub>app</sub></b>	Permeabilidad Aparente
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato Salino
<b>PC</b>	Policarbonato
<b>PM</b>	Peso Molecular
<b>PMA</b>	Peso Molecular Alto
<b>PMB</b>	Peso Molecular Bajo
<b>pMDI</b>	Inhalador Presurizado de Dosis Medida
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RP</b>	Ratio de Presiones (Presión aire/Presión líquido)
<b>RPM</b>	Revoluciones por Minuto
<b>SEM</b>	Microscopio Electrónico de Barrido
<b>TEM</b>	Microscopio Electrónico de Transmisión
<b>TFA</b>	Ácido Trifluoroacético
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>UPLC</b>	Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopia de Absorción de Ultravioleta visible
<b>v</b>	Válvula
<b>XPS</b>	Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X
<b>XRD</b>	Difracción de Rayos X
<b>γ</b>	Velocidad de Deformación
<b>τ</b>	Esfuerzo Cortante



# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

---

*En este primer Capítulo se realiza una descripción general del sistema respiratorio, las enfermedades respiratorias más habituales y los tratamientos actuales. Seguidamente, se describen de forma general las características de las terapias inhaladas y se presenta el uso e interés de los polímeros naturales para el desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas. Entre las terapias por vía inhalatoria, se discuten las principales características de los inhaladores de polvo seco disponibles comercialmente y los retos principales asociados a esta vía de administración. Finalmente se exponen los objetivos globales que se persiguen en la investigación motivo de esta Tesis Doctoral.*



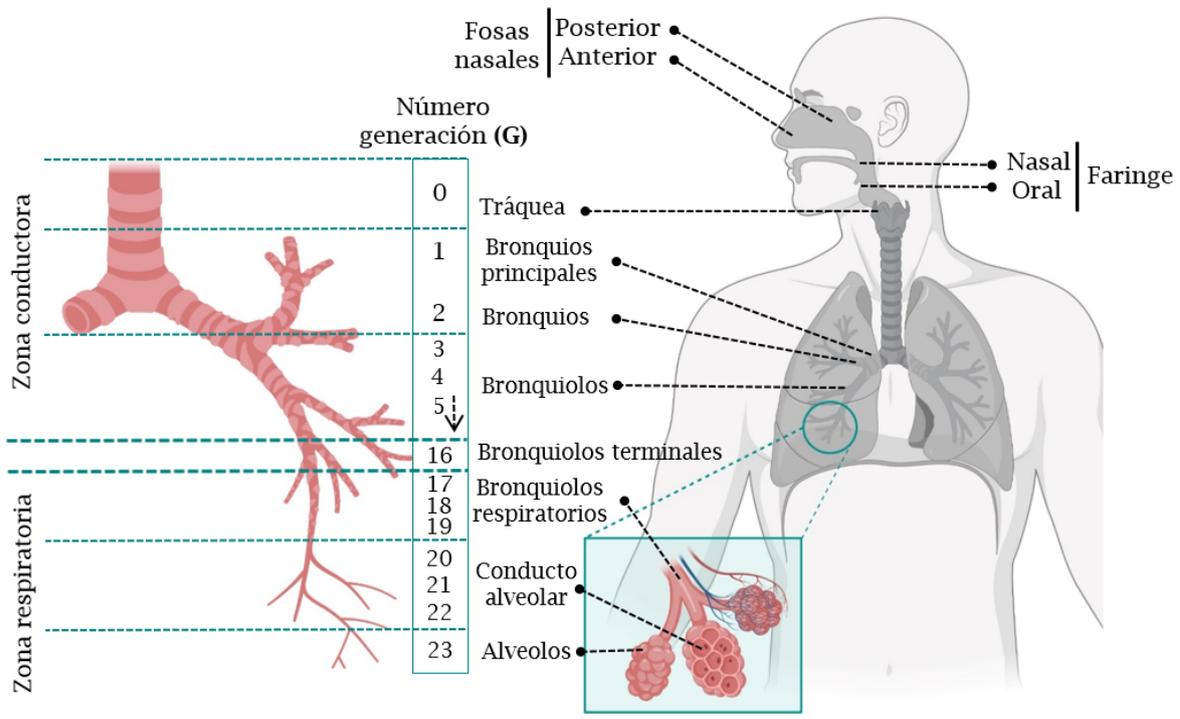
# 1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

## 1.1 Sistema respiratorio

### 1.1.1 Anatomía del tracto respiratorio

Los pulmones poseen unas características anatómicas y un entorno fisiológico únicos, lo que resulta de especial interés en la investigación para el diseño de nuevas estrategias y formulaciones que permitan obtener una administración de fármacos más eficaz utilizando la vía inhalatoria [1].

El sistema respiratorio consta de dos zonas desde el punto de vista funcional. La zona de conducción, compuesta de las primeras 16 generaciones respiratorias (de un total de 23) comprendidas desde la tráquea (generación 0) hasta los bronquiolos terminales [2]. Y, la zona respiratoria, formada por todas las estructuras que forman parte del intercambio gaseoso, comenzando por los bronquiolos respiratorios hasta llegar a los alveolos (*Figura 1.1*) [3].



**Figura 1.1.** - Estructura fisiológica de los pulmones con zona de conducción (G0 - G16) y zona respiratoria (G17 - G23) (figura adaptada de Guo *et al.*, [3]).

La composición celular de la barrera epitelial cambia dependiendo de la región del sistema respiratorio. El epitelio traqueo-bronquial tiene un recubrimiento compuesto predominantemente por células cilíndricas ciliadas, células caliciformes secretoras de moco y células basales. Por ello, en el epitelio bronquial, las sustancias depositadas deben atravesar una distancia de unas 30 - 40  $\mu\text{m}$ , además de una capa mucosa antes de llegar al torrente sanguíneo [4].

En la zona alveolar existen dos tipos celulares, las células escamosas tipo I que cubren el 95% de la superficie alveolar, son grandes y extremadamente delgadas [5]. Las células tipo II (secretan surfactante pulmonar, lípido y proteínas), son de menor tamaño y tienen forma de cubo [6]. El grosor del epitelio alveolar en la mayoría de las regiones se sitúa entre 0,1 - 0,2  $\mu\text{m}$ , dando como resultado una distancia aproximada entre el epitelio y el torrente sanguíneo de 0,5 - 1,0  $\mu\text{m}$  [7]. Cabe destacar además, la gran superficie alveolar disponible, entre 80 y 140  $\text{m}^2$  dependiendo de la distensión del pulmón, la cual favorece una absorción de fármacos más eficiente [8].

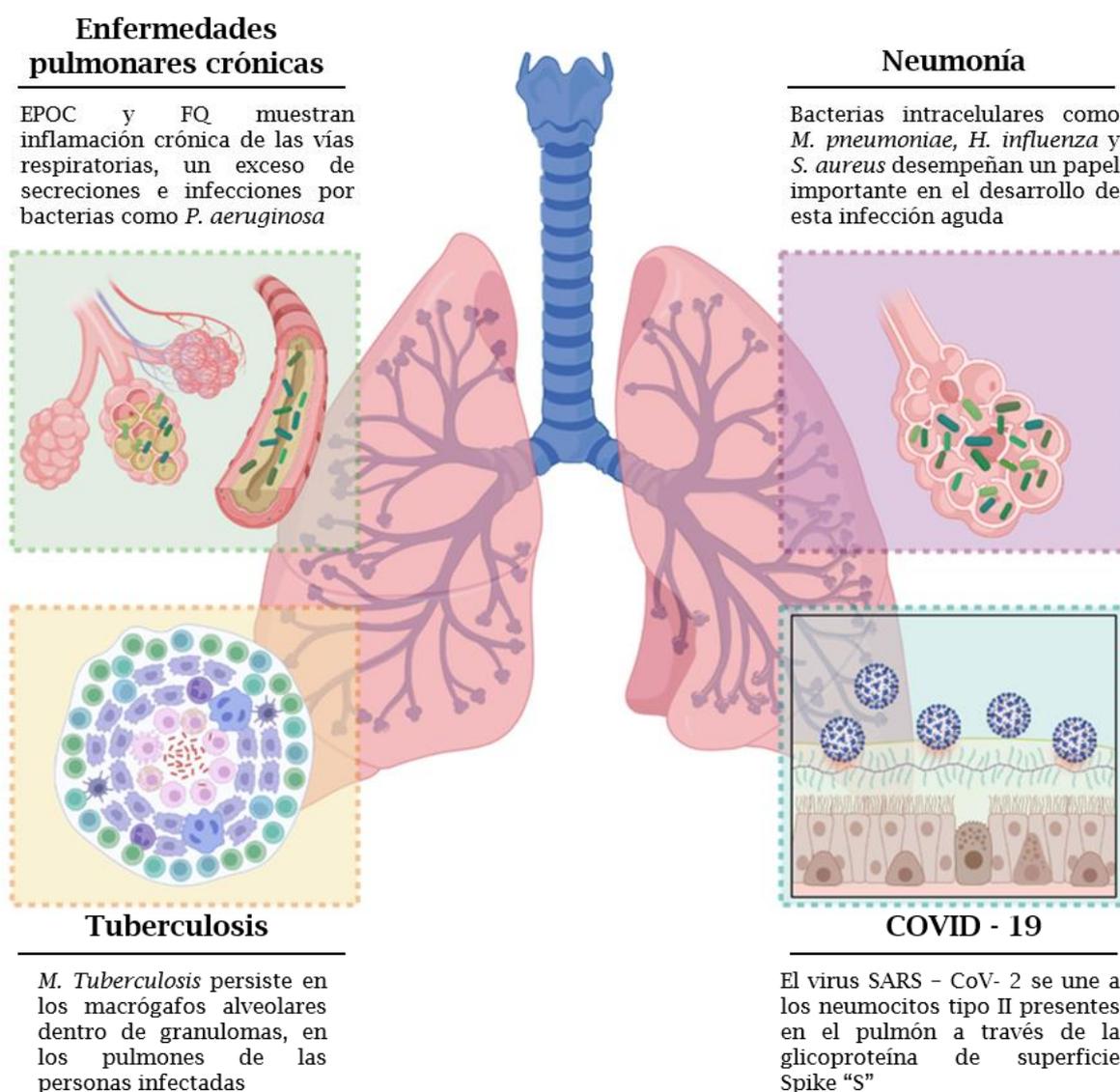
### 1.1.2 Enfermedades respiratorias

Las enfermedades respiratorias son frecuentes y son responsables de casi 6 millones de muertes cada año, siendo uno de los mayores problemas de salud pública a nivel global [9]. Este tipo de patologías pueden ser tanto agudas como crónicas y, en la mayoría de los casos, no es posible recuperar por completo la función pulmonar una vez finalizado el tratamiento. Algunas de estas enfermedades son, fibrosis quística (FQ), neumonía, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, tuberculosis o COVID-19 [10].

Entre todas ellas destaca la EPOC, siendo la tercera causa de defunción en el mundo, lo cual supuso un 6% del total de muertes a nivel mundial con 3,23 millones fallecimientos en el año 2019 [11], seguida de las infecciones en el sistema respiratorio que representan la cuarta causa de fallecimiento a nivel global. Aunque se logró reducir la cifra de fallecimientos por infecciones respiratorias de manera considerable en el año 2019 (2,6 millones de muertes), la pandemia generada por el virus SARS-CoV-2 ha hecho que esta cifra se

incremento notablemente en estos dos últimos años [12]. Los datos reportados por la OMS en el mes de mayo de 2022 indican que este virus ha infectado a más de 525 millones de personas y ha provocado más de 6,30 millones de muertes en todo el mundo [13].

En la *Figura 1.2* se muestran las principales infecciones a nivel pulmonar. A continuación, se describen brevemente la fibrosis quística, neumonía y EPOC, por su relación con las bacterias objetivo de los tratamientos estudiados en esta Tesis Doctoral (*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*).



**Figura 1.2.** – Infecciones pulmonares producidas por distintos patógenos (figura adaptada de Huang *et al.*, [14]).

### 1.1.2.1 Fibrosis Quística (FQ)

La Fibrosis Quística es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva. Se caracteriza por la presencia de una mutación en el gen regulador de la proteína CFTR (conductancia transmembrana de la fibrosis quística) localizado en el cromosoma 7 [15]. Esta enfermedad afecta a cerca de 70.000 personas en el mundo y aproximadamente 8.500 - 10.000 personas son diagnosticadas de FQ al año. Aunque es una enfermedad multi-sistémica, la principal causa de mortalidad y morbilidad en pacientes es la progresión de la enfermedad en el sistema pulmonar [16].

En el caso de los pacientes con FQ, la mutación de la proteína CFTR da lugar a un transporte ineficaz de los iones a través de la membrana pulmonar, provocando desequilibrio iónico, deshidratación y dificultades en la eliminación de la mucosidad, lo que provoca una acumulación de las secreciones en las vías respiratorias causando obstrucción bronquial [17]. La presencia de moco espeso en las vías respiratorias favorece el desarrollo de infecciones por numerosas especies bacterianas como *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenza*, al mismo tiempo que infecciones causadas por patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, la cual puede desarrollar biofilms [18]. Tras la cronificación de esta infección, la recuperación es difícil debido a que se produce una respuesta inflamatoria persistente, causando daño en el tejido y provocando la pérdida de la función pulmonar [19].

Las terapias más efectivas se centran en la erradicación de los biofilms formados pero, la escasa capacidad de los antibióticos para introducirse en su interior contribuye a rebajar la dosis efectiva a la que se ven expuestas las bacterias, derivando en un aumento de resistencias bacterianas y favoreciendo la aparición de exacerbaciones clínicas [20,21]. Los antibióticos para el tratamiento de la FQ pueden administrarse por vía oral, intravenosa o inhalatoria. Tobramicina, aztreonam y colistimetato de sodio (pro-fármaco de la colistina) están comercializados para administración inhalatoria, representando una alternativa a la administración oral e intravenosa [22].

### 1.1.2.3 Neumonía

La neumonía es una infección de los pulmones o del parénquima pulmonar, frecuente en la población infantil y geriátrica, y es responsable de la muerte de 3 millones de personas al año en el mundo [23].

Puede ser causada por bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. También puede ser causada por virus, siendo los más frecuentes rinovirus, adenovirus, influenza y virus respiratorio sincitial [24]. Aproximadamente un 20% de las neumonías son infecciones mixtas entre bacterias y virus, y tienden a ser infecciones más severas que las producidas solo por bacterias [25]. Para que se desarrolle una neumonía, alguno de los patógenos comentados anteriormente debe llegar a los alveolos, multiplicarse e incitar una respuesta inflamatoria en el hospedador, produciendo fiebre, liberación de neutrófilos, fallo pulmonar y en ocasiones, el fallecimiento del paciente [26,27].

En los pacientes con neumonía severa, el tratamiento antimicrobiano debe administrarse lo antes posible. Típicamente se basa en la administración intravenosa de  $\beta$ -lactámicos (ceftriaxona, cefotaxima y ampicilina/sulbactam) junto con macrólidos (azitromicina) o la administración inhalatoria de fluoroquinolonas (levofloxacino o ciprofloxacino) [28]. Junto a los antibióticos también se administran terapias adyuvantes con el objetivo de paralizar la respuesta inflamatoria, siendo los corticoides los fármacos más usados [29].

### 1.1.2.3 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica es una inflamación crónica que conduce a un estrechamiento irreversible de las vías respiratorias inferiores (predominantemente en los bronquiolos) produciendo la destrucción de la pared alveolar (enfisema), a diferencia del asma que es una inflamación reversible que afecta a todas las vías respiratorias [30].

Aunque el humo del tabaco es la primera causa, también puede desarrollarse por inhalación de gases procedentes de la contaminación atmosférica, exposición a polvo y vapores químicos, así como por otras patologías como asma, bronquitis crónica o infecciones respiratorias [31]. Los pacientes con EPOC sufren cambios estructurales en las vías respiratorias centrales y periféricas, en el parénquima pulmonar y en los vasos sanguíneos, todo ello debido al resultado de la activación innata de las células inmunitarias por el proceso inflamatorio ocurrido en los pulmones [32].

Además, se produce una hipersecreción mucosa crónica que contribuye a la progresión de la enfermedad y favorece la colonización de bacterias al mismo tiempo que actúa como “barrera” bloqueando el paso de fármacos [33]. Todo ello hace que los pulmones sean más susceptibles de sufrir infecciones que derivan en procesos de inflamación, irritación y congestión de las vías respiratorias. Entre las principales bacterias causantes de estas infecciones se destacan *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* [34].

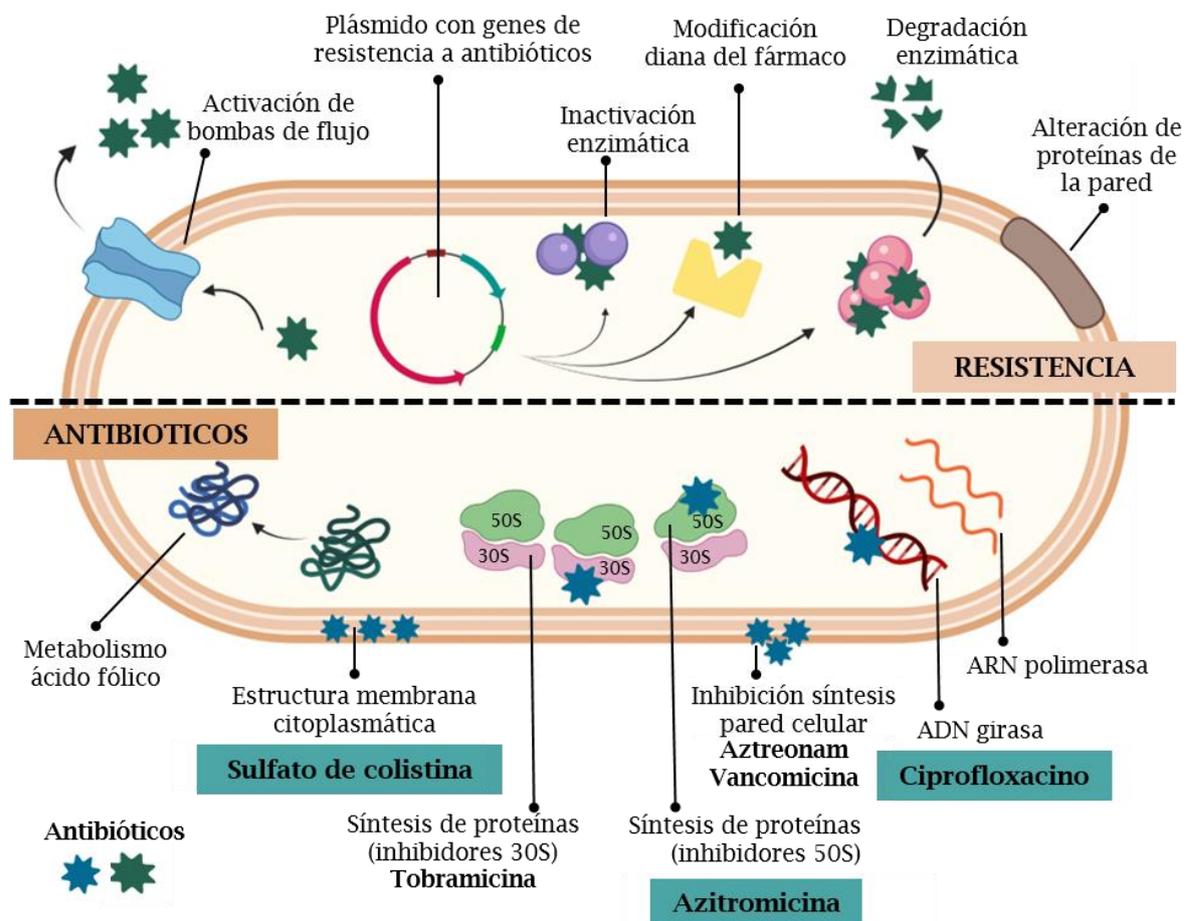
La terapia actual contra la EPOC se puede englobar en tres grupos principales de fármacos [35]: (1) Antiinflamatorios, glucocorticoides y otros fármacos con actividad antiinflamatoria por vía inhalatoria; (2) Antibióticos y antivirales, solo para aquellos pacientes que desarrollen infección; o (3) Terapia de soporte, como son broncodilatadores, terapia con oxígeno y ventilación.

### **1.1.3 Principales antibióticos empleados como tratamiento en enfermedades pulmonares**

El éxito clínico del tratamiento frente a infecciones respiratorias depende entre otros factores de la biodisponibilidad y absorción de los agentes antimicrobianos en el parénquima pulmonar, las cuales pueden reducirse de forma importante cuando se suministran por vía oral o sistémica [36]. Este hecho favorece la potencial aparición de resistencias antimicrobianas en el paciente [37]. En 2019 la resistencia a antibióticos produjo 1,27 millones de fallecimientos directos y casi 5 millones de manera indirecta. Entre los seis patógenos que han desarrollado mayor resistencia se destacan: *E. coli*, *S. aureus*,

*K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, siendo la mayoría de ellos capaces de causar infecciones pulmonares [38].

Entre los antibióticos comercializados para administración oral o intravenosa, los aminoglucósidos (tobramicina), monobactámicos (aztreonam), glicopéptidos (vancomicina), polimixinas (colistina), fluoroquinolonas (ciprofloxacino) y macrólicos (azitromicina) han sido los más estudiados para inhalación, mostrando resultados variables y, al mismo tiempo, muy prometedores [39]. En la *Figura 1.3* se describen los principales mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias y el mecanismo de acción de los principales antibióticos empleados por vía inhalatoria [40].



**Figura 1.3.** – Mecanismos principales de resistencia desarrollados por las bacterias frente a la acción de los agentes antimicrobianos. En azul se encuentran señalados los antibióticos empleados en esta Tesis Doctoral (figura adaptada de Spirescu *et al.*, [40]).

A continuación, se describen en mayor detalle aquellos antibióticos empleados a lo largo de esta Tesis Doctoral: Ciprofloxacino (Capítulos 4 y 5); Sulfato de Colistina (Capítulo 6) y Azitromicina (Capítulo 7).

#### 1.1.3.1 Ciprofloxacino (CPX)

El ciprofloxacino es un antibiótico semisintético perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas debido a la incorporación del átomo de flúor (F) en su estructura [41] (*Tabla 1.1*). Presenta un perfil solubilidad - pH en forma de “U”, es decir, una alta solubilidad a pH <5 y > 10, y una solubilidad mínima cerca de su punto isoeléctrico, dificultando su clasificación dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica<sup>a</sup> (BCS; *Biopharmaceutical Classification System*). Sin embargo, la mayoría de los autores lo clasifican como un fármaco de clase IV, es decir, baja solubilidad y baja permeabilidad [42].

Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de las enzimas bacterianas ADN girasa (Topoisomerasa II) y la Topoisomerasa IV, evitando que el ADN bacteriano se desenrolle y se duplique, provocando la muerte celular [43]. Es un antibiótico de amplio espectro con actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [44]. Para alcanzar su diana, las quinolonas deben atravesar la pared celular y la membrana plasmática en las bacterias Gram-positivas. En el caso de las bacterias Gram-negativas tienen que cruzar una membrana externa adicional, lo que aumenta el riesgo de desarrollo de resistencias antimicrobianas inducidas por el incremento de actividad en las bombas de flujo presentes en la membrana bacteriana y por procesos de captación celular [45].

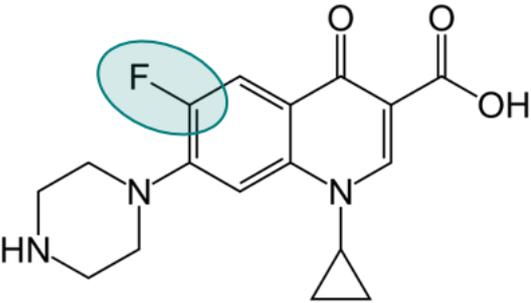
La administración del ciprofloxacino se realiza por vía oral (más común), intravenosa, ocular o inhalatoria. Sin embargo, su biodisponibilidad es

---

<sup>a</sup> El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) es un método empleado para clasificar las sustancias farmacológicas en función de su solubilidad acuosa a tres pH diferentes y su permeabilidad intestinal. Las sustancias se clasifican en cuatro grupos: Clase I (alta solubilidad - alta permeabilidad); Clase II (baja solubilidad - alta permeabilidad); Clase III (alta solubilidad - baja permeabilidad); Clase IV: baja solubilidad - baja permeabilidad) [454]

relativamente baja cuando se administra por vía oral, ya que tiene una alta metabolización en el sistema gastrointestinal, produciendo efectos adversos como náuseas y anorexia. La administración intravenosa es otra alternativa, pero también genera efectos secundarios, los más comunes son rubefacción o flebitis [46]. Por ello, la inhalación en el tratamiento de infecciones pulmonares podría ser una vía de administración interesante para superar las limitaciones presentadas por su suministro por vía oral y sistémica. Actualmente, se encuentra en fase de estudio clínico la administración de ciprofloxacino por vía pulmonar tanto en forma de nebulizado (Pulmoquin™, Linhaliq™) como en forma de polvo seco (Cipro®) [47] (Sección 1.4).

**Tabla 1.1** – Ciprofloxacino: (A) Estructura molecular. En azul se encuentra señalado el grupo que con el átomo de flúor (F) característico de las fluoroquinolonas; (B) Propiedades físico - químicas (información de la base de datos PubChem®).

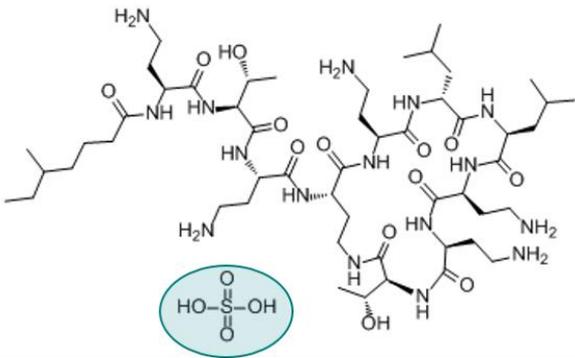
A. Estructura molecular	B. Propiedades físico - químicas		
	Fórmula molecular	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	
	Peso molecular	331,34 g/mol	
	Punto de fusión	315 - 322 °C	
	Descomposición	255 °C	
	Forma	Sólido cristalino	
	pKa	6,16 y 8,62	
	<b>Solubilidad (25 °C)</b>		
	Etanol, acetona, DMSO, cloroformo	Insoluble	
	Agua pH 7,5	1 mg/mL	
Agua con HCl (0,1N)	35 mg/mL		

### 1.1.3.2 Sulfato de colistina (CLS)

El sulfato de colistina es un antibiótico del grupo de los polipéptidos, el cual incluye diferentes polimixinas. Sin embargo, únicamente la polimixina B y E tienen aplicación en clínica. La polimixina E (CLS) es una mezcla de decapeptidos, polimixina E1 (colistina A) y polimixina E2 (colistina B) [48].

La colistina se clasifica en BCS como un fármaco de clase IV, por su baja permeabilidad y solubilidad [49]. Debido a su elevado peso molecular y sus propiedades catiónicas a pH fisiológico la colistina atraviesa mal las membranas fisiológicas y se distribuye principalmente en el espacio extracelular. Además, se elimina parcialmente por vía renal, por lo que la dosis administrada debe adaptarse en base a la función renal del paciente [50]. Su estructura molecular, así como sus principales propiedades físico - químicas se recogen en la *Tabla 1.2*.

**Tabla 1.2** - Sulfato de colistina: **(A)** Estructura molecular. En azul se encuentra señalado el grupo sulfato con el átomo de azufre (S); **(B)** Propiedades físico - químicas (información obtenida de la base de datos PubChem®).

A. Estructura molecular	B. Propiedades físico - químicas	
	Sinónimos	Polimixina E
	Fórmula molecular	$C_{52}H_{98}N_{16}O_{13}$
	Peso molecular	1253,53 g/mol
	Punto de fusión	200 - 220 °C
	Forma	Sólido amorfo
	pKa	10,23 y 11,57
	<b>Solubilidad (25 °C)</b>	
Etanol, acetona, DMSO, cloroformo	Insoluble	
Agua	~ 50,0 mg/mL	

Las polimixinas muestran un efecto bacteriostático dañando la membrana externa y provocando la muerte celular bacteriana. Además, este grupo de antibióticos son selectivos hacia bacterias Gram-negativas, teniendo como diana de acción el componente principal de la membrana celular, el lipopolisacárido (LPS) [51]. Este LPS tiene numerosas cargas negativas que se unen mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas a las polimixinas cargadas positivamente desplazando los cationes divalentes ( $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ), encargados de estabilizar la membrana bacteriana. Como resultado, se produce

un incremento de la permeabilidad de la membrana externa y las polimixinas acceden al espacio periplásmico [52,53].

La colistina es de gran importancia en el tratamiento de infecciones nosocomiales graves, incluida la neumonía provocadas por bacterias Gram-negativas, como *Acinetobacter spp.*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* Puede ser administrada por vía tópica, vía sistémica (vía principal) e inhalación [54]. Aunque posee una fuerte actividad antimicrobiana frente a infecciones respiratorias causadas por bacterias Gram-negativas multi-resistentes, el sulfato de colistina se encuentra en la última línea de tratamiento y su principal vía de administración es la vía sistémica [55]. Sin embargo, la dosis actualmente empleada por esta vía de administración no consigue que la concentración de sulfato de colistina que alcanza los pulmones sea suficiente para tratar infecciones pulmonares [56]. Además, su administración requiere vigilancia y monitorización debido a la estrecha ventana terapéutica que posee este antibiótico [57]. Aproximadamente, un 60% de los pacientes sufren nefrotoxicidad, lo que resulta un factor limitante en su administración [58]. Asimismo, la administración de altas dosis también puede generar neurotoxicidad [56].

Debido a que el sulfato de colistina requiere elevadas concentraciones en el sitio de acción, la administración por vía inhalatoria podría ayudar a lograrlo, reduciendo la exposición sistémica y los efectos secundarios [59]. Por ello existen presentaciones de este antibiótico para su administración por vía inhalatoria tanto en forma de nebulizador (Promixin<sup>®</sup>, ColiFin<sup>®</sup>, Colomycin<sup>®</sup>) como en forma de polvo seco (Colobreathe<sup>®</sup>) (Sección 1.4).

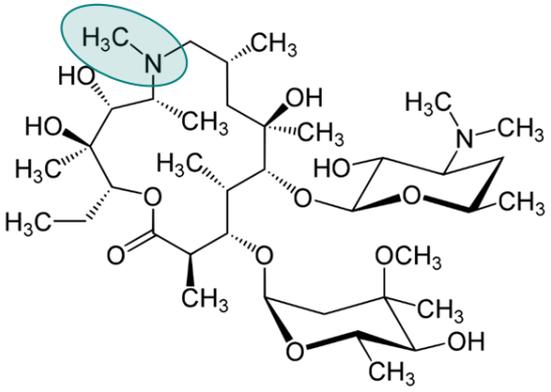
#### 1.1.3.3 Azitromicina (AZT)

La azitromicina es un antibiótico semisintético perteneciente al grupo de los macrólidos [60]. La azitromicina tiene una carga positiva extra debido a la incorporación de un átomo de nitrógeno que sustituye a un metilo en el lugar del grupo carbonilo situado en la posición 9a del anillo de aglicona (*Tabla 1.3A*). Esta modificación produce un incremento del tiempo de vida media del fármaco

en el suero sanguíneo, una mayor capacidad de penetración en los tejidos, un menor número de efectos secundarios y una actividad antimicrobiana de amplio espectro [61], sin embargo presenta baja solubilidad en medio acuoso y baja permeabilidad [62].

La azitromicina es un fármaco de clase II/IV según el BCS, es decir, se caracteriza por presentar una baja solubilidad acuosa y/o permeabilidad [62,63]. Se encuentra principalmente en su forma hidratada y se caracteriza por su limitada solubilidad en agua y una mayor estabilidad en medios ácidos [64] (*Tabla 1.3B*).

**Tabla 1.3** - Azitromicina: **(A)** Estructura molecular. En azul se encuentra señalado el átomo de nitrógeno que sustituye a un metilo y que permite diferenciar la azitromicina de la eritromicina; **(B)** Propiedades físico - químicas (información obtenida de la base de datos PubChem®).

A. Estructura molecular	B. Propiedades físico - químicas		
	Fórmula molecular	C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>	
	Peso molecular	749,0 g/mol	
	Punto de fusión	124 - 128 °C	
	Descomposición	250 °C	
	Forma	Sólido cristalino	
	pKa	8,1 y 8,8	
	<b>Solubilidad (25 °C)</b>		
	Etanol, acetona, DMSO, cloroformo	~ 100 mg/mL	
Agua	~ 0,0024 mg/mL		

Los macrólidos son fármacos bacteriostáticos, cuyo mecanismo de acción consiste en la unión reversible al sitio P presente en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano [65]. La azitromicina se acumula en los fagocitos, lo que permite alcanzar una mayor concentración en el sitio de infección, produciendo un rápido aclaramiento plasmático y una extensa distribución en los tejidos [66]. Entre sus otras acciones antibacterianas, podemos destacar su capacidad para inhibir el quorum-sensing, reducir la formación de biofilms y

suprimir la producción de factores de virulencia bacterianos [60]. La azitromicina también posee efecto antiinflamatorio, siendo capaz de suprimir los signos de la inflamación y reducir los niveles de numerosos factores pro-inflamatorios [67].

La azitromicina ha sido aprobada por la FDA (FDA; *Food and Drug Administration*) para el tratamiento de neumonía (primera línea de tratamiento), EPOC y asma. Sus principales vías de administración son oral o intravenosa [68]. Aunque por lo general es efectiva, su administración intravenosa unido a su baja solubilidad en medio acuoso hace que la biodisponibilidad en los pulmones sea baja, y por tanto, se necesite suministrar una mayor dosis derivando en la aparición de efectos secundarios como malestar gastrointestinal o pérdida auditiva [69].

Recientemente, diversos estudios han evaluado la posibilidad de administrar azitromicina junto con hidroxiclороquina para el tratamiento de la COVID-19 [70-72]. La azitromicina posee dos características que la hacen una buena candidata para la terapia frente a este virus [73]. La primera es que tiene propiedades fisicoquímicas favorables, es un fármaco con alta liposolubilidad ( $\log P=3,03$ ) que puede acumularse en el compartimiento celular, considerándose un agente lisosomotrópico <sup>b</sup> [74]. En segundo lugar, tiene un efecto antiinflamatorio, promoviendo una reducción de la inflamación derivada de la infección [75].

Actualmente no hay ninguna formulación diseñada de azitromicina para inhalación, pero por todos los motivos comentados anteriormente, la administración directa de la azitromicina a los pulmones podría ser una buena alternativa frente a los tratamientos actuales.

---

<sup>b</sup> Un agente lisosomotrópico significa que la azitromicina es suficientemente lipófila para introducirse en las células y al mismo tiempo, es una base débil que se protona a valores de pH bajos. Esto favorece que se quede atrapada en el interior de los lisosomas, desestabilizando su membrana y bloqueando sus funciones [455]

## 1.2 Terapias inhaladas

### 1.2.1 Ventajas e inconvenientes de la vía de administración inhalatoria

Como se ha visto, la administración directa del fármaco en las vías respiratorias es una opción atractiva para el tratamiento de enfermedades pulmonares como la EPOC o las infecciones respiratorias [76]. La administración inhalatoria permite que la relación concentración/dosis en el sitio de acción sea máxima en comparación con otras vías (oral o intravenosa) [77]. Además, es la forma de suministro más adecuada para lograr una concentración de fármaco eficiente en las vías respiratorias distales [78]. Las principales ventajas e inconvenientes de esta vía de administración se encuentran recogidas en la *Tabla 1.4*.

**Tabla 1.4** – Ventajas y desventajas de la vía de administración pulmonar [78,79].

Ventajas	Desventajas
Ruta de administración no invasiva	La estructura de las vías respiratorias actúa como un filtro reteniendo partículas
Superficie alveolar grande (100 m <sup>2</sup> ) que favorece una mejor absorción de fármacos	El proceso de absorción se puede ver afectado por la patología del paciente
Extensiva vascularización y barrera epitelial de bajo espesor (1,2 - 0,7 µm). Rápida absorción	Presencia de macrófagos alveolares que pueden eliminar partículas. Estas también pueden ser exhaladas en función de su tamaño
Baja actividad enzimática comparada con otras vías de administración. Biodisponibilidad casi total	Necesidad de dispositivos de inhalación complejos y partículas con propiedades aerodinámicas concretas
Evita el metabolismo de primer paso hepático y la degradación gastrointestinal	Las propiedades de la formulación administrada condicionan su acceso al pulmón
Administración directa en el lugar de acción (en la mayoría de los casos)	Numerosos factores afectan a la reproducibilidad
Posibilidad de administrar dosis de fármaco más bajas	En ocasiones, el manejo de los dispositivos de inhalación puede ser complejo
Reducción de los efectos secundarios	Aclaramiento mucociliar

## 1.2.2 Mecanismos y factores que afectan a la biodisponibilidad de las partículas inhaladas

Si un fármaco aerosolizado se deposita a una dosis subóptima en la zona objetivo o si parte del fármaco termina en una región del pulmón no afectada por la patología a tratar, la efectividad del tratamiento se verá comprometida. La concentración de partículas que se depositan en distintas regiones del sistema respiratorio va a depender principalmente de las propiedades de la formulación y del tracto respiratorio del paciente (*Tabla 1.5*) [80].

**Tabla 1.5** – Principales factores que influyen en la deposición pulmonar de los fármacos.

Características del aerosol	Factores del paciente
<b>Tamaño de partícula</b>	<b>Mecanismo de inhalación</b>
Tamaño	Flujo inspiratorio
Densidad	Volumen inhalado
Carga	Tiempo de apnea
<b>Formulación</b>	<b>Sistema respiratorio</b>
Lipófila	Tipo de enfermedad
Higroscopicidad	Nivel de gravedad (moderado o severo)
<b>Pluma</b>	<b>Inhalador</b>
Velocidad	Aceptación
Duración	Complicación
	Adherencia

### 1.2.2.1 Factores de la formulación que afectan al depósito pulmonar

El **diámetro aerodinámico** ( $d_{aer}$ ), es la característica más importante de la formulación y representa el diámetro que debería tener una esfera de densidad  $1 \text{ g/cm}^3$  para que su velocidad terminal en aire sea la misma que la de la partícula de interés de densidad arbitraria,  $\rho$  (Ecuación 1.1) [81]:

$$d_{aer} = d_g \sqrt{\frac{\rho}{\chi}} \quad (\text{Ec. 1.1})$$

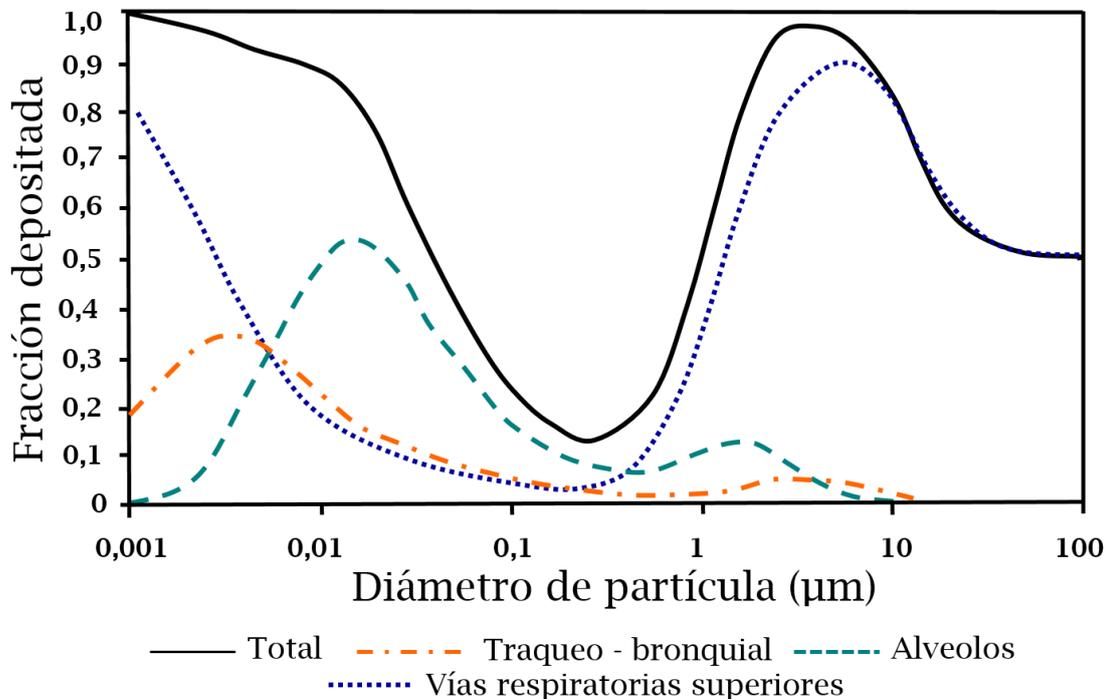
donde  $d_{aer}$  es el diámetro aerodinámico de la partícula,  $d_g$  es el diámetro geométrico,  $\rho$  es la densidad de la partícula y  $\chi$  es el factor dinámico de la partícula que indica su desviación de la forma esférica.

El diámetro aerodinámico influye en cómo las partículas inhaladas se depositan en el sistema respiratorio. El proceso de deposición en las vías aéreas pulmonares se produce principalmente por tres mecanismos: impactación por inercia, sedimentación gravitacional y difusión browniana (*Tabla 1.6*) [82].

Por lo general, las partículas con un mayor diámetro de partícula ( $d_p$ ) ( $d_p > 5 \mu\text{m}$ ) se depositan en las vías respiratorias superiores (boca, tráquea y bronquios) principalmente por un mecanismo de impactación, no son internalizadas por los fagocitos y no tienden a formar agregados pero tras el proceso de inhalación, suelen difundirse hacia la garganta [83]. Las partículas con un  $d_p$  entre  $1\text{-}5 \mu\text{m}$  se depositan en las vías aéreas inferiores por impactación y sedimentación, donde están sujetas a un aclaramiento mucociliar y a un proceso de fagocitosis. Finalmente, las partículas con  $d_p$  entre  $0,1\text{-}1 \mu\text{m}$  se depositan principalmente por movimiento browniano y pueden llegar hasta los alveolos, la mayoría de ellas son resuspendidas en las vías aéreas y posteriormente exhaladas. Están expuestas a procesos de fagocitosis y suelen formar agregados [84,85].

Existen numerosos estudios que tratan de modelar la deposición en las distintas zonas del sistema respiratorio en función del tamaño de las partículas inhaladas. La Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP, *International Commission on Radiological Protection*) presentó un modelo para la deposición de partículas en el tracto respiratorio humano [86] (*Figura 1.4*). Este modelo muestra la deposición de las partículas en las diferentes regiones del tracto respiratorio determinado de manera semi-empírica. Se basa en el uso de valores paramétricos de la deposición inercial y browniana, que al mismo tiempo, dependen del sexo, edad y frecuencia respiratoria, entre otros parámetros [82]. Hinds [87] representó diferentes ecuaciones simplificadas para el depósito de las partículas en las vías respiratorias, alveolar, traqueo - bronquial y vías superiores, basándose en el modelo ICPR. Estas ecuaciones

permitieron calcular la eficiencia del depósito pulmonar de las partículas a partir de este modelo (ICRP), basándose en el promedio de los datos obtenidos tanto de mujeres como de hombres con diferentes actividades físicas y, por tanto, bajo distintas frecuencias respiratorias.



**Figura 1.4.** - Representación de la eficiencia de deposición de las partículas en el tracto respiratorio humano en función del tamaño de partícula según ICRP [86] y Hinds [87].

Por lo general, la deposición de las partículas se ha estandarizado a partir del cálculo de dos parámetros, diámetro medio geométrico, GMD (recomendado para partículas con  $d_p < 1 \mu\text{m}$ ) y diámetro de masa media aerodinámica, (DMMA) (recomendado para partículas con  $d_p > 1 \mu\text{m}$ ) [88]. La *Figura 1.4* representa una estimación de la fracción depositada en función del tamaño. Como se puede comprobar, la región alveolar tiene una fuerte dependencia con el diámetro aerodinámico de partícula. Se espera que las partículas con DMMA entre 0,01-0,1  $\mu\text{m}$  tenga una fracción de depósito alveolar más alta (~ 50%), dando un importante rendimiento de deposición de partículas en las distales del sistema respiratorio. De igual modo, las partículas con un DMMA entre 1-10  $\mu\text{m}$  tendrán una deposición prácticamente total (~ 100%) [89]. Las partículas con un tamaño inferior a 100 nm ofrecen la posibilidad de alcanzar los alveolos de forma

selectiva, ya que la fracción depositada en otras regiones de los pulmones es muy pequeña. Sin embargo, este tamaño de partícula es extremadamente difícil de aerosolizar ya que tienden a aglomerarse [80].

Por otro lado, la **densidad ( $\rho$ )**, es un parámetro que puede afectar al diámetro aerodinámico, en el cual partículas relativamente grandes, pero con un valor de densidad bajo pueden ser inhaladas con éxito y alcanzar la zona distal del tracto respiratorio [90].

**Tabla 1.6** – Correlación entre las áreas de deposición pulmonar, los mecanismos de deposición y el tamaño de partícula.

Localización	Tamaño	Mecanismo predominante
Bronquios primarios	5 - 10 $\mu\text{m}$	Impactación
Bronquios secundarios	1 - 5 $\mu\text{m}$	Sedimentación
Bronquiolos	1 - 3 $\mu\text{m}$	Sedimentación
Alveolos	0,5 - 1 $\mu\text{m}$	Movimiento browniano

La **forma** también va a influir en el comportamiento aerodinámico de las partículas. Se ha reportado que partículas con el mismo diámetro aerodinámico, pero diferente forma, muestran depósitos en diferentes zonas del sistema respiratorio [91], mostrando una mayor toxicidad pulmonar partículas alargadas en comparación con las de forma esférica [92].

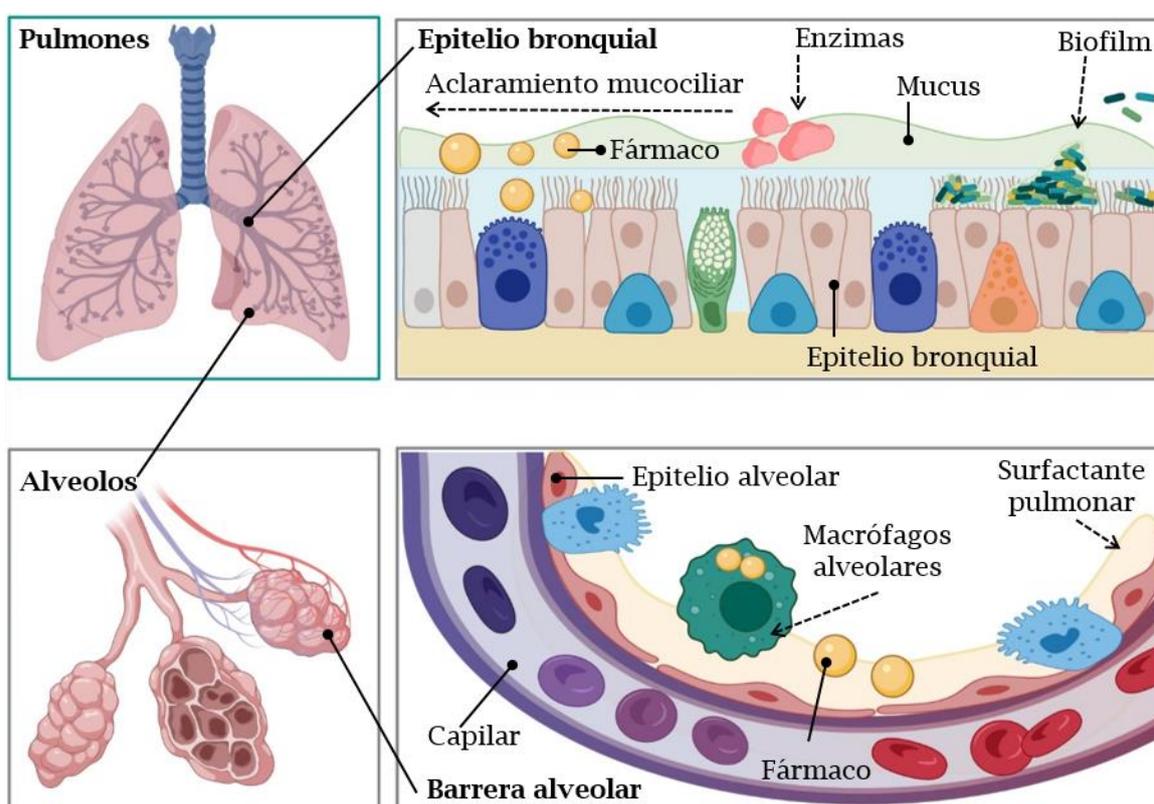
La **rugosidad de la superficie**, en formulaciones en forma de polvo seco, puede influir en las interacciones cohesivas interparticulares y, por lo tanto, en su comportamiento aerodinámico. En general, partículas de mayor rugosidad suelen presentar una mayor tendencia a la aglomeración [93].

La **carga electrostática superficial**, va a favorecer o evitar la adhesión de las partículas a las células o bacterias [94]. Los compuestos lipófilos y las macromoléculas con cargas positivas muestran preferencia por su unión al tejido pulmonar, lo que puede dificultar en ocasiones su capacidad de atravesar la capa mucosa [95]. Hay que tener en cuenta que el valor del potencial  $\xi$  de la superficie de las partículas también va a influir en la aglomeración y

desaglomeración de las partículas y, esto a su vez, puede afectar a sus propiedades aerodinámicas [80].

### 1.2.2.2 Barreras biológicas que afectan a la absorción de fármacos

El sistema respiratorio posee múltiples barreras naturales como la geometría de las vías respiratorias, la humedad, el aclaramiento mucociliar o los macrófagos que dificultan la absorción de fármacos [91]. Además, el desarrollo de infecciones pulmonares puede tener como consecuencia una alteración de la función pulmonar e interferir negativamente en la terapia inhalatoria, evitando la deposición de las partículas en las regiones diana de los pulmones [96] (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** - Procesos biológicos que afectan a la absorción de fármacos administrados por vía inhalatoria: aclaramiento mucociliar, creación de biofilms, acción de macrófagos alveolares, degradación enzimática y surfactante pulmonar (figura adaptada de Selo *et al.*, y He *et al.*, [97,98]).

**Barrera mucociliar:** El aclaramiento mucociliar es uno de los mecanismos más importantes de defensa del pulmón, ayuda a eliminar las partículas y sustancias exógenas inhaladas que son consideradas como extrañas [99]. Consta de una: (1) Capa periciliar, con cilios sobre la superficie apical de las células epiteliales; (2) Capa mucosa, la cual se encuentra por encima de la capa periciliar [100]. Tras el proceso de inhalación, las moléculas o partículas del fármaco quedan atrapadas en la capa mucosa, afectando a su disolución y dificultando su difusión e interacción con la superficie celular [101]. En los bronquiolos terminales hay menor cantidad de cilios y de células productoras de moco, por lo que, al llegar a los alveolos, cualquier sustancia que se deposite será eliminada por fagocitosis mediante los macrófagos alveolares [102].

**Surfactante pulmonar:** Es una mezcla compleja de lípidos (90%) y proteínas producida por las células alveolares tipo II. Su función principal consiste en reducir la tensión superficial durante el proceso de respiración [103]. El surfactante pulmonar influye en la administración de fármacos inhalados ya que produce cambios en la viscosidad del mucus que recubre las vías respiratorias, afectando a la capacidad de adhesión o penetración de las partículas inhaladas [104].

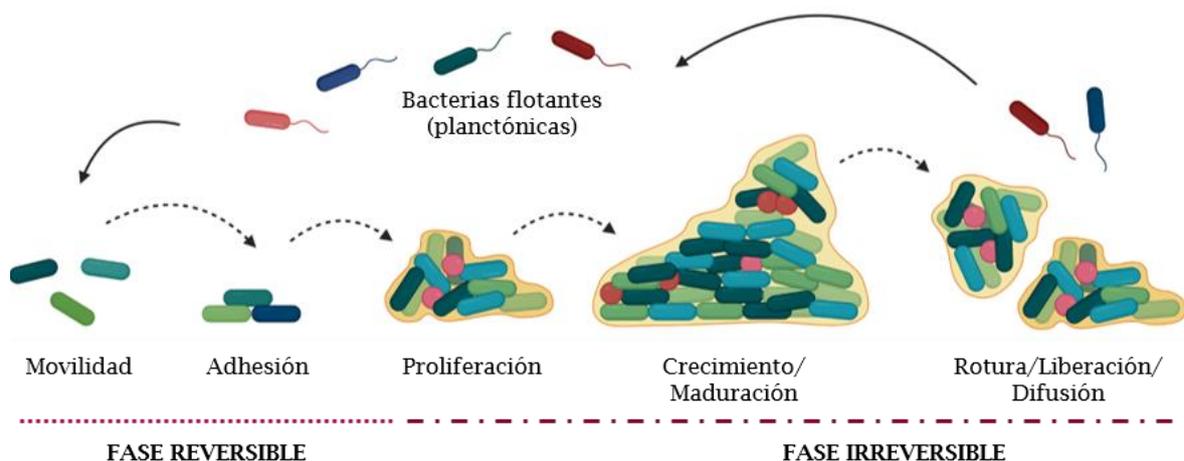
**Células inmunológicas:** La zona de las células alveolares que se encuentra expuesta al aire, está rodeada por macrófagos, los cuales engullen y digieren con gran rapidez las partículas insolubles que se depositan sobre los alveolos actuando como primera línea de defensa celular [105].

**Degradación enzimática:** Aunque la concentración enzimática en el sistema pulmonar es baja, existen varias isoformas del citocromo P-450 que se expresan en los pulmones y que representan la principal enzima de degradación de los compuestos terapéuticos inhalados. También existen peptidasas y proteasas pulmonares que pueden degradar péptidos y proteínas respectivamente [106,107].

**Biofilms:** Aunque no forman parte del tejido pulmonar, suponen una barrera física importante para la absorción de partículas inhaladas. Los biofilms

se caracterizan por tener una alta resistencia tanto a los mecanismos de defensa inmunológicos como a las terapias antimicrobianas. Los biofilms bacterianos son de 10 a 100 veces menos susceptibles a las terapias antimicrobianas que las bacterias planctónicas [108,109]. Se establecen en la capa mucosa del tracto respiratorio y limitan la efectividad de tratamientos por vía sistémica ya que se requieren dosis altas de antibiótico para llegar al tejido pulmonar, provocando el desarrollo de efectos secundarios [110,111].

El desarrollo de biofilms comprende 5 etapas (*Figura 1.6*): En la primera, las células bacterianas se adhieren a la superficie de manera reversible a partir de los apéndices celulares como son los flagelos y los pili Tipo IV [112]. Seguidamente, las células bacterianas experimentan el cambio de unión de reversible a irreversible [113]. En la tercera y cuarta etapa se produce una propagación de las bacterias al interior de la estructura 3D desarrollada (microcolonia), lo que indica el proceso de maduración del biofilm [114]. En la última etapa, el centro de la microcolonia se rompe por un proceso de autólisis que produce la dispersión de las células bacterianas. Las bacterias planctónicas desprendidas comienzan a colonizar nuevas zonas del tracto respiratorio, comenzando de nuevo el ciclo [115].



**Figura 1.6.** – Representación del ciclo de vida del biofilm bacteriano, desde la etapa en la que se adhieren las bacterias planctónicas que flotan libremente su posterior adhesión y formación de la matriz extracelular, hasta la rotura del biofilm y su salida de nuevo al medio.

La dificultad en la erradicación de los biofilms está influenciada por la densidad de la matriz de exopolisacáridos generados por las bacterias que evita la entrada del fármaco en su interior y proporciona una mayor protección contra la inmunidad innata del huésped y los antibióticos [21,116].

### **1.3 Micro y nanomateriales como vectores para el tratamiento de enfermedades pulmonares por vía inhalatoria**

Los vectores de medicamentos empleados en administración inhalatoria tienen como objetivo prevenir la degradación, mejorar la estabilidad, aumentar o evitar la captación celular y favorecer la llegada al sitio de acción de la sustancia activa que transportan (ADN, proteínas, fármacos...), así como lograr una distribución homogénea en la superficie pulmonar objetivo [117].

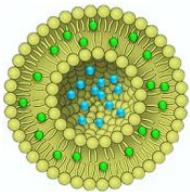
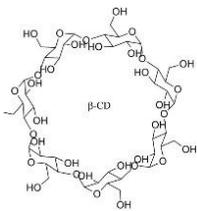
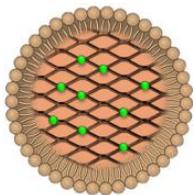
Entre las características que deben tener los sistemas de administración se destaca su biocompatibilidad, biodegradación y elevada estabilidad. Además, la elección del sistema de administración va a depender del tipo de formulación que se quiera desarrollar, la patología objetivo, la molécula o fármaco que se encapsule o transporte y el dispositivo de inhalación que se emplee para su administración final [118]. La *Tabla 1.7* recoge de manera resumida los vectores más usados para administración inhalatoria. Entre ellos cabe destacar las partículas poliméricas. Los polímeros son hoy en día un recurso insustituible para el desarrollo de distintas formulaciones gracias a su amplia versatilidad permitiendo dar respuesta a un amplio rango de aplicaciones [119].

Sin embargo, para lograr una eficacia terapéutica óptima en tratamientos inhalados, la concentración del fármaco en los pulmones debe ser la adecuada. Dicha concentración depende de la deposición pulmonar del fármaco y su posterior liberación, ambos parámetros influenciados por el tipo de formulación diseñada. En el caso de formulaciones basadas en vectores poliméricos, tanto el tipo de partícula desarrollada como la velocidad de degradación del polímero empleado constituirán factores clave [120].

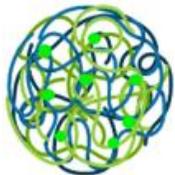
Existen polímeros sintéticos, como el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) o el ácido poli-láctico (PLA), ampliamente usados en la generación de partículas para administración inhalatoria [121,122]. Su producción es sencilla y son vectores efectivos para liberar el fármaco con un perfil sostenido en el tiempo (días o semanas) [127]. Sin embargo, su degradación puede dar lugar a productos como el ácido láctico y el ácido glicólico en el pulmón, con la posibilidad de generar irritaciones a largo plazo. De manera puntual, puede producir respuestas inmunitarias en el pulmón como tos, edema e infiltración de neutrófilos [68]. También se puede producir una acumulación de polímero sintético degradado de manera incompleta en las vías respiratorias causando toxicidad a nivel pulmonar [123].

Una alternativa interesante por su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y escasa toxicidad sería el uso de polímeros naturales como el quitosano, alginato, dextrano, ácido hialurónico o gelatina [106]. Los polímeros naturales a menudo presentan un perfil de liberación del fármaco más rápido, permitiendo concentrar mayores cantidades de antibiótico en el lugar de la infección en un menor periodo de tiempo [124]. Por ello se han seleccionado vectores basados en polímeros naturales para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, en concreto: quitosano (Capítulo 4), dextrano (Capítulo 5) y alginato (Capítulo 6).

**Tabla 1.7** – Principales vectores de administración de fármacos empleados por vía pulmonar.

Sistemas de administración	Composición	Forma	Características	Formulaciones comerciales diseñadas para administración por vía pulmonar
<p><b>Liposomas</b></p> 	<p>Uno o más fosfolípidos dispuestos en forma de bicapa con un espacio interior acuoso [125].</p>	<p>Vesículas en forma de esfera que pueden ser multi- o unilamelares [126].</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Permiten encapsular sustancias hidrofóbicas y lipofílicas</li> <li>· ↓ toxicidad del fármaco</li> <li>· ↑ fármaco en el lugar de acción [127].</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Amikacina (Arikayce®)</li> <li>· Tobramicina (en estudio)</li> <li>· Ciprofloxacino (Lipoquin™ y Pulmaquin™) [128].</li> </ul>
<p><b>Ciclodextrinas</b></p> 	<p>Oligosacáridos cíclicos compuestos por unidades de α - D- glucopiranosas unidas mediante enlaces α-1,4 [129]</p>	<p>Conos truncados huecos con una cavidad hidrófoba interna y una cavidad exterior hidrofílica [129].</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Forman complejos no covalentes con compuestos lipofílicos</li> <li>· ↑ solubilidad del fármaco</li> <li>· ↑ estabilidad</li> <li>· ↑ permeabilidad a través de barreras biológicas (nasal o pulmonar) [130]</li> </ul>	<p>No hay formulaciones comercializadas. Se ha evaluado su efecto en fármacos con ↓ solubilidad:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Budesonida [131]</li> <li>· Itraconazol [132]</li> </ul>
<p><b>Partículas lipídicas sólidas</b></p> 	<p>Dispersión coloidal acuosa de partículas con matriz de lípidos sólidos recubiertas por una cubierta estable de surfactante biodegradable [133]</p>	<p>Forma esférica</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Evitan aclaramiento fagocítico</li> <li>· Fármaco en la matriz</li> <li>· Liberación controlada del fármaco [134]</li> </ul>	<p>Desarrollo de la tecnología PulmoSphere™ que permite la obtención de partículas porosas (1 - 5 μm) con morfología de esponja y monocapa de fosfolípidos [135]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Tobramicina (Tobi® Podhaler™) [136]</li> </ul>

**Tabla 1.7 – (Continuación) Principales vectores de administración de fármacos empleados por vía pulmonar.**

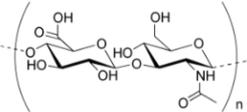
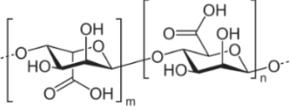
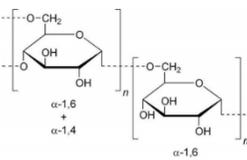
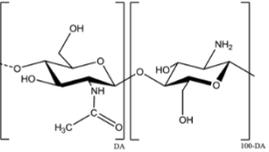
Sistemas de administración	Composición	Forma	Características	Formulaciones diseñadas para administración por vía pulmonar
<b>Partículas poliméricas</b>  	<p>Forma esférica</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· Esferas, matriz polimérica que contiene el fármaco. Se pueden encapsular moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas</li> <li>· Cápsulas con un interior hueco donde se aloja el fármaco rodeado por una delgada capa polimérica</li> </ul> <p>[137,138]</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>· Evitar la resistencia bacteriana</li> <li>· ↑ farmacocinética del fármaco</li> <li>· ↑ biodistribución del fármaco</li> <li>· Liberación sostenida y controlada</li> <li>· ↑ localización en el lugar de acción</li> <li>· Posibilidad de crear modificaciones en la superficie de las partículas</li> <li>· Mucoadhesión</li> <li>· ↑ favorecer la retención del fármaco en el pulmón</li> </ul> <p>[91,139]</p>	<p>No hay formulaciones comercializadas.</p>

### 1.3.1 Sistemas de administración de fármacos basados en polímeros naturales

Los polímeros naturales constituyen un grupo complejo y diverso de biopolímeros aislados de fuentes vegetales (ej. pectina, alginato o goma guar), animales (ej. quitosano o ácido hialurónico) y microbianas (ej. dextrano o goma xanthan). La mayoría de ellos están disponibles en grandes cantidades, son solubles en agua y tienen procesos de extracción sencillos y de bajo coste [140]. Además, gran parte de los biopolímeros presenta propiedades de bioadhesión o mucoadhesión al epitelio pulmonar y las membranas celular debido a los grupos funcionales que poseen [141,142].

De entre todos los biopolímeros existentes se pueden destacar cuatro, por su especial relevancia: ácido hialurónico, alginato, dextrano y quitosano. Los tres últimos han sido empleados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. En la *Tabla 1.8* se encuentra un resumen de sus principales propiedades físico-químicas y biológicas, así como ejemplos de algunos estudios en los que se explora su posible administración por vía inhalatoria contra determinadas dianas terapéuticas.

**Tabla 1.8** – Propiedades de los principales polímeros naturales empleados por vía inhalatoria (tto: tratamiento; GI: gelificación ionotrópica; MPs: micropartículas; NPs: Nanopartícula).

Polímero	Origen	Propiedades físico-químicas	Propiedades biológicas	Ejemplos de formulaciones diseñadas para administración por vía pulmonar
<b>Ácido hialurónico</b> 	Matriz intracelular del tejido conectivo de la mayoría de los vertebrados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carga negativa</li> <li>• Lineal</li> <li>• Soluble en agua</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mucoadhesivo</li> <li>• Biodegradable</li> <li>• Acción sobre receptores CD44*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MPs para el tto de la tuberculosis por <i>spray-drying</i> [143]</li> <li>• MPs con budesonida para el tto asma y EPOC por <i>spray-drying</i> [144]</li> <li>• NPs con dexametona como tto de la inflamación pulmonar por precipitación [145]</li> </ul>
<b>Alginato</b> 	Pared celular de algas pardas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carga negativa</li> <li>• Lineal</li> <li>• Soluble en agua (pKa 3,5)</li> <li>• Conformación dependiente del pH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biodegradable</li> <li>• Biocompatible</li> <li>• Mucoadhesivo</li> <li>• Hemocompatible</li> <li>• No tóxico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MPs Alg/PLGA como tto de la tuberculosis por emulsión y liofilización [146]</li> <li>• MPs para EPOC por emulsión y <i>spray-drying</i> [147]</li> <li>• MPs con paclitaxel como tto del cáncer de pulmón por emulsión [148]</li> </ul>
<b>Dextrano</b> 	Polisacárido exocelular producido por bacterias en ambientes ricos en glucosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carga neutra</li> <li>• Ramificado</li> <li>• Soluble en agua</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mucolítico</li> <li>• Inhibidor adhesión bacteriana</li> <li>• Mucopermeabilidad</li> <li>• Biodegradable</li> <li>• Biocompatible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MPs con camptotecina como tto del cáncer de pulmón por doble emulsión [149]</li> <li>• MPs con budesonida como tto del asma por <i>spray-drying</i> [150]</li> <li>• MPs con insulina como tto de la diabetes por <i>spray-drying</i> [151]</li> </ul>
<b>Quitosano</b> 	Endoesqueletos de cefalópodos y paredes celulares de hongos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carga positiva</li> <li>• Lineal</li> <li>• Insoluble en agua (pKa 6,5)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mucoadhesivo</li> <li>• Biocompatible</li> <li>• Biodegradable</li> <li>• Antimicrobiano</li> <li>• ↑permeabilidad</li> <li>• Apertura uniones celulares</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NPs con isoniazida y piramizina como tto de la tuberculosis por GI [152]</li> <li>• MPs con cisplatino como tto del cáncer de pulmón por emulsión - GI [153]</li> <li>• MPs con salbutamol como tto del asma por <i>spray-drying</i> [154]</li> </ul>

### 1.2.2.1 Alginato

El alginato es un polisacárido aniónico de origen natural que se extrae de la pared celular de las algas pardas de la clase *Phaeophyceae* mediante un tratamiento con disoluciones alcalinas acuosas, normalmente NaOH. El extracto de alginato se filtra y se añade cloruro de sodio o de calcio al filtrado para precipitar el alginato, obteniéndose sal de alginato de sodio o de calcio [155].

La estructura del alginato está formada por ácido  $\alpha$ -L-glucurónico (G) y ácido  $\beta$ -D-manurónico (M), unidos de manera lineal mediante enlaces 1,4-glucosídicos [156]. El alginato tiene la capacidad única de formar hidrogeles mediante reticulación ionotrópica en presencia de cationes divalentes como calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o bario ( $\text{Ba}^{2+}$ ). El proceso de gelificación se produce debido a un mecanismo de dimerización en el que se intercambian los iones de sodio procedentes del ácido glucurónico (bloques G) con los cationes multivalentes. Este mecanismo ayuda al proceso de entrecruzamiento, formando la estructura denominada “caja de huevo” [157].

El alginato es un polímero biodegradable, biocompatible, mucoadhesivo, hemocompatible y no se acumula en el organismo [158]. La mucoadhesividad es directamente proporcional su peso molecular y a la presencia de grupos polares en su estructura. De este modo, el alginato es capaz de formar enlaces por puentes de hidrógeno como resultado de interacciones entre sus grupos carboxilo e hidroxilo con las glicoproteínas presentes en las células pulmonares, mucinas [159]. Se utiliza ampliamente en biomedicina en forma de hidrogeles para la cicatrización de heridas, como sistema de liberación de fármacos y en ingeniería de tejidos [160].

### 1.2.2.2 Dextrano

El dextrano es un tipo de glucano producido por bacterias del género *Leuconostoc*, *Gluconobacter*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* mediante la enzima bacteriana extracelular dextransacarasa en ambientes ricos en sacarosa [161]. La estructura del dextrano está formada por monómeros de glucosa unidos

mediante enlaces lineales  $\alpha$ -1,6-glucosídicos con algún grado de derivación mediante enlaces  $\alpha$ -1,3-glucosídicos [162].

El uso del dextrano como vector de fármacos ofrece ventajas como son solubilidad en agua, estabilidad en amplio rango de pH, biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y protección de los fármacos transportados. La presencia de numerosos grupos hidroxilo en su estructura contribuyen a su carácter hidrófilo, y proporcionan carga superficial negativa disminuyendo su penetración en los tejidos y aumentando el tiempo de residencia en la circulación sistémica [162,163]. En el campo de la biomedicina este polímero ha sido empleado principalmente como anticoagulante porque posee la capacidad de unirse a glóbulos rojos y plaquetas, evitando el proceso de agregación [164]. Debido a estas propiedades, las formulaciones a base de dextrano para la inmovilización de células, transfección de genes y sistemas de liberación de fármacos han sido investigadas con el objetivo de diseñar una amplia variedad de productos farmacéuticos [165].

### 1.2.2.3 Quitosano

El quitosano es un polisacárido presente en la pared celular de hongos y conchas de artrópodos como los crustáceos. Se obtiene a partir de la quitina por un proceso de desacetilación en ambiente alcalino. Tiene una estructura lineal formada por unidades distribuidas aleatoriamente de 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa y 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4 [166]. Las propiedades físico-químicas del quitosano dependen principalmente de su peso molecular y grado de desacetilación [167].

Una de las características principales del quitosano en comparación con otros polímeros, es que posee en sus cadenas numerosos grupos amino libres. En un ambiente ácido, los grupos amino se protonan, dotándolo de carga superficial positiva. Esta carga positiva favorece por un lado la interacción del quitosano con las paredes celulares y bacterianas, ambas con carga negativa [168,169]. Por otro lado, la mucoadhesión del quitosano potenciando el proceso de absorción de fármacos que transporta [170,171]. Por último, y no menos

importante, destacar que esta carga positiva también le confiere propiedades antimicrobianas, facilitando la unión del quitosano a los LPS de la membrana bacteriana, alterando su permeabilidad y provocando su muerte [172]. Por lo tanto, el quitosano es un candidato ideal para el diseño de sistemas de liberación sostenida de fármacos, ya que no solo puede actuar regulando la liberación del fármaco en el tiempo sino que también permite su adhesión al tejido pulmonar [173].

Sin embargo, a pesar de los potenciales beneficios que presentan estos tres biopolímeros para la administración pulmonar de fármacos, hoy en día, no hay ninguna formulación diseñada con ellos en fase de ensayos clínicos [174].

## 1.4 Dispositivos de inhalación

Hoy en día, hay disponibles más de 250 tipos diferentes de inhaladores, formulaciones y cámaras espaciadoras, todos con un mismo objetivo común, mejorar la calidad de vida de los pacientes. Además, la vía inhalatoria puede ejercer un efecto tanto a nivel local (tracto respiratorio) como sistémico [175].

La administración de fármacos directamente al pulmón se logra principalmente mediante la generación de un aerosol que contenga el fármaco, es decir, una suspensión de pequeñas gotas de líquido o partículas sólidas finas dispersas en un gas [176]. Las tres tecnologías más usadas para administrar fármacos por vía inhalatoria son: inhaladores presurizados de dosis medida (pMDIs; *Pressurised Metered Dose Inhalers*), nebulizadores e inhaladores de polvo seco (DPIs; *Dry Powder Inhalers*). La *Tabla 1.9* recoge una comparación entre los tres grupos principales de dispositivos de inhalación [177].

Los pMDIs son dispositivos de inhalación portátiles, multidosis y que constan de un bote de aluminio (depósito) que contiene una suspensión o solución presurizada de partículas de fármaco micronizadas dispersas en un propelente [178]. Un ejemplo de pMDIs es el fármaco salbutamol (Ventolin®), al cual se le pueden acoplar diferentes cámaras espaciadoras de inhalación para

facilitar su administración en población pediátrica y geriátrica y, reducir la deposición del fármaco en la región orofaríngea [179]. Debido a la necesidad de administrar elevadas dosis de antibióticos para lograr un efecto terapéutico óptimo en el pulmón, no se han encontrado formulaciones de antibióticos con pMDIs.

Por otro lado, los nebulizadores son dispositivos de inhalación polivalentes que administran de manera pasiva el fármaco al paciente en forma de solución o suspensión [77]. Los nebulizadores, a pesar de los inconvenientes que presentan (*Tabla 1.9*), siguen siendo la opción principal para muchos grupos de pacientes donde la coordinación de la respiración puede ser difícil de alcanzar (como en los pDMIs). Durante su utilización solo es necesario hacer respiraciones tranquilas sin generar esfuerzos inspiratorios significativos (como en los DPIs) [180]. Las formulaciones diseñadas a partir de antibióticos para administración por nebulización se encuentran recogidas en la *Tabla 1.7* y *1.9*. Se destaca la tobramicina (Tobi®; Bramitob®; Bethkis®) como único antibiótico aprobado como terapia de mantenimiento en pacientes con fibrosis quística que presentan infección por *P. aeruginosa* [181].

El papel fundamental de los inhaladores de polvo seco (DPIs) consiste en dispersar la formulación en forma de polvo en partículas finas (FR; Fracción Respirable) por medios aerodinámicos [182]. Poseen múltiples ventajas frente a dispositivos de inhalación como los nebulizadores (*Tabla 1.9*). Se destaca su alta eficiencia, fácil y rápida administración y una mejor relación coste-efectividad. La administración de los antibióticos en forma de polvo seco es preferible frente a la nebulización, ya que se trata de dispositivos portátiles, tienen tiempos de administración más cortos y no requieren de almacenamiento en frío, ya que la formulación en forma de polvo es mucho más estable [183,184].

**Tabla 1.9** – Comparación de los tres dispositivos de inhalación más comunes en el mercado: inhaladores de polvo seco (DPI), inhaladores presurizados de dosis medida (pMDI) y nebulizadores [177]; (HFA\*, hidrofluoroalcanos).

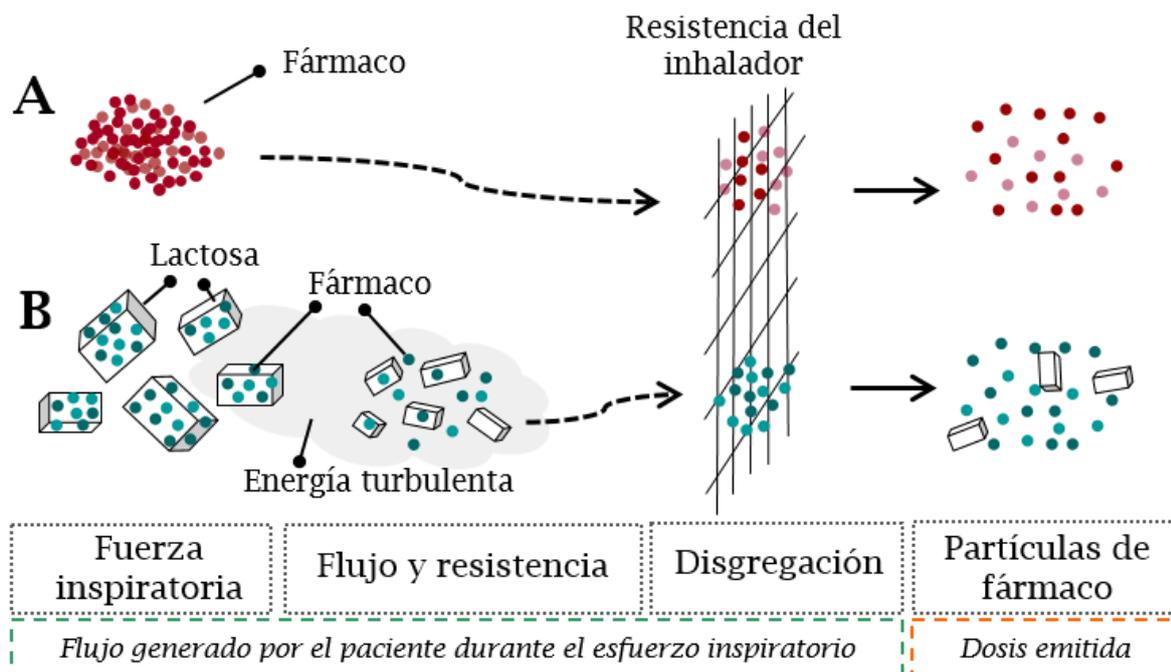
Dispositivos de inhalación	Ventajas	Inconvenientes	Formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de infecciones pulmonares
<b>Presurizados (pMDIs)</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Portátil</li> <li>· Administración rápida</li> <li>· Empleo de cámara espaciadora</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Necesaria la coordinación del paciente</li> <li>· Empleo de HFA* como gas propelente</li> <li>· Dificultad para administrar principios activos insolubles en HFA</li> </ul>	-
<b>Nebulizadores</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Respiración normal del paciente durante el tratamiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Largo tiempo de tratamiento</li> <li>· La dosis administrada no se conoce con exactitud</li> <li>· Los dispositivos son voluminosos y caros</li> <li>· Es necesaria la limpieza tras su uso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Tobramicina: Tobi®; Bramitob®; Bethkis®</li> <li>· Amikacina: Arikace™</li> <li>· Aztreonam: Cayston®</li> <li>· Ciprofloxacino: Pulmaquin™</li> <li>· Colistina: Promixin®</li> </ul>
<b>Polvo seco (DPIs)</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Portátil</li> <li>· Rápida administración</li> <li>· Económico</li> <li>· No requiere la coordinación del paciente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· La humedad acumulada durante el almacenamiento disminuye el rendimiento del aerosol</li> <li>· Es necesario un flujo inspiratorio adecuado</li> <li>· La formulación se encuentra en forma de polvo, lo que puede producir irritación y tos en el paciente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Tobramicina: Tobi® Podhaler™</li> <li>· Ciprofloxacino: Cipro®</li> <li>· Manitol: Bronchitol®</li> <li>· Colistina: Colobreathe®</li> <li>· Vancomicina: AeroVanc™</li> </ul>

### 1.4.1 Inhaladores de polvo seco (DPIs)

Un inhalador de polvo seco es el conjunto formado por la formulación y el dispositivo de inhalación, cuyo principal objetivo es conseguir una adecuada relación entre ambos. La deposición del fármaco en el tracto respiratorio va a depender de las propiedades de la formulación, disgregación, tamaño aerodinámico o dosis emitida y a su vez, todo ello, va a estar directamente relacionado con el inhalador empleado [185]. Los DPIs son sistemas complejos y su rendimiento depende de aspectos técnicos que hay que tener en cuenta a la hora de diseñar la formulación y evaluar el dispositivo de inhalación [186].

Actualmente hay dos tipos de formulaciones para los DPIs (*Figura 1.7*), por un lado, formulaciones formadas únicamente por el fármaco y por otro, formulaciones compuestas por fármaco junto con un portador o excipiente. Las formulaciones sin excipientes tienden a mostrar una dependencia del rendimiento de aerosolización en función de las propiedades físico - químicas del fármaco aerosolizado [187]. Al mismo tiempo, evitan los problemas derivados de la falta de uniformidad de dosis en sistemas híbridos. De este modo, las propiedades de aerosolización dependerán exclusivamente del fármaco o de las partículas que formen parte de la formulación, del inhalador y de la técnica de inhalación [188].

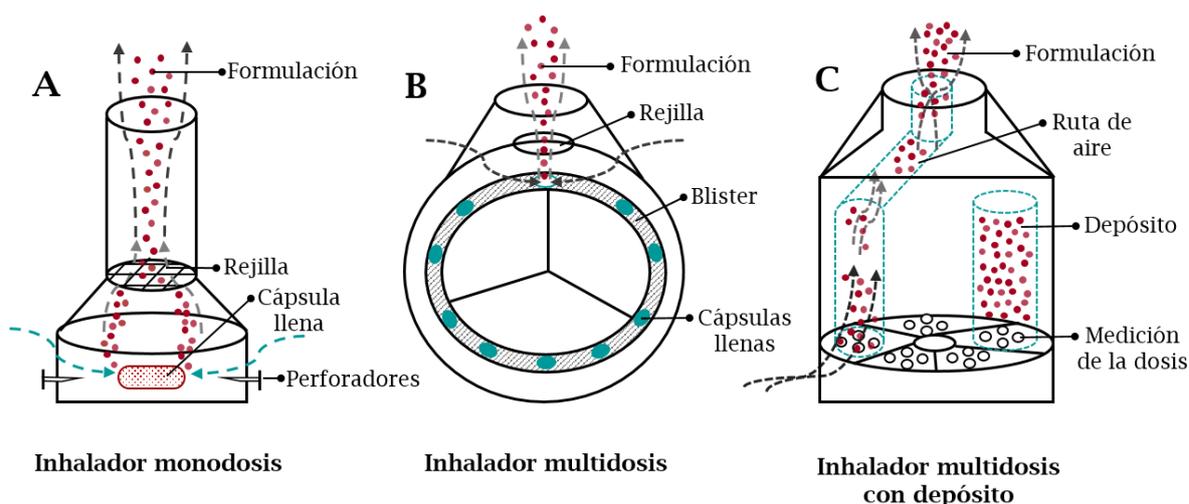
En las formulaciones que incluyen excipientes, el fármaco tiene un tamaño de partícula entre 1-5  $\mu\text{m}$ , mientras que el portador presenta un tamaño  $> 50 \mu\text{m}$ . La función principal del portador es impedir la aglomeración del fármaco, siendo la lactosa el excipiente más empleado. Durante su administración, la inspiración del paciente ayuda a aerosolizar el polvo y separar las partículas de fármaco que se encuentran en la superficie de los portadores, permitiendo que las partículas de fármaco sean capaces de llegar a los pulmones [189]. Estas formulaciones suelen contener menos del 4% de fármaco y son principalmente usadas en asma y EPOC, donde la dosis de tratamiento es del rango de  $\mu\text{g}$  [190].



**Figura 1.7.-** Representación esquemática de las formulaciones más usadas para los DPIs y los factores implicados en el proceso de inhalación: **(A)** Formulación de partículas constituidas únicamente por fármaco; **(B)** Formulación con excipiente (ejemplo: lactosa) y partículas de fármaco (figura adaptada de Lavorini *et al.*,[182]).

Debido a que la terapia inhalatoria de antibióticos requiere grandes dosis terapéuticas (entre 10-100 mg) el empleo de excipientes (como lactosa, manitol, glucosa, leucina o estearato de magnesio) dificulta su administración ya que reduce la cantidad de antibiótico inhalado [191].

Existen tres grandes grupos de dispositivos de inhalación de polvo seco (Figura 1.8) [192]: (1) Inhaladores monodosis (ej. Breezhaler®), donde la formulación se encuentra almacenada en cápsulas individuales de hidroxipropilmetil celulosa o gelatina; (2) Inhaladores multidosis-individuales (ej. Ellipta®), en los cuales la formulación se encuentra en cápsulas, que a su vez están almacenadas en *blisters* dentro del inhalador; (3) Inhaladores multidosis con depósito (ej. Nexthaler®), donde la formulación se encuentra guardada en un depósito y la dosis se dispensa con cada activación.



**Figura 1.8.-** Tipos de inhaladores de polvo seco: **(A)** Inhalador monodosis; **(B)** Inhalador multidosis; **(C)** Inhalador multidosis con depósito. El flujo de aire se muestra con líneas discontinuas (figura adaptada de Ye *et al.*, [192]).

Cada DPI tiene una resistencia al flujo de aire que está relacionada con al diseño físico del dispositivo. Es decir, para cada inhalador es necesario ejercer una fuerza inspiratoria umbral que permita alcanzar el correcto flujo de aire para aerosolizar, disgregar y dispersar la formulación en polvo seco y de esta manera, conseguir una respuesta terapéutica óptima [193]. Los DPIs se pueden clasificar en función de dicha resistencia en, baja (flujo > 90 L/min), media (flujo  $\approx$  50-60 L/min) o alta (flujo < 50 L/min). Los DPIs de alta resistencia (mayor caída de presión a través del dispositivo), tienden a producir una mayor deposición de los fármacos en el sistema respiratorio que aquellos que tienen una menor resistencia [194]. Es importante seleccionar un dispositivo de resistencia adecuada a la patología del paciente, porque la capacidad inspiratoria debe ser suficiente como para superar la resistencia del inhalador y poner las partículas de fármaco en movimiento [195]. Por ello, hoy en día sigue existiendo la necesidad de contar con dispositivos alternativos para la administración de fármacos en fase aerosol a partir de material sólido.

#### 1.4.2 Antibióticos administrados con inhaladores de polvo seco

Numerosos estudios han demostrado que la inhalación de antibióticos es capaz de reducir la frecuencia de exacerbaciones, disminuir de manera significativa la densidad bacteriana en las vías aéreas, mejorar la función

pulmonar y lo que es más importante, mejorar la calidad de vida de los pacientes con infección pulmonar [196].

El hecho de que los inhaladores presurizados de dosis medida (pDMIs) solo puedan administrar de 100 a 200 µg de principio activo en cada dosis y que la mayoría de los nebulizares requieran tiempos de inhalación prolongados incluso para administrar pequeñas cantidades de fármaco, hace que los DPIs sean la mejor opción para la inhalación de antibióticos [197]. Es especialmente interesante el uso de formulaciones sin excipientes, reduciendo la cantidad de polvo inhalado y por consiguiente, los efectos adversos asociados a la administración de altas dosis de polvo (tos y ahogo) [39].

Se han aprobado cuatro antibióticos en Europa para su uso clínico: colistina (poliximina), tobramicina (aminoglucósido), ciprofloxacino (fluoroquinolona) y aztreonam (betalactámico). El ciprofloxacino (fluoroquinolona) se encuentra actualmente en fases de ensayos clínicos. En la *Tabla 1.10* se recogen algunos ejemplos de los ensayos clínicos realizados con antibióticos en forma de polvo seco.

**Tobramicina (Tobi® Podhaler™):** Fue el primer antibiótico investigado para administrar por vía inhalatoria en pacientes con fibrosis quística. En el año 1997 la FDA aprobó el uso de tobramicina por vía inhalatoria con el nombre comercial TOBI® [198]. Este antibiótico ha sido desarrollado con la tecnología PulmoSphere™ (*Tabla 1.7*) y para su administración se emplea el inhalador T-326 de la compañía farmacéutica Novartis [135], capaz de mejorar la aerosolización de la dosis de 200 mg de polvo del cual un 56% es de tobramicina. Debido a la incapacidad de almacenar toda esa masa en una sola cápsula y de respirar todo en una sola inhalación, el polvo se divide en 4 cápsulas cada una con una cantidad de aproximadamente 50 mg. Es necesario repetir el proceso de inhalación cuatro veces para inhalar la dosis de fármaco completa [199]. La incomodidad que genera en el paciente el empleo de múltiples cápsulas con un proceso de inhalación repetido dos veces al día puede afectar a la adherencia al tratamiento [200]. El uso de este antibiótico inhalado es capaz de disminuir la colonización de *P. aeruginosa*, retrasar la

aparición infecciones crónicas, incrementar la función pulmonar y mejorar la calidad de vida de los pacientes [201].

**Colistina (Colobreathe®):** Aunque existen nebulizadores para la administración de este antibiótico, el desarrollo de su formulación en forma de polvo seco tiene como objetivo principal promover una mayor adherencia al tratamiento así como mejorar la calidad de vida de pacientes al acortar el tiempo de administración [202]. Este inhalador contiene el antibiótico micronizado en forma partículas finas en polvo seco, sin empleo de excipientes. Es administrado a través de un DPI (Turbospin®) y la formulación se encuentra en cápsulas individuales que contienen 125 mg de antibiótico. Entre sus ventajas se puede destacar que es un inhalador portátil, que aumenta la cantidad de fármaco administrado al pulmón en comparación con el dispositivo de nebulización, requiere poca limpieza, no necesita mantenimiento y es desechable al final de cada tratamiento (28 días) [203].

**Ciprofloxacino (Cipro®):** Actualmente la administración de este antibiótico en forma de polvo seco sigue en fase de ensayo clínico. La formulación está desarrollada a partir de la tecnología PulmoSphere™ (*Tabla 1.7*). El uso de una formulación basada únicamente en el antibiótico junto con la con el inhalador T-326 de polvo seco (Bayer AG, Alemania) tiene como objetivo la frecuencia de exacerbaciones en pacientes con bronquiectasia y con infecciones respiratorias. El tratamiento se administra dos veces al día durante 28 días (cada cápsula contiene 32,5 mg de ciprofloxacino) [204]. Los estudios farmacocinéticos demuestran que el ciprofloxacino en DPIs produce una mayor concentración en el sistema pulmonar en comparación con su administración oral. Esta formulación ha completado actualmente los ensayos clínicos de fase I, II y III [205] (*Tabla 1.10*).

**Vancomicina (AeroVanc™):** Se trata de una formulación en polvo seco para tratar la neumonía provocada por *S. aureus* resistente a meticilinas (MRSA) en pacientes con fibrosis quística. El aumento de la prevalencia de esta bacteria en las vías respiratorias ha hecho que aumente el interés en el desarrollo de formulaciones con este antibiótico también por nebulización [206].

Actualmente, no existe ningún inhalador comercial con este antibiótico, pero tras mucho tiempo de investigación, la farmacéutica Savara ha desarrollado una formulación inhalable en polvo seco con el nombre de AeroVanc™ (15 mg /cápsula). Diversos estudios preclínicos y clínicos desarrollados han demostrado las ventajas de la administración inhalatoria de la vancomicina logrando una alta concentración de antibiótico en los pulmones y evitando la aparición de los efectos secundarios sistémicos [207,208]. Este fármaco se encuentra en la fase III de estudio clínico (*Tabla 1.10*) [209]. Los resultados obtenidos han demostrado que su administración inhalatoria también puede emplearse en pacientes con fibrosis quística antes y después de un trasplante de pulmón [210].

**Tabla 1.10** – Ejemplos de antibióticos usados en ensayos clínicos mediante formulaciones de polvo seco para el tratamiento de infecciones pulmonares (ND = no hay datos).

Antibiótico	Nombre comercial**	Patología	Formulación	Descripción del ensayo	Fase de estudio*
<b>Ciprofloxacino (CPX)</b>	Cipro® (T - 326)	EPOC	Polvo seco	Seguridad y farmacocinética del CPX tras la inhalación de dosis únicas de 52,5 y 48,75 mg	Fase I NCT01168895
<b>Vancomicina (VMC)</b>	AeroVanc®	Fibrosis quística	Polvo seco	Eficacia y seguridad de la VMC como tratamiento de pacientes con FQ con infección persistente de MRSA	Fase III NCT03181932
<b>Tobramicina (TBM)</b>	Tobra® (T - 326)	Fibrosis quística	Polvo seco	Seguridad de la TBM inhalada en pacientes con infección por <i>P. aeruginosa</i>	Fase III NCT01069705
<b>Tobramicina/Colistina</b>	TOBI® (Podhaler) <i>Colistina</i>	Fibrosis quística	Polvo seco (tobramicina) nebulización (colistina)	Eficacia de la administración conjunta de ambos antibióticos en pacientes con infección por <i>P. aeruginosa</i>	Fase III NCT03341741
<b>Colistina</b>	ND	Neumonía	Suspensión inhalatoria	Eficacia de la administración temprana por inhalación de la colistina en pacientes con infección por Gram-negativa resistente	Fase II y III NCT03622450
<b>Ivermectina (IVM)</b>	ND	Tuberculosis	Polvo seco	Eficacia y seguridad de la IVM para tratar la infección pulmonar por SARS-Cov-2	Fase III NCT04681053
<b>Amikacina</b>	Amikacin Cyclops™	Tuberculosis	Polvo seco	Farmacocinética y tolerancia de la amikacina administrada por inhalación	Fase I NCT0424951

\*La información sobre estos u otros ensayos clínicos pueden encontrarse en: <https://www.clinicaltrials.gov>

## 1.5 Retos de la administración pulmonar y el desarrollo de nuevos dispositivos de inhalación

Aunque las terapias inhalatorias con antibióticos han mostrado un efecto terapéutico máximo para erradicar la infección, siguen existiendo numerosos retos y limitaciones en esta vía de administración:

- *Mejorar la biodisponibilidad y absorción de los fármacos.* Aunque haya un alto grado de vascularización y se produzca una administración directa en el lugar de acción, se requiere que el antibiótico tenga una solubilidad suficiente en medio acuoso [211].
- *Minimizar la degradación de la formulación.* La naturaleza higroscópica de los antibióticos es uno de los principales problemas de los DPIs y de su almacenamiento. Por ejemplo, en el caso de la tobramicina (Podhaler® TOBI®) debe almacenarse en una caja hermética con un desecante inmediatamente después de su uso [212].
- *Lograr un depósito óptimo del fármaco en el sitio de acción.* Es necesario que la dosis administrada se mantenga por encima de la concentración mínima inhibitoria (MIC) tanto tiempo como sea posible. La administración repetida de la dosis puede provocar toxicidad en las células adyacentes a la infección. Por este motivo, se prefiere el uso de antibióticos con efectos dependientes de la concentración, como los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas que permiten alcanzar altas concentraciones en el tracto respiratorio [39].
- *Incorporar nuevos excipientes requiere amplios estudios toxicológicos.* Aunque una sustancia sea considerada segura, la administración pulmonar a largo plazo necesita investigaciones más exhaustivas [213].
- *Escasez de antibióticos aprobados para su suministro pulmonar.* A pesar de que existe una gran variedad de antibióticos disponibles en el

mercado para su administración por vía oral y sistémica y aunque la administración por vía inhalatoria ha demostrado potenciales beneficios clínicos, solo unos pocos antibióticos están aprobados para ser administrados por esta vía de administración para el tratamiento de infecciones pulmonares [214].

Para la innovación y mejora de los DPIs, es importante comprender como se puede controlar la deposición pulmonar y qué características son críticas para ello [215]. Es necesario desarrollar inhaladores más efectivos que no sean dependientes de las fuerzas interparticulares presentes en la formulación, ni de la capacidad inspiratoria del paciente. Al mismo tiempo, es deseable que sean capaces de conseguir dosis altas de partículas de tamaño adecuado a velocidades de flujo bajas (para evitar deposición orofaríngea) y sin empleo de excipientes [216].

Desde la aprobación de la tobramicina para inhalación, se han realizado grandes avances en la administración de antibióticos por vía inhalatoria, especialmente en el tratamiento de los pacientes con FQ. Los avances futuros en este campo permitirán que tanto las nuevas formulaciones como la innovación de los dispositivos de inhalación logren maximizar los beneficios potenciales de la inhalación de antibióticos, reduciendo la toxicidad y la aparición de resistencias antimicrobianas y ofreciendo una mejora de la calidad de vida de los pacientes y una menor aparición de efectos secundarios.

## 1.6 Objetivos

En este contexto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y optimización de formulaciones en forma de polvo seco para ser empleadas en el dispositivo de generación de aerosoles UNIZAR previamente desarrollado en la [Universidad de Zaragoza](#) para estudios relacionados con la exposición laboral a nanopartículas.

Para lograr este objetivo principal, se han establecido una serie de objetivos secundarios los cuales se especifican en cada capítulo. A fin de facilitar el seguimiento de esta memoria, se detallan también a continuación:

*1. Validación del dispositivo de generación de aerosoles UNIZAR, con formulaciones comerciales en polvo seco*

Evaluar la capacidad del dispositivo de generación de aerosoles UNIZAR para producir aerosoles a partir de formulaciones en polvo seco de diversos inhaladores comerciales.

*2. Producción y caracterización de partículas en forma de polvo seco basadas en biopolímeros*

Desarrollar formulaciones en forma de polvo seco aptas para su aerosolización. Para ello se han utilizado tres técnicas diferentes, electropulverización, gelificación/precipitación y atomización, tres biopolímeros diferentes, quitosano, dextrano y alginato, y tres antibióticos distintos, ciprofloxacino, sulfato de colistina y azitromicina.

*3. Evaluación de la actividad in vitro en células pulmonares y bacterias*

Evaluar la citotoxicidad de las formulaciones desarrolladas en tres líneas celulares de pulmón, A549, NCI-H441 y Calu-3, y su actividad antimicrobiana en dos modelos bacterianos de infecciones pulmonares, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

*4. Estudio de la capacidad de aerosolización de las formulaciones desarrolladas y su empleo como terapia inhalatoria*

Estudiar las posibilidades de las formulaciones desarrolladas para ser administradas por vía inhalatoria en el tratamiento de infecciones pulmonares. Evaluar la deposición pulmonar *in vitro*, y la capacidad de generar una nube de aerosol con las partículas en suspensión. Y realizar la comparación entre un dispositivo de polvo seco comercial y el generador de aerosoles UNIZAR.

# Capítulo 2

## MATERIALES, MÉTODOS E INSTRUMENTACIÓN

---

*En el presente capítulo se muestran los métodos de producción de micropartículas utilizados en esta Tesis Doctoral. Al mismo tiempo, se describen los protocolos empleados en los ensayos in vitro, tanto en células de origen pulmonar como en bacterias, finalizando con los ensayos realizados in vitro para evaluar la administración y deposición en el sistema respiratorio de las partículas desarrolladas.*

*Los instrumentos y técnicas utilizadas para la caracterización físico - química de los materiales empleados se recogen en el [Anexo I](#).*



## 2. MATERIALES, MÉTODOS E INSTRUMENTACIÓN

### 2.1 Métodos de producción de micropartículas

En el diseño de formulaciones en polvo seco, la tecnología empleada desempeña un papel muy importante sobre las propiedades físicas (tamaño, porosidad, cristalinidad...) de las partículas.

Los métodos de fabricación de partículas se pueden dividir en dos grandes grupos, procesos “*top-down*” y procesos “*bottom-up*”.

En el primer grupo se engloban técnicas como la molienda [217] o micronización [218], que proporcionan partículas de menor tamaño a partir de la descomposición física de otras mayores. Estas técnicas se encuentran entre las más usadas para mejorar la solubilidad de principios activos [219,220]. Sin embargo, presentan algunas desventajas como son la creación de superficies planas, distorsión en la estructura cristalina de la molécula y, a menudo, producen cargas electrostáticas en las partículas, lo que puede afectar a la adherencia o cohesión del producto final [221].

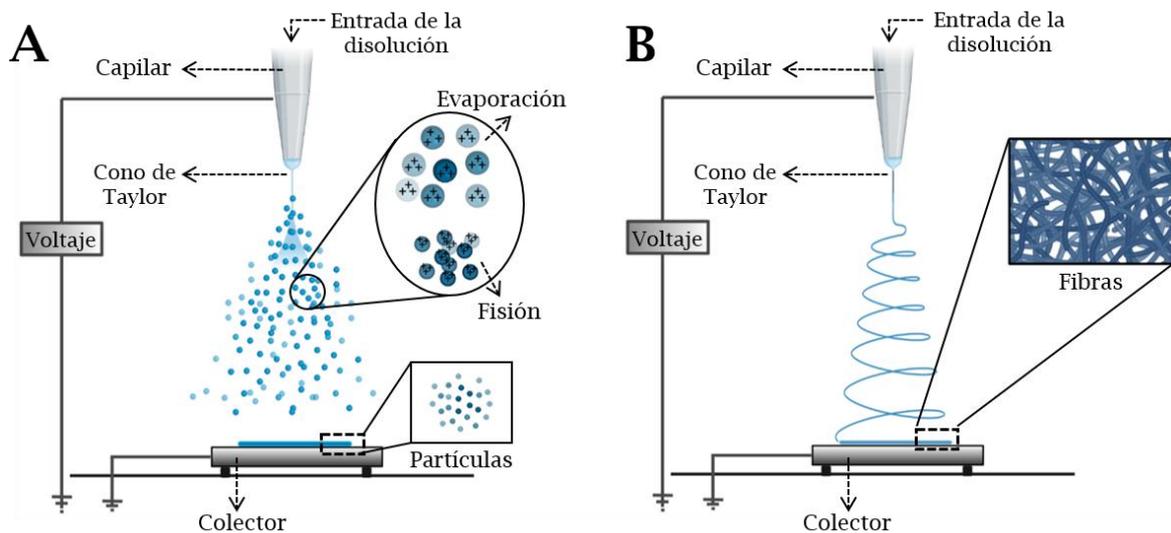
El segundo grupo de procesos, los denominados “*bottom-up*”, comprenden tecnologías como el *spray-drying* [222], fluidos supercríticos [223], atomización [224] o electropulverización [225], en las cuales la formación de las partículas se desarrolla desde el nivel molecular, proporcionando la oportunidad de optimizar el diseño de la formulación desarrollada, de cara a una mejora del posterior proceso de aerosolización.

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han empleado tres técnicas de producción de partículas diferentes pertenecientes a las tecnologías “*bottom-up*”: electropulverización o *electrospray*, atomización y gelificación-precipitación. El objetivo principal en todas ellas ha sido el mismo, obtener micropartículas biocompatibles en forma de polvo seco con un tamaño de partícula óptimo para su administración por vía inhalatoria ( $\leq 5 \mu\text{m}$ ).

### 2.1.1 Electropulverización

La electropulverización forma parte del mismo proceso físico en el que mediante fuerzas electrostáticas pueden obtenerse fibras (electrohilado) o partículas (electropulverización). Este proceso emplea una disolución conductora de polímero/principio activo que se bombea a través de un capilar, dando lugar a la formación de una gota en su extremo debido a la tensión superficial [226]. Dicha gota adquiere forma cónica, denominado “cono de Taylor”, como resultado de dos fuerzas electrostáticas generadas a partir del voltaje aplicado. Una primera fuerza debido a las cargas presentes en la propia disolución y una segunda por las repulsiones electrostáticas de Coulomb [227]. A medida que las fuerzas electrostáticas superan la tensión superficial de la disolución, se produce la expulsión de un hilo desde el cono de Taylor hacia el colector, el cual se encuentra cargado negativamente [228]. Durante este proceso, en condiciones de electropulverización, se da lugar la formación de más gotas producidas por la inestabilidad de Rayleigh debido a la tensión superficial. Si la distancia al colector es suficiente durante la caída, el disolvente se evapora y las gotas se depositan en el colector como partículas sólidas [229]. Las condiciones también pueden alterarse para obtener un hilo continuo en lugar de partículas (electrohilado) (*Esquema 2.1*).

Aunque entre sus principales limitaciones se destaca la necesidad del uso de disolventes orgánicos, esta técnica permite el uso de disolventes de baja toxicidad como son la acetona o el etanol [230]. Por otro lado, requiere una fuente de alto voltaje que genere un campo eléctrico suficiente como para superar la tensión superficial de la gota [231]. Entre las ventajas principales de esta técnica, se puede destacar la posibilidad de un mayor control del tamaño, de partícula, mejorando la uniformidad y estructura de las partículas obtenidas respecto a otras técnicas. Además, permite obtener partículas con un rango de tamaños muy amplio ( $d_p < 10 \text{ nm}$  hasta  $> 100 \text{ }\mu\text{m}$ ) con una distribución de tamaños relativamente estrecha. Si la velocidad del caudal empleada es elevada, el rendimiento del proceso tiende a ser alto. Finalmente, no requiere de múltiples pasos de síntesis ni valores de temperatura o presión elevados [232].



**Esquema 2.1.** - (A) Esquema del sistema de electropulverización empleado en los [Capítulo 4](#) y [7](#) para la generación de las micropartículas de quitosano y azitromicina respectivamente; (B) Esquema del sistema de electrohilado para la obtención de fibras.

#### 2.1.1.1 Parámetros que influyen en el proceso de electropulverización

Hay múltiples factores que pueden afectar a las partículas obtenidas. Dichos factores se pueden dividir en dos grupos principales: (a) propiedades de la disolución y (b) parámetros del proceso.

##### (a) Propiedades de la disolución:

- Peso molecular (PM) y concentración (% p/p): Un incremento en el PM por lo general da lugar a la aparición de partículas de mayor tamaño, incrementando la producción de fibras [233]. En el [Capítulo 4](#) se estudian dos tipos de peso moleculares diferentes de quitosano (bajo y alto) y su influencia en la obtención de fibras o partículas. Por otro lado, un incremento en la concentración de polímero favorece la formación de fibras o partículas de mayor tamaño [234]. En el [Capítulo 7](#), se estudia la influencia de la concentración en el tamaño de partícula obtenido.
- Viscosidad (mPa·s): Va a depender de la concentración y PM del polímero. Disoluciones con valores de viscosidad bajos van a formar un

cono de Taylor más estable y como resultado, las partículas formadas tendrán un tamaño y una morfología más homogénea [235]. Por el contrario, un aumento en el peso molecular o en la concentración va a incrementar el valor de la viscosidad, dificultando la formación de gotas y produciendo fibras [236].

- Tensión superficial (mN/cm): Si el valor de la tensión superficial de la disolución es alto, el voltaje aplicado necesario para producir la rotura de las gotas también lo será y, dará como resultado la formación de partículas de mayor tamaño. Si los valores de tensión superficial son bajos, el proceso de fisión se producirá más fácilmente generando partículas de menor tamaño [237].
- Conductividad ( $\mu\text{S/cm}$ ): Este parámetro se va a determinar por el disolvente y el polímero o sustancia activa empleada. La conductividad va a afectar a la estabilidad del cono de Taylor y de manera indirecta va a influir en el valor del caudal empleado. Disoluciones con valores elevados de conductividad tendrán una mayor estabilidad empleando caudales bajos y viceversa [238].

(b) Parámetros del proceso:

- Voltaje (kV): La diferencia de voltaje necesaria entre el extremo del capilar y el colector para obtener la formación de gotas va a depender de las propiedades de la disolución empleada (concentración, viscosidad, disolventes empleados...). El voltaje aplicado deberá ser suficiente como para mantener estable el cono de Taylor [237].
- Caudal de alimentación (mL/h): Altos valores de caudal harán que la disolución se mueva a mayor velocidad por el capilar. El proceso de evaporación del disolvente puede no ser lo suficientemente rápido, obteniendo en consecuencia partículas de mayor tamaño, en ocasiones incluso aglomerados [238]. En el [Capítulo 7](#) se observa el efecto de incrementar el valor del caudal y su influencia en el tamaño de partícula.

### 2.1.1.2 Descripción del sistema de electropulverización

El equipo empleado para llevar a cabo el proceso de electropulverización fue el electrospinner Yflow 2.2D-500 (Coaxial Electrospinning Machines / I + D Microencapsulation, Málaga, España) perteneciente al grupo NFP del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), CSIC-Universidad de Zaragoza. El equipo tiene incorporado un sistema de tres bombas de jeringa digitales, que se emplean para controlar los diferentes caudales de alimentación. Se utilizó un capilar (aguja) con un diámetro interior de 0,6 mm y se colocó en posición vertical sobre el colector para la realización de los experimentos. El colector se conectó al polo negativo de la fuente de alimentación y se cubrió con una hoja de papel de aluminio para facilitar la posterior extracción de las partículas. La distancia entre la punta del capilar y el colector se fijó en un valor de 10 cm. Por otro lado, el capilar se conectó al electrodo de polaridad positiva alimentado por una fuente de alto voltaje. El equipo de electropulverización empleado se sitúa en el interior de una cámara cerrada, donde los valores de humedad relativa (%) y temperatura (°C) se miden continuamente por una sonda que se encuentra en el interior. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente y a unos valores de humedad relativa que oscilaron entre 25-50%. Los experimentos preliminares, así como la información recogida de la bibliografía, permitieron optimizar alguno de los parámetros del proceso tales como la distancia de la punta al colector (D) y el voltaje (V) empleados.

### 2.1.1.3 Materiales

El equipo de electropulverización se empleó para la producción de las micropartículas de quitosano (MPs de CS) descritas en el [Capítulo 4](#) y de azitromicina (MPs de AZT) detalladas en el [Capítulo 7](#).

Los materiales empleados para las MPs de CS fueron: Quitosano de alto peso molecular (CS PMA) (grado de desacetilación:  $\geq 75\%$ ; viscosidad: 800-2000 cP 1% p/p en ácido acético al 1% v/v), quitosano de bajo peso molecular (CS PMB) (grado de desacetilación: 75-85%; viscosidad 20-300 cP 1% p/p en ácido acético al 1% v/v), comprimidos de buffer salino fosfato (PBS; pH 7,4) y ácido

trifluoroacético (TFA), todos adquiridos a Sigma-Aldrich (EE. UU.). Diclorometano (DCM) y ácido acético (AA) fueron suministrados por Fisher Chemicals (Reino Unido). El antibiótico ciprofloxacino (CPX) (1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-ilquinolina-3-carboxílico) empleado fue de la casa comercial Fluka analytical (España).

Los materiales empleados para la producción de las MPs de AZT fueron: Azitromicina dihidratada (AZT;  $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ ) de Alfa Aesar (EE. UU.). El buffer salino fosfato (PBS, pH 7,4), etanol absoluto, acetona, cloroformo y metanol, se adquirieron a Sigma-Aldrich (EE. UU.). El acetonitrilo se compró en WVR (Avantor, EE. UU.). El agua de grado UPLC se obtuvo de un sistema Milli-Q Advantage A10 con resistividad de 18,2 m $\Omega$  (Merk Milli-pore, Alemania). El fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC; 1,2 - dipalmitoil - sn - glicerol - 3 - fosfocolina) que se empleó pertenece a la casa comercial Avanti Polar Lipids (EE. UU.).

Los disolventes empleados en estos experimentos y sus propiedades principales se encuentran recogidos en la *Tabla 2.1*.

**Tabla 2.1** - Propiedades de los disolventes empleados en la técnica de electropulverización (información obtenida de la base de datos PubChem®).

Disolvente	Tensión superficial (mN/m)	Constante dieléctrica (F/m)	Temperatura de ebullición (°C)	Densidad (g/mL) a 25°C
Agua	71,8	78,5	100	1,000
Ácido acético	27,1	6,2	117,9	1,044
Ácido trifluoroacético	13,5	8,6	72,4	1,531
Acetona	23,7	20,7	55,8	0,784
Cloroformo	27,1	4,8	61,1	1,478
Diclorometano	28,2	8,9	40	1,325
Etanol	21,8	24,5	78,2	0,789

## 2.1.1.4 Producción de micropartículas

Para la obtención de las *micropartículas de quitosano* se emplearon dos tipos de quitosano de distinto peso molecular (PM): bajo (CS PMB) y alto (CS PMA). La optimización del proceso permitió la generación de partículas poliméricas de quitosano con el antibiótico ciprofloxacino encapsulado en su interior. Para la producción de las *micropartículas de azitromicina* no se empleó ningún polímero, y se incorporó en su electropulverización el fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Las condiciones experimentales, así como los parámetros estudiados para la producción de ambos tipos de partículas se recogen en la *Tabla 2.2*.

**Tabla 2.2** - Condiciones experimentales estudiadas para la optimización del proceso de electropulverización.

Parámetros	Micropartículas quitosano	Micropartículas azitromicina
Polímero	CS PM alto y bajo	–
Concentración (% p/p)	2 - 5	
Fármaco	Ciprofloxacino	Azitromicina
Concentración (% p/p)	0,1 - 1	1 - 10
Excipientes	–	DPPC
Concentración (% p/p)		0,05 - 0,4
Diámetro de la aguja (mm)	0,6	0,6
Distancia del capilar al colector (D) (cm)	10	10
Voltaje (kV)		
• Carga positiva	12,0 - 18,0 kV	12,0 - 15,0 kV
• Carga negativa	-3,0 - -9,0 kV	-6,0 - -8,0 kV
Caudal (mL/h)	0,2 - 1,0	0,5 - 2,5
Disolventes	AA/agua TFA/DCM	Cloroformo Acetona Etanol Etanol/acetona

### 2.1.2 Atomización

La atomización es un proceso en el que la acción disruptiva de una fuerza aerodinámica externa se opone a las fuerzas ejercidas por la viscosidad y la tensión superficial del líquido atomizado [239].

En el proceso de atomización, las micro-gotas se generan cuando se pone en contacto el aire y la disolución polimérica, ambos introducidos de manera simultánea a valores de flujo y presión elevados en el interior de una boquilla. De esta manera, la mezcla de ambos flujos inmiscibles a velocidades diferentes da lugar a elevados esfuerzos rasantes que producen la atomización. Finalmente, las micro-gotas producidas de polímero se recogen en una disolución que contiene el agente entrecruzante empleado para su gelificación [240].

Este método se ha empleado en la producción de partículas lipídicas [241], encapsulación de proteínas [242], células [243] o bacterias [244]. Entre las ventajas de la atomización se podría destacar que se trata de una técnica rápida, sencilla y económica. Sin embargo, las principales desventajas son la amplia distribución de tamaños de gota obtenidos, así como la posibilidad de que se produzca una obstrucción de la boquilla durante el proceso de atomización, especialmente cuando se trabaja con disoluciones poliméricas con valores de viscosidad elevados [245].

#### 2.1.2.1 Descripción del sistema de atomización

El sistema de atomización empleado (AutoJet Spray Controller, modelo 2250, AutoJet Technologies, EE. UU.) perteneciente al [Departamento de Ingeniería Química y Textil](#) de la [Universidad de Salamanca](#), se encuentra detallado en el *Esquema 2.2*. Este equipo está formado por dos componentes principales: un tanque presurizado y una boquilla.

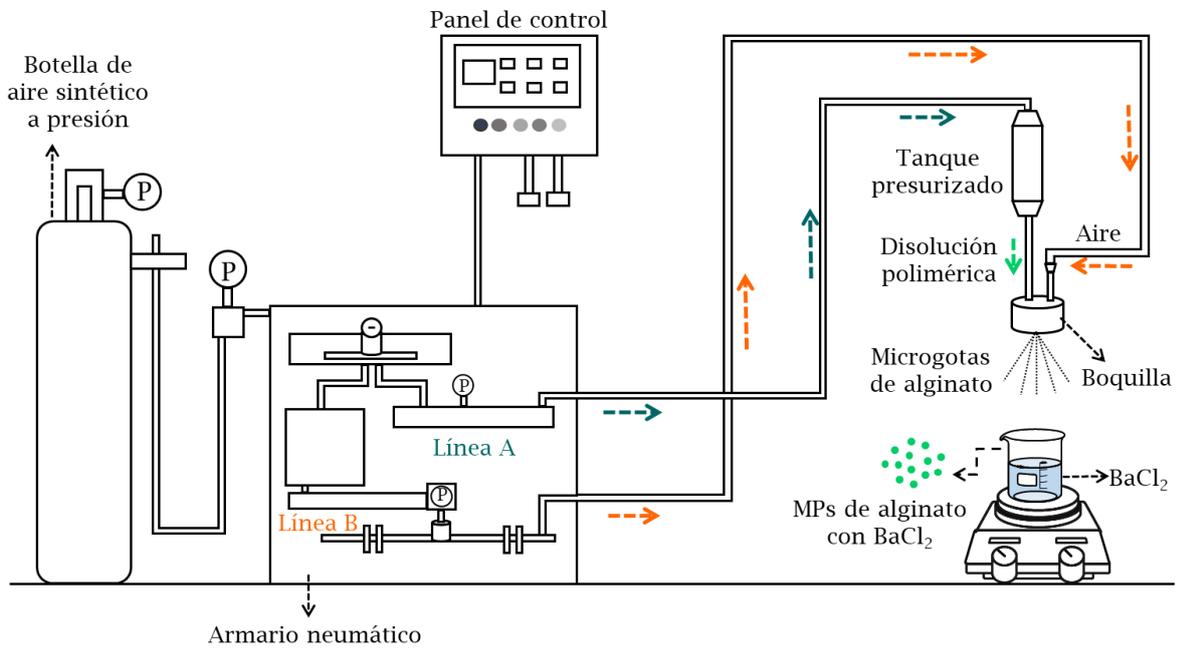
El tanque presurizado permite trabajar con disoluciones poliméricas de elevada viscosidad. Está fabricado en acero inoxidable con una capacidad

aproximada de 50 mL, aunque en todos los ensayos se empleó un volumen de 30 mL. Sirve como almacenamiento de la disolución polimérica antes de ser atomizada y es capaz de soportar presiones  $\geq 1$  barg. Además, está provisto de un sistema de control encargado de regular la presión en el tanque, de forma que la disolución de polímero almacenada en él pueda fluir a un caudal fijado previamente de forma constante. Este sistema se encuentra formado por tres partes diferenciadas que se describen a continuación:

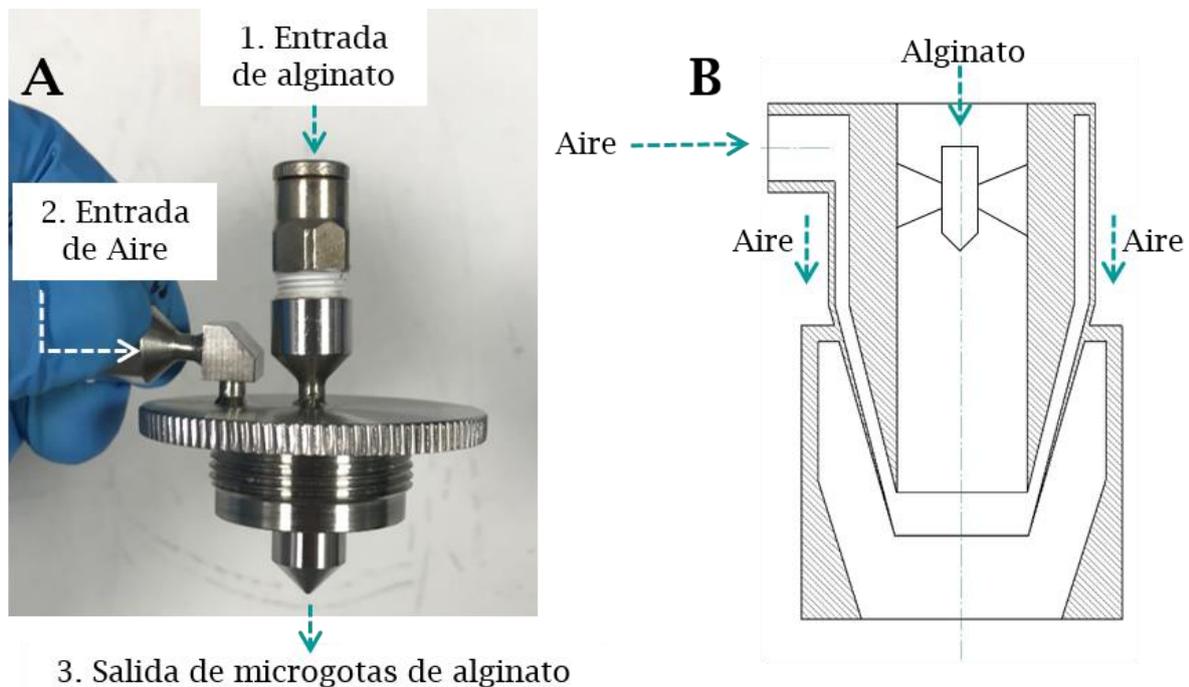
- Botella de aire sintético a presión (Air Liquid, España, pureza del 99,99%) proporciona aire a todo el sistema al caudal fijado en el panel de control.
- Armario neumático permite controlar y suministrar caudales de aire a dos líneas diferenciadas. La primera línea (línea A) proporciona presión al tanque presurizado y la segunda línea (línea B) sirve para producir la atomización de la disolución polimérica al entrar en la boquilla. El valor máximo de sobrepresión que se puede alcanzar en ambas líneas es de 1 barg.
- Panel de control, está compuesto por un software que permite tener un control del proceso y modificar los valores de la presión de líquido y de aire de manera automática.

Por otro lado, la boquilla está formada por tres cavidades diferentes (*Figura 2.1*). La primera de ellas va a permitir la entrada de la disolución de polímero desde el tanque presurizado. Por la segunda cavidad va a entrar un flujo de aire (al valor de presión fijado previamente) a gran velocidad rompiendo el flujo de líquido y produciendo el *spray* de la disolución polimérica. La tercera y última cavidad va a permitir la salida del polímero al exterior atomizado en pequeñas gotas que son recogidas en un recipiente que contiene la disolución del agente entrecruzante ( $\text{BaCl}_2$ ). Ésta última cavidad presenta un orificio con un diámetro interior de 250  $\mu\text{m}$  y otro exterior con un tamaño de 350  $\mu\text{m}$ . El *spray* de alginato sale a través de la boquilla, cayendo sobre el recipiente donde se recogen. En el momento en el que las gotas de alginato caen en la disolución de  $\text{BaCl}_2$ , los iones  $\text{Ba}^{2+}$  difunden hacia el interior

de las mismas, produciendo una red tridimensional de alginato reticulado iónicamente que dará como resultado la formación de micropartículas.



**Esquema 2.2.** - Esquema del sistema de atomización empleado en el Capítulo 6 para la generación de micropartículas de alginato (esquema adaptado de Herrero *et al.*, [239]).



**Figura 2.1.** - (A) Fotografía de la boquilla del sistema de atomización con las tres cavidades; (B) Esquema del interior de la boquilla (adaptado de Herrero *et al.*, [239]).

### 2.1.2.2 Materiales

Sal de alginato de sodio extraído de alga parda (viscosidad media,  $\geq 2000$  cP, 2% (25 °C)), cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) ( $> 99\%$ ), hidróxido de sodio (NaOH) (98%) y buffer fosfato salino (PBS; *Phosphate buffered saline*) (pH 7,4) se compraron en Sigma Chemicals (EE. UU.). Cloruro de bario deshidratado ( $\text{BaCl}_2$ ) ( $> 99\%$ ) se adquirió en Scharlau (España). El ácido clorhídrico (HCl) (37%), etanol absoluto, lactosa 1-hidrato y D(+)-sacarosa se compraron en PanReac (AppliChem) (España). La sal de sulfato de colistina (CLS) fue proporcionado por la casa comercial MP Biomedicals, LLC (EE. UU.). El surfactante Surfynol 440<sup>®</sup> que se empleó fue de Evonik (Alemania).

### 2.1.2.3 Optimización del proceso de atomización

El tamaño de gota puede controlarse mediante la variación de distintos parámetros: concentración de polímero, flujo, presión de líquido y presión de aire.

Basándonos en estudios previos realizados por el grupo de investigación de *Aplicaciones Biomédicas de Ingeniería Química* de la Universidad de Salamanca [243,246], la optimización del proceso se inició con una disolución de alginato a una concentración del 2% p/p para, posteriormente incrementar la concentración hasta 2,5% p/p. El efecto que ejerció la ratio de presiones aire/líquido (RP) se estudió variando el valor de ambas desde 0,6 barg hasta un valor máximo de 1,0 barg. El valor del flujo estuvo relacionado con la presión de líquido fijada.

En la *Tabla 2.3* se recogen las condiciones experimentales estudiadas. La concentración de la disolución de  $\text{BaCl}_2$  que actuó como agente entrecruzante se mantuvo constante en un 2% p/p a lo largo de todo el estudio.

**Tabla 2.3** - Condiciones experimentales estudiadas para la optimización del proceso de atomización.

Parámetros experimentales	
Alginato (% p/p) (30 mL) en agua	2,0 - 2,5
BaCl <sub>2</sub> (% p/p) (300 mL) en agua	2,0
Flujo (L/h)	5,4 - 6,7
RP*	0,85 - 1

RP\* = ratio de Presión aire/Presión líquido

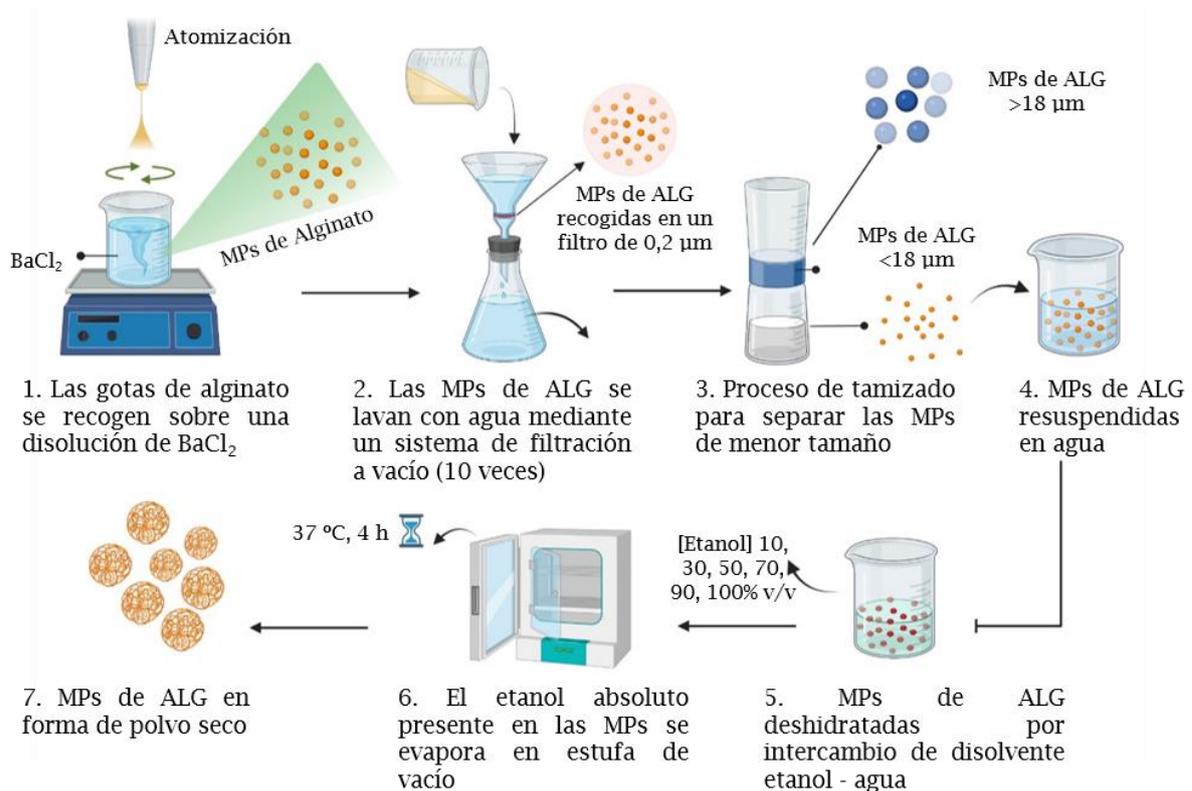
#### 2.1.2.4 Generación de micropartículas de alginato por atomización en forma de polvo seco

Las disoluciones de alginato (2% y 2,5% p/p) se prepararon disolviendo la sal de alginato de sodio en agua Milli-Q bajo agitación (500 rpm), 12 h a temperatura ambiente. La disolución de BaCl<sub>2</sub> se preparó siguiendo el mismo protocolo a una concentración del 2% p/p.

Los valores de sobrepresión de aire y líquido fijados como óptimos fueron 0,9 barg y 1,0 barg respectivamente (Capítulo 6). La disolución de alginato se atomizó sobre una disolución de BaCl<sub>2</sub> en agitación suave (150 rpm). Tras el proceso de atomización, las partículas se aislaron mediante filtración a vacío (filtro 0,2 µm (Merck-Millipore, EE. UU.)) y se resuspendieron en agua Milli-Q. Posteriormente, las micropartículas se lavaron con agua Milli-Q para eliminar los iones Ba<sup>2+</sup> residuales (repetiendo dicho proceso 10 veces). Finalmente, las micropartículas se sometieron a un proceso de tamizado con el objetivo de eliminar la población de partículas de mayor tamaño (tamaño del tamiz < 18 µm, (C.I.S.A., España)). Las micropartículas de alginato se almacenaron en una suspensión de agua Milli-Q.

Tras la optimización del proceso de secado (Capítulo 6, Punto 6.3.2.2) las micropartículas de alginato se sometieron a un proceso de deshidratación con intercambio de disolvente agua-etanol. Para ello, se emplearon concentraciones crecientes de etanol de 10, 30, 50, 70, 90, 100% v/v. Las micropartículas de

alginato se mantuvieron en cada una de ellas un tiempo mínimo de 2 h, hasta finalmente ser resuspendidas en etanol absoluto. El etanol absoluto se evaporó en estufa de vacío (Memmert, Irlanda) a 37 °C, durante 4 h. Las micropartículas de alginato obtenidas en forma de polvo seco se almacenaron a 4 °C hasta su posterior análisis. En el *Esquema 2.3* se reflejan las principales etapas del proceso descrito.



**Esquema 2.3.** - Esquema de las diferentes etapas para la obtención de las micropartículas de alginato ([Capítulo 6](#)) en forma de polvo seco a partir del proceso de atomización.

### 2.1.3 Gelificación y precipitación

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales capaces de absorber grandes cantidades de agua mientras permanecen insolubles en dichas disoluciones acuosas [247]. La formación de un hidrogel puede darse a partir de métodos químicos o físicos. En el primer grupo, la reticulación química se produce por polimerización de radicales [248], reacción química [249] o vía enzimática [250]. La principal ventaja de los métodos químicos es que el resultado es una matriz polimérica tridimensional con una resistencia

mecánica muy alta y, dependiendo de la naturaleza de los enlaces químicos formados, presentan un tiempo de degradación largo. Sin embargo, la sustancia bioactiva que se incorpora puede verse afectada por los agentes químicos empleados, con la consecuente pérdida de actividad. En el segundo grupo, la formación de los hidrogeles se basa en la creación de interacciones físicas entre las cadenas poliméricas, tales como interacciones iónicas, hidrofóbicas o enlaces de hidrógeno [247]. Estos tipos de hidrogeles pueden ser disueltos por estímulos externos como cambios de pH o temperatura.

### 2.1.3.1 Materiales

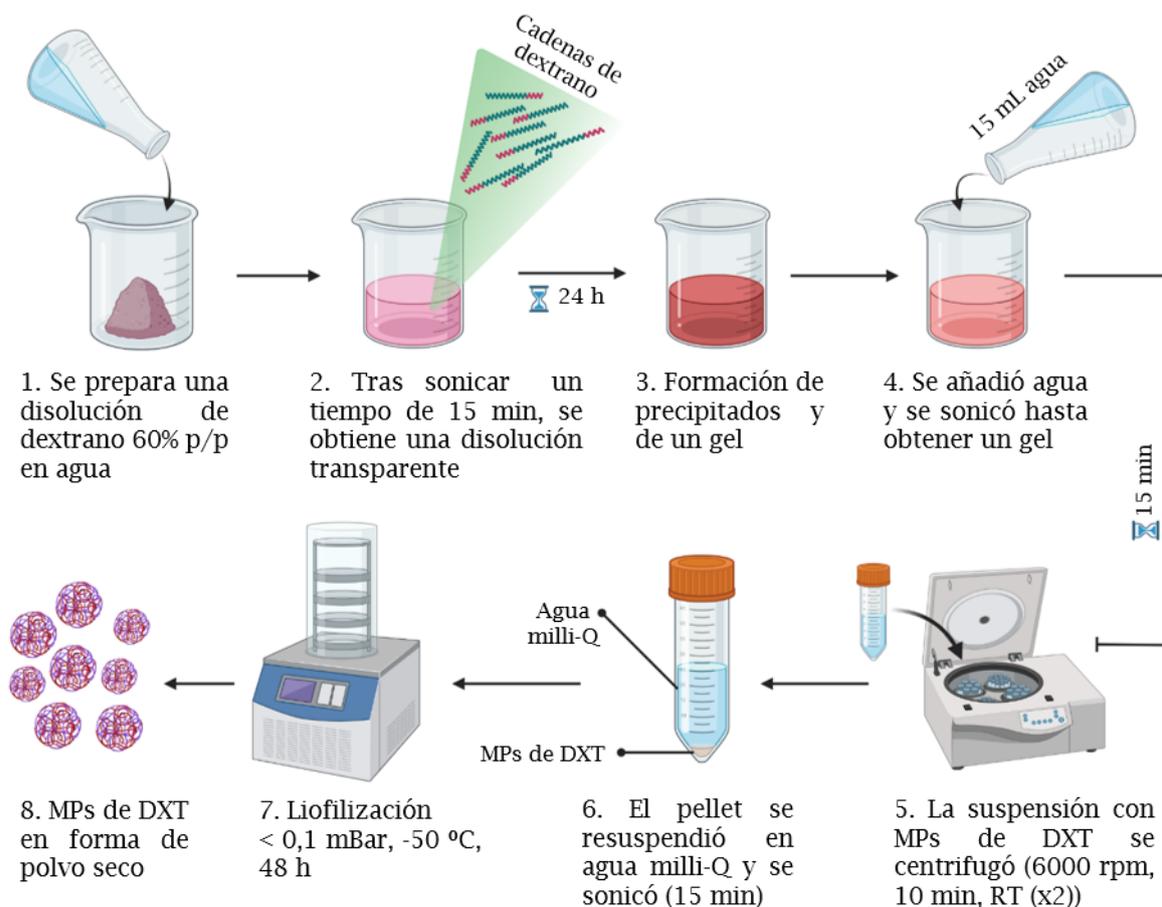
El dextrano producido por la bacteria del género *Leuconostoc spp.* con peso molecular bajo (~ 6000 g/mol) y los comprimidos buffer salino fosfato (PBS; pH = 7,4) se compraron en Sigma-Aldrich (EE. UU.). El antibiótico ciprofloxacino (CPX) (1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-ilquinolina-3-carboxílico) fue de la casa comercial Fluka analytical (España). El agua Milli-Q se obtuvo del sistema Milli-Q Advantage A10 con resistividad de 18,2 mΩ (Merk Milli-pore, Alemania).

### 2.1.3.2 Formación de las micropartículas de dextrano

La producción de micropartículas de dextrano (MPs de DXT) se optimizó en base al estudio realizado previamente por Stenekes *et al.*, [247] (Capítulo 5). Se variaron diferentes parámetros, que se recogen en la *Tabla 2.4*.

**Tabla 2.4** - Condiciones experimentales estudiadas para la optimización del proceso de gelificación.

Parámetros experimentales	
Dextrano (% p/p)	30 - 60
Disolvente	Agua, PBS
Tiempo	1 - 48 h
Temperatura	4 °C, 25 °C, 60 °C
Agitación	Estático o agitación (suave o intensa)



**Esquema 2.4.** - Esquema de las diferentes etapas para la obtención de micropartículas de dextrano (Capítulo 5) en forma de polvo seco a partir del proceso de gelificación, precipitación y posterior liofilización.

En el *Esquema 2.4* se describen las diferentes etapas para la obtención de las micropartículas de dextrano. Se preparó una disolución de dextrano (60% p/p) en agua Milli-Q, para lo cual se agitó (15 minutos) con ayuda de un vortex (IKA® Vortex 3, China) y de un sonicador (Digital Ultrasonic Cleaner, Vevor, EE. UU.) hasta que el polímero se disolvió por completo. Con el paso del tiempo, las disoluciones fueron adquiriendo un color turbio debido a la formación de precipitados en forma de partículas (Capítulo 5, Figura 5.3C) y, pasadas 24 h, se obtuvo un gel de color blanco. Tras la formación del gel, se añadieron 15 mL de agua Milli-Q y se sonicó durante 15 minutos hasta obtener una suspensión. Las micropartículas de dextrano formadas se purificaron mediante dos procesos de centrifugación (10 minutos, a 6000 rpm a temperatura ambiente) y posterior resuspensión del pellet en 10 mL de agua Milli-Q, mediante sonicación durante 15 minutos. Finalmente, las partículas se obtuvieron como

un polvo seco tras un primer proceso de congelación (−20 °C, 4 h) y posterior liofilización (<0,1 mBar, −50 °C, 48 h) (LyoQuest, Telstar, Japón). Las micropartículas de dextrano en polvo seco se mantuvieron a 4 °C hasta su caracterización.

## 2.2 Estudios en células pulmonares

Los ensayos descritos en esta sección se desarrollaron en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA, Zaragoza), donde se emplearon las líneas celulares de pulmón A549 y Calu-3 y, en el Trinity Biomedical Science Institute (TSBI, Dublín) donde se usó la línea celular NCI-H441.

### 2.2.1 Materiales

Las líneas celulares empleadas y los medios de cultivo celular en el que se cultivaron se recogen en la *Tabla 2.5*.

**Tabla 2.5** – Líneas celulares y medios de cultivo celular empleados.

Célula	Origen	Procedencia	Medio de cultivo
A549 (ATCC-CLL-185)	Alveolar	Prof. Pilar Martín Duque	DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium; Gibco, Invitrogen, EE. UU)
NCI-H441 (ATTC-HTB-174)	Alveolar	Prof. Carsten Ehrhardt	RPMI-1640 ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ; Gibco, Invitrogen, EE. UU)
Calu-3 (ATCC-HTB-55)	Bronquial	ATTC	EMEM (Eagle´s Minimum Essential Medium; ATTC, España)

Se empleó suero fetal bovino (FBS; *Fetal Bovine Serum*) y los antibióticos, penicilina, estreptomina y anfotericina B (PSA, Biowest, EE. UU.). También se usó piruvato de sodio, tripsina, buffer fosfato salino (PBS; *Phosphate-Buffered Saline*) y buffer fosfato salino de Dulbecco (DPBS; *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*). Del mismo modo, también se empleó dexametasona ( $\geq 97\%$ )

apta para cultivo celular. Todos los reactivos descritos procedieron de la casa comercial Sigma-Aldrich. El colágeno-I procedente de cola de rata (concentración inicial de 3 mg/mL) se compró en la casa comercial Gibco (Invitrogen, EE. UU.). La insulina-transferrina-selenio (ITS) Premix se adquirió en Thermo Fisher Scientific (EE. UU.). El buffer Buffer Krebs-Ringer Bicarbonato (KRB) se elaboró en el laboratorio.

### 2.2.2 Cultivo celular

Los medios de cultivo DMEM y EMEM se complementaron con FBS al 10% v/v y una mezcla de antibióticos y antimicóticos (penicilina (60 µg/mL), estreptomina (100 µg/mL) y anfotericina B (0,25 µg/mL)). El medio RPMI-1640 se suplementó únicamente con FBS al 5% v/v y piruvato de sodio al 1% v/v. En el caso de que el medio RPMI-1640 se emplease para los ensayos de interfaz líquido-aire además de ser suplementado con FBS 5% v/v y piruvato de sodio 1% v/v se añadió insulina-transferrina-selenio (ITS) 1% v/v y dexametasona 0,005% v/v.

### 2.2.3 Viabilidad celular

Para evaluar la citotoxicidad metabólica *in vitro* de las diferentes micropartículas generadas en la presente Tesis Doctoral se hizo uso del ensayo de viabilidad celular Alamar Blue® (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). El reactivo Alamar Blue (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) es capaz de detectar la actividad metabólica de las células debido a un indicador de crecimiento colorimétrico que lleva incorporado en su composición. Se trata de un sistema de oxidación-reducción (REDOX) que emite fluorescencia y cambia de color en respuesta a la reducción química que se produce en el medio celular en presencia de actividad metabólica, relacionada con el crecimiento de las células. Esto hace que dicho indicador REDOX cambie de forma oxidada (no fluorescente y de color azul) a su forma reducida (fluorescente y de color rojo), emitiendo a 590 nm cuando es excitado a 530 nm.

Los ensayos de viabilidad celular con las líneas celulares A549 y Calu-3 se desarrollaron siguiendo el protocolo que se describe a continuación. Las células se sembraron con una densidad de  $10 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos (ThermoFisher Scientific, España) empleando un volumen de 100  $\mu\text{L}$ /pocillo. Tras la siembra, las células se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$ , favoreciéndose la adhesión celular al fondo del pocillo. Pasado este tiempo, el medio de cultivo celular se cambió por medio celular fresco con distintas concentraciones de partículas resuspendidas. Las células se mantuvieron en incubación durante 24 h y 48 h. A los diferentes tiempos de estudio, el medio con las partículas se retiró y las células se lavaron con DPBS. Posteriormente, se incubaron con el medio de cultivo correspondiente suplementado con el reactivo Alamar Blue® (10% v/v; incubación un tiempo mínimo de 2 h a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$ ). La medida de intensidad de fluorescencia se realizó en condiciones de excitación/emisión: 530/590 nm en un lector de placas automático Synergy HT (Biotek, EE. UU.).

La realización de los ensayos de viabilidad celular con la línea celular NCI-H441 se desarrollaron siguiendo un protocolo ligeramente diferente al descrito en el párrafo anterior. Las células se sembraron con una densidad de  $50 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  en una placa de 96 pocillos ( $0,33\text{cm}^2$ /pocillo). Tras la siembra, se incubaron durante un tiempo de 7 días a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$  de este modo, se favoreció la adhesión celular al fondo de la placa y, por tanto, la formación de una monocapa celular. Durante este periodo de tiempo el medio de cultivo celular se cambió cada 2 días.

24 h previas al comienzo del ensayo, el medio celular se cambió por un nuevo medio sin FBS para paralizar el crecimiento celular. Se empleó este medio de cultivo celular hasta finalizar el ensayo. Pasadas 24 h, el medio de cultivo celular se sustituyó por medio de cultivo celular nuevo con diferentes concentraciones de partículas. Las células se mantuvieron en incubación durante 24 h y 48 h. A los diferentes tiempos de estudio, el medio con partículas se retiró y las células se lavaron con medio de cultivo nuevo. Seguidamente, las células se incubaron con medio de cultivo suplementado con el reactivo Alamar Blue® (10% v/v; 3 h, 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$ ). Las medidas de

intensidad de fluorescencia se realizaron en condiciones de excitación/emisión 544/590 nm usando un lector de placas automático (FLUOstar Optima, BM Labtech, Offenburg, Alemania).

En ambos protocolos los resultados se expresaron en porcentaje de viabilidad celular (% VC), considerando como 100% la viabilidad celular de los pocillos control (no tratados con las partículas) a los mismos tiempos de estudio. Los datos se obtuvieron a partir de la ecuación 2.1:

$$\% VC = \frac{\text{VMF de las células tratadas con las partículas}}{\text{VMF de las células control}} \times 100 \quad \text{Ec.(2.1)}$$

donde *VMF* hace referencia al valor medio de la fluorescencia obtenida. Los datos representados hacen referencia al promedio de 3 medidas.

Para determinar el umbral de citotoxicidad metabólica se utilizó la norma ISO 10993-5 (*Evaluación biológica de dispositivos médicos-Parte 5: Pruebas de citotoxicidad in vitro*), que considera un material como no citotóxico cuando la viabilidad celular es > 70%.

En los ensayos de viabilidad celular, la concentración evaluada de fármaco puro fue equivalente a la de los fármacos encapsulados en las distintas micropartículas. Para las micropartículas de quitosano, las micropartículas de dextrano (ambas con ciprofloxacino) y las micropartículas de alginato con sulfato de colistina el rango de concentraciones estudiado fue desde 0,1 hasta 100 µg/mL. En el caso de las micropartículas con azitromicina, el rango de concentraciones fue desde 0,1 hasta 1000 µg/mL.

#### 2.2.4 Cultivo celular de interfaz líquido – aire (ensayos ALI)

Para la evaluación *in vitro* del transporte de las partículas a través de un epitelio pseudoestratificado, se empleó la línea celular NCI-H441 mediante un

cultivo celular de Interfaz Líquido-Aire (ALI; *Air Liquid Interface*) (Capítulos 5 y 7).

Los ensayos ALI se desarrollaron en pocillos Transwell® (Costar®, Corning Incorporated, EE. UU.) empleando una multiplaca de 12 pocillos. El procedimiento experimental se resume en el *Esquema 2.5*. Previo al comienzo del ensayo, el fondo del pocillo de los Transwell® se cubrió con una capa de colágeno-I a una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . El medio de cultivo empleado tanto para el sembrado de las células como para el llenado de los Transwell® fue RPMI-1640 suplementado con FBS 5% v/v, piruvato de sodio 1% v/v, insulina-transferrina-selenio (ITS) 1% v/v y dexametasona 0,005% v/v.

Las células se sembraron con una densidad de  $70 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  en una placa de 12 pocillos (1,12  $\text{cm}^2$ /pocillo). Se sembraron en un volumen de 180  $\mu\text{L}$  añadido en la cámara apical mientras que en la cámara basolateral se añadió un volumen de 700  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, las células se incubaron a 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  durante toda la noche. Pasadas 24 h y tras la adherencia de las células al fondo del pocillo, la cámara apical se completó con un volumen de 120  $\mu\text{L}$  (volumen final 300  $\mu\text{L}$ ) y la cámara basolateral con un volumen de 800  $\mu\text{L}$  (volumen final 1500  $\mu\text{L}$ ). Las células se dejaron en condiciones Interfaz Líquido - Líquido (ILL) durante 3 días, cambiando el medio de cultivo en ambos lados diariamente.

Pasado este tiempo, se retiró el medio de la cámara apical, dejando las células expuestas al aire y en la cámara basolateral un volumen de 700  $\mu\text{L}$ . A partir del día 5 se procedió a la medida del valor de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER; *Transepithelial Electrical Resistance*), la cual nos indica la permeabilidad de la capa celular a las especies iónicas. Según lo reportado en bibliografía, en condiciones Interfaz Líquido-Aire (ALI) en células NCI-H441 los valores TEER son  $\sim 300 \Omega \times \text{cm}^2$  [97,178].

Para la medida del valor de TEER, se rellenó la cámara apical con un volumen de 500  $\mu\text{L}$  y la cámara basolateral se completó con un volumen de 800  $\mu\text{L}$ , (obteniendo un volumen final 1500  $\mu\text{L}$ ). La medida del valor de TEER se realizó con un voltímetro Epithelial Volt-Ohm Meter (Millicell® ERS-2,

Alemania). El electrodo (mantenido en una disolución de KCl 3M) se introdujo en los pocillos para realizar la medida. Los ensayos se comenzaron cuando se alcanzó un valor de  $250\text{-}300 \Omega \times \text{cm}^2$ .

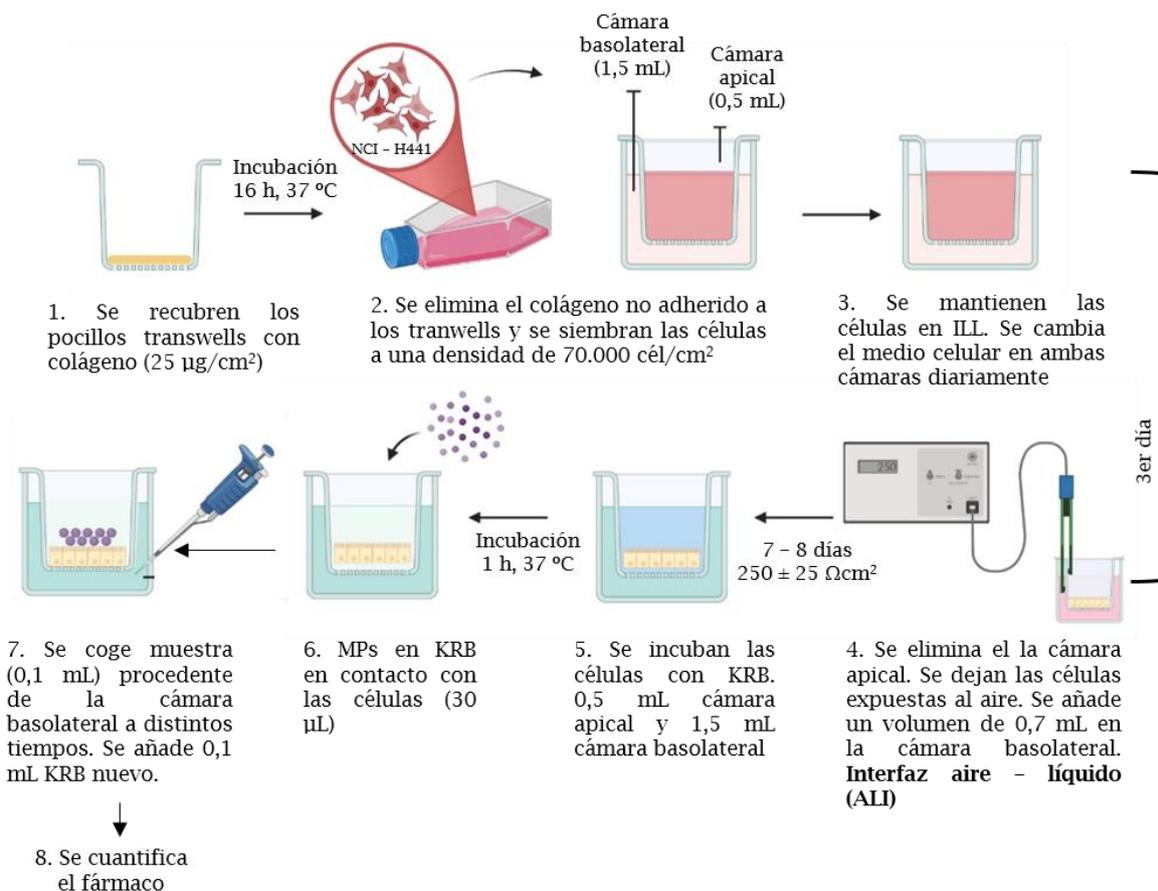
Para la realización del ensayo el medio celular se retiró de la cámara basolateral y se sustituyó añadiendo un volumen de  $1500 \mu\text{L}$  de KRB. En el caso de la cámara apical se añadieron  $500 \mu\text{L}$  de KRB. Las células se dejaron incubar durante 1 h en este buffer y se procedió a la medida del valor TEER. Las partículas se añadieron en la cámara apical en un volumen de  $30 \mu\text{L}$ . La muestra se cogió de la cámara basolateral ( $200 \mu\text{L}$ ) a tiempos fijados de 30, 60, 120 y 240 min, reemplazándose dicho volumen por KRB nuevo.

Los resultados se expresaron mediante el cálculo del valor de permeabilidad aparente ( $P_{\text{app}}$ ) (ecuación 2.2):

$$P_{\text{app}} = \frac{dC}{dt} \times \frac{V}{A \times C_0} \quad \text{Ec. (2.2)}$$

donde  $A$  es el área superficial de la monocapa celular formada por las células NCI-H441 ( $1,12 \text{ cm}^2$ ),  $C_0$  la concentración inicial de fármaco ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en la cámara apical y  $dC/dt$  es la pendiente de la curva Q-t (concentración de fármaco transportada versus tiempo) en la cámara basolateral.

En los ensayos de Interfaz Líquido - Aire las concentraciones de fármaco puro y fármaco encapsulado se situaron dentro del rango evaluado en los ensayos de viabilidad celular (Punto 2.2.3). En el caso de las micropartículas de azitromicina la concentración fue de  $500 \mu\text{g}$  azitromicina/mL y en las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino de  $50 \mu\text{g}$  ciprofloxacino/mL.

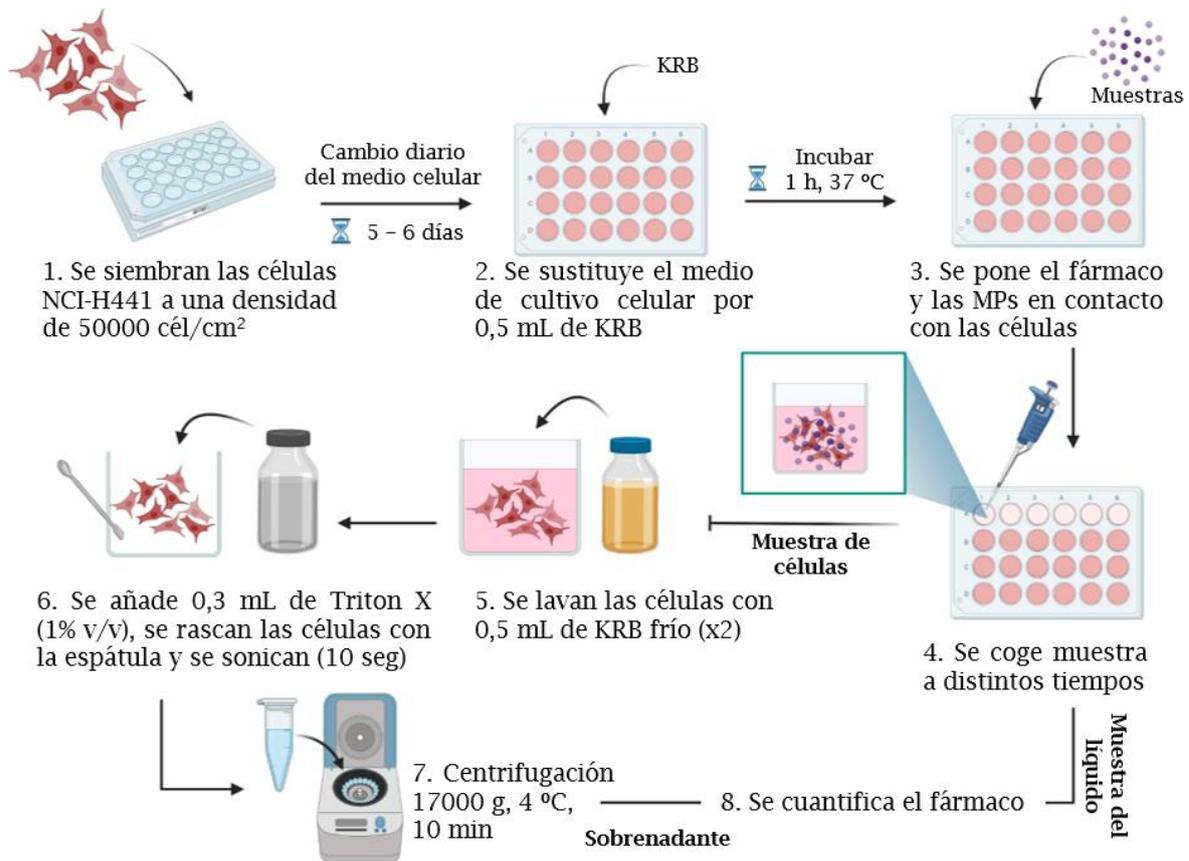


**Esquema 2.5.** – Protocolo seguido para el desarrollo de los experimentos interfaz aire-líquido (ALI) con las células NCI-H441.

### 2.2.5 Captación celular

Los ensayos de captación celular (Capítulos 5 y 7) se llevaron a cabo con la línea celular NCI-H441, empleándose multiplacas de 24 pocillos. Las células se sembraron a una densidad de  $50 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  por pocillo (1,9  $\text{cm}^2/\text{pocillo}$ ). El medio de cultivo celular empleado fue RPMI-1640 suplementado con FBS 5% v/v y piruvato de sodio 1% v/v. El medio celular de los pocillos se cambió diariamente (volumen empleado, 1000  $\mu\text{L}$ ) y las células se mantuvieron en crecimiento durante 5-6 días, tras los que se pudo observar una monocapa. Pasado este tiempo y antes de comenzar el ensayo, el medio celular se sustituyó por 500  $\mu\text{L}$  de KRB (previamente atemperado a 37 °C), las células se incubaron 1 h a 37 °C, tras lo cual, se sustituyó el KRB por 500  $\mu\text{L}$  de una suspensión de micropartículas cargadas con fármaco a distintas concentraciones. A diferentes tiempos (30, 60, 120 y 240 min) se recogieron

dos tipos de muestra: (1) muestra procedente del KRB en contacto con las células (100  $\mu$ L) y (2) muestra de las células (*Esquema 2.6*).



**Esquema 2.6.** - Protocolo seguido para los experimentos de captación celular con las células NCI-H441.

- (1) Las muestras procedentes del KRB en contacto con las células se analizaron con dos técnicas diferentes dependiendo del fármaco empleado. En el caso de las micropartículas AZT las muestras se analizaron por UPLC ([Anexo I, Punto I.3.4](#)). Sin embargo, en el caso de las muestras con MPs de dextrano con ciprofloxacino, las muestras se analizaron con un lector de placas por autofluorescencia ([Anexo I, Punto I.3.3](#)).
- (2) Las muestras procedentes de las células se lavaron por duplicado con KRB frío (4 °C) para detener la captación celular. El KRB se sustituyó por 300  $\mu$ L de una disolución de Triton X (1% v/v) en KRB y con ayuda de una espátula, las células se despegaron del fondo del pocillo.

Seguidamente, las células se sonicaron (Microson™, Ultrasonic Cell Disruptor) durante 10 segundos y se centrifugaron durante 10 minutos en una centrifuga Heraeus, Fresco 17 (Thermo Scientific, EE. UU.) a 17.000 g y 4 °C. Finalmente, se recogió muestra del sobrenadante y se procedió a su análisis tal y como se indica en el punto anterior.

La concentración de fármaco y micropartículas en los ensayos de captación celular se situó dentro del rango previsto para los ensayos de citotoxicidad (Punto 2.2.3): 500 µg de fármaco/mL para las micropartículas de azitromicina y 50 µg de fármaco/mL para las micropartículas de dextrano.

## 2.3 Ensayos de actividad antimicrobiana

Los ensayos descritos en esta sección se desarrollaron en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA, Zaragoza), donde se emplearon las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y, en el Departamento de Microbiología del Hospital Universitario Tallaght, Trinity College (Dublín), donde se usaron distintas cepas de *Pseudomonas*.

### 2.3.1 Materiales

Para los ensayos de bacterias planctónicas se emplearon las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923; Ielab, España) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145; Ielab, España). Los medios de crecimiento bacteriano fueron, caldo de soja tríptico (TSB; *Tryptone Soy Broth*) y agar de soja tríptico (TSA; *Tryptone Soy Agar*) ambos fueron suministrados por Conda-Pronadisa (España).

Para el desarrollo de los ensayos de biofilms se emplearon seis cepas clínicas diferentes de *Pseudomonas* procedentes de pacientes ingresados en el Hospital Universitario Tallaght con fibrosis quística (Tabla 2.6). En estos ensayos se empleó medio líquido de cultivo bacteriano (LB Broth) y cristal violeta (1% v/v en agua), ambos reactivos procedentes de la casa comercial Sigma-Aldrich. Las placas de 96 pocillos de fondo redondo necesarios para el

desarrollo de los biofilms fueron de la marca Costar® (Corning Incorporated, EE. UU.).

**Tabla 2.6** – *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística empleadas en los ensayos de biofilms.

Código de paciente	Identificación de especie por MALDI-Tof	Identificación de especie por 16s rRNA	(%) Identificación de especie por secuenciación 16s rRNA
PA01	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	100%
5158	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	100%
5339	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	95,67%
5382	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	99,73%
5165	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	99,10%
5562	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	99,87%
5536	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	99,73%

### 2.3.2 Cultivos bacterianos

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se empleó como modelo de cepa bacteriana Gram-positiva y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 como modelo de cepa bacteriana Gram-negativa. Ambas cepas bacterianas se dejaron crecer un tiempo mínimo de 16 h en TSB a 37 °C, bajo agitación (150 rpm). Finalmente, se obtuvo un cultivo bacteriano en fase estacionaria de crecimiento con  $10^8$  -  $10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC; *Colony Forming Units*).

### 2.3.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y de la Concentración Mínima Bactericida (MBC)

Previamente a los experimentos para la obtención de la MIC y MBC de los distintos antibióticos empleados en esta Tesis Doctoral, se realizó una búsqueda bibliográfica que permitiese establecer los rangos de concentraciones a estudiar (*Tabla 2.7*).

**Tabla 2.7** – Rango de concentraciones de los antibióticos ensayados para la obtención de los valores de MIC y MBC.

Antibiótico	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ciprofloxacino	0,125 - 1 µg/mL [251]	0,0625 - 8 µg/mL [252]
Azitromicina	0,50 - 64 µg/mL [253]	16 - 512 µg/mL [254]
Sulfato de colistina	-	0,125 - 8,00 µg/mL [255]

### 2.3.3.1 Medidas de densidad óptica (OD600)

El crecimiento de bacterias en medios de cultivo líquidos se puede seguir midiendo la densidad óptica a 600 nm (OD600). Por lo general, las mediciones de la OD600 se usan para determinar la etapa de crecimiento de un cultivo bacteriano.

Las densidades ópticas de ambas cepas bacterianas se midieron a 600 nm con el espectrofotómetro Implen™ OD600 DiluPhotometer™ (ThermoFisher Scientific, EE. UU.) con el fin de monitorizar y obtener las curvas de crecimiento bacteriano. La concentración inicial que se empleó en ambas cepas bacterianas fue de  $10^5$  UFC/mL en TSB. Para la realización de este ensayo se prepararon diferentes concentraciones de los fármacos y de las partículas a evaluar, que posteriormente se pusieron en contacto con las bacterias. Dichas suspensiones bacterianas se mantuvieron en ligera agitación (150 rpm) a 37 °C, un mínimo de 16 h. Los valores de OD600 de las bacterias se midieron a diferentes tiempos durante 24 h. En todos los ensayos se empleó una suspensión bacteriana sin tratar como control. Los resultados se expresaron como promedio de la media de 3 réplicas (*Esquema 2.7A*).

### 2.3.3.2 Método de diluciones seriadas en agar

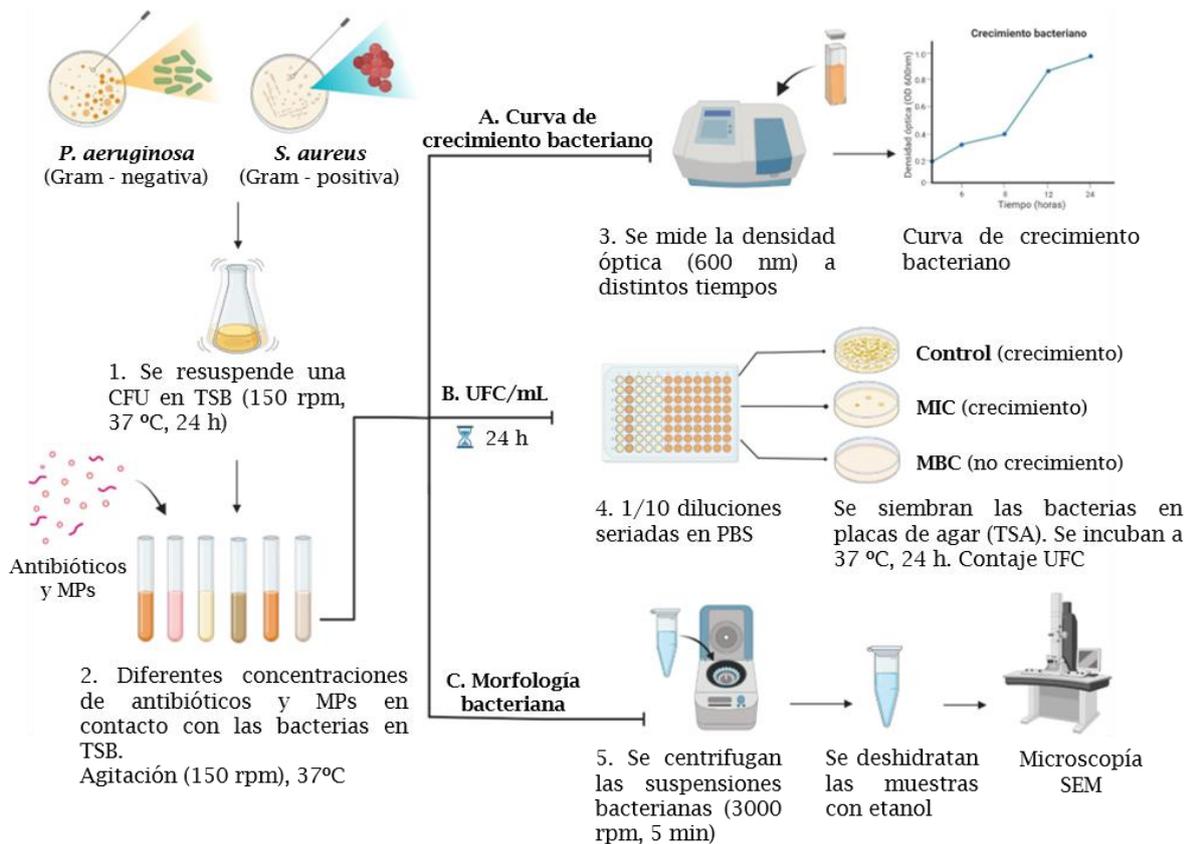
Este ensayo se desarrolló con el objetivo de obtener de manera cuantitativa el valor de recuento bacteriano medido en UFC/mL en ambas cepas tras ser tratadas con las diferentes muestras. Se empleó un inóculo inicial de

bacterias de  $10^5$  UFC/mL en TSB, el cual se puso en contacto con diferentes concentraciones de las muestras a estudiar. Dichas suspensiones bacterianas se mantuvieron en agitación (150 rpm), a 37 °C durante 24 h. Tras el periodo de incubación, tanto las suspensiones bacterianas tratadas como el control (sin tratar) se diluyeron en PBS mediante la realización del método de diluciones seriadas [256]. Posteriormente, las diluciones bacterianas se sembraron en placas de agar (TSA) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Finalmente, se realizó el conteo de las colonias crecidas en cada placa y se expresaron los resultados como promedio de los valores obtenidos en 3 réplicas (*Esquema 2.7B*)

#### 2.3.4 Morfología bacteriana

La morfología de ambas cepas, tanto las muestras control como las tratadas, se evaluaron por microscopia SEM tras su incubación con los diferentes antibióticos y micropartículas. Para este análisis, se necesitó la fijación previa de las muestras, consiguiéndose de este modo mantener inalteradas las propiedades bacterianas durante su observación mediante microscopía SEM.

En el protocolo de fijación seguido, las diferentes suspensiones bacterianas se centrifugaron (Micro Star 17R, VWR, EE. UU.) a 3000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet obtenido tras el proceso de centrifugación se lavó 3 veces con PBS (0,1M), posteriormente se fijó con glutaraldehído 2,5% v/v y se incubó a 4 °C un mínimo de 12 h. Tras este paso, las muestras se centrifugaron y se lavaron con agua Milli-Q. El pellet se resuspendió en agua Milli-Q y se filtró empleando un filtro de nylon de 0,2  $\mu$ m (Millipore, Irlanda). El filtro se deshidrató con una serie de lavados con etanol absoluto con concentraciones crecientes (10, 30, 50, 70, 90 y 100% v/v) manteniéndolo un tiempo mínimo de 15 minutos en cada una ellas. Finalmente, el etanol absoluto resultante se evaporó dejando secar la muestra a temperatura ambiente. Los filtros se prepararon para su observación por SEM tal y como se describe en el *Anexo I, Punto I.2.1 (Esquema 2.7C)*.



**Esquema 2.7.** – Protocolo seguido para estudiar el efecto de los antibióticos y partículas sobre las muestras bacterianas: **(A)** Medida de la densidad óptica (OD600) y obtención de la curva de crecimiento; **(B)** Método de diluciones seriadas en agar y obtención de los valores MIC y MBC; **(C)** Preparación de las muestras para su análisis por microscopía SEM y observación de la morfología bacteriana.

### 2.3.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana en biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*

Para evaluar la actividad antimicrobiana en biofilms preformados y en producción de las partículas descritas en los [Capítulos 5 y 7](#) se emplearon seis cepas clínicas diferentes de *Pseudomonas* siguiendo el protocolo descrito por Díez-Aguilar *et al.*, [257]. Dichas bacterias se aislaron de pacientes con fibrosis quística y se confirmó que pertenecían al género *Pseudomonas* por secuenciación ARNr 16S y MALDI-Tof (*Tabla 2.6*). Los datos de secuenciación fueron realizados por la Dra. Emma Reece investigadora del Departamento de Microbiología del Hospital Universitario Tallaght.

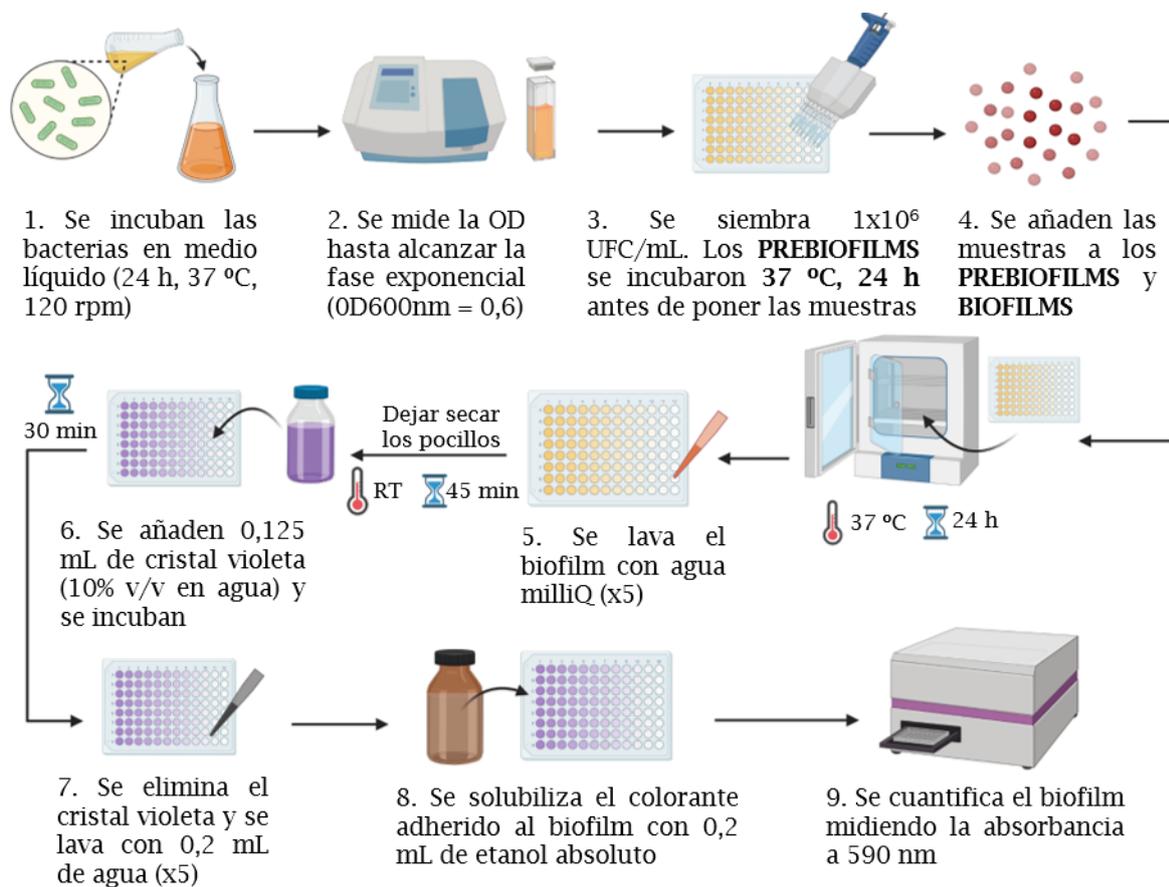
Como se ha indicado en el Capítulo 1 (Punto 1.1.4.2, Figura 1.6), la formación de biofilms consta de 5 etapas. Para el crecimiento del biofilm bacteriano se colocó un inóculo de cada una de las cepas, 1 mL de suspensión bacteriana en 20 mL de medio LB broth. Se dejaron en incubación (Incubating Orbital Shaker, VWR, EE. UU.) 24 h a 37 °C con agitación suave (120 rpm).

Pasadas 24 h, cada una de las cepas se diluyó en medio líquido (LB broth) hasta alcanzar un valor de densidad óptica, OD600 nm =  $0,6 \pm 0,01$  (u.arb.) empleando para ello un lector de densidad óptica BioPhotometer (ThermoFisher Scientific, EE. UU.). Alcanzado este valor, las bacterias fueron sembradas en placas de 96 pocillos de fondo redondo a una densidad de  $1 \times 10^6$  UFC/mL con un volumen final de 200  $\mu$ L/pocillo. Se empleó la cepa PA01 de *P. aeruginosa* como control positivo y medio de cultivo sin bacterias como control negativo. Las placas se incubaron a 37 °C sin agitación, lo que permitió obtener un biofilm pasadas 24 h. Dichas placas con el biofilm formado son referenciadas en los resultados como *pre-biofilms*. Para obtener placas con el biofilm en proceso de formación, se repitió el mismo protocolo descrito en el párrafo anterior, pero sin la etapa de incubación de 24 h.

Una vez se tuvieron las placas con ambos tipos de biofilm: preformado y en proceso de formación, se estudió la capacidad antimicrobiana en biofilms. Para ello se añadió a cada uno de los pocillos la muestra con el fármaco o micropartículas a estudiar, tras lo cual, todas las placas se incubaron 24 h a 37 °C sin agitación, permitiendo comprobar la eficacia de los compuestos añadidos en ambos tipos de biofilms (*Esquema 2.8*).

Finalmente se procedió a cuantificar el biofilm. Para ello se eliminó el medio de crecimiento y las células bacterianas no adheridas, seguido por un proceso de lavado con agua Milli-Q (repetición del proceso 5 veces). Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente un tiempo mínimo de 45 minutos. Transcurrido este periodo, se añadieron 125  $\mu$ L de reactivo cristal violeta (10% v/v en agua) y se dejó actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de reactivo se eliminó y los pocillos se lavaron cinco veces con 200  $\mu$ L de agua Milli-Q. Seguidamente se solubilizó el cristal violeta con etanol

absoluto al 95% v/v. Se transfirieron 100  $\mu$ L de esta solución etanólica a una placa de fondo plano y se cuantifico el biofilm midiendo la absorbancia de los pocillos con la alícuota de etanol con cristal violeta a una longitud de onda de 590 nm. El lector de placas empleado para la obtención de los resultados fue Varioskan LUX 3020 - 190 con el Software SkanIt 4.1.



**Esquema 2.8.** - Protocolo seguido para el desarrollo de ensayos de biofilms con diferentes especies clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2.4 Estudios *in vitro* de administración pulmonar de fármacos

Los factores que determinan la deposición pulmonar de fármacos en el sistema respiratorio están asociados a las propiedades aerodinámicas de las partículas (ej. el diámetro aerodinámico), a las características del tracto respiratorio (como su geometría o volumen pulmonar) y a las características fisiológicas del paciente, determinadas por la presencia o no de patologías y la frecuencia y velocidad del flujo respiratorio.

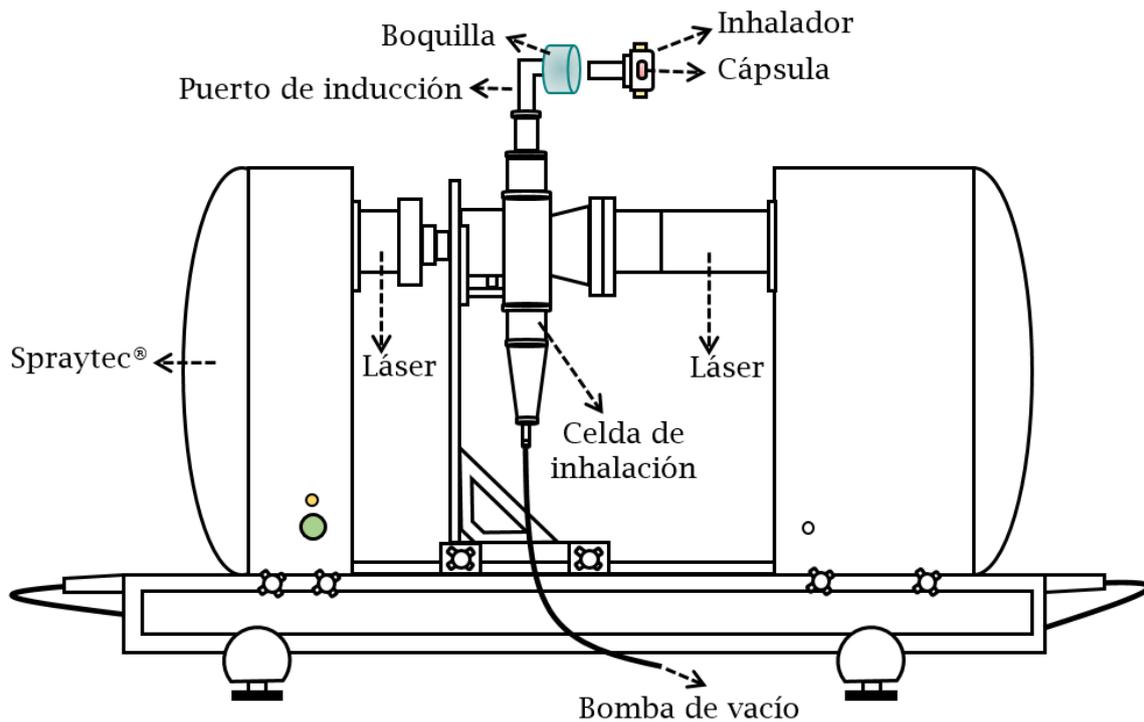
Para evaluar el depósito de las partículas en los pulmones se han realizado distintos estudios *in vitro* de administración inhalatoria de fármacos. Estos estudios se desarrollaron en la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco (UPV, Vitoria).

### 2.4.1 Materiales

El Brij-35 empleado procedió de los laboratorios Fagron (España). El etanol absoluto ( $\geq 99\%$ ), glicerol ( $\geq 99\%$ ) y DMSO ( $\geq 99\%$ ) se adquirieron todos ellos en Sigma Aldrich. Las cápsulas de gelatina rojo opaco (tamaño 3) fueron de los laboratorios Vencaser (España). El inhalador de polvo seco (DPI) empleado para la realización de los ensayos con dispositivos comerciales fue el Breezhaler® (Novartis, Suiza).

### 2.4.2 Tamaño físico de partícula

La distribución volumétrica del tamaño físico de partícula se obtuvo con un equipo de espectrometría de difracción láser Spraytec® (Malvern Instruments, Reino Unido). Para ello, se acopló al equipo Spraytec® una celda de inhalación y ésta a su vez se unió a una bomba de vacío (Copley HCP 5. Copley, Reino Unido). Para cada ensayo se empleó una cápsula dura de gelatina con 15 mg de partículas en forma de polvo seco que se introdujeron en el inhalador de polvo seco Breezhaler®. La bomba de vacío permitió generar una nube de aerosol de partículas que, al atravesar la celda de inhalación, fueron detectadas por el sistema óptico proporcionando la distribución volumétrica del tamaño de partícula. Cada experimento tuvo una duración máxima de 10 segundos y se realizó un mínimo de 3 réplicas por tipo de muestra (1 cápsula (15 mg/cápsula)  $\times$  3 experimentos, 3 cápsulas en total) (*Esquema 2.9*).



**Esquema 2.9.** - Esquema del equipo de espectrometría de difracción láser Spraytec® empleado para la obtención de la distribución volumétrica del tamaño físico de partícula.

Los principales valores obtenidos fueron el diámetro volumétrico medio (VMD =  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$ ,  $D_{v90}$ ) y el Span (Ecuación 2.3), que proporciona una medida de la amplitud de la distribución.

$$\text{Span} = \frac{D_{v90} - D_{v10}}{D_{v50}} \quad \text{Ec. (2.3)}$$

donde  $D_{v10}$ ,  $D_{v50}$  y  $D_{v90}$  hacen referencia al diámetro por debajo del cual está contenido el 10%, 50% y 90% del volumen total de partículas presentes en la muestra respectivamente.

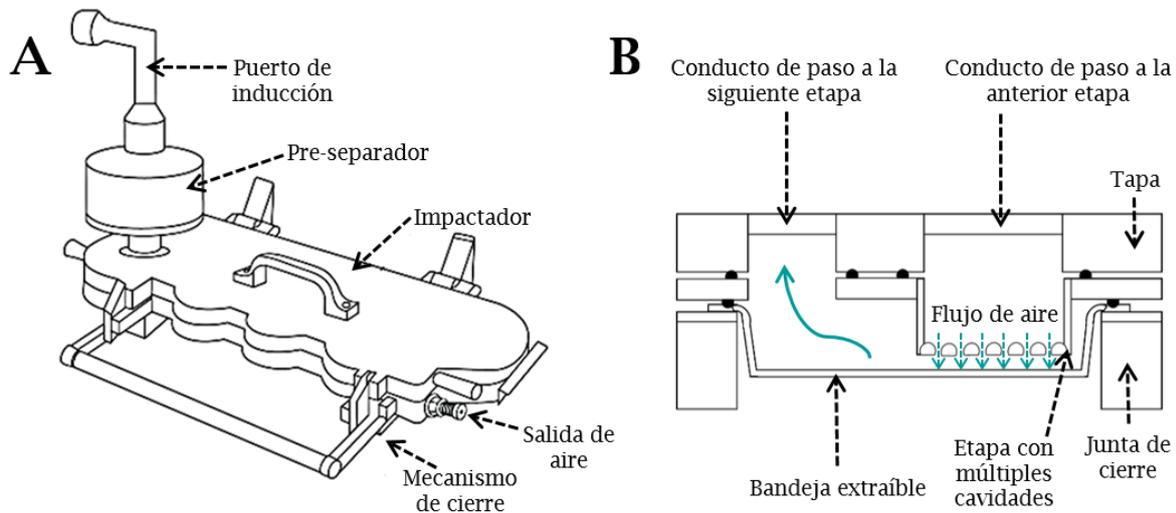
### 2.4.3 Diámetro de partícula aerodinámico

La deposición de las partículas en las distintas regiones del tracto respiratorio está relacionada con el diámetro aerodinámico de masa medio (DMMA). Cuando se administra un fármaco por vía inhalatoria, el pulmón actúa

como un filtro provocando que las partículas de mayor tamaño se queden retenidas en las vías respiratorias superiores y las partículas de menor tamaño alcancen las zonas más profundas del pulmón.

Los impactadores (entre ellos el *Next Generation Impactor*<sup>™</sup> o NGI, Copley, Reino Unido) son los equipos empleados para la evaluación *in vitro* de la eficiencia de administración de los fármacos destinados a inhalación, simulando el proceso respiratorio. Los ensayos realizados con estos instrumentos permiten obtener valores como la dosis emitida, la fracción respirable o el diámetro aerodinámico de masa medio de partícula entre otros parámetros [258].

El NGI es un equipo de impactación con diseño horizontal que consta de siete etapas y un colector final con microorificios que actúa como filtro (denominado MOC; *Micro-orifice collector*). La formulación en polvo seco se introduce en el interior del NGI a través del puerto de inducción con ángulo de 90° o a través de la tráquea de Alberta, ambos simulan la garganta, siendo la tráquea la opción más realista (*Esquema 2.10A*). El polvo se mueve atravesando el pre-separador, donde se recogen los agregados de partículas más grandes, previo a que el resto de la formulación ingrese en las diferentes etapas del NGI [259]. El polvo se mueve a través del impactador en forma de aerosol y se deposita en cada etapa dependiendo del tamaño de partícula. Las partículas con un tamaño pequeño siguen la corriente de aire atravesando las cavidades presentes en cada etapa del NGI (*Esquema 2.10B*). Por el contrario, las partículas de tamaño más grande, impactan en la superficie de las distintas bandejas, donde posteriormente son recogidas. El diámetro de las cavidades presentes en cada etapa va disminuyendo de manera progresiva y la velocidad de la corriente de aire aumenta durante su paso por el NGI, las partículas impactan en función de su tamaño. Los diámetros de corte de las cavidades presentes en las diferentes etapas están definidos por el caudal de aire utilizado [260].



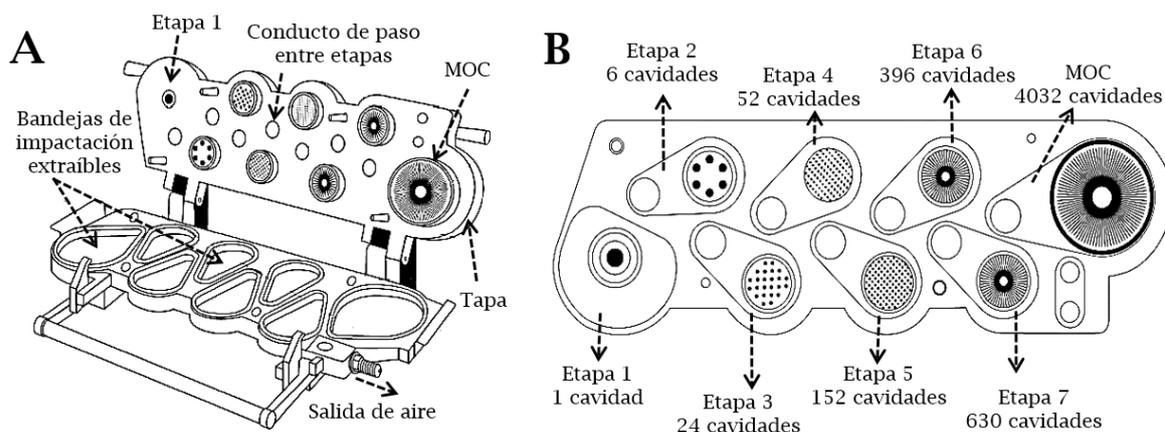
**Esquema 2.10.** – Esquema del equipo experimental *Next Generation Impactor* (NGI, Copley, Reino Unido): (A) Equipo completo para los ensayos de farmacopea; (B) Sección transversal de una etapa del NGI, representación del paso del flujo de aire a través de ella (figuras adaptadas de Ph. Eur. 5.1 [260]).

Los ensayos que se describen a continuación se realizaron con las micropartículas de dextrano (Capítulo 5) y con las micropartículas de azitromicina (Capítulo 7).

#### 2.4.3.1 Ensayo según las reglas de la farmacopea

El ensayo según farmacopea se realizó empleando un equipo estandarizado NGI, el cual está formado por 8 etapas diferentes (*Esquema 2.11A*). Además, se completó con una boquilla, un puerto de inducción de acero inoxidable y un pre-separador (*Esquema 2.10A*). Finalmente, al NGI se acopló una bomba de vacío (Copley HCP5, Reino Unido) y un controlador de flujo crítico (Copley TPK 2000, Reino Unido). Antes de realizar cada experimento se comprobó el flujo inspiratorio con un caudalímetro Copley DMF 2000 (Copley, Reino Unido). El inhalador Breezhaler®, de baja resistencia, requirió aplicar un flujo inspiratorio alto, en concreto de 100 L/min. Teniendo en cuenta que el volumen de los pulmones es de 4 L, el tiempo necesario para completar una respiración fue de 2,4 segundos.

Los diámetros de corte aerodinámico efectivos en cada etapa se obtuvieron siguiendo las instrucciones del fabricante (Copley, Reino Unido) para un flujo de 100 L/min: Etapa 1 (6,12  $\mu\text{m}$ ), etapa 2 (3,42  $\mu\text{m}$ ), etapa 3 (2,18  $\mu\text{m}$ ), etapa 4 (1,31  $\mu\text{m}$ ), etapa 5 (0,72  $\mu\text{m}$ ), etapa 6 (0,40  $\mu\text{m}$ ) y etapa 7 (0,24  $\mu\text{m}$ ) (*Esquema 2.11B*).



**Esquema 2.11.** - Equipo experimental *Next Generation Impactor* (NGI, Copley, Reino Unido): (A) Vista exterior del equipo abierto sin el puerto de inducción ni el pre-separador; (B) Esquema que muestra la orientación de las distintas etapas (figuras adaptadas de Ph. Eur. 5.1[260]).

Antes de comenzar el experimento, las diferentes etapas del NGI, así como el pre-separador se recubrieron con una mezcla formada por Brij-35 (15% p/p), etanol absoluto (51% p/p) y glicerol (34% p/p). Con este recubrimiento se favoreció la adhesión de las micropartículas al pasar por las distintas etapas del NGI, simulando de este modo los mecanismos de impactación y sedimentación que se producen en las vías respiratorias. Se introdujeron 15 mg de material a ensayar en cápsulas duras de gelatina y posteriormente se liberaron en el NGI empleando el inhalador de polvo seco (Breezhaler®, Capítulo 3, Figura 3.6). Para la realización de cada experimento se emplearon un total de 3 cápsulas (15 mg/cápsula) con el objetivo de obtener suficiente cantidad de principio activo depositado en las diferentes partes del NGI para su posterior cuantificación. Se realizaron 3 réplicas de cada experimento para posteriormente obtener los análisis estadísticos correspondientes (3 cápsulas/experimento  $\times$  3 experimentos, 9 cápsulas en total).

Después de cada experimento, el polvo depositado en las diferentes etapas del NGI, cápsulas e inhalador, se recogió en muestras independientes utilizando el disolvente adecuado de manera que se asegurase la total disolución del material activo a analizar. En el caso de las micropartículas de dextrano el disolvente empleado fue el DMSO y las muestras se analizaron posteriormente por UV-Vis (Anexo I, Punto I.3.2). Por otro lado, en el caso las micropartículas de azitromicina, las muestras se recogieron en etanol absoluto y se analizaron por UPLC (Anexo I, Punto I.3.4).

Los valores de fracción emitida (FE) (ecuación 2.4), la fracción fina de partículas (FFP) (ecuación 2.5) y la fracción respirable (ecuación 2.6) se calcularon con las ecuaciones descritas a continuación,

$$FE(\%) = \left( \frac{DE}{DT} \right) \times 100 \quad \text{Ec. (2.4)}$$

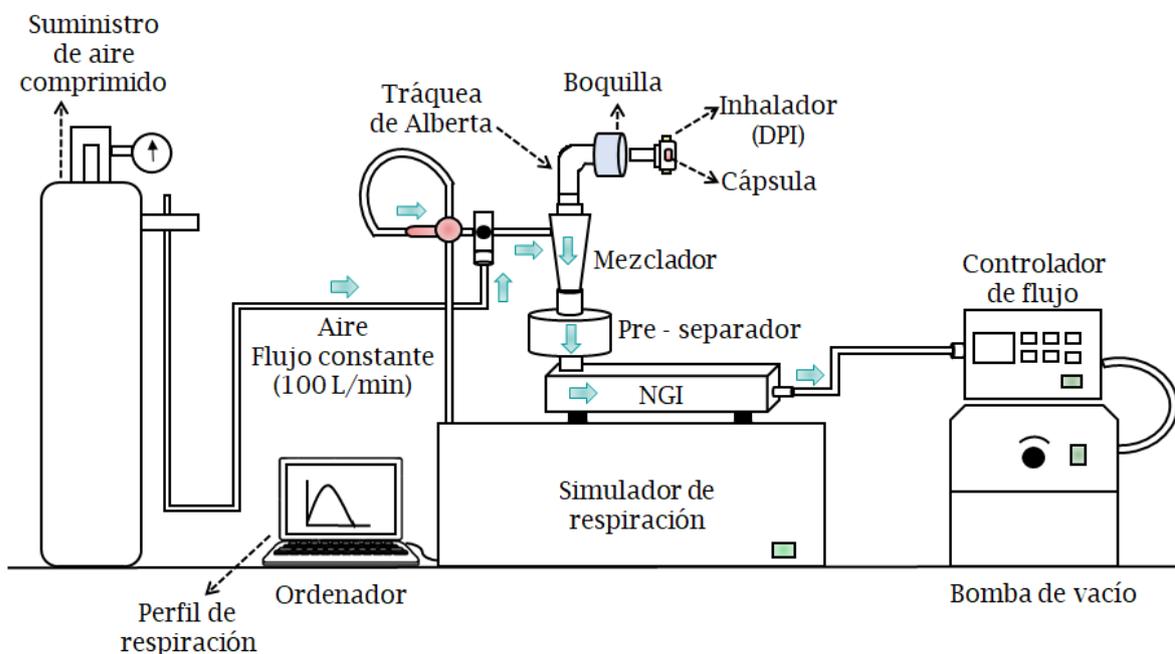
$$FFP(\%) = \left( \frac{DFP}{DE} \right) \times 100 \quad \text{Ec. (2.5)}$$

$$FR(\%) = \left( \frac{DFP}{DD} \right) \times 100 \quad \text{Ec. (2.6)}$$

donde la dosis emitida (DE) hace referencia a diferencia de masa de polvo inicial y la masa de polvo detectada después del proceso de aerosolización (descontando la masa residual en las cápsulas y dispositivo de inhalación). La dosis total (DT) es la cantidad de polvo (mg) cargado en las cápsulas. La fracción fina de partículas (FFP) se determinó como la cantidad de micropartículas depositadas en el NGI (diámetro aerodinámico  $\leq 4,46 \mu\text{m}$ ) sobre la dosis emitida. Y finalmente, la fracción respirable se calculó como la cantidad de micropartículas depositadas en el NGI (diámetro aerodinámico  $\leq 4,46 \mu\text{m}$ ) sobre la dosis depositada (DD) la cual representa las micropartículas depositadas entre las etapas 1 - 7 del NGI.

### 2.4.3.2 Influencia del perfil de respiración en la administración pulmonar de fármacos

Con el objetivo de obtener un diámetro aerodinámico más realista se empleó un simulador de respiración BRS 3000 (Copley, Reino Unido). El puerto de inducción empleado en los ensayos según farmacopea se sustituyó por la tráquea de Alberta y el flujo de inspiración constante (100 L/min) por un perfil de respiración diferenciado (correspondiente a un paciente sano o enfermo) (*Esquema 2.12*). Del mismo modo que en los ensayos de farmacopea la tráquea de Alberta se recubrió con una mezcla formada por Brij-35, etanol y glicerol.



**Esquema 2.12.** - Esquema experimental del sistema usado para las medidas realizadas con los perfiles de respiración. El sistema consta de: tráquea de Alberta, mezclador, pre-separador, simulador de respiración y NGI.

Los perfiles respiratorios tanto de un paciente sano como de un paciente enfermo de EPOC se obtuvieron de bibliografía [261,262]. Ambos perfiles se introdujeron en el software del simulador de respiración (Copley, Reino Unido) a partir de los datos que se encuentran recogidos en la *Tabla 2.8*, dando como resultado los perfiles de respiración que se observan en la *Figura 2.2*.

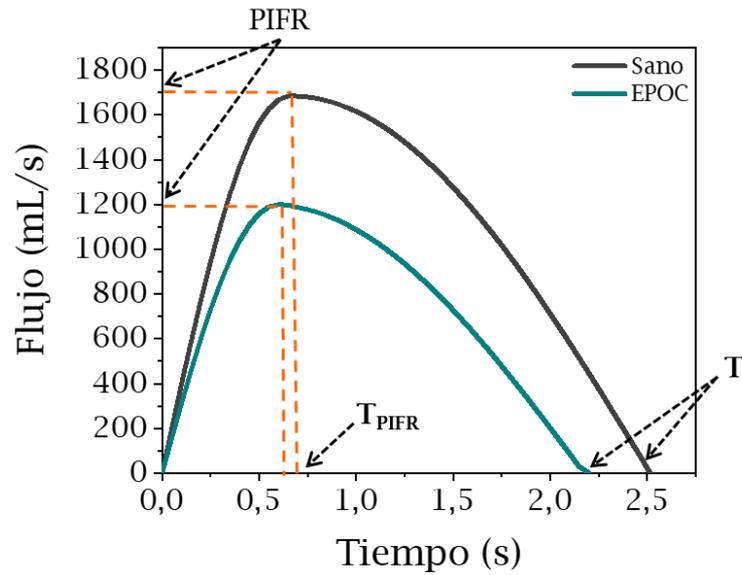
Hubo dos principales diferencias en los perfiles de respiración. En el caso del perfil del paciente sano, la duración fue algo mayor que en el caso del paciente con EPOC (2,5 s vs. 2,2 s). Lo mismo ocurrió con el valor del flujo inspiratorio máximo, ya que en el caso del paciente sano fue de 100 L/min frente a los 72 L/min del paciente con EPOC, en concordancia con una mayor capacidad pulmonar por parte del paciente sano.

En cada experimento se emplearon 3 cápsulas duras de glicerina con 15 mg de muestra. Cada experimento se repitió un total de 3 veces (3 cápsulas/réplica × 3 réplica, 9 cápsulas en total) empleando para la realización de los ensayos el inhalador de polvo seco Breezhaler®. Los valores de fracción emitida, fracción fina de partículas y fracción respirable se calcularon con las ecuaciones descritas anteriormente en el [Punto 2.4.3.1](#).

**Tabla 2.8** – Parámetros y ecuaciones empleadas para obtener los perfiles de respiración.

Parámetros*	Perfil Sano	Perfil EPOC
<b>PIFR</b>	101,1 L/min	72 L/min
<b>TPIFR</b>	0,66 s	0,60 s
	$T(s) = \frac{PIFR \times [L \times \text{min}^{-1}] \times T(s)}{30 \pi}$	
<b>V</b>	2,7 L	1,7 L
	$T(s) = \frac{30 \pi \times V(L)}{PIFR \times (L \times \text{min} - 1)}$	
<b>T<sub>total</sub></b>	2,517 s	2,225 s
	$0 \leq t < TIFR$	
<b>Función</b>	$FR(t) = PIFR \times \text{sen}\left(\frac{\pi t}{2TPIFR}\right)$	
	$TPIFR \leq t \leq T$	
	$FR(t) = PIFR \times \text{cos}\left(\frac{\pi(t - TPIFR)}{2(T - TPIFR)}\right)$	

\***PIFR**: Máximo de flujo inspiratorio; **TPIFR**: tiempo en el que se produce el PIFR; **V**: volumen inhalado; **T**: tiempo total de inspiración



**Figura 2.2.** – Perfiles de respiración estudiados: (A) Perfil de respiración de un paciente sano (tiempo total inspiración: 2,51 segundos); (B) Perfil de respiración de un paciente con EPOC (tiempo total inspiración: 2,21 segundos).



# Capítulo 3

## DISPOSITIVO DE GENERACIÓN DE AEROSOL DE SUSPENSIÓN NEUMÁTICA CON POSIBLE APLICACIÓN BIOMÉDICA

---

*Este tercer Capítulo aborda la generación de aerosoles a partir de materiales en forma de polvo seco. En primer lugar, se ofrece una descripción del dispositivo de generación de aerosoles empleado a lo largo de esta Tesis Doctoral. A continuación, se detallan los ensayos realizados para estudiar la viabilidad de su posible uso en tratamientos inhalatorios. Para ello se realizará la generación de aerosoles con distintas formulaciones en forma de polvo seco presentes en tres inhaladores comerciales. Se muestran ejemplos de su posible utilización y administración. Finalmente se recogen las principales conclusiones alcanzadas a lo largo de este capítulo.*



### 3. DISPOSITIVO DE GENERACIÓN DE AEROSOLES DE SUSPENSIÓN NEUMÁTICA CON POSIBLE APLICACIÓN BIOMÉDICA

#### 3.1 Introducción

Entender los mecanismos de deposición de partículas en el sistema respiratorio es de gran importancia tanto para evaluar los posibles riesgos que conlleva el proceso de inhalación de partículas como para mejorar la eficiencia de la administración de fármacos por vía inhalatoria [263]. Como se ha mencionado en el [Capítulo 1](#), tanto el mecanismo de deposición como su localización final en el sistema respiratorio dependen en gran medida del tamaño de partícula presente en el aerosol [82].

La administración de nano- y micropartículas directamente en los pulmones presenta importantes desafíos. En el caso de las nanopartículas con poca inercia se observa una baja eficiencia de retención debido a la exhalación. Por ello, resulta imprescindible avanzar en el desarrollo de nuevos dispositivos y formulaciones optimizadas a partir de nano- y microportadores que permitan solventar estos inconvenientes [264,265].

En los últimos años se ha desarrollado y patentado en nuestro grupo de investigación un generador de aerosoles basado en un impulso neumático capaz de aerosolizar micro- y nanomateriales en forma de polvo seco [266,267]. Este dispositivo combina las ventajas tanto de un inhalador de polvo seco (DPIs) con las de un inhalador presurizado de dosis medida (pDMIs) ([Capítulo 1, Tabla 1.9](#)).

Aunque en su origen el generador de aerosoles se diseñó para crear de manera reproducible atmósferas de nanopartículas aerosolizadas para su uso en estudios de riesgos por exposición a nanomateriales, presentó propiedades que lo hacen adecuado también para el suministro de fármacos por vía inhalatoria. Estudiarlas es el objetivo de esta Tesis Doctoral. En concreto, el

generador de aerosoles UNIZAR (denominado así en adelante) posee las siguientes características:

- *Efectivo*, la formulación empleada se encuentra en forma de polvo seco y, si se ha formulado correctamente, el dispositivo permite su disgregación en partículas individuales con un tamaño adecuado para llegar a las distintas regiones del sistema respiratorio. No sería por tanto necesario el uso de excipientes ni portadores que faciliten el proceso de disgregación de las partículas de fármaco, ya que el propio mecanismo de funcionamiento separa los agregados formados [191].
- *Versátil*, como se describe a lo largo de esta Tesis Doctoral, ha permitido la aerosolización de distintas formulaciones, desde partículas poliméricas hasta partículas de fármaco puro, con un amplio rango de tamaños, eliminando de esta forma la limitación que poseen muchos DPIs de ser exclusivos para una única formulación [185].
- *Estable*, ya que es capaz de producir dispersiones instantáneas de partículas en forma de nube y/o generar una corriente de aerosol con una concentración constante y estable en el tiempo.
- *Reproducible*, permite generar aerosoles con una concentración de fármaco reproducible. Al ser independiente del flujo inspiratorio del paciente, la concentración de partículas presentes en el aerosol para unas condiciones de aerosolización y una determinada formulación va a ser siempre la misma.
- *Compatible* con cualquier patología, no es necesaria la coordinación del paciente en el proceso de inhalación como en el caso de los pMDIs ni tampoco un flujo inspiratorio suficiente por parte del paciente para inhalar el polvo de la formulación como en los DPIs [268]. Esta característica permitiría su uso por un amplio grupo de pacientes.

- *Terapia dirigida*, su alta capacidad de disgregación de la formulación junto con su versatilidad en cuanto al tamaño de partícula que se puede aerosolizar, permite emplear formulaciones con un tamaño de partícula diseñado para alcanzar una determinada región del sistema respiratorio que sea objeto del tratamiento. En concreto, al permitir superar las limitaciones asociadas a la aglomeración de las partículas de menor tamaño, se puede alcanzar incluso los alveolos [80].

Por ello, la tecnología desarrollada podría solventar de manera conjunta algunos de los principales problemas que presentan ambos tipos de dispositivos de inhalación, DPIs y pMDIs. En base a estas ventajas potenciales, se decidió estudiar el uso del generador de aerosoles UNIZAR como posible dispositivo de administración de fármacos por vía inhalatoria.

### **3.2 Descripción del generador de aerosoles de suspensión neumática**

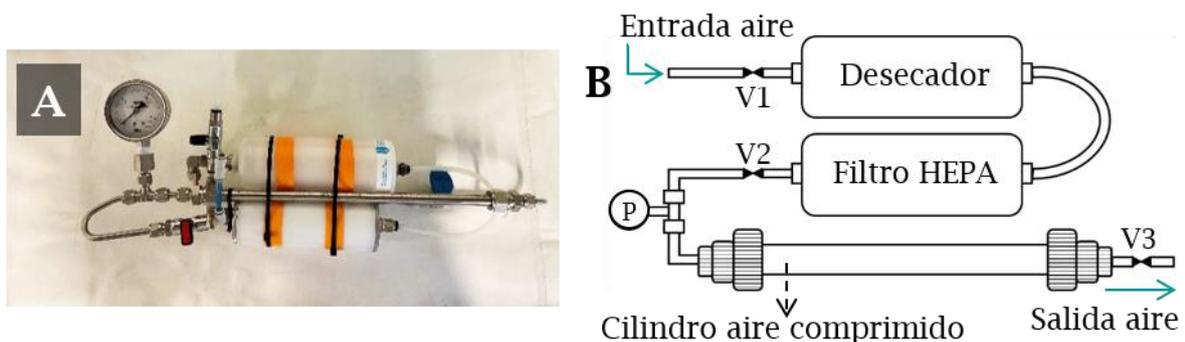
El dispositivo de generación de aerosoles UNIZAR empleado en esta Tesis Doctoral, fue diseñado y desarrollado en el marco de la Tesis Doctoral del **Dr. Alberto Clemente**, patentado por la Universidad de Zaragoza y licenciado posteriormente a la empresa VitroCell Systems GmbH (Waldkirch, Alemania) para aplicación de estudios toxicológicos [266]. Este sistema permite la generación instantánea de una nube y/o de una corriente continua de aerosol particulado empleando micro- o nanopartículas en forma de polvo seco mediante un pulso de presión. La versatilidad del sistema se demostró tanto con compuestos inorgánicos (óxido de titanio, óxido de zinc y óxido de cobre (II)) como con compuestos orgánicos (nanotubos de carbono) [267].

A continuación, se describen en detalle las diferentes partes que componen este dispositivo de generación de aerosoles, así como el mecanismo de funcionamiento para obtener un aerosol particulado.

### 3.2.1 Equipo de generación de aerosoles UNIZAR. Descripción de sus componentes

#### 3.2.1.1 Reservorio de aire

El reservorio de aire (o cámara secundaria) está compuesto por una zona de acondicionamiento del aire a presión y contenedor de aire comprimido de volumen fijo. La primera zona está formada por un desecador de gel de sílice y un filtro de alta eficiencia (HEPA) que permiten el secado y filtrado del aire empleado para la dispersión de las partículas. El contenedor de aire comprimido de volumen fijo, consiste en un cilindro de acero inoxidable (10 mm de diámetro interno) de albergar un volumen de 30 cm<sup>3</sup> en su interior, que contiene aire a una sobrepresión de hasta 8 barg. Este cilindro viene delimitado por dos válvulas (V) manuales de paso V2 y V3 (*Figura 3.1*).



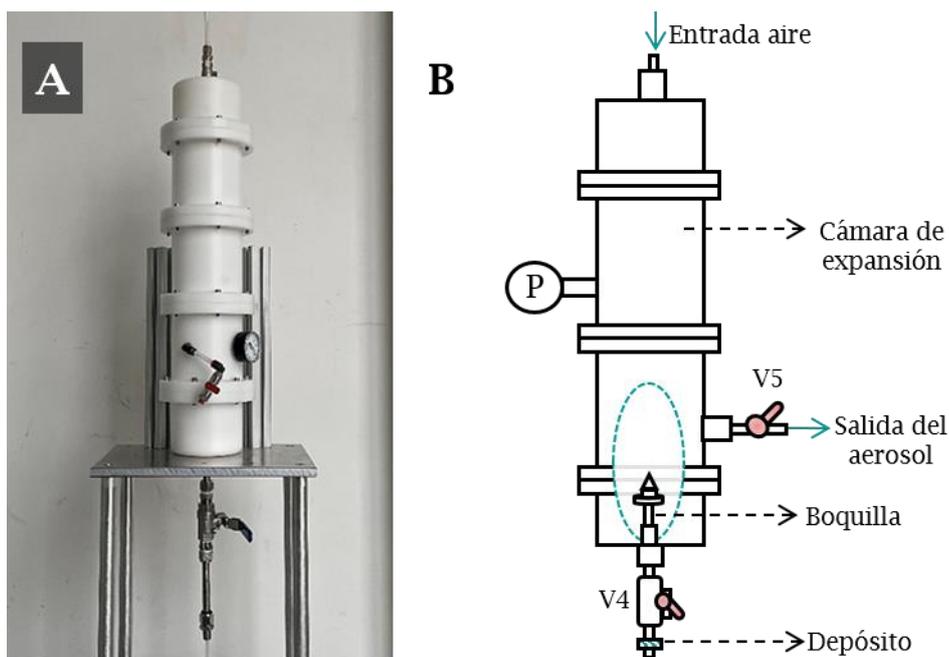
**Figura 3.1.** – (A) Fotografía del (reservorio de aire); (B) Esquema del reservorio de aire comprimido con las distintas partes que la componen.

#### 3.2.1.2 Cámara principal o de expansión

La cámara principal o de expansión está constituida por un cilindro fabricado a partir del polímero polioximetano (POM) con 10,5 cm de diámetro interno y ~ 50 cm de longitud. La cámara principal es desmontable y de diseño modular, lo que facilita el proceso de limpieza y la posibilidad de regular su tamaño. Se encuentra subdividida en bloques centrales de 15 cm y dos bloques terminales de 10 cm de longitud (*Figura 3.2*) y es capaz de contener aire hasta una sobrepresión de 4 barg. En el interior de esta cámara se encuentra una

boquilla (Punto 3.2.1.3) por la que sale el material particulado impulsado neumáticamente formando una nube de aerosol.

Además, la cámara principal cuenta con una válvula manual de paso (V5) que, tras su apertura, permite la salida de una corriente continua del aerosol almacenado en el interior (Figura 3.2).



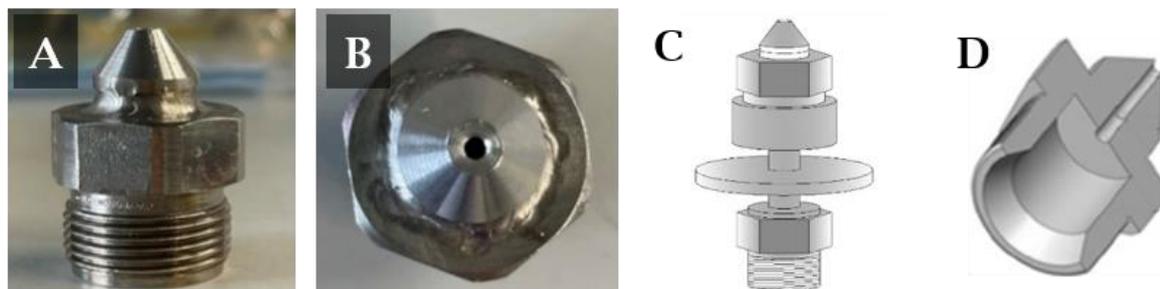
**Figura 3.2.** - (A) Fotografía de la cámara principal (cámara de expansión); (B) Esquema de la cámara principal con las distintas partes que la componen.

### 3.2.1.3 Boquilla

La boquilla de dispersión se encuentra en el interior de la cámara principal y comprende un cuerpo principal en cuyo interior se disponen diversas cavidades interconectadas y alineadas a lo largo de un eje longitudinal (Figura 3.3D). La cavidad de salida de la boquilla tiene un diámetro de 1,6 mm y da paso al aerosol a la cámara principal (Figura 3.3).

Al final de dicho eje longitudinal se encuentra el soporte para la formulación, constituido por una malla de acero inoxidable (50  $\mu\text{m}$  de luz) sobre la que se coloca el material en forma de polvo seco que se va a aerosolizar.

Dicha malla puede extraerse fácilmente para proceder a su sustitución o limpieza.



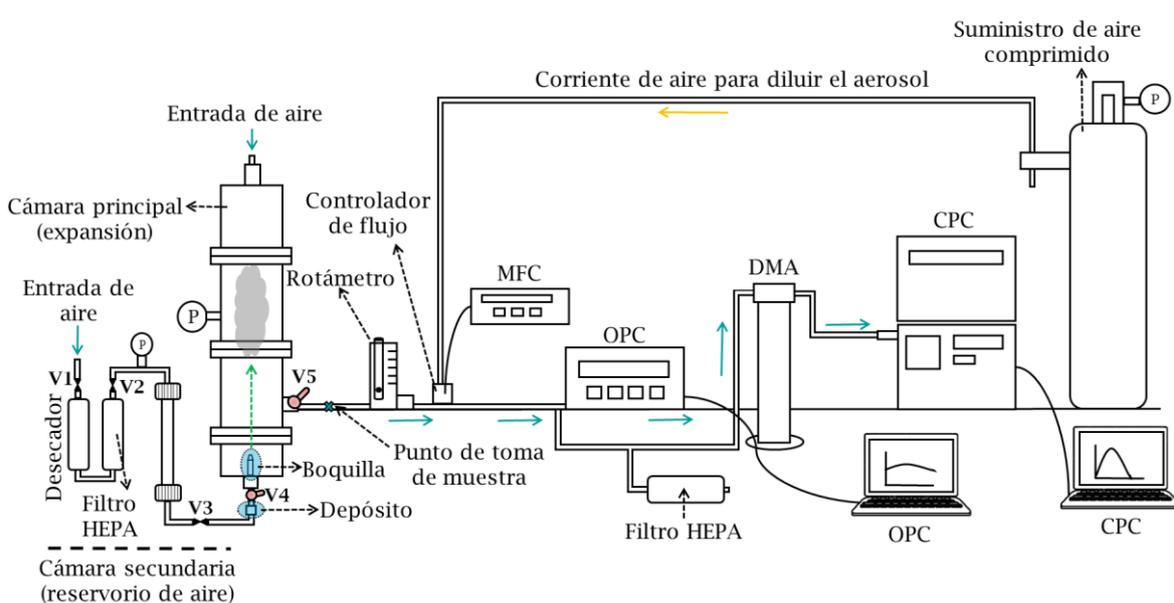
**Figura 3.3.** - (A - B) Vistas lateral y superior de la boquilla empleada en el sistema de generación de aerosoles UNIZAR; (C - D) Esquema mostrando la boquilla y sus conexiones.

### 3.2.2 Principio de funcionamiento del generador de aerosoles UNIZAR

La cámara principal se coloca en posición vertical y se conecta a la cámara secundaria a través de la válvula de paso V3. La apertura instantánea y completa de V4, da paso al aire comprimido del reservorio, produciendo una onda de presión en la cámara principal que arrastra el material en forma de polvo seco colocado sobre la rejilla. Las fuerzas rasantes que se producen al pasar el aire a gran velocidad por el estrechamiento que presenta la boquilla favorecen la disgregación de los aglomerados presentes en la muestra inicial, dando lugar a un aerosol con alta dispersión que se almacena en el interior de la cámara principal. La apertura de la V5 produce la salida de una corriente continua del aerosol contenido en la cámara principal, cuyo caudal se regula con un rotámetro.

La corriente de salida puede mezclarse a una corriente de aire de dilución que permita modular la concentración de la corriente de aerosol generada según las necesidades del estudio o para asegurar el correcto funcionamiento de los equipos de caracterización de aerosoles empleados, contador de partículas óptico (OPC) y contador de núcleos de condensación (CPC) que requieren unos intervalos de concentración concretos ([Anexo I, Sección I.4](#)).

Este caudal de dilución se reguló mediante un controlador de flujo másico (MFC; *Mass Flow Controller*) (Esquema 3.1).



**Esquema 3.1.** – Esquema general de la instalación para la generación y medida de aerosoles formado por la cámara secundaria, cámara de expansión, boquilla y equipos de caracterización de aerosoles, OPC y CPC.

### 3.3 Utilización del dispositivo de generación de aerosoles para la administración de fármacos por vía inhalatoria

Como se ha comentado en el [Capítulo 1](#), actualmente hay una gran variedad de inhaladores en polvo seco tanto para el tratamiento del asma como de la EPOC. Por este motivo, se usaron tres formulaciones comerciales en forma de polvo seco diferentes: Ultibro<sup>®</sup>, Seebri<sup>®</sup> y Foster<sup>®</sup>, que son administradas en dos tipos de inhaladores diferentes, Breezhaler<sup>®</sup> y Nexthaler<sup>®</sup>, todas ellas de dispensación en farmacia.

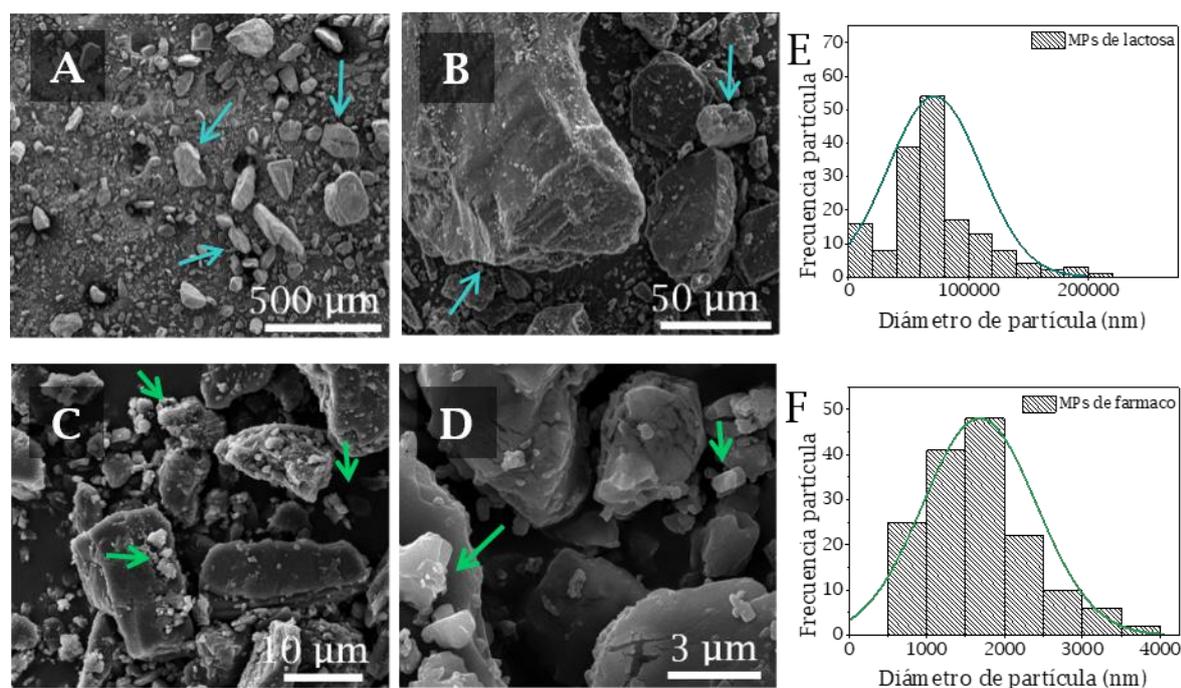
#### 3.3.1 Fármacos comerciales

##### 3.3.1.1 Ultibro<sup>®</sup> y Seebri<sup>®</sup> en Breezhaler<sup>®</sup>

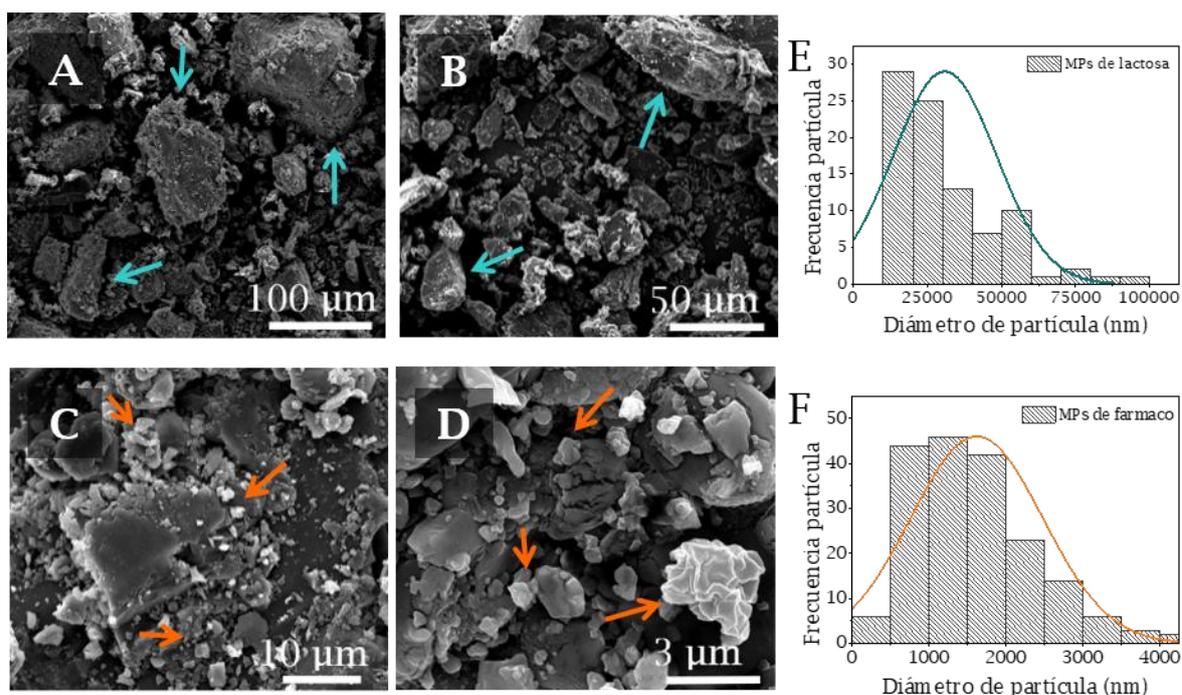
Breezhaler<sup>®</sup> es un dispositivo de inhalación de polvo seco comercializado por la compañía farmacéutica Novartis (Suiza). Este DPI ha sido aprobado para

la administración de los fármacos indacaterol (agonista  $\beta$ -adrenérgico de larga duración (LABA)) y bromuro de glicopirronio (broncodilatador, anticolinérgico de larga duración). Estos fármacos se pueden administrar conjuntos (Ultibro®) o de manera individual (Seebri®) [269].

Ultibro® contiene en cada cápsula una mezcla de los dos principios activos, 63  $\mu\text{g}$  bromuro de glicopirronio y 143  $\mu\text{g}$  de maleato de indacaterol y, como excipiente (portador) cristales de lactosa monohidrato 23,5 mg (Figura 3.4). Por el contrario, la formulación Seebri® está formada por un solo principio activo y cada cápsula tiene aproximadamente 63  $\mu\text{g}$  bromuro de glicopirronio y 23,6 mg de lactosa monohidrato (Figura 3.5) [270]. Ambas formulaciones se observaron por microscopía SEM (Figura 3.4 y 3.5), lo que permitió comprobar la existencia de micropartículas de fármaco sobre los cristales de lactosa.



**Figura 3.4.** - (A - D) Imágenes de microscopía SEM de la formulación Ultibro® en forma de polvo seco presente en las cápsulas del inhalador Breezhaler®. Las flechas azules señalan los cristales de lactosa, mientras que las flechas verdes indican las micropartículas de fármaco dispuestas sobre su superficie; (E) Histograma de distribución de tamaños de los cristales de lactosa ( $d_p = 71,65 \pm 38,70 \mu\text{m}$ ) (N= 150); (F) Histograma de distribución tamaños de las micropartículas de fármaco ( $d_p = 1,68 \pm 0,73 \mu\text{m}$ ) (N= 150).

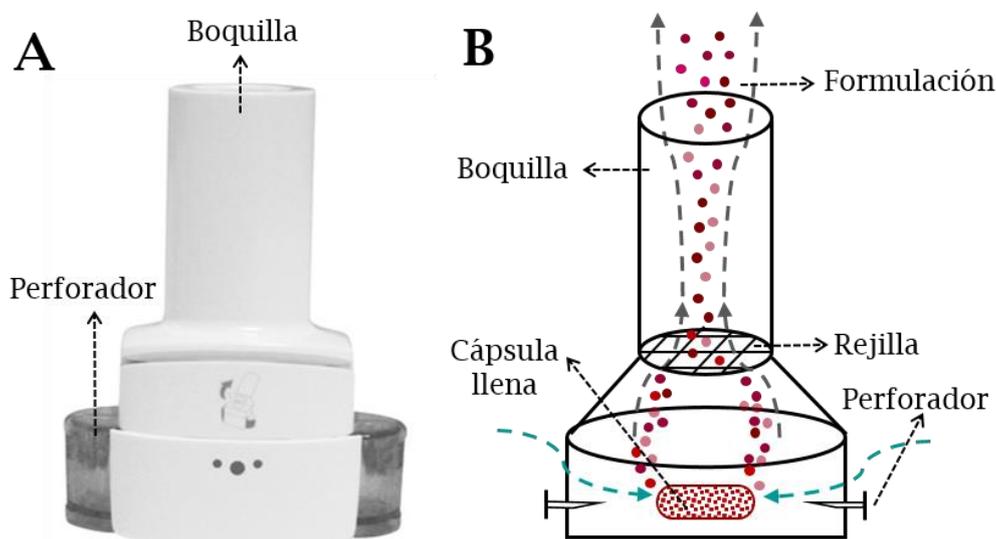


**Figura 3.5.** - (A - D) Imágenes de microscopía SEM de la formulación en forma de polvo seco presente en las cápsulas del inhalador Seebri® Breezhaler®. Las flechas azules señalan los cristales de lactosa, mientras que las flechas naranjas indican micropartículas de fármaco dispuestas sobre la superficie; (E) Histograma de distribución de tamaños de los cristales de lactosa ( $d_p = 30,80 \pm 17,40 \mu\text{m}$ ) (N= 90); (F) Histograma de distribución de distribución de las micropartículas de fármaco ( $d_p = 1,61 \pm 0,86 \mu\text{m}$ ) (N= 150).

En ambas formulaciones se observó una gran diferencia entre los tamaños del principio activo adherido a la superficie en forma de pequeños aglomerados y la lactosa con una morfología de bloques. Como se ha visto en otras formulaciones, las partículas de lactosa mostraron una superficie sin rugosidades con sólo unas pocas hendiduras [271].

El dispositivo de inhalación Breezhaler® es un inhalador monodosis de polvo seco y de baja resistencia (flujos > 90 L/min) (Figura 3.6) en el que la formulación se encuentra almacenada en cápsulas individuales. El mecanismo de funcionamiento es sencillo y no requiere la coordinación entre la inhalación y la rotura de la cápsula [272]. Se ha demostrado que con este dispositivo la fracción fina de partículas (FFP), que llega al sistema respiratorio se incrementa en función del tiempo de apnea tras el proceso de inhalación. El porcentaje de la FFP es directamente proporcional al tiempo de apnea obteniéndose valores

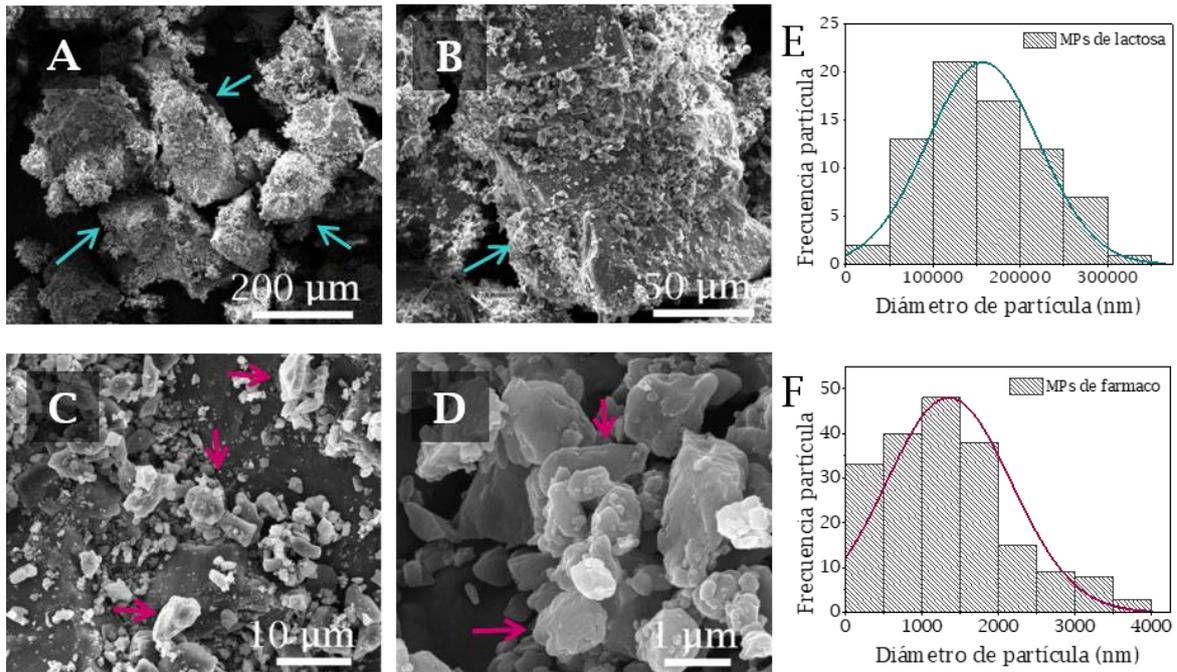
de 26,5%, 37,2% y 53% para 5, 10 y 25 segundos respectivamente [273]. Este inhalador permite alcanzar unos valores de FFP altos, al mismo tiempo que puede emplearse por pacientes con distintos grados de EPOC, entre los cuales ha mostrado buena adherencia [269].



**Figura 3.6.** - (A) Imagen del inhalador de polvo seco Breezhaler®; (B) Esquema del interior del inhalador con las diferentes partes que lo componen. Las flechas grises hacen referencia al movimiento de la formulación por el inhalador en el proceso de inspiración.

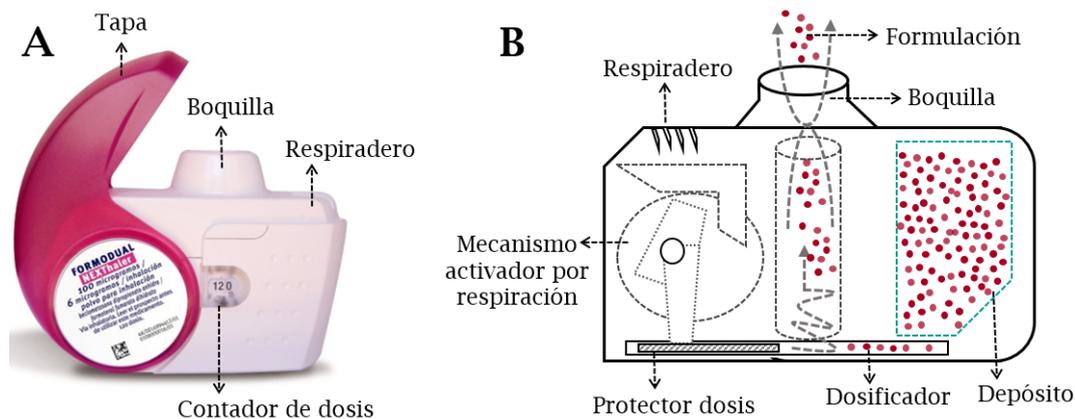
### 3.3.1.2 Foster® Nexthaler®

Foster Nexthaler® contiene una formulación en forma de polvo seco compuesta por dos principios activos, un corticoide (beclometasona dipropionato anhidro, 100 µg) y un agonista β<sub>2</sub>-adrenérgico de acción larga (LABA) (formoterol fumarato dihidrato, 6 µg), siendo los excipientes empleados lactosa monohidratada y estearato de magnesio [274]. La formulación se basa en la micronización de ambos fármacos para la obtención de micropartículas que posteriormente se mezclan con cristales de lactosa de gran tamaño y estearato de magnesio que actúan como portadores [275] (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** - (A - D) Imágenes de microscopía SEM de la formulación en forma de polvo seco presente en el depósito del inhalador Foster® Nexthaler®. Las flechas azules señalan los cristales de lactosa, mientras que las flechas moradas indican micropartículas de fármaco dispuestas sobre la superficie; (E) Histograma de distribución de tamaños de los cristales de lactosa ( $d_p = 157,15 \pm 64,00 \mu\text{m}$ ) ( $N= 75$ ); (F) Histograma de distribución de tamaños de las micropartículas de fármaco ( $d_p = 1,34 \pm 0,82 \mu\text{m}$ ) ( $N= 150$ ).

Esta formulación se encuentra en un DPI multidosis (Nexthaler®, Chiesi, Italia) (Figura 3.8). Su característica más innovadora es que tiene integrado un mecanismo de activación por respiración, es decir, la dosis de fármaco es emitida desde el inhalador en el momento en el que el flujo inspiratorio del paciente es lo suficientemente alto como para ser capaz de respirarla (35 L/min) [276]. Este caudal de flujo inspiratorio provoca una turbulencia de alta intensidad en el interior del inhalador, que se pretende que dé como resultado una separación eficiente de gran parte de las micropartículas del fármaco de los cristales de lactosa. Al mismo tiempo, esta separación también está favorecida por las colisiones entre partículas con elevada energía cinética y las paredes del inhalador [277]. El proceso de inhalación de una dosis del medicamento es sencillo, en el momento en el paciente abre la tapa, la dosis se libera del depósito encontrándose disponible para su inhalación [278].



**Figura 3.8.** – (A) Imagen del inhalador de polvo seco Foster Nexthaler® con las diferentes partes que lo componen; (B) Esquema del interior del inhalador. Las flechas grises hacen referencia al movimiento de la formulación por el inhalador durante el proceso de inhalación.

Se ha demostrado que Nexthaler® emite una fracción fina de partículas ( $d_p < 5\mu\text{m}$ ) y una fracción ultrafina ( $d_p < 2\mu\text{m}$ ) [278]. Es más, aproximadamente un tercio de la FFP está compuesto por partículas de un tamaño  $< 1\mu\text{m}$ . Las partículas de menor tamaño no se depositan en la orofaringe, lo que favorece que un 56% de la dosis inhalada sea capaz de alcanzar las vías respiratorias [279]. Además, este inhalador ha confirmado no solo ha demostrado ser eficaz en la administración del fármaco aerosolizado, sino que ha logrado una buena aceptación y adherencia por parte de los pacientes con asma que requieren un tratamiento de mantenimiento de dicha enfermedad [280].

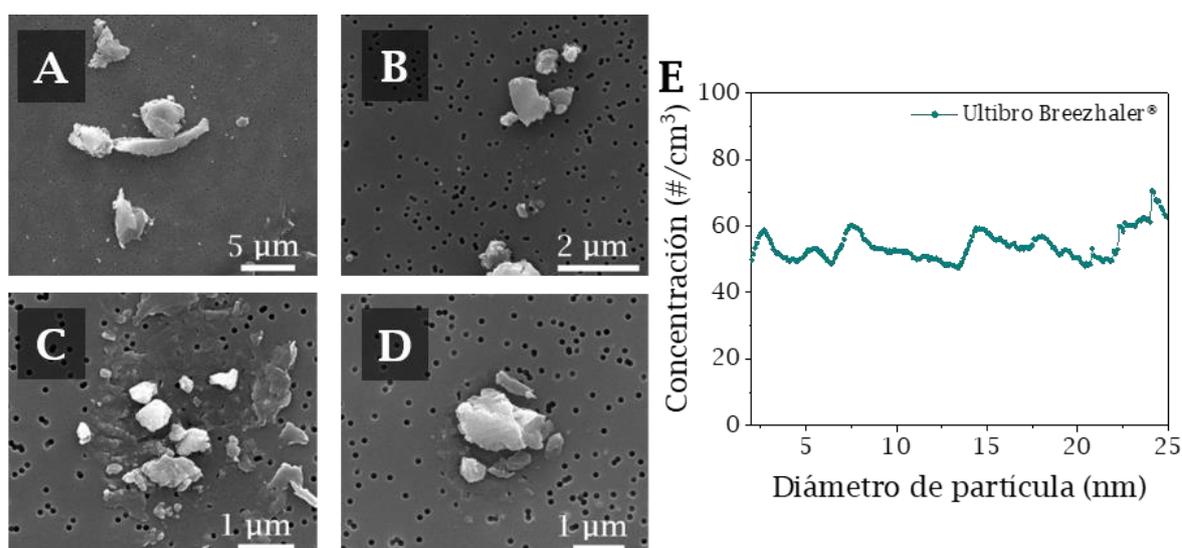
### 3.3.2 Aerosolización de las formulaciones comerciales con el dispositivo de generación de aerosoles UNIZAR

Las formulaciones procedentes de los tres inhaladores de polvo seco (Ultibro® Breezhaler®, Seebri® Breezhaler® y Foster® Nexthaler®) se extrajeron de las cápsulas (en el caso de Breezhaler®) y del depósito (Nexthaler®) y se colocó una masa de  $20 \pm 2\text{ mg}$  de cada una en el depósito para el material del generador UNIZAR (Sección 3.1). La configuración del generador de aerosoles UNIZAR fue la misma en todos los casos.

Los ensayos se realizaron con presiones de 8 barg en el depósito de aire comprimido (cámara secundaria) y 4 barg en la cámara de expansión. Tras la aerosolización, se procedió a la apertura de la válvula V5 obteniéndose una corriente continua de aerosol que se caracterizó empleando los contadores de partículas OPC y CPC. Se realizó la toma de muestra del material particulado presente en la fase aerosol capturándolo en filtros de policarbonato (PC) (microscopía SEM) y rejillas para microscopía TEM (Anexo I, Sección I.2).

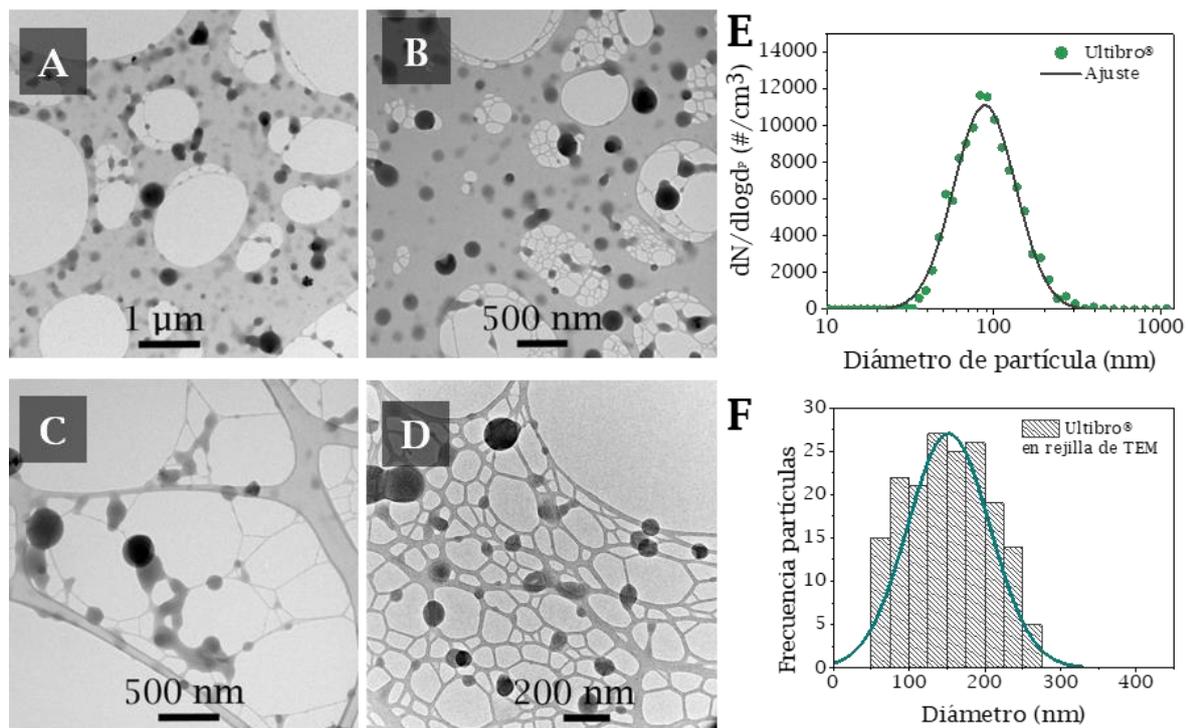
### 3.3.2.1 Aerosolización Ultibro® Breezhaler®

La aerosolización de la formulación Ultibro® empleando el generador de aerosoles UNIZAR permitió producir una corriente estable de aerosol (a partir de los primeros 2 minutos). Se monitorizó la evolución temporal del aerosol para partículas micrométricas (entre 0,3 - 10  $\mu\text{m}$ ), mediante OPC (Figura 3.9E), obteniéndose una concentración aproximadamente constante durante 25 minutos, aunque con una concentración escasa de partículas en este rango de tamaños (del orden de 55  $\#/\text{cm}^3$ ). Las muestras recogidas para su observación por microscopía SEM mostraron capturas de micropartículas de fármaco ( $d_p = 0,65 \pm 0,49 \mu\text{m}$ ) (Figura 3.9A-D).



**Figura 3.9.** - (A - D) Imágenes de microscopía SEM de la formulación de Ultibro® Breezhaler® capturada en fase aerosol tras su aerosolización en forma de polvo seco con el generador de aerosoles UNIZAR; (E) Evolución temporal de la concentración de partículas entre 0,3 - 10  $\mu\text{m}$  medido por OPC.

Por otro lado, la medida de la distribución de tamaños de partícula obtenidas con el CPC (fracción de partículas entre 0,01 - 1  $\mu\text{m}$ ) muestra un aerosol con una concentración total de partículas  $\sim 22.000 \text{ \#/cm}^3$  y un diámetro geométrico medio (GMD) de  $91,2 \pm 1,5 \text{ nm}$  (Figura 3.10). Las muestras de partículas en fase aerosol capturadas en rejillas de TEM mostraron una distribución de tamaño en el mismo orden de magnitud de partículas con un  $d_p = 152,4 \pm 54,2 \text{ nm}$ . Estos tamaños medios obtenidos por el equipo CPC y por microscopía TEM son mucho menores que el tamaño de partícula que presentaba el material de partida ( $d_p = 1,68 \pm 0,73 \mu\text{m}$ ). Esto sugiere que no solo se produce una disgregación de las micropartículas de fármaco, separándose el principio activo desde los cristales de lactosa, sino que, al mismo tiempo, se produce una rotura de las micropartículas de principio activo en tamaños inferiores a 1  $\mu\text{m}$ , generando un tamaño adecuado para llegar a los alveolos.

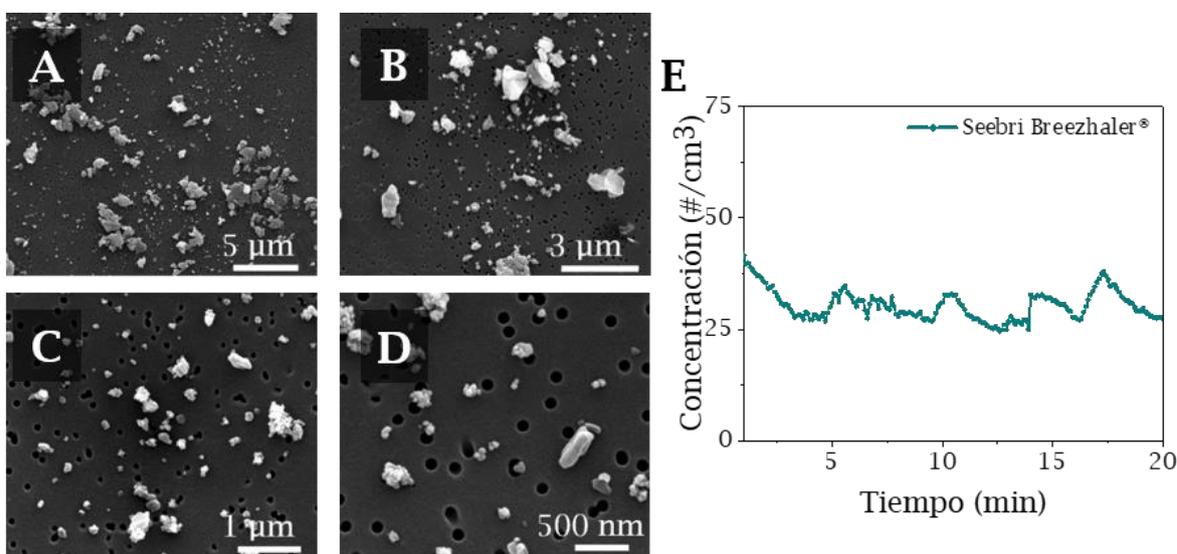


**Figura 3.10.** - (A - D) Imágenes de microscopía TEM de la formulación de Ultibro® Breezhaler® capturada en fase aerosol tras su aerosolización en forma de polvo seco con el generador de aerosoles UNIZAR; (E) Caracterización de la corriente de aerosol. Curva de distribución de tamaño de partículas entre 0,01 - 1  $\mu\text{m}$  medido con CPC; (F) Histograma de distribución de tamaños de partícula ( $d_p = 152,4 \pm 54,2 \text{ nm}$ ) ( $N = 150$ ).

Además, la configuración del aerosolizador favorece la eliminación de las partículas de lactosa, que por su mayor tamaño sedimentarían en la cámara principal, quedando la corriente de salida libre de ellas, como muestran los resultados reflejados en la *Figura 3.10*.

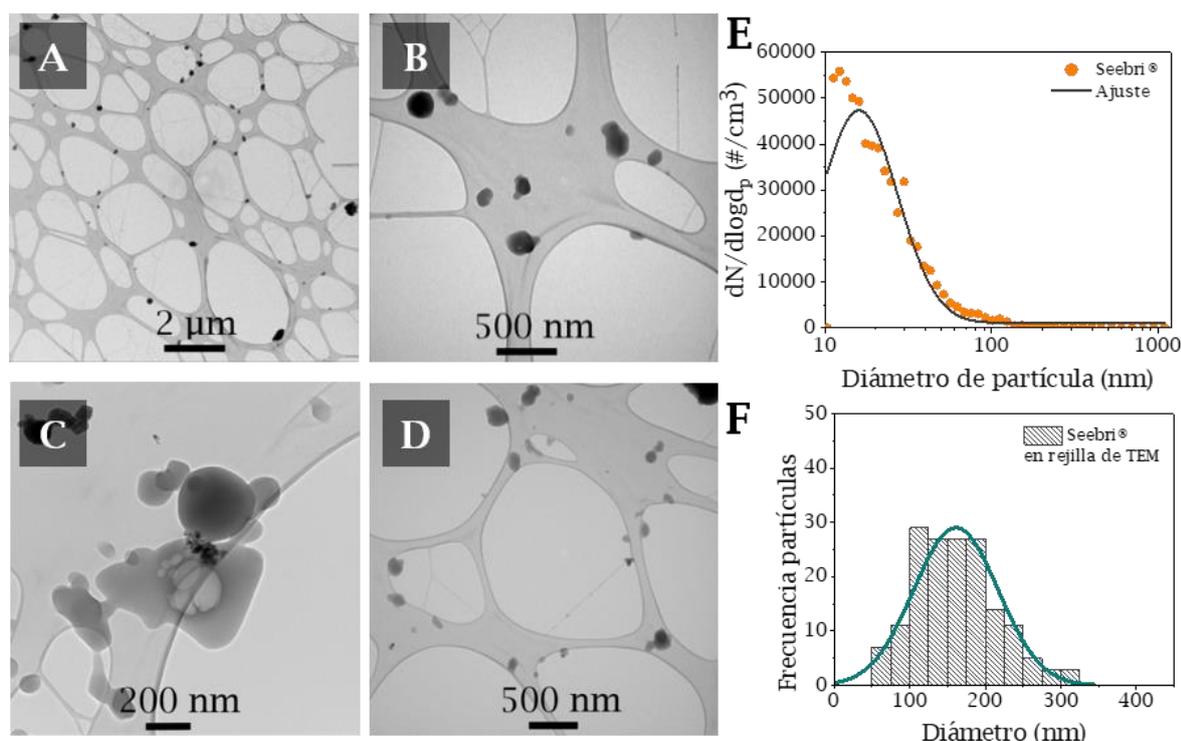
### 3.3.2.2 Aerosolización Seebri Breezhaler®

La aerosolización de la formulación Seebri® generó una corriente de aerosol continua en el tiempo de unos 20 minutos. Su monitorización de forma continua por medio del OPC (partículas entre 0,3 - 10  $\mu\text{m}$ ) mostró una concentración de  $\sim 40 \text{ \#/cm}^3$ , reflejando una pequeña contribución de las partículas en este rango de tamaños (*Figura 3.11E*). Las imágenes analizadas por microscopía SEM de las muestras capturadas en fase aerosol mostraron un  $d_p = 246,8 \pm 194,3 \text{ nm}$  (*Figura 3.11*). Al igual que en el caso anterior, se concluye que en el proceso de aerosolización no solo se separaron las micropartículas de fármaco de los cristales de lactosa, sino que también se disgregaron en micropartículas de menor tamaño respecto a la muestra de partida, donde el tamaño medio del fármaco era de  $1,61 \pm 0,86 \mu\text{m}$ .



**Figura 3.11.** - (A - D) Imágenes de microscopía SEM de la formulación de Seebri® Breezhaler® capturada en fase aerosol tras su aerosolización en forma de polvo seco con el generador de aerosoles UNIZAR; (E) Evolución temporal de la concentración de partículas entre 0,3 - 10  $\mu\text{m}$  medido mediante OPC.

Las partículas entre 0,01 - 1  $\mu\text{m}$ , mostraron una concentración medida mediante CPC de 79.595  $\#/\text{cm}^3$  (GMD = 21,1  $\pm$  1,4 nm) (Figura 3.12). Las imágenes de las rejillas de TEM de las partículas en fase aerosol capturadas mostraron fragmentos de fármaco aún más pequeñas que las observadas por microscopía SEM, con un tamaño medio de partícula de 161,1  $\pm$  55,9 nm.



**Figura 3.12.** - (A - D) Imágenes de microscopía TEM de la formulación de Seebri® Breezhaler® capturada en fase aerosol tras su aerosolización en forma de polvo seco con el generador de aerosoles UNIZAR; (E) Curva de distribución de tamaño de partículas entre 0,01 - 1  $\mu\text{m}$  medido por CPC (GMD = 21,1  $\pm$  1,4 nm); (F) Histograma de distribución de tamaños de partícula ( $d_p = 161,1 \pm 55,9$  nm) (N = 150).

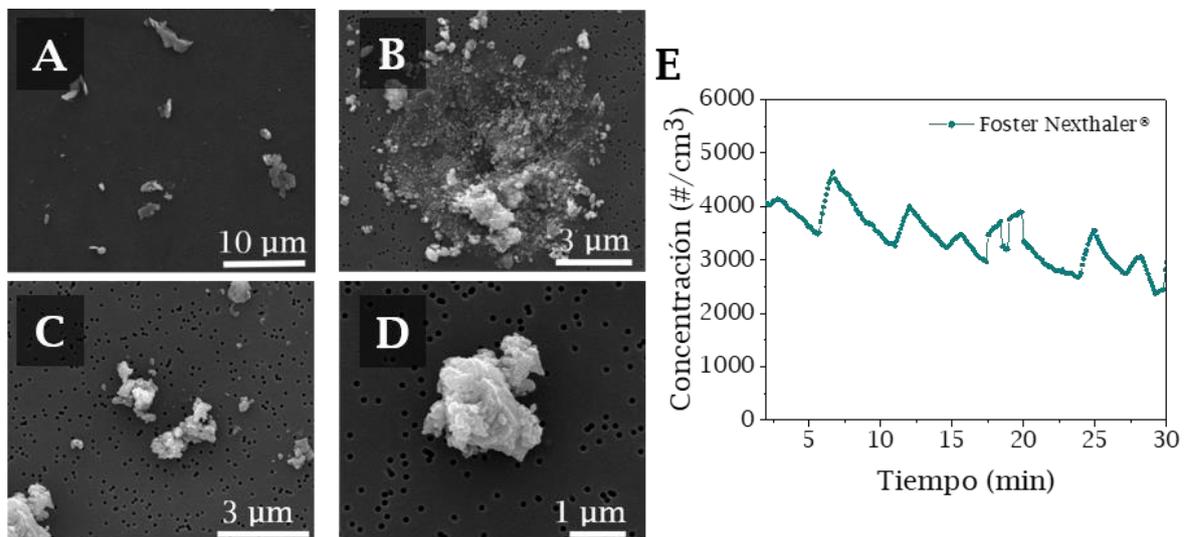
Del mismo modo que en el caso anterior, los resultados obtenidos sugieren que la aerosolización de esta formulación en el generador de aerosoles UNIZAR permite una separación de las partículas de principio activo de los cristales de lactosa y una fragmentación de las micropartículas de principio activo en tamaños inferiores a 1  $\mu\text{m}$ . En comparación con la formulación anterior (Ultibro®), la fragmentación de las micropartículas de fármaco sería aún mayor, produciendo una población de nanopartículas extremadamente

pequeñas ( $\sim 20 - 25 \text{ nm}$ ) que no pueden ser fácilmente capturadas por los filtros y rejillas utilizados.

### 3.3.2.3 Aerosolización Foster® Nexthaler®

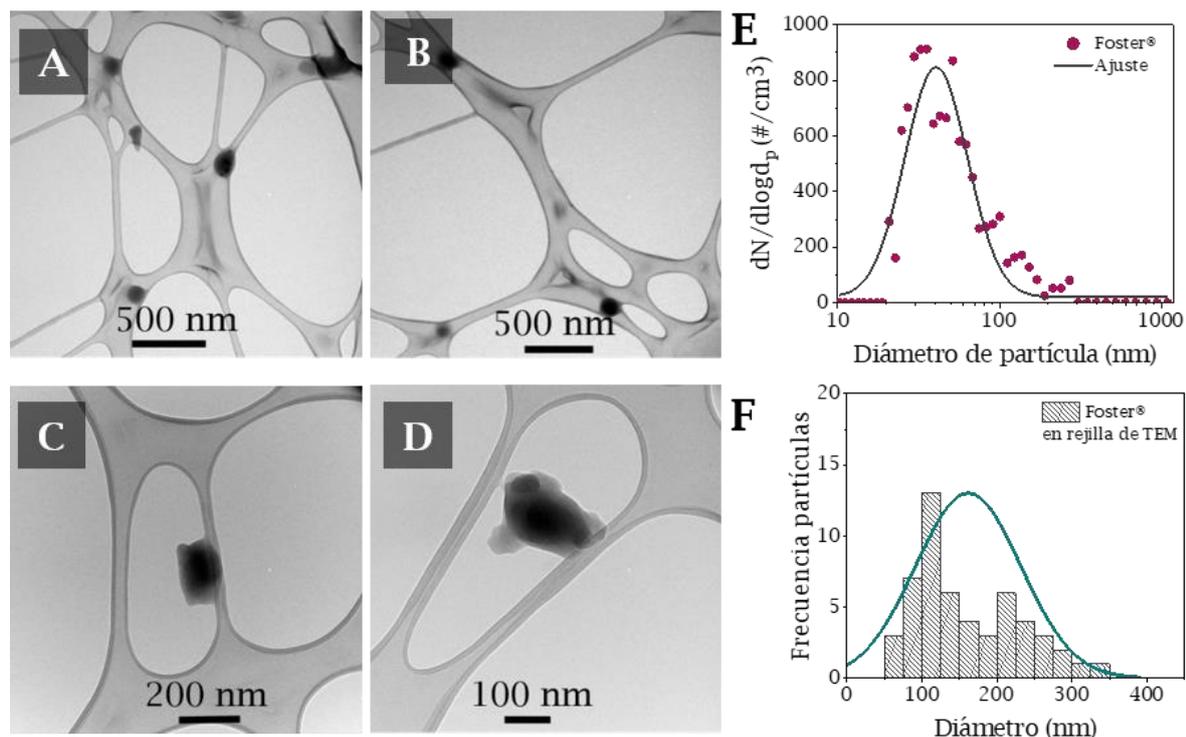
En el caso de la formulación Foster® también se obtuvo una corriente de aerosol continua durante los 25 minutos del ensayo con una concentración de partículas de  $\sim 3.500 \text{ \#/cm}^3$  para partículas medidas por el equipo OPC, es decir, con un tamaño entre  $0,3 - 10 \text{ \mu m}$  (Figura 3.13E). Esto indica una contribución significativa de partículas en este rango de tamaños considerablemente mayor que con las formulaciones Ultibro® y Seebri®.

Igual que en los casos anteriores, se han realizado medidas de microscopía sobre muestras del aerosol. En las muestras capturadas en filtros de PC para microscopia SEM, se aprecia una elevada concentración de partículas, más aglomeradas y con una menor disgregación en comparación con las muestras tras la aerosolización de las formulaciones para Ultibro® y Seebri® (Figura 3.13A-D).



**Figura 3.13.** - (A - D) Imágenes de microscopía SEM de la formulación Foster® de partículas capturadas en fase aerosol tras su aerosolización en forma de polvo seco con el generador de aerosoles UNIZAR; (E) Evolución temporal de la concentración de partículas entre  $0,3 - 10 \text{ \mu m}$  medido por OPC.

La concentración de partículas con tamaños entre 0,01 - 1  $\mu\text{m}$  se situó en unas 1.500  $\#/\text{cm}^3$  medida por CPC (GMD =  $44,4 \pm 1,7$  nm) siendo menor que la fracción de partículas mayores (0,3 - 10  $\mu\text{m}$ ) (*Figura 3.14*). Además, las partículas submicrométricas presentes en la formulación se pudieron observar a partir de muestras capturadas en rejillas de TEM, donde el tamaño medio fue de  $161,3 \pm 70,3$  nm.



**Figura 3.14.** - (A - D) Imágenes de microscopía TEM de la formulación de Foster® Nexthaler® capturada tras su aerosolización en forma de polvo seco con el generador de aerosoles UNIZAR; (E) Curva de distribución de tamaño de partículas entre 0,01 - 1  $\mu\text{m}$  medido por CPC; (F) Histograma de distribución de tamaños de partícula ( $d_p = 161,3 \pm 70,3$  nm) ( $N = 55$ ).

Igual que en los casos anteriores, el tamaño de partícula observado en las imágenes TEM es algo mayor que el medido con el contador de partículas CPC. Esto puede deberse a que las partículas de menor tamaño no son capturadas en las rejillas de TEM, pero sí son detectadas por el equipo de medida.

En resumen, basándonos en los resultados del análisis del tamaño de partícula y con las imágenes de microscopía SEM y TEM, se puede concluir que

el generador de aerosoles UNIZAR es capaz de aerosolizar dichas formulaciones, que las partículas grandes de lactosa quedaron en su mayor parte depositadas en el interior la cámara de expansión (especialmente en las formulaciones diseñadas para el inhalador Breezhaler®) y, solo las partículas de fármaco de tamaño micrométrico estuvieron presentes en la corriente de aerosol.

Además, las partículas de fármaco sufrieron en gran parte una fragmentación o rotura durante el proceso de generación del aerosol, favoreciendo la producción de partículas de tamaños nanométricos. Al observar la curva de deposición de partículas en el sistema respiratorio dependiendo del tamaño ([Capítulo 1, Figura 1.4](#)), se puede deducir la mayoría de las partículas de fármaco presentes en el aerosol serían capaces de alcanzar la región alveolar.

No obstante, debemos señalar las discrepancias observadas entre las distribuciones de tamaños adquiridos mediante los contadores de partícula y los resultados obtenidos del análisis de las imágenes de microscopía. Aunque pensamos que las conclusiones generales de este capítulo se sustentan con ambas medidas, resulta necesario investigar las causas de estas discrepancias, posiblemente con un sistema mejorado de captura de partículas para microscopía.

### **3.3.3 Comparación del generador de aerosoles UNIZAR con un inhalador de polvo seco comercial**

Los análisis por difracción láser proporcionan medidas del tamaño físico de las partículas sin tener en cuenta su densidad aparente, a diferencia de los equipos basados en impactación como el NGI ([Capítulo 2, Punto 2.4.3](#)) empleados normalmente para la determinación del diámetro aerodinámico. En comparación con otras técnicas de difracción láser, el equipo Spraytec® ([Capítulo 2, Punto 2.4.2](#)) presenta la ventaja de que el estudio de la distribución de tamaños de la partícula utiliza caudales de inspiración controlados que son similares a los generados por un paciente. Los resultados obtenidos son más

realistas e informan sobre la tendencia de una formulación en polvo seco a disgregarse durante el proceso de inhalación [281].

Con el fin de obtener tanto la distribución volumétrica como el tamaño físico de las partículas presentes en el aerosol generado se realizaron medidas con el equipo de difracción láser Spraytec® (Malvern, Reino Unido) (Capítulo 2, Punto 2.4.2). Estas medidas tuvieron como objetivo comparar la distribución de tamaños de partícula obtenida al aerosolizar una misma formulación con un inhalador de polvo seco comercial y el generador de aerosoles UNIZAR.

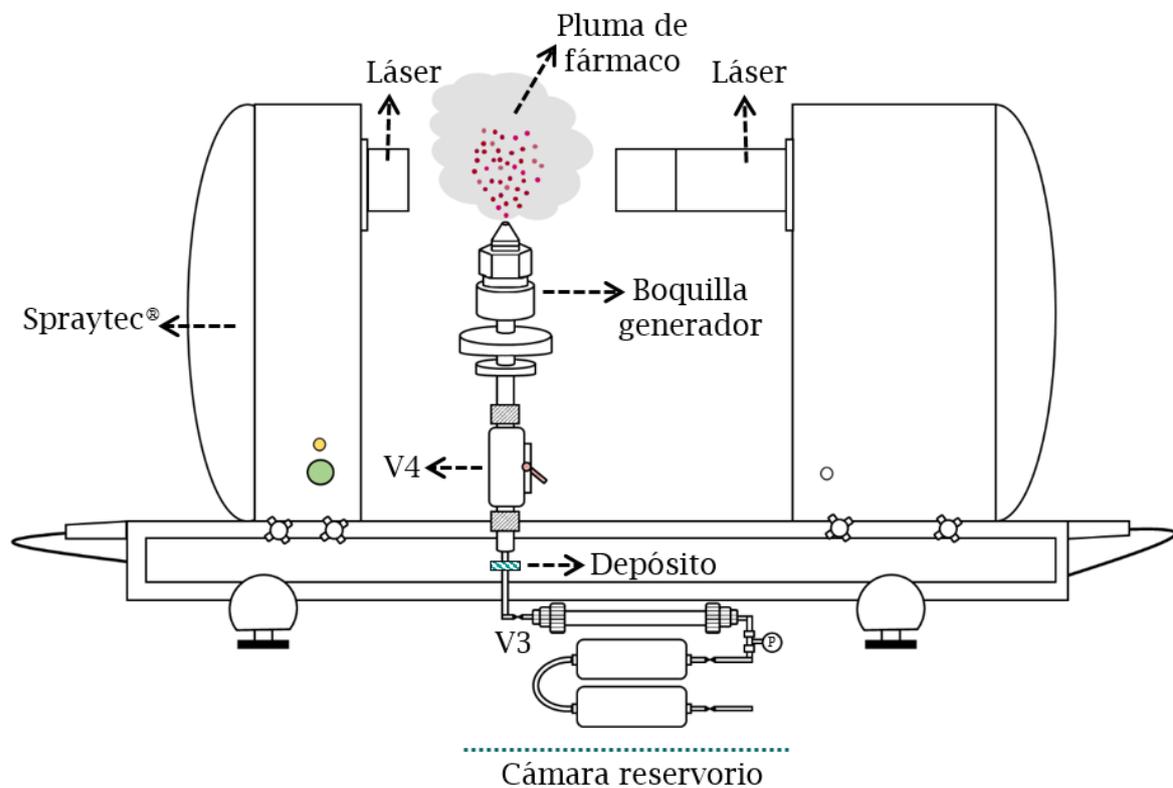
Para el desarrollo de estos ensayos se seleccionaron las formulaciones Seebri® y Foster®. Como dispositivo comercial se seleccionó el inhalador de polvo seco Breezhaler®, ya que se disponía de la pieza adecuada para acoplar ese dispositivo de inhalación a la boquilla del equipo Spraytec®.

Los ensayos con el DPI (Breezhaler®) se realizaron directamente con las cápsulas de Seebri® (~ 24 mg/cápsula). Para el fármaco Foster®, la formulación se introdujo previamente en cápsulas de gelatina (20 mg/cápsula). Las formulaciones de ambos fármacos se midieron empleando un flujo constante de 100 L/min. El procedimiento seguido para el desarrollo de estos ensayos se encuentra descrito en el Capítulo 2, Punto 2.4.2, Esquema 2.9.

En el caso del generador de aerosoles UNIZAR se midió la pluma generada del aerosol inmediatamente después de atravesar la boquilla, obteniendo de manera directa el tamaño físico de las partículas que se recogen en la cámara principal y que forman parte de la nube de aerosol. Para ello, la boquilla del generador UNIZAR se extrajo del interior de la cámara principal, se mantuvo en posición vertical y se unió a la cámara secundaria con una presión de 4 barg. Para la realización de estos ensayos se añadieron 20 mg de cada formulación en el depósito. Las válvulas V3 y V4 se abrieron de manera simultánea, en el momento en el que el aire a presión atravesó el depósito y arrastró la formulación a través de la boquilla, los láseres del equipo Spraytec® detectaron la presencia de partículas en la pluma del aerosol, obteniendo la

correspondiente distribución de tamaños. En el *Esquema 3.2* se muestra una representación del montaje diseñado para la realización de estos experimentos.

Previo a la realización de estos ensayos se realizó un blanco para comprobar si los láseres detectaban o no la presencia de partículas de polvo ambiental y determinar si podían interferir en la medida. Además, en los ensayos realizados con el generador de aerosoles UNIZAR al no emplear la celda de inhalación usada con los DPIs (*Capítulo 2, Esquema 2.9*), se trató de reducir la luz del laboratorio al mínimo posible con el fin de evitar posibles interferencias en las medidas.



**Esquema 3.2.** – Esquema del montaje de la boquilla del generador de aerosoles junto con la cámara secundaria para la medida de la pluma con el equipo de difracción láser Spraytec®.

La curva de distribución de tamaños de partícula obtenidas con ambos dispositivos de inhalación se encuentra recogida en la *Figura 3.15*. En la *Tabla 3.1* se recogen los datos de diámetro volumétrico medio y los valores de amplitud de la curva (Span).

En la *Figura 3.15A* se muestran las curvas de distribución de tamaños de partícula obtenidas a partir de la formulación Seebri®. La curva correspondiente al DPI Breezhaler® (gris) muestra dos picos principales. Un primer pico que va desde las 3  $\mu\text{m}$  hasta las 30  $\mu\text{m}$  ( $Dv_{10} = 7,80 \pm 0,75 \mu\text{m}$ ), que se asocia a las micropartículas de fármaco presentes en la formulación con un tamaño medio de  $1,61 \pm 0,86 \mu\text{m}$  tanto individuales como aglomeradas y a cristales de lactosa individuales ( $d_p = 30,80 \pm 17,40 \mu\text{m}$ ) (*Figura 3.5*). Y un segundo pico asociado a cristales de lactosa aglomerados con o sin fármaco en su superficie. Dicho pico comprende aglomerados desde un tamaño de 60  $\mu\text{m}$  hasta 150  $\mu\text{m}$ .

Empleando el generador de aerosoles UNIZAR (curva naranja) con esta misma formulación, se observa un único pico, que incluye partículas desde 1  $\mu\text{m}$  que puede asociarse a las partículas de fármaco individuales, como se ha visto en el [Punto 3.3.2.2](#), y que va incrementando poco a poco hasta mostrar su máximo en un tamaño medio de 100  $\mu\text{m}$  ( $Dv_{50} = 87,50 \mu\text{m}$ ). Aunque en el aerosol generado por ambos dispositivos se aprecian agregados de gran tamaño ( $\sim 100 \mu\text{m}$ ), el generador de aerosoles UNIZAR consigue una mayor fracción de partículas de tamaños inferiores a las 3  $\mu\text{m}$  en comparación con la proporcionada por el DPI comercial.

Por otro lado, en la *Figura 3.15B*, se encuentran representadas las curvas de distribución de tamaños de partícula obtenidos a partir de la aerosolización de la formulación Foster®. En la curva correspondiente al DPI Breezhaler® (gris), muestra un pico muy pequeño centrado en 7  $\mu\text{m}$  correspondiente a micropartículas de fármaco aglomeradas ( $d_p = 1,34 \pm 0,82 \mu\text{m}$ ). Seguidamente, un segundo pico que comienza en un tamaño próximo a 250  $\mu\text{m}$  ( $Dv_{50} = 287,00 \pm 13,77 \mu\text{m}$ ) hasta alcanzar su máximo en 450  $\mu\text{m}$  ( $Dv_{90} = 458,83 \pm 5,52 \mu\text{m}$ ), ambos asociados a micropartículas de lactosa individuales o en agrupaciones ( $d_p = 157,15 \pm 64,00 \mu\text{m}$ ). Los resultados obtenidos al emplear el generador de aerosoles UNIZAR muestran una mayor disgregación de la formulación. Se observa un pico que va desde 0,2  $\mu\text{m}$  hasta 10  $\mu\text{m}$  ( $Dv_{10} = 1,23 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ), que estaría asociado las micropartículas de fármaco presentes en la formulación ( $d_p = 1,34 \pm 0,82 \mu\text{m}$ ) (*Figura 3.6*). Además, aparece otro pico que indica la presencia de agregados de menor tamaño que

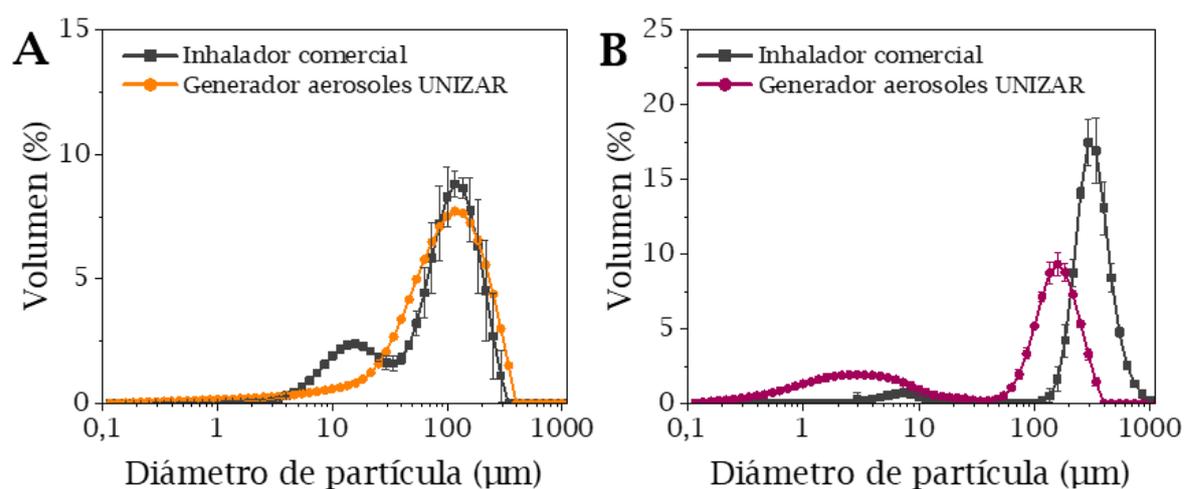
los obtenidos con el DPI comercial, el cual comienza en  $\sim 70 \mu\text{m}$  y muestra su máximo cercano a  $100 \mu\text{m}$  ( $Dv_{50} = 103,15 \pm 4,37 \mu\text{m}$ ), muy por debajo de los  $450 \mu\text{m}$  del máximo alcanzado con el DPI comercial. En ambos casos, este segundo pico es indicativo de la presencia de cristales de lactosa ( $d_p = 157,15 \pm 64,00 \mu\text{m}$ ).

**Tabla 3.1** - Valores obtenidos de la nube de aerosol de ambas formulaciones comerciales con el equipo Spraytec®.

	Dispositivo	Dv10 ( $\mu\text{m}$ )	Dv50 ( $\mu\text{m}$ )	Dv90 ( $\mu\text{m}$ )	Span
Seebri®	Inhalador polvo seco*	$7,80 \pm 0,75$	$67,18 \pm 9,16$	$178,50 \pm 14,36$	2,54
	Generador aerosoles UNIZAR**	20,24	87,92	208,7	2,14
Foster®	Inhalador polvo seco*	$171,37 \pm 36,14$	$287,00 \pm 13,77$	$458,83 \pm 5,52$	1,00
	Generador aerosoles UNIZAR**	$1,23 \pm 0,08$	$103,15 \pm 4,37$	$215,83 \pm 4,20$	2,08

\*Inhalador de polvo seco: Breezhaler®

\*\*Generador de aerosoles UNIZAR medida de la pluma



**Figura 3.15.** - Distribución de tamaños de partícula de las distintas formulaciones medidas con el Spraytec® según su tamaño físico: (A) Seebri®; (B) Foster®. Las curvas naranja y morado muestran la distribución del tamaño de partícula obtenido con el generador de aerosoles UNIZAR y las curvas grises muestran la distribución del tamaño de partícula obtenido con el inhalador de polvo seco comercial Breezhaler® para ambas formulaciones.

En el caso de la formulación Seebri<sup>®</sup>, el dispositivo UNIZAR no consigue mostrar una notable mejoría respecto al DPI comercial a pesar de las imágenes obtenidas de microscopía SEM del proceso de aerosolización (Punto 3.3.2.2). Se concluye, por tanto, la necesidad de una mayor optimización del proceso, ya que, en los ensayos realizados anteriormente empleando la cámara de expansión, se ha mostrado la capacidad de generar una corriente de aerosol con micropartículas de fármaco, al mismo tiempo que se ha favorecido la sedimentación de las partículas de lactosa de mayor tamaño, evitando su aparición en la corriente de aerosol generada y, por ende, en el posible aerosol respirable.

### 3.4 Ejemplo de modo de utilización

Como cualquier producto farmacéutico, tanto la formulación como el dispositivo de inhalación diseñado debe ajustarse a dos categorías principales: (1) Rendimiento y calidad farmacéutica, es decir, reproducibilidad de la dosis, alta capacidad de transferir el concepto al mercado y fabricarlo y, además, estabilidad de la formulación; (2) Rendimiento clínico, principalmente seguridad y eficacia [282].

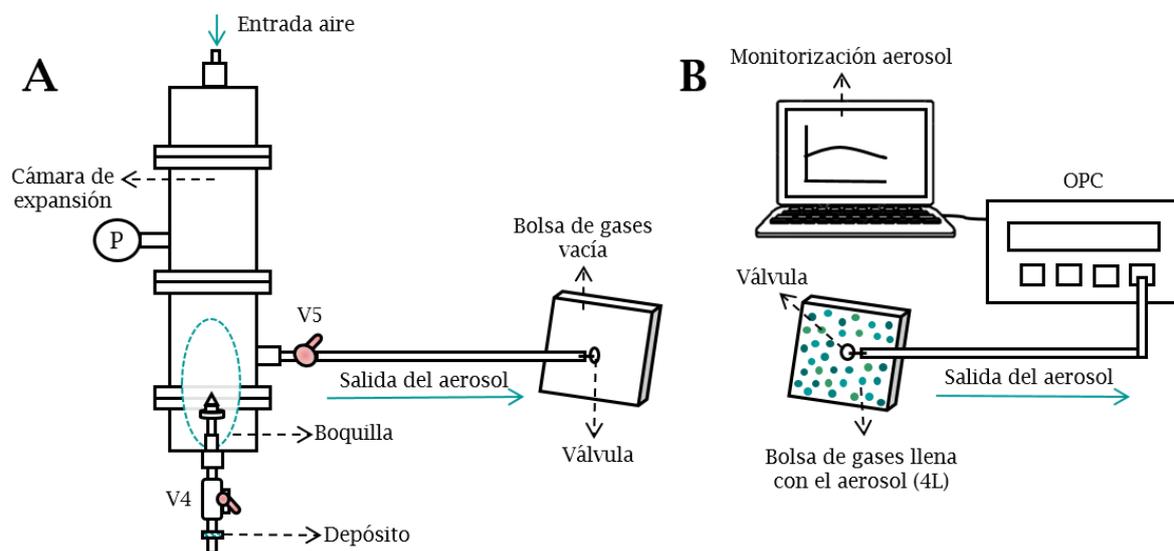
Para la inhalación de fármacos a partir de los aerosoles producidos con el generador de aerosoles UNIZAR se idearon distintas posibilidades de modo de utilización, siendo algunos de los métodos diseñados descritos a continuación. Para el desarrollo de estos ejemplos de utilización se emplearon las micropartículas de azitromicina desarrolladas en el Capítulo 7, debido a que su composición fue formada únicamente por antibiótico y facilitó el cálculo de la posible dosis inhalada.

#### 3.4.1 Ejemplo de utilización 1. Bolsa de gases como reservorio de dosis controlada de fármaco

El ejemplo de utilización 1 consistió en emplear una bolsa de gases como reservorio del material particulado que facilitaría la inhalación de una dosis

exacta de fármaco en forma de aerosol por parte del paciente, para lo cual se sugiere el empleo de una boquilla o máscara de inhalación.

Estos ensayos constan de tres etapas. Una primera etapa en la que se generó el aerosol particulado, siguiendo el método descrito en el [Punto 3.2.1.4](#) pero con una variación en los valores de presión empleadas para obtener un volumen de al menos 4 L en el interior de la cámara de expansión. Las presiones empleadas fueron de 1 barg en la cámara principal y de 5 barg en la cámara secundaria. Se colocó una masa de  $15 \pm 2$  mg de micropartículas de azitromicina en el depósito, este proceso se repitió tres veces para conseguir una elevada concentración de partículas en el interior de la cámara de expansión. Una segunda etapa en la que se procedió al llenado de la bolsa de gases con el aerosol generado, bolsa con un volumen máximo de capacidad de 5 litros y con cierre por válvula de bloqueo (Tedlar® Bags, Supelco® Analytical, EE. UU.) (*Esquema 3.3A*). El volumen final introducido en la bolsa de gases fue de  $\sim 4$  L (representación del volumen medio de inhalación pulmonar).



**Esquema 3.3.** - Descripción del montaje empleado como ejemplo de administración del aerosol: **(A)** Llenado de la bolsa de gases desde la cámara principal, volumen total  $\sim 4$ L; **(B)** Medida de las partículas presentes en el aerosol contenido en el interior de la bolsa de gases con el equipo OPC, que representaría la dosis regulada que recibiría un paciente, en inhalaciones sucesivas del contenido de la bolsa.

Finalmente, en la tercera etapa se midió la concentración de partículas presentes el aerosol introducido en la bolsa de gases. Se conectó la bolsa de gases al equipo de medida OPC, se abrió nuevamente la válvula de bloqueo y se procedió a la medida de la concentración de partículas. El equipo OPC tiene un flujo de absorción de 1,2 L/min, por lo que la medida tuvo una duración total aproximada de 3,5 minutos (*Esquema 3.3B*). La concentración media de las partículas con un tamaño entre 0,3 - 10  $\mu\text{m}$  fue de  $\sim 1.690 \text{ \#/cm}^3$ . Se realizó una réplica de este ensayo, comprobando la reproducibilidad del método propuesto.

Tras obtener la concentración de partículas totales en la bolsa de acuerdo a la ecuación 3.1, se procedió al cálculo de la masa de azitromicina asociada, ya que correspondería a la cantidad inhalada (ecuación 3.2). El valor de la densidad de la azitromicina se obtuvo de bibliografía  $575,8 \text{ mg/cm}^3$  [283]. El diámetro geométrico medio obtenido a partir del análisis del tamaño de partícula por microscopía SEM tuvo un valor  $3,10 \mu\text{m}$  (*Capítulo 7, Tabla 7.3*) ( $V_{\text{partícula}} = 1,56 \times 10^{-11} \text{ cm}^3$ ). Además, se tuvo en cuenta que el volumen introducido en el interior de cada una de las bolsas de gases fue 4 L, y la concentración medida en el interior fue de  $1.690 \text{ \#/cm}^3$ . Con ayuda de las ecuaciones 3.1 - 3.5 se calculó la masa de azitromicina.

$$\bar{C} = \int_0^{t_f} C(t)dt \quad (\text{Ec. 3.1})$$

$$N = \bar{C} \times V \quad (\text{Ec. 3.2})$$

$$V_p (\text{cm}^3) = N^{\circ} \text{ de part. aerosol (\#)} \times \text{Volumen esfera (\text{cm}^3)} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

$$\rho_p (\text{mg/cm}^3) = \frac{\text{Masa total azitromicina (mg)}}{\text{Volumen total esferas (\text{cm}^3)}} \quad (\text{Ec. 3.4})$$

$$\text{Dosis} = V_p \times \rho_p \quad (\text{Ec. 3.5})$$

donde  $\bar{C}$  es la concentración de partículas ( $\text{\#/cm}^3$ ),  $V_p$  es el volumen total de las partículas presentes en el aerosol y  $\rho_p$  es la densidad de la azitromicina ( $\text{mg/cm}^3$ ).

La masa de azitromicina detectada en el interior de cada una de las bolsas fue de 60,5  $\mu\text{g}$ . En el caso concreto de este antibiótico, los estudios realizados en los que se ha administrado en forma de polvo seco por vía inhalatoria son escasos. Zhang *et al.*, [284] en el estudio *in vivo* con ratas que llevaron a cabo emplearon una dosis de 23 mg/kg de azitromicina en forma de polvo seco administrado por vía intra-traqueal. Y, en otro estudio realizado por Wang *et al.*, [68] se desarrollaron partículas con diketopiperazina N-fumaroilada (FDKP) con azitromicina encapsulada (carga de fármaco  $\sim 38\%$ ). El estudio *in vivo* se realizó con ratones que se les administró por vía intra-traqueal una dosis de 78 mg/kg de partículas, lo que es equivalente teniendo en cuenta la carga de fármaco en las partículas de 28 mg/kg de azitromicina, valor muy similar al empleado en el estudio anteriormente citado. Se concluye que la masa de azitromicina presente en la bolsa de gases disponible para inhalar fue inferior a la que se necesita administrar como tratamiento.

Sin embargo, los valores de masa detectados son adecuados para administración de fármacos como los agonistas  $\beta 2$ -adrenérgicos de acción larga (LABA) y los antagonistas muscarínicos de acción prolongada (AMAP) empleados para el tratamiento de la EPOC. Estos fármacos requieren dosis en su mayoría  $< 50 \mu\text{g}$  [285]. Uno de los ejemplos es la formulación Seebri<sup>®</sup> empleada en la [Sección 3.3](#) cuya dosis necesaria como tratamiento es de 44  $\mu\text{g}$ .

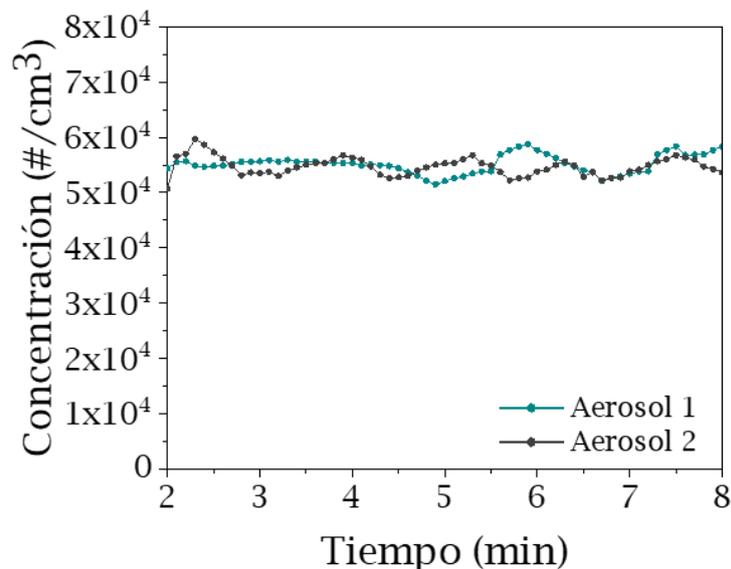
### **3.4.2 Ejemplo de utilización 2. Producción de una corriente continua de aerosol con una elevada concentración de fármaco**

El ejemplo de utilización 2 consistió proporcionar una corriente continua de aerosol con una elevada concentración de fármaco que podría ser suministrada al paciente mediante una máscara de inhalación, que permitiría la inhalación a partir de una corriente estable.

Para ello se generó el aerosol particulado, siguiendo el método descrito en el [Punto 3.2.2.](#), empleando 1 barg en la cámara principal y 5 barg en la cámara secundaria. Se colocó una masa de  $20 \pm 2 \text{ mg}$  de micropartículas de azitromicina en el depósito. Se obtuvo una corriente continua de aerosol de

corta duración (~ 6 minutos), que tardó en estabilizarse aproximadamente dos minutos y que se mantuvo con una concentración de ~ 55.000 #/cm<sup>3</sup> (Figura 3.16). De esta forma, tras la realización de los cálculos siguiendo el procedimiento indicado en el Punto 3.4.1, la masa de fármaco en el interior de la cámara de expansión y, por tanto, respirable, sería de 1.970,8 µg.

Acoplado esta corriente a una mascarilla de tipo Venturi (empleadas actualmente en la administración de oxígeno), se podría inhalar una corriente de oxígeno al mismo tiempo que se mezcla con la corriente de aerosol que contenga las partículas del fármaco procedente del generador de aerosoles UNIZAR.



**Figura 3.16.** - Evolución temporal de la concentración de partículas (#/cm<sup>3</sup>) con tamaños entre 0,3 - 10 µm medido por OPC.

### 3.5 Conclusiones

A continuación, se enumeran las conclusiones más importantes de este capítulo:

- El dispositivo de generación de aerosoles UNIZAR permite la generación de corrientes continuas y estables en cuanto a concentración de

partículas de aerosoles a partir de formulaciones comerciales en forma de polvo seco para su suministro por inhalación.

- La onda de presión provocada por la conexión súbita de ambas cámaras entre las que existe una adecuada diferencia de presiones favorece la separación de las micropartículas de fármaco presentes en la superficie de los cristales de lactosa, en las concentraciones ensayadas.
- Además de la separación de las micropartículas de fármaco de la superficie de los cristales de lactosa, también parece promover su rotura en partículas de tamaño inferior, susceptibles de alcanzar los alveolos en mayor proporción.
- Existe una discrepancia significativa entre las medidas de tamaño de los aerosoles obtenidos por distintos métodos, obteniéndose diámetros medios de menor tamaño con el equipo CPC. Una posible explicación es que las partículas de tamaño nanométrico no son capturadas en los filtros de PC ni en las rejillas de TEM, pero, sin embargo, sí que serían detectadas por el equipo de medida.
- El diseño de formulaciones libres de excipientes para ser suministradas con el generador de aerosoles UNIZAR, podría permitir una novedosa terapia para tratar enfermedades del sistema respiratorio, dirigiendo el fármaco al sitio de acción del tratamiento, vías superiores, inferiores o alveolos.
- Los ensayos realizados para el diseño de un posible sistema de administración requieren una mayor optimización, ya que la dosis inhalada sería inferior a la requerida para tratar infecciones respiratorias. Aunque, sí que estaría dentro del rango establecido para EPOC, si se consideran las referencias habituales expresadas en mg/kg de masa corporal. Sin embargo, el suministro directo a los alveolos pulmonares requiere una re-definición de las dosis y las bases de cálculo establecidas, que generalmente considera el suministro sistémico.



# Capítulo 4

## PARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON CIPROFLOXACINO

---

*En el presente capítulo se presenta la fabricación de partículas micrométricas basadas en quitosano mediante electropulverización. En la primera parte se describe la optimización del proceso de producción: selección del disolvente, concentración y peso molecular del quitosano, caudal de alimentación y concentración de ciprofloxacino. Posteriormente, se realiza una caracterización de las partículas obtenidas. En la segunda parte, se estudia la cinética de liberación del antibiótico, además de evaluar la actividad citotóxica tanto del ciprofloxacino libre como encapsulado frente a dos líneas celulares de pulmón, A549 y Calu-3. En la tercera parte, se utilizan estas partículas para evaluar su efectividad frente a dos modelos de bacterias planctónicas, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Finalmente, se estudia la generación de aerosoles y su posible aplicación como terapia inhalatoria.*



## 4. PARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANO CARGADAS CON CIPROFLOXACINO

### 4.1 Introducción

En las últimas décadas, la inhalación de antibióticos ha suscitado un gran interés debido a un incremento de la resistencia bacteriana [286]. La vía de administración pulmonar permite una administración directa del fármaco en el lugar de acción, el empleo de una menor dosis, una reducción de los efectos secundarios, una disminución en la aparición de resistencias y en la cronificación de la infección. Y, por lo tanto, una mejora en la calidad de vida de los pacientes [287].

Entre las numerosas formulaciones desarrolladas para administrar antibióticos por vía pulmonar, destacamos las formulaciones a base de polímeros naturales [288]. El quitosano es uno de los polímeros naturales más usados en la industria biomédica y farmacéutica, ya que posee numerosas ventajas para la administración de fármacos y moléculas. Entre las características que posee, se puede destacar su carácter catiónico [289]. La presencia de cargas positivas en estos sistemas de liberación permite el desarrollo de interacciones electrostáticas con las membranas celulares y bacterianas, las cuales se encuentran cargadas negativamente, mejorando de este modo la permeabilidad y biodisponibilidad del fármaco que transportan [290].

Sin embargo, la terapia inhalada presenta numerosos retos, siendo uno de los más importantes la liberación del fármaco en el lugar de acción. Ya que el tamaño de las partículas juega un papel clave para determinar el lugar del sistema respiratorio donde se depositarán tras el proceso de inhalación [291]. En el caso del asma, la administración del fármaco se debe realizar en las vías superiores, mientras que en el caso de patologías como la enfermedad obstructiva crónica (EPOC) o la fibrosis pulmonar, el fármaco debe llegar a las vías inferiores [292].

El ciprofloxacino se ha elegido como antibiótico modelo, dado que se trata de un antibiótico de gran efectividad frente a microorganismos causantes de infecciones en el sistema respiratorio, como *S. aureus* y *P.aeruginosa* [46]. Actualmente, la vía de administración más común para el ciprofloxacino es la vía oral, con dosis de 500 mg/24 h o 250 mg/12 h [293]. Sin embargo, una exposición prolongada a dosis elevadas puede dar origen a numerosos efectos adversos siendo los más comunes los problemas gastrointestinales [294]. Cabe señalar que, debido al riesgo de lesiones permanentes en el sistema musculoesquelético, el ciprofloxacino no está recomendado como primera línea de tratamiento por la FDA para neonatos y jóvenes menores de 16 años [295].

En este Capítulo se estudia la encapsulación del ciprofloxacino en partículas de quitosano con el objetivo de lograr una administración localizada y una liberación sostenida en el lugar de acción, abriendo la posibilidad a reducir la dosis de antibiótico administrada y, por ende, los efectos adversos derivados de éste.

## 4.2 Optimización de la producción de partículas basadas en el polímero quitosano por electropulverización

La técnica de electropulverización depende de diversas variables de operación que afectan a la morfología y distribución del tamaño de las micro- o nanopartículas resultantes. En este Capítulo hemos estudiado el efecto de la concentración y peso molecular del polímero quitosano, disolvente empleado y caudal de alimentación. Las condiciones empleadas en el estudio de producción de estas partículas se recogen en la *Tabla 2.2* (Capítulo 2, Punto 2.1.1.4).

### 4.2.1 Efecto del disolvente

Se ha utilizado dos mezclas de disolventes seleccionadas a partir de la experiencia previa en electropulverización: (1) Ácido acético y agua (AA/H<sub>2</sub>O); (2) trifluoroacético y diclorometano (TFA/DCM).

#### 4.2.1.1 Ácido acético y agua

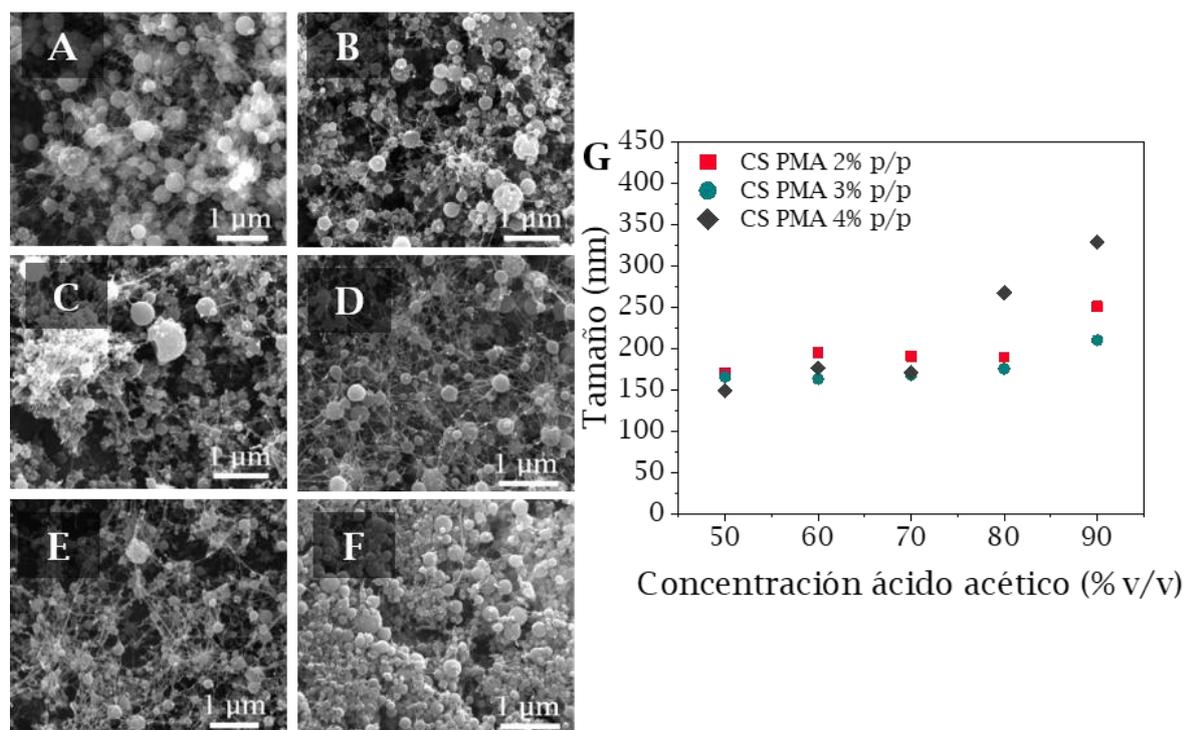
La mezcla de ácido acético y agua (AA/H<sub>2</sub>O), es de las más empleadas en bibliografía para la obtención de partículas o fibras mediante la técnica de electropulverización [296–298]. La conductividad eléctrica se ve afectada por la variación en la concentración de AA, y un aumento de este disolvente desde el 50% v/v hasta el 90% v/v, se asocia a una disminución en los valores de conductividad, debido al bajo grado de disociación del ácido acético, lo que da lugar a partículas de mayor tamaño [299]. Por el contrario, un aumento en la concentración de AA produce un aumento en la densidad de carga y una disminución en el valor de la tensión superficial, dando lugar a partículas de menor tamaño [300].

La influencia de la concentración de AA en la viscosidad de la disolución no es significativa, siendo la concentración de quitosano empleado en su preparación el factor que más afecta a la viscosidad de la muestra [301]. Durante el proceso de optimización se observó que, valores altos de viscosidad generaron un cono de Taylor inestable originando mayor concentración de gotas grandes y fibras durante el proceso de electropulverización.

Para el estudio del proceso de electropulverización con la mezcla de disolventes AA/H<sub>2</sub>O se empleó el quitosano de alto peso molecular. En concentraciones desde el 2% hasta el 5% p/p. La concentración de ácido acético se hizo variar desde el 50% hasta el 90% v/v. Se observó que para las disoluciones preparadas con una concentración de quitosano del 5% p/p y una concentración de ácido acético > 80% v/v se necesitó tiempos muy largos para obtener una disolución completa del polímero, como consecuencia de la elevada viscosidad del líquido. Además, el empleo de disoluciones de quitosano con concentraciones  $\geq$  5% p/p ocasionó problemas de obstrucción del capilar, por lo que se descartó su empleo. Basándose en bibliografía el caudal de alimentación se fijó en 0,15 mL/h [297,299,302].

La *Figura 4.1* muestra el efecto de la concentración de quitosano y de AA sobre el tamaño de partícula obtenido. La concentración de quitosano varió

desde el 2% hasta un 4% p/p. A la concentración más baja estudiada tanto de quitosano como de ácido acético (2% p/p y 50% v/v respectivamente), se obtuvieron partículas con morfología esférica, con un tamaño medio de  $171,1 \pm 79,9$  nm (*Figura 4.1A*). A esta misma concentración de AA (50%v/v), un aumento en la concentración de quitosano (3% y 4% p/p) produjo un tamaño de partícula muy similar,  $165,6 \pm 53,5$  nm y  $148,6 \pm 65,2$  nm respectivamente, pero con una mayor presencia de fibras (*Figura 4.1B y C*). Por el contrario, los valores de concentración de quitosano (4% p/p) y de ácido acético (90% v/v) más altos dieron como resultado partículas con un tamaño medio de  $328,8 \pm 157,8$  nm y una alta polidispersidad (*Figura 4.1F*). Por consiguiente, se obtienen tamaños de partículas más grandes cuando se incrementa tanto la concentración de quitosano como la de ácido acético (valores  $\geq 80$  y 90% v/v).



**Figura 4.1.** - Resultados de la electropulverización con distintas concentraciones de quitosano y de ácido acético. Concentración de ácido acético al 50% v/v: (A) CS PMA 2% p/p; (B) CS PMA 3% p/p; (C) CS PMA 4% p/p; Concentración de ácido acético al 90% v/v: (D) CS PMA 2% p/p; (E) CS PMA 3% p/p; (F) CS PMA 4% p/p; (G) Efecto de la concentración de ácido acético (% v/v) en el tamaño de partícula obtenido con diferentes concentraciones de quitosano (desde 2 - 4% p/p).

Los mejores resultados se obtuvieron con las concentraciones de quitosano y de AA más bajas, 2% p/v y 50% v/v respectivamente. Sin embargo, todas las muestras, independientemente de la concentración de quitosano y de ácido acético reflejaron partículas aglomeradas e interconectadas por fibras (*Figura 4.1*).

Debido a la gran cantidad de fibras y aglomerados obtenidos bajo las distintas condiciones de estudiadas, se descartó el uso de esta mezcla de disolventes para la producción de partículas de quitosano.

#### 4.2.1.2 Trifluoroacético y diclorometano

Se realizó un estudio con la mezcla de trifluoroacético y diclorometano (TFA/DCM), con el objetivo de determinar si estos disolventes permitían obtener partículas individuales en ausencia de fibras.

Como se ha comentado anteriormente, la selección del disolvente empleado es de gran importancia en el proceso de electropulverización. El uso de disolventes con alto punto de ebullición provoca una ralentización del proceso de evaporación del disolvente, haciendo que el rendimiento del proceso disminuya y se dificulte la obtención de partículas en forma de polvo seco, mientras que, los disolventes con un punto de ebullición bajo dan lugar a un proceso de evaporación rápido, lo que puede derivar en la aparición de depósitos de polímero que obstruyan o bloqueen el capilar. Del mismo modo, la velocidad del proceso de secado va a influir en la morfología de las partículas generadas [303].

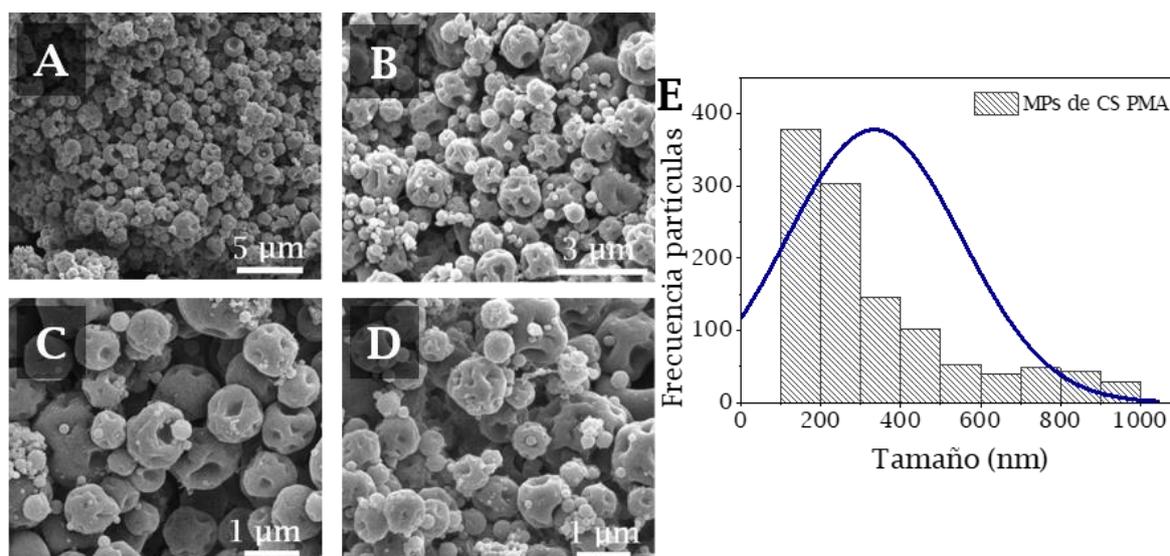
El quitosano es un polímero soluble en disoluciones ligeramente ácidas que puede disolverse en mezclas de ácido acético y agua (como se ha comentado anteriormente). Sin embargo, el punto de ebullición de estos disolventes es elevado (118 y 100 °C), lo que dificulta el proceso de secado. Por el contrario, el trifluoroacético (TFA) presenta ciertas ventajas para ser usado como disolvente en el proceso de electropulverización. Por un lado, se trata de un ácido fuerte, con bajo punto de ebullición (71,8 °C) y un valor de tensión

superficial menor en comparación con el ácido acético [233]. Además, el TFA es capaz de disolver el quitosano, formando sales con los grupos amino presentes en sus cadenas, lo que rompe las interacciones entre las moléculas de quitosano y, por lo tanto, facilita el proceso de electropulverización [304,305]. Por otro lado, la incorporación del disolvente diclorometano (DCM) a la disolución genera una disminución en los valores de la constante dieléctrica y de la conductividad de la mezcla, ayudando a la formación de partículas en vez de fibras [306].

Estudios previos han mostrado que las disoluciones de TFA/DCM (70/30 v/v) son adecuadas para la electropulverización por dos motivos principales. En primer lugar, porque el punto de ebullición de ambos disolventes es inferior al del agua, lo que favorece una rápida evaporación. En segundo, un valor bajo de tensión superficial facilita la electropulverización sin la necesidad de usar valores de voltaje muy elevados [233].

Para empezar, se comprobó que el uso de esta mezcla de disolventes permitió obtener partículas individuales al mismo tiempo que se evitaba la aparición de fibras. Para ello, se empleó el quitosano de PMA a una concentración del 2% p/p. Del mismo modo que con la mezcla de disolventes AA/H<sub>2</sub>O, el caudal de alimentación se estableció en un valor de 0,2 mL/h basándose en lo reportado en bibliografía [303,307]

En la *Figura 4.2* se observan las partículas de quitosano de PMA producidas tras disolverlo con TFA/DCM. El tamaño medio ( $d_p$ ) de las partículas fue de  $333,9 \pm 217,9$  nm, por lo que se consideran micropartículas, ya que las nanopartículas se definen como aquellas partículas con un diámetro inferior a 100 nm [80].



**Figura 4.2.** – Optimización del disolvente TFA/DCM para la obtención de partículas de quitosano (PMA). Concentración 2% p/p: (A – D) Imágenes de microscopía SEM de las partículas de quitosano obtenidas; (E) Histograma de distribución del tamaño de partícula ( $d_p = 333,9 \pm 217,9$  nm; N = 150).

#### 4.2.2 Influencia del peso molecular, concentración y caudal de alimentación

Tras establecer como apropiada la mezcla de disolventes TFA/DCM para el proceso de electropulverización del quitosano, se procedió a optimizar la concentración de polímero empleada y el caudal de alimentación para la obtención de micropartículas. Se emplearon dos tipos de quitosano, peso molecular alto (PMA) (310-375 kDa) y peso molecular bajo (PMB) (50-190 kDa) (datos basados en la viscosidad y obtenidos de la casa comercial Merck®).

La concentración de quitosano varió desde un 2% hasta un 5% p/p. No fue posible electropulverizar concentraciones > 5% p/p debido a su elevada viscosidad, lo que provocó obstrucciones en el capilar. Para investigar la influencia del caudal de alimentación en el tamaño de las partículas obtenidas se usaron valores de 0,2 mL/h, 0,6 mL/h y 1 mL/h. El caudal de alimentación máximo se fijó en 1 mL/h por causa de la inestabilidad del cono de Taylor a caudales de alimentación mayores. La *Tabla 4.1* recoge un resumen de los parámetros estudiados.

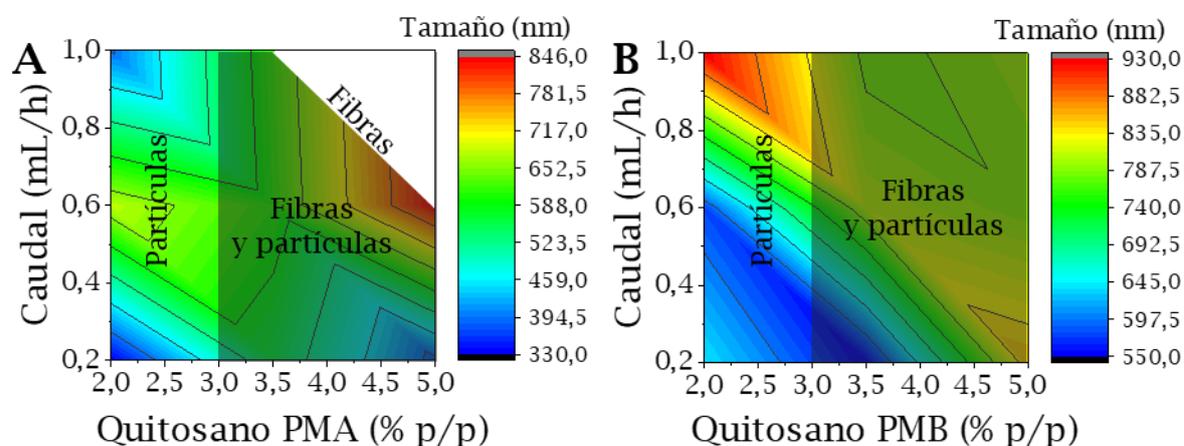
**Tabla 4.1** – Parámetros estudiados para la producción de micropartículas de quitosano por electropulverización.

Tipo de quitosano	Parámetros	Niveles		
PMA	Caudal de alimentación (mL/h)	0,2	0,6	1
	Concentración de quitosano (% p/p)	2,0	3,5	5,0
PMB	Caudal de alimentación (mL/h)	0,2	0,6	1
	Concentración de quitosano (% p/p)	2,0	3,5	5,0

Para ambos pesos moleculares, tanto la concentración de quitosano como el caudal de alimentación empleados afectaron a la morfología del material obtenido. El principal parámetro de operación fue la concentración de quitosano, se evitó la formación de fibras hasta una concentración alrededor del 3% p/p en todo el rango de caudales estudiados, independientemente del PM empleado. Se ha reportado que concentraciones bajas de quitosano favorecen la rotura de las posibles fibras formadas y evita su aparición en el producto final. Por el contrario, un aumento en la concentración de quitosano favorece fibras más estables, dificultando su rotura y aumentando su presencia en el colector. Del mismo modo, valores elevados del caudal de alimentación producen un mayor aporte de disolución polimérica, lo que favorece desde la aparición de partículas de mayor tamaño hasta la formación final de fibras [308].

El peso molecular también influyó en la obtención de partículas y fibras. Geng *et al.*, [300] mostraron la mayor tendencia del quitosano de PMA de formar fibras mientras que en el quitosano de PMB predominó la generación de partículas. En la *Figura 4.3A* se puede observar como en el caso del quitosano de PMA en la región con valores más altos tanto de concentración como de caudal de alimentación, se obtuvieron fibras exclusivamente. En ambos casos, se observa cómo a valores de caudal de alimentación y concentración de quitosano bajos se obtienen partículas submicrométricas con una población de tamaños de partícula más homogénea. Se establecieron como valores

adecuados una concentración de quitosano del 2 % p/p y un valor de caudal de alimentación del 0,2 mL/h.



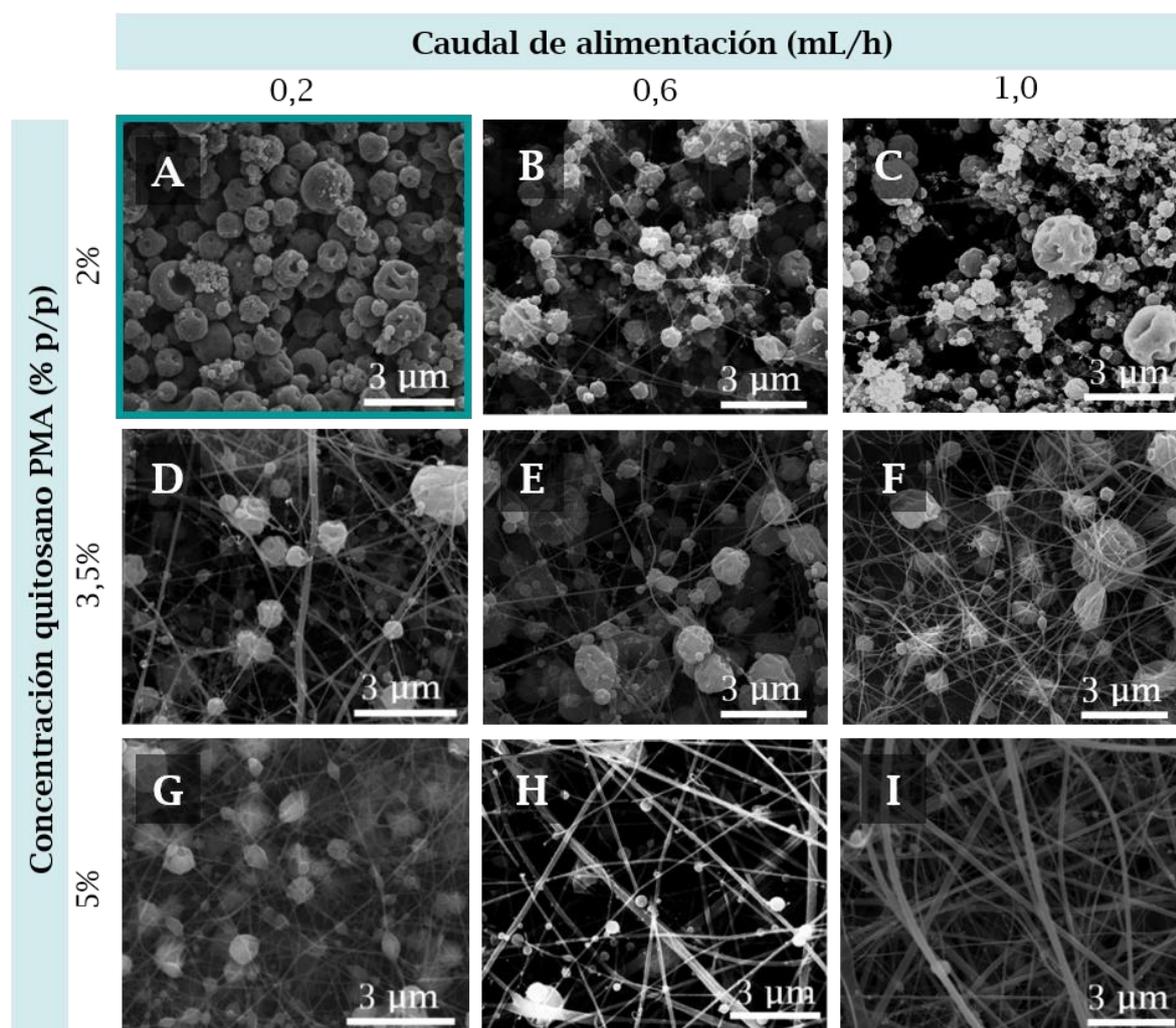
**Figura 4.3.** - Influencia del caudal de alimentación (mL/h) y de la concentración de quitosano (% p/p) en el tamaño de partícula dependiendo del peso molecular empleado: (A) Quitosano de peso molecular alto (PMA); (B) Quitosano de peso molecular bajo (PMB).

Los tamaños de partícula obtenidos con ambos polímeros (PMA y PMB) se recogen en la *Tabla 4.2*. Se puede apreciar que el quitosano de PMB da lugar a tamaños de partícula más grandes en comparación con los que se obtienen al emplear quitosano de PMA. Las *Figuras 4.4* y *4.5* recogen imágenes de microscopia SEM correspondientes a las distintas condiciones ensayadas.

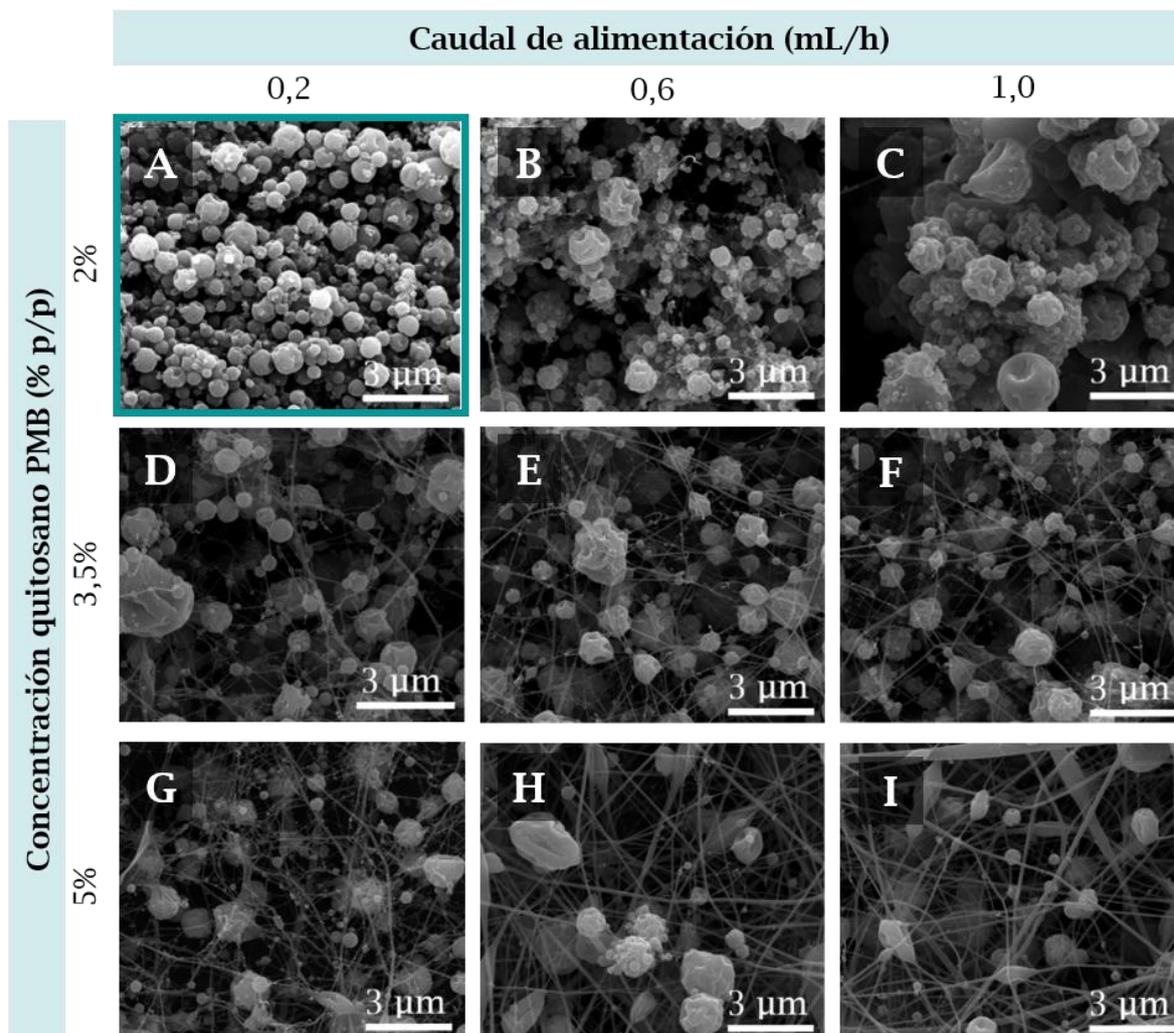
La influencia del peso molecular en la obtención de fibras o partículas fue observada por Geng *et al.*, [300] mostrando que el quitosano PMB tiende a formar fibras mucho más frágiles que el quitosano de PMA, por lo que se rompen dando lugar a partículas de mayor tamaño. La tendencia del quitosano de PMA de formar fibras se atribuyó a la presencia de una mayor densidad de carga de las moléculas de quitosano, las cuales tienen un mayor número de grupos amino por molécula. Igualmente, en el estudio realizado por Torres - Gines *et al.*, [233] se observó que un incremento en el PM del quitosano con la mezcla TFA/DCM producía un incremento en la viscosidad y una disminución en el valor de la tensión superficial. Como consecuencia, con el quitosano de PMA resultaba más fácil obtener fibras y partículas de menor tamaño, al contrario que con el quitosano de PMB.

**Tabla 4.2** - Distribución del tamaño de partícula (nm) obtenido con ambos pesos moleculares en diferentes condiciones estudiadas.

		Quitosano (% p/p)	Caudal de alimentación (mL/h)		
			0,2	0,6	1,0
PM Alto	2,0 %	333,9 ± 217,9 nm	561,5 ± 326,5 nm	379,6 ± 211,6 nm	
	3,5 %	681,2 ± 418,7 nm	613,6 ± 291,1 nm	845,5 ± 320,7 nm	
	5,0 %	390,8 ± 228,1 nm	623,1 ± 404,3 nm	-	
PM Bajo	2,0 %	636,3 ± 312,4 nm	582,1 ± 310,3 nm	927,9 ± 600,7 nm	
	3,5 %	546,1 ± 281,0 nm	814,3 ± 366,7 nm	784,6 ± 361,6 nm	
	5,0 %	851,4 ± 501,8 nm	794,1 ± 453,2 nm	806,4 ± 455,9 nm	



**Figura 4.4.** - Imágenes de microscopía SEM de MPs de CS PMA obtenidas a partir de electropulverización con TFA/DCM como disolvente. El caudal de alimentación (mL/h) y la concentración de quitosano (% p/p) se indican en la figura. Recuadrada en azul aparece la imagen de microscopía SEM para las condiciones de operación fijadas como referencia.



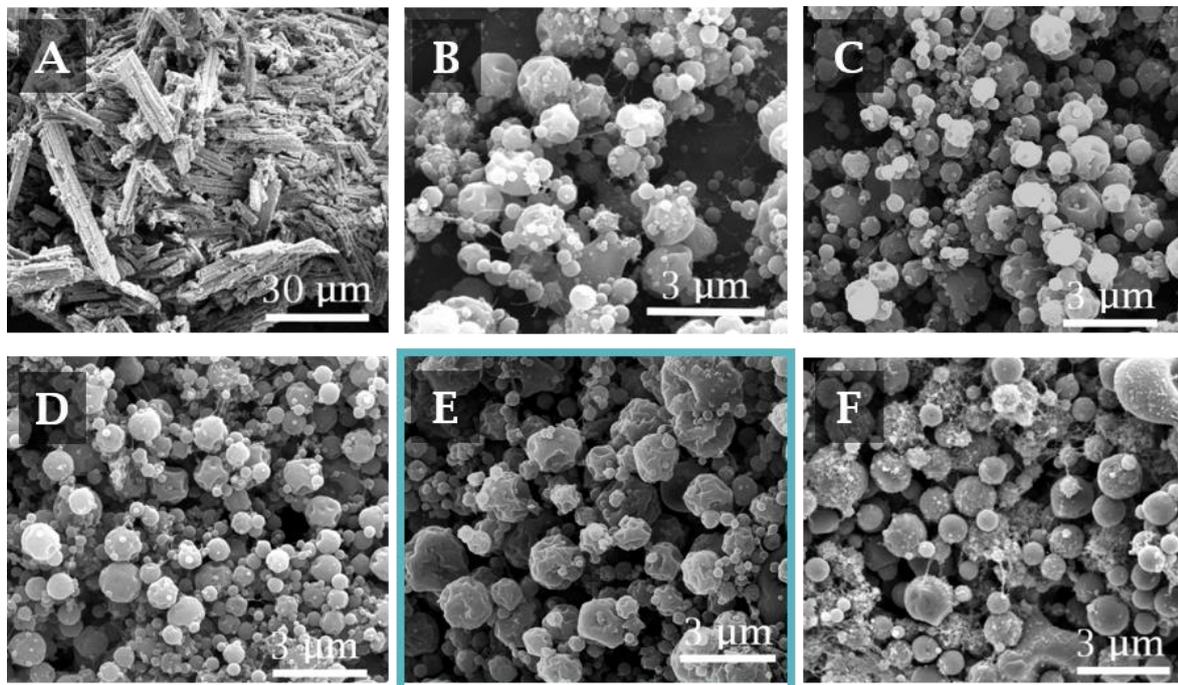
**Figura 4.5.** – Imágenes de microscopía SEM de MPs de CS de PMB obtenidas a partir de electropulverización con TFA/DCM como disolvente. El caudal de alimentación (mL/h) y la concentración de quitosano (% p/p) se indican en la figura. Recuadrada en azul aparece la imagen de microscopía SEM para las condiciones de operación fijadas como referencia.

#### 4.2.3 Encapsulación del antibiótico ciprofloxacino (CPX)

Se empleó la mezcla disolvente de TFA/DCM, una concentración de quitosano al 2% p/p y un caudal de alimentación de 0,2 mL/h. En primer lugar, se realizó un estudio sistemático para determinar la concentración de fármaco adecuada para la producción de las partículas, empleando para ello quitosano de PMA, tras lo cual se procedió a la síntesis de las micropartículas en las condiciones fijadas también con el quitosano de PMB, asumiendo que las mismas condiciones eran aplicables a este segundo PM.

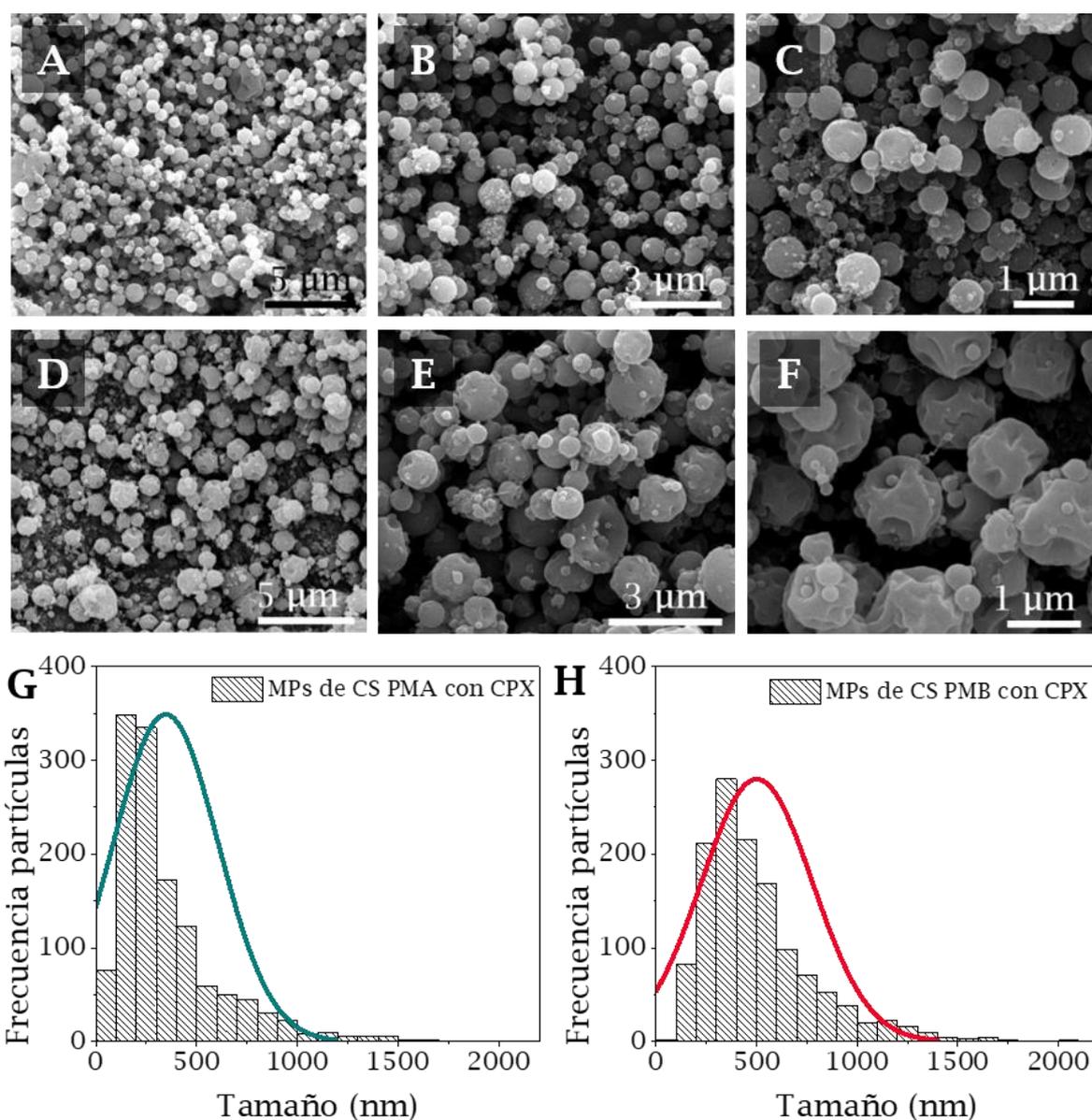
El fármaco se añadió a la disolución de quitosano antes de ser introducida en el equipo de electropulverización. Las concentraciones de ciprofloxacino que se probaron se encontraron en el rango de 0,01% p/p hasta 1% p/p. Todos los parámetros anteriormente descritos se mantuvieron constantes.

Como se puede ver en la *Figura 4.6* se obtuvieron partículas esféricas a concentraciones crecientes de fármaco. Es importante destacar que la morfología obtenida con las diferentes concentraciones de ciprofloxacino fue muy similar a la obtenida con las micropartículas de quitosano con PMA sin fármaco. Debido a un ligero aumento en la aparición de fibras con la mayor concentración de fármaco probada (1% p/p), se fijó como óptima una concentración de ciprofloxacino de 0,5% p/p, permitiendo de este modo una mayor carga de fármaco sin presencia de fibras en el material final. En estas condiciones, la relación quitosano/ciprofloxacino fue de 4/1.



**Figura 4.6.** – Imágenes de microscopía SEM: (A) Ciprofloxacino comercial puro; MPs de CS PMA (concentración de quitosano: 2 %p/p; caudal de alimentación: 0,2 mL/h) producidas mediante electropulverización a distintas concentraciones de ciprofloxacino: (B) 0,1% p/p; (C) 0,2% p/p; (D) 0,4% p/p; (E) 0,5% p/p; (F) 1% p/p; Recuadrada en azul se indica la imagen de microscopía SEM correspondiente a las condiciones de operación fijadas como referencia.

Del mismo modo, empleando las condiciones de referencia establecidas anteriormente, se repitieron los experimentos de electropulverización con el quitosano de peso molecular alto y bajo. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 4.7*. Como se puede observar en las curvas de distribución de tamaños, del mismo modo que en las MPs CS sin ciprofloxacino, el quitosano de PMB da lugar a partículas de mayor tamaño ( $d_p = 501,1 \pm 276,3$  nm) en comparación con el quitosano de PMA ( $d_p = 386,1 \pm 248,5$  nm) (*Tabla 4.3*).



**Figura 4.7.** - Imágenes de microscopía SEM de las MPs de CS con distinto PM obtenidas con CPX: (A - C) PMA; (D - F) PMB; Histograma de distribución de las MPs de CS: (G) PMA; (H) PMB; (N = 150).

Las imágenes de microscopía SEM mostraron partículas con una superficie rugosa, independientemente del peso molecular y de la presencia o no de ciprofloxacino (*Figuras 4.4, 4.5 y 4.7*), producida por el rápido secado del disolvente antes de ser recogidas en el colector. Además, los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron que para el mismo peso molecular el tamaño fue muy similar en ambos tipos de partículas (con y sin ciprofloxacino). El ciprofloxacino puro reveló un aspecto acicular (*Figura 4.6A*) con un tamaño longitudinal medio de  $10,36 \pm 6,30 \mu\text{m}$ . Los tamaños de partícula obtenidos se muestran en la *Tabla 4.3*. Las partículas con un tamaño  $< 1\mu\text{m}$  son las más interesantes ya que se depositan preferentemente en el sistema respiratorio inferior como bronquios y alveolos [10,309].

**Tabla 4.3** - Distribución de tamaños de las micropartículas de quitosano.

Muestras	SEM				
	$d_p$ Media $\pm$ DE (nm)	D10 (nm)	D50 (nm)	D90 (nm)	Span
<b>Ciprofloxacino</b>	$10361,90 \pm 6296,88$	4857,3	8323,2	17367,8	1,50
<b>MPs de CS PMA</b>	$333,9 \pm 217,9$	134,4	256,3	709,2	2,24
<b>MPs CS PMA con CPX</b>	$386,1 \pm 248,5$	153,6	314,3	720,0	1,80
<b>MPs de CS PMB</b>	$636,3 \pm 312,4$	314,5	560,0	1078,4	1,64
<b>MPs CS PMB con CPX</b>	$501,1 \pm 276,3$	230,5	427,3	878,3	1,51

## 4.3 Caracterización de las micropartículas de quitosano (MPs)

### 4.3.1 Caracterización físico-química

La espectroscopia XPS se empleó para determinar los elementos presentes en las muestras y confirmar la ausencia o presencia de restos de disolvente. La caracterización se completó mediante FTIR. La carga superficial de las partículas se obtuvo mediante la medida del potencial  $\xi$ . Las técnicas, condiciones de caracterización y protocolos seguidos se encuentran descritos en el *Anexo I*.

Tras la obtención de las micropartículas de quitosano con y sin ciprofloxacino, se estudió el contenido de disolventes residuales empleados en la formulación, ácido trifluoroacético y diclorometano. El diclorometano es un disolvente de Clase 2, por lo que su presencia debe ser limitada en formulaciones farmacéuticas debido a su toxicidad inherente. El límite de concentración es de 6,0 mg/día y el límite de exposición diaria permitida (VLA-ED) es de 50 ppm, mientras que el disolvente trifluoroacético, se encuentra clasificado como otros disolventes residuales, siendo los estudios realizados insuficientes para dar tanto datos toxicológicos adecuados como un valor concreto de VLA-ED [310].

La técnica de XPS permitió comprobar la posible presencia de trifluoroacético o diclorometano en las micropartículas. En la *Tabla 4.4* se muestra la presencia de flúor (F) en todas las micropartículas tanto en las que tienen encapsulado ciprofloxacino como las que no. De ahí, que la presencia del F no sea atribuible al antibiótico (el cual tiene F en su estructura molecular, *Capítulo 1, Tabla 1.1*) sino que es consecuencia de una deficiente evaporación del disolvente durante el proceso de electropulverización. Por el contrario, los resultados obtenidos del análisis de las micropartículas no mostraron la presencia de cloro (Cl) procedente del diclorometano, por lo que se concluye que la evaporación de este disolvente se realizó de manera completa.

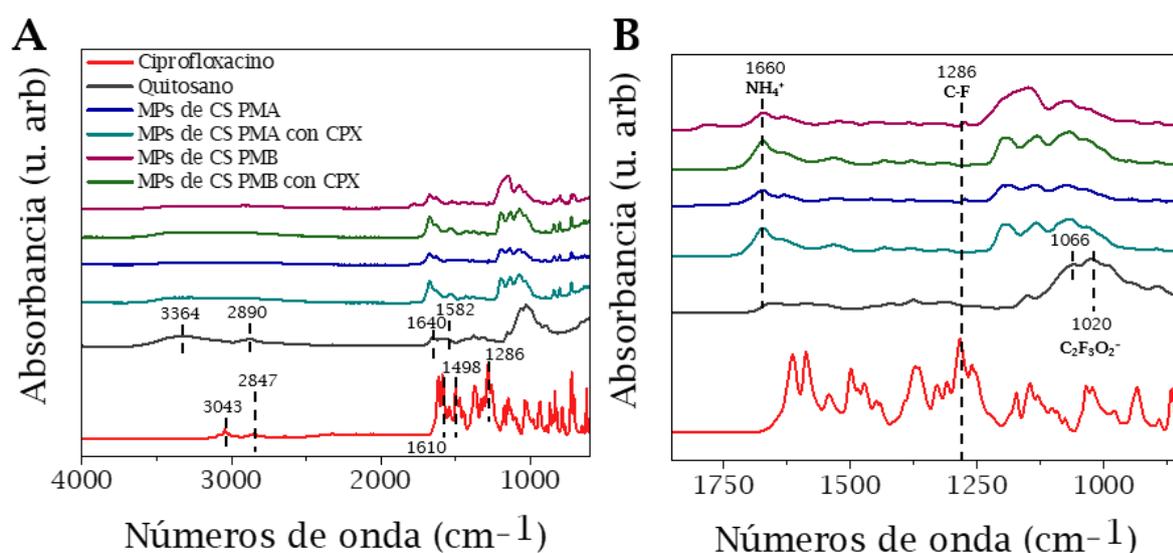
**Tabla 4.4** - Valores obtenidos del análisis por XPS.

Muestras	Elementos					
	Disolvente	O 1s	C 1s	F 1s	N 1s	Cl 2p
MPs de CS PMA		27,3 %	62,2 %	5,0 %	5,5 %	-
MPs de CS PMA con CPX		26,8 %	59,3 %	7,6 %	6,3 %	-
MPs de CS PMB		27,2 %	57,1 %	9,1 %	6,6 %	-
MPs de CS PMB con CPX		27,3 %	57,1 %	9,8 %	5,8 %	-

A pesar de todo, como se demuestra más adelante, los niveles de trazas muestran una ligera toxicidad en la línea celular A549. Por lo que, en vista a

una posible aplicación biomédica, habría que desarrollar un proceso de secado más completo.

Con el objetivo de identificar la presencia de fármaco en las micropartículas poliméricas se empleó la técnica FTIR. Se obtuvo el espectro del quitosano y del ciprofloxacino puros, así como de las micropartículas con y sin fármaco (*Figura 4.8*).



**Figura 4.8.** – Espectros FTIR de ciprofloxacino y quitosano puros, MPs de CS PMA con y sin CPX y MPs de CS PMB con y sin CPX: **(A)** Espectro FTIR entre 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ ; **(B)** Región ampliada en el rango de 1750 a 600  $\text{cm}^{-1}$ .

El espectro del quitosano mostró una banda característica en la región 3400 - 3200  $\text{cm}^{-1}$  atribuida a los grupos  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{OH}$ . Además, se observaron dos picos a 2920  $\text{cm}^{-1}$  y a 1640  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los enlaces C-H y amida I respectivamente. El ciprofloxacino mostró un pico característico a 1286  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al enlace C-F [311,312]. Las micropartículas de quitosano con y sin fármaco mostraron el desplazamiento de una de las bandas características del polímero de 1640  $\text{cm}^{-1}$  a 1660  $\text{cm}^{-1}$ , lo que permitió confirmar la presencia de quitosano en ambas partículas. Además, los espectros de las micropartículas de quitosano (con ambos pesos moleculares) cargadas con ciprofloxacino revelaron la banda característica del ciprofloxacino a 1286  $\text{cm}^{-1}$  (enlace C-F). La aparición de este pico permitió confirmar la presencia del antibiótico en dos tipos de micropartículas analizadas. Al mismo tiempo, se puede observar que

las micropartículas de quitosano presentaron bandas correspondientes a los enlaces N-H (incluido  $\text{NH}_4^+$ ) a  $1660\text{ cm}^{-1}$  y al enlace C-O del grupo  $\text{C}_2\text{F}_3\text{O}_2^-$  en las bandas  $1190 - 890\text{ cm}^{-1}$ . La presencia de estos grupos activos en las micropartículas podrían dar origen a propiedades antimicrobianas por sí mismos [233,306].

Como se puede observar en la *Tabla 4.5*, ambos tipos de micropartículas mostraron una carga superficial positiva debido principalmente a los grupos amino procedentes del quitosano. Normalmente es necesario un potencial mínimo de  $\pm 30\text{ mV}$  para alcanzar una suspensión de partículas estables únicamente por repulsión electrostática [307]. En nuestro estudio, los valores del potencial  $\xi$  de todas las muestras analizadas mostraron valores por encima de los  $40\text{ mV}$ , lo que proporcionó estabilidad hidrodinámica impidiendo la aglomeración de las partículas. Además, las cargas positivas suponen una importante ventaja en su posterior aplicación, ya que va a favorecer la interacción entre las partículas y la capa de mucus presente en los pulmones o, entre las partículas y la superficie de las bacterias, ambas cargadas negativamente [313,314].

**Tabla 4.5** - Caracterización de las micropartículas de quitosano.

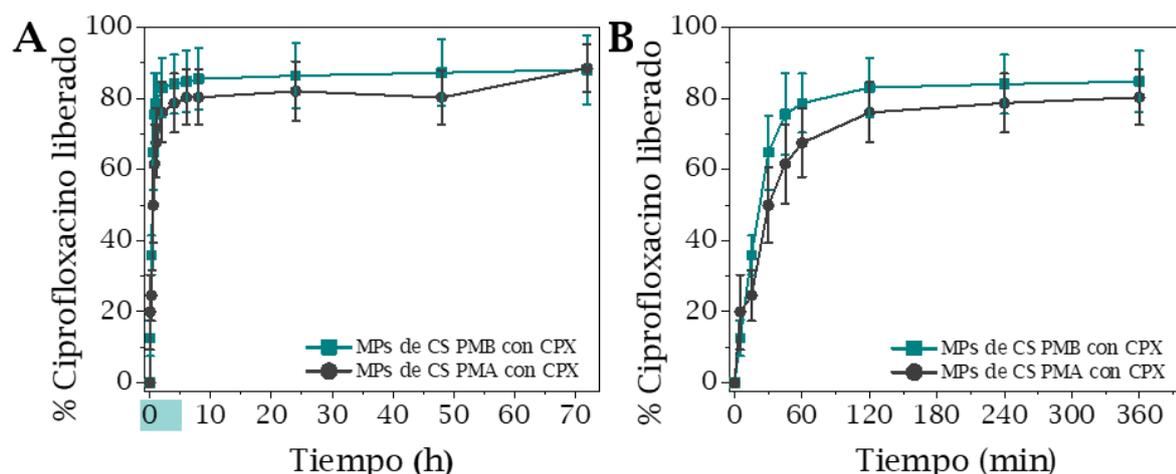
Muestras	Potencial $\xi$ (mV)	DLS (media $\pm$ DE) (nm)	EE (%)	CF (%)
<b>Ciprofloxacino</b>	+12,1	-	-	-
<b>MPs de CS PMA</b>	+51,0	438,0 $\pm$ 81,2	-	-
<b>MPs de CS PMA con CPX</b>	+42,1	625,1 $\pm$ 68,6	75,6 $\pm$ 10,2	15,8 $\pm$ 2,1
<b>MPs de CS PMB</b>	+42,6	596,2 $\pm$ 100,7	-	-
<b>MPs de CS PMB con CPX</b>	+52,0	533,3 $\pm$ 39,1	70,5 $\pm$ 16,5	14,1 $\pm$ 3,3

Una de las principales ventajas del proceso de electropulverización es la alta eficiencia de encapsulación (EE) en comparación con el proceso de gelificación inotrópica, técnica muy usada para generar partículas de quitosano, donde los valores de eficacia de encapsulación son inferiores al 50%

[169,315,316]. Sin embargo, en los dos tipos de micropartículas basadas en quitosano producidas en esta Tesis Doctoral fueron los valores de eficacia de encapsulación fueron ~ 75%, coincidiendo con lo reportado en estudios previos a partir de la técnica de electropulverización [297,317]. Finalmente, la carga de fármaco (CF (%)) alcanzó un valor de ~ 15%, similar en ambos tipos de micropartículas independientemente del peso molecular del polímero empleado (*Tabla 4.5*).

### 4.3.2 Cinética de liberación del antibiótico ciprofloxacino

Los experimentos de liberación se hicieron en medio PBS a 37 °C (*Anexo I, Punto I.3.1*) se observó que, en ambos tipos de micropartículas, independientemente del peso molecular, la mayor parte del fármaco (aproximadamente un 70%) se liberó dentro de la primera hora. Posteriormente, en torno al 90% del fármaco se desprendió de las micropartículas en un periodo de tiempo de 10 h tras ponerse en contacto con el medio (*Figura 4.9*). El experimento se alargó hasta un tiempo de estudio de tres días con el objetivo de comprobar que no se liberaba más ciprofloxacino hasta que no se produjese una degradación completa de las micropartículas.



**Figura. 4.9.** – Liberación acumulada de fármaco (%) en función del tiempo en PBS para las MPs de CS PMA y PMB con CPX: (A) Tiempo hasta 72 h; (B) Región ampliada hasta 6 h; (media ± DE,  $n = 3$ ).

Los resultados anteriores se emplearon para obtener la cinética de liberación del antibiótico. Inicialmente, las curvas de liberación del ciprofloxacino se ajustaron a modelos empíricos como Linder-Lippold [318], Ritger-Peppas [319] y Peppas-Shalin [320].

Linder y Lippold [318] describieron un mecanismo de liberación de tipo *burst*. Es decir, la liberación del fármaco se produce de manera inmediata cuando el vector se pone en contacto con el medio. Este modelo se ajusta a la ecuación (*Tabla 4.6*, ecuación 4.1).

En el modelo descrito por Ritger-Peppas [319] se describe el mecanismo de liberación de fármacos a partir de sistemas con distintas geometrías y con capacidad de hinchamiento. La liberación se va a producir combinando difusión fickiana (ley de Fick) y mecanismos no fickianos. El mecanismo de liberación está determinado por el valor del parámetro  $n$  (*Tabla 4.6*, ecuación 4.2). Para partículas de forma esférica: (A)  $n \leq 0,43$  indican un mecanismo controlado por difusión (Ley de Fick); (B)  $0,43 < n < 0,85$  representan un proceso de difusión no fickiano; (C)  $n \geq 0,85$  hasta 1 indica un mecanismo de erosión del vector que transporta el fármaco.

Finalmente, Peppas-Shalin [320] describen una liberación que combina dos mecanismos de liberación en una misma muestra, un proceso de difusión fickiano provocado por un gradiente de potencial químico, que tiene lugar junto con un hinchamiento del polímero. Se usan dos constantes  $k_1$  indica la contribución de la difusión (cinética de la ley de Fick) mientras que el valor de  $k_2$  está asociado tanto a la disolución del fármaco como a la relajación de las cadenas poliméricas (*Tabla 4.6*, ecuación 4.3).

**Tabla 4.6** – Modelos cinéticos empleados en el ajuste de los datos de la liberación de ciprofloxacino.

Modelo	Ecuación	
Linder - Lippold	$m_t/m_\infty = k \cdot t^n + b$	(Ec. 4.1)
Ritger - Peppas	$m_t/m_\infty = k \cdot t^n$	(Ec. 4.2)
Peppas - Shalin	$m_t/m_\infty = k_1 \cdot t^n + k_2 \cdot t^{2n}$	(Ec. 4.3)

De las ecuaciones anteriores,  $m_t/m_\infty$  es la fracción de fármaco que se ha liberado a un tiempo  $t$ ,  $n$  es el exponente que indica el mecanismo de liberación del medicamento y  $t$  es el tiempo.

El ajuste obtenido a partir de los datos experimentales de concentración de ciprofloxacino frente al tiempo en estos modelos no fue satisfactorio ( $R^2 < 0,900$ ) a pesar del número de parámetros ajustables empleados (2 o 3 según modelo) (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7** – Parámetros obtenidos de los ajustes cinéticos de la liberación del ciprofloxacino a partir de modelos empíricos.

	Linder - Lippold				Ritger - Peppas			Peppas - Shalin			
	$k$	$n$	$b$	$R^2$	$k$	$n$	$R^2$	$k1$	$n$	$k2$	$R^2$
CS PMA*	40,66	0,28	14,61	0,811	55,24	0,22	0,775	70,96	0,50	-17,3	0,880
CS PMB*	51,97	0,22	11,59	0,894	63,68	0,19	0,856	94,49	0,45	-24,5	0,961

\*se hace referencia a las MPs basadas en quitosano cargadas con ciprofloxacino

Como se ha indicado, en la Figura 4.9 se observa una liberación inicial rápida del ciprofloxacino del quitosano. Esta rápida liberación del antibiótico del vector que lo transporta es una ventaja cuando el objetivo es el tratamiento de infecciones bacterianas agudas o cuando se producen exacerbaciones, ya que el antibiótico se libera poco tiempo después de la inhalación, pero también implica que el tiempo de tránsito debe minimizarse para evitar la pérdida de

fármaco antes de alcanzar el objetivo. Por eso la vía inhalatoria resulta ideal para este tipo de cinéticas.

A la vista de los resultados obtenidos de los ajustes con modelos empíricos habituales, se decidió realizar una descripción más realista de la cinética de liberación del fármaco. Los datos experimentales fueron analizados con la asistencia del Prof. Antonio Monzón empleando la metodología descrita en el Anexo II, Sección II.1. Para el ajuste de los datos se utilizó la ecuación 4.4:

$$-\frac{dm_t^{CS}}{dt} = k_R \times m_t^{CS} \rightarrow m_t^{CS} = m_0^{CS} \times \exp(-k_R \times t) \quad (\text{Ec. 4.4})$$

donde  $m_0$  representa la concentración de ciprofloxacino inicial en las micropartículas de quitosano y  $k_R$  es la constante cinética de liberación del fármaco. Este parámetro es dependiente de la interacción específica que se establece entre el polímero (quitosano) y el fármaco liberado (ciprofloxacino), así como de las condiciones experimentales.  $k_R$  fue el único parámetro que se calculó mediante regresión no lineal del modelo.

En la *Tabla 4.8* se presentan los valores de  $k_R$ ,  $m_\infty$  y  $R^2$  obtenidos tras realizar el ajuste de los datos de liberación de ciprofloxacino con la ecuación 4.4 en los dos tipos de micropartículas de quitosano, PMA y PMB. El ajuste obtenido es considerablemente mejor, como se ve para los valores de  $R^2$  a pesar de ser un modelo de un solo parámetro, y al mismo tiempo, describe bien las tendencias observadas.

**Tabla 4.8** - Parámetros obtenidos de la liberación del ciprofloxacino a partir de la ecuación 4.4.

Muestra (MPs)	$k_R \pm \text{DE} (\text{min}^{-1})$	$m_\infty \pm \text{DE} (\%)*$	$R^2$	Puntos experimentales
CS PMA con CPX	$0,0303 \pm 0,0026$	$81,237 \pm 1,607$	0,970	104
CS PMB con CPX	$0,0416 \pm 0,0022$	$85,938 \pm 0,957$	0,995	65

\*masa total = 0,750 mg (PMA) y 0,700 mg (PMB), datos según % EE

Según este modelo, la tasa de liberación intrínseca del ciprofloxacino en las MPs CS PMB es alrededor del 37% mayor que en el caso de las MPs CS PMA. Esto es indicativo de una menor interacción entre el quitosano de PMB y el fármaco. Los valores estimados de  $m_{\infty}$  coinciden con los valores experimentales de  $m^s_0$  utilizados en cada caso.

La liberación tan rápida del ciprofloxacino de las micropartículas de quitosano observadas en este estudio se puede explicar a partir de investigaciones realizadas con anterioridad. Sangsanoh *et al.*, [321] indicaron que el disolvente TFA forma sales con los grupos amino presentes en las moléculas de quitosano. Este proceso se desarrolla en dos pasos, el primero es la protonación de los grupos amino de las cadenas de quitosano y el segundo es la interacción iónica entre estos grupos amino protonados y los aniones procedentes del TFA. De este modo, la estructura resultante presenta sales que son fácilmente solubles en medio acuoso. Igualmente, en el estudio realizado por Jayakumar *et al.*, [304] indicaron que las fibras y partículas generadas por electropulverización a partir de la mezcla de disolventes TFA/DCM se disolvieron de manera rápida y completa cuando se pusieron en contacto con disoluciones acuosas ligeramente básicas o neutras. Este hecho podría explicar la liberación tan rápida del ciprofloxacino al medio acuoso desde las micropartículas de quitosano.

#### **4.4 Ensayos *in vitro*: citotoxicidad en células pulmonares y estudio de la actividad antimicrobiana en *S. aureus* y *P. aeruginosa***

Los ensayos *in vitro* realizados con micropartículas basadas en quitosano se llevaron a cabo con dos líneas celulares procedentes de pulmón, una alveolar (A549) y una bronquial (Calu-3). Se evaluó la actividad antimicrobiana de las micropartículas basadas en quitosano en dos cepas bacterianas modelo, *P. aeruginosa* (Gram-negativa) y *S. aureus* (Gram-positiva). Los protocolos seguidos para el desarrollo de ambos estudios se encuentran detallados en el Capítulo 2.

#### 4.4.1 Ensayos de citotoxicidad celular

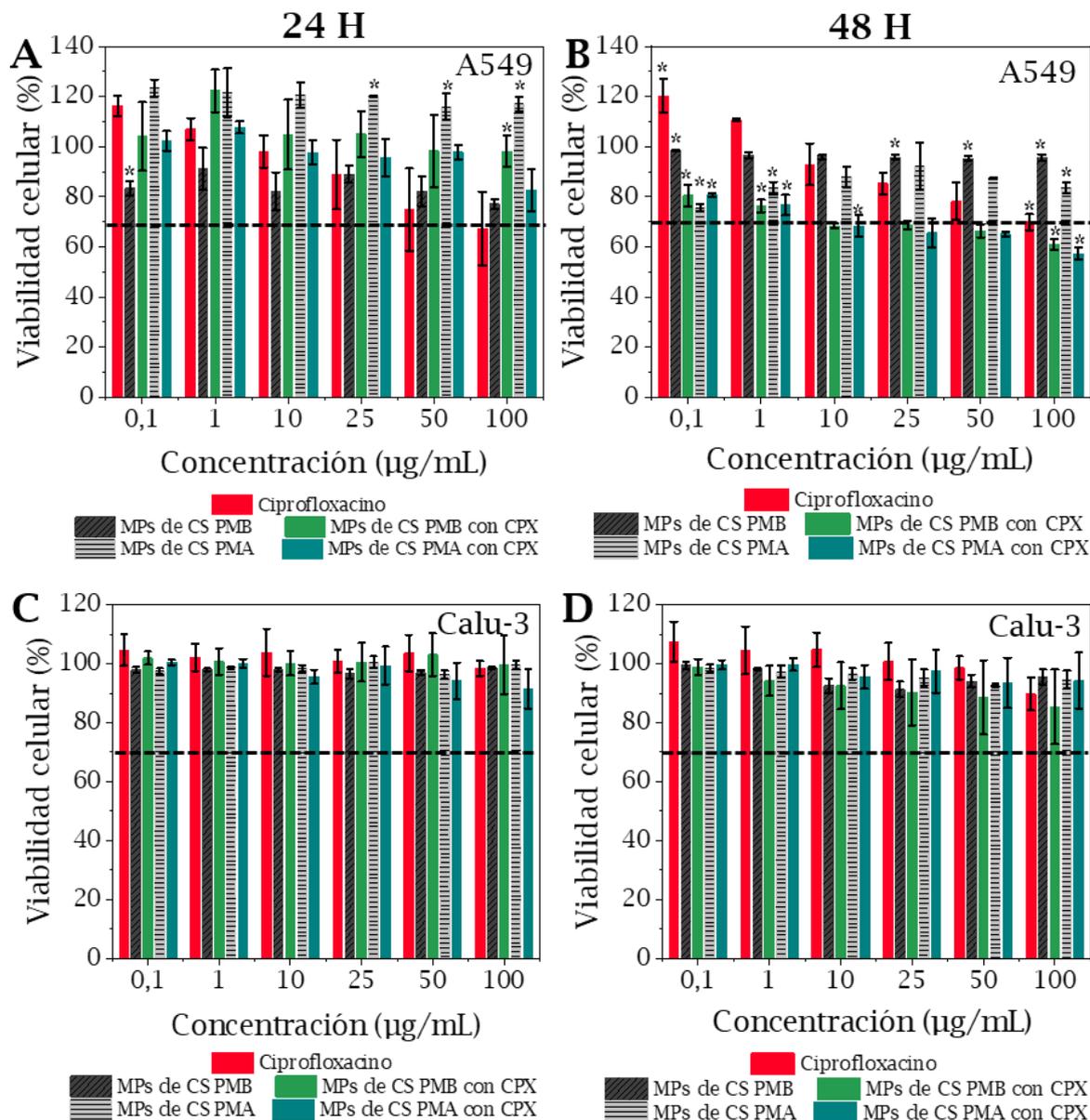
El ensayo Alamar Blue (Capítulo 2, Punto 2.2.3) permitió cuantificar la viabilidad celular después de que las células se expusiesen a distintas concentraciones de fármaco y de micropartículas a dos tiempos de estudio, 24 h y 48 h. El rango de concentraciones que se estudió fue desde 0,1 µg/mL hasta 100 µg/mL, siendo la máxima concentración probada 50 veces superior al valor de MBC en *P. aeruginosa* (2 µg/mL) [252].

Los resultados de viabilidad celular se recogen en la *Figura 4.10*. Se observó que, a las 24 h, solo el ciprofloxacino puro mostró citotoxicidad a la concentración más alta probada (100 µg/mL) en la línea celular A549. Sin embargo, tras 48 h, se observó que ambas MPs de quitosano cargadas con ciprofloxacino mostraron toxicidad a concentraciones > 10 µg/mL.

Se fijó la concentración máxima tolerada por la línea celular A549 en 10 µg/mL, siendo esta concentración 10 veces superior al valor de MBC para *S. aureus* y 5 veces superior al de *P. aeruginosa* (como se mostrará en el [Punto 4.3.4.2](#)). Es decir, a esa concentración se produciría la muerte bacteriana de *S. aureus* y de *P. aeruginosa* sin producir toxicidad en las células alveolares.

Se pueden encontrar tres posibles efectos que contribuyen a los resultados de toxicidad obtenidos. La primera es que tal y como se vio por análisis XPS (*Tabla 4.4*), el disolvente TFA no se evaporó por completo durante el proceso de electropulverización, por lo que las trazas presentes en las MPs podrían resultar tóxicas para las células. En segundo lugar, como se ha comentado anteriormente, las micropartículas poseen carga positiva, lo que favorece una mayor interacción con las células que se encuentran cargadas negativamente. Esta interacción se produce de manera inespecífica, no se ha encontrado la existencia de un receptor celular propio para el quitosano [322], y favorecería el contacto entre el ciprofloxacino y las células, mejorando su absorción. Finalmente, la tercera posible explicación reside en el estudio del efecto citostático del ciprofloxacino sobre la línea celular A549 realizado por Kloskowski *et al.* [323]. En dicho estudio se mostró la capacidad del

ciprofloxacino de disminuir la viabilidad celular tras 48 h de tratamiento, a causa del mecanismo de acción del ciprofloxacino, que inhibe la Topoisomerasa II celular.



**Figura 4.10.** - Viabilidad celular tras exposición a CPX puro y a las MPs de CS con y sin CPX en dos líneas celulares de pulmón procedentes de alveolo y bronquios a tiempos de 24 y 48 h: (A - B) Línea celular A549; (C - D) Línea celular Calu-3. Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) entre las muestras respecto al CPX libre. La línea discontinua negra indica el 70% de viabilidad celular, de acuerdo a la norma ISO 10993-5.

#### 4.4.2 Actividad antimicrobiana en *S. aureus* y *P. aeruginosa*

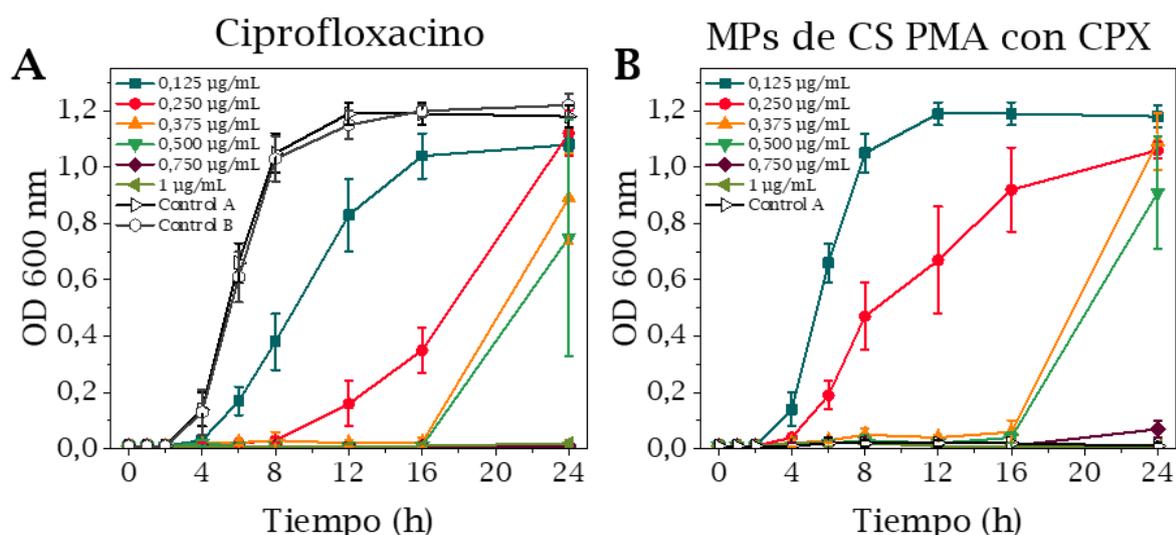
La actividad antimicrobiana tanto del ciprofloxacino libre como encapsulado en las micropartículas de quitosano fue estudiada en *S. aureus* y en *P. aeruginosa*, ambas bacterias implicadas en el desarrollo de infecciones pulmonares.

Los grupos amino con carga positiva procedentes de las cadenas de quitosano hacen que éste tenga actividad antimicrobiana de amplio espectro. Asimismo, la actividad antimicrobiana está influenciada por el peso molecular del polímero. Un incremento en el peso molecular del quitosano está relacionado con una mayor efectividad frente a bacterias Gram-positivas. Por el contrario, un menor peso molecular está relacionado con un mayor efecto frente a bacterias Gram-negativas [324]. Numerosos estudios han demostrado que el quitosano con PMA es capaz de unirse a los componentes con carga negativa de la pared celular bacteriana. Esta unión entre el quitosano y los componentes de la pared va a promover la creación de una capa semi - permeable que dificulta el transporte de las sustancias a través de la pared celular. Por el contrario, el quitosano de PMB tiene la habilidad de atravesar la pared bacteriana, unirse al ADN e inhibir la transcripción del ADN y la síntesis de ARNm [301,325,326].

Por consiguiente, a lo largo del estudio de actividad antimicrobiana, las micropartículas de quitosano de PMA se han usado frente a *S. aureus* y las micropartículas de quitosano de PMB para el tratamiento de *P. aeruginosa*. Basándonos en bibliografía, las concentraciones probadas estuvieron en el rango de 0,125 - 1 µg/mL y de 0,0625 - 8 µg/mL para *S. aureus* y *P. aeruginosa* respectivamente [251,252].

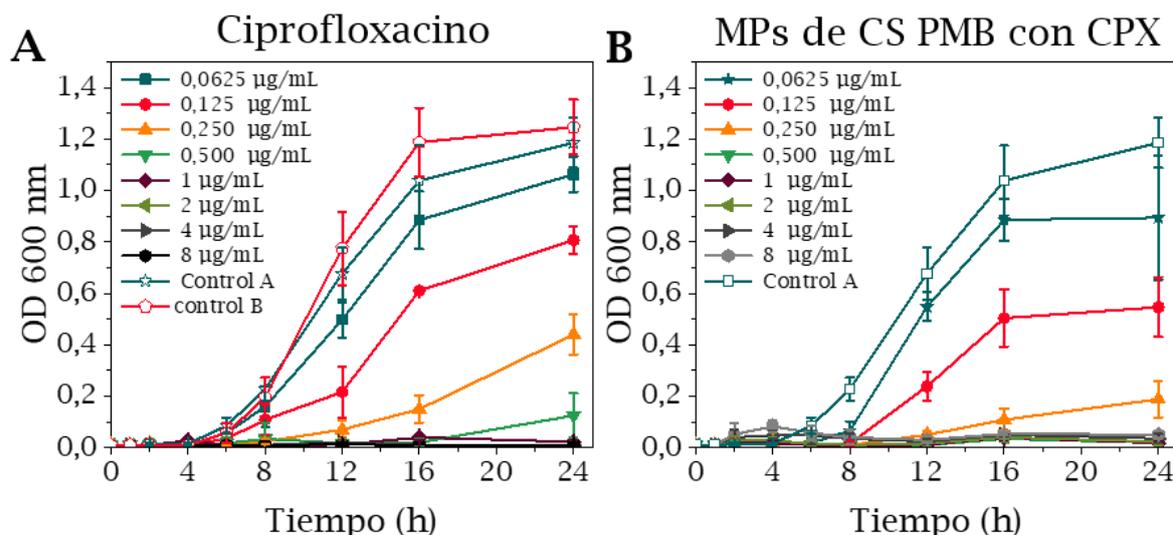
El seguimiento del crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa* se realizó midiendo el valor de la densidad óptica (OD600) de las diferentes suspensiones bacterianas tras ser tratadas con concentraciones crecientes equivalentes de ciprofloxacino libre y encapsulado en las micropartículas. Las curvas de crecimiento para ambas bacterias se encuentran representadas en las

Figuras 4.11 y 4.12 y muestran una fuerte disminución del crecimiento bacteriano con la concentración de ciprofloxacino. Se observó que, a la misma concentración de antibiótico, la fase de crecimiento logarítmico mostró un retraso en su aparición en el caso de las bacterias tratadas con las micropartículas. En el caso de *S. aureus* a las concentraciones de 0,250 - 0,375  $\mu\text{g}/\text{mL}$  el retraso en el crecimiento se extiende hasta las 16 h, indicando la inhibición del crecimiento bacteriano (Figura 4.11B).



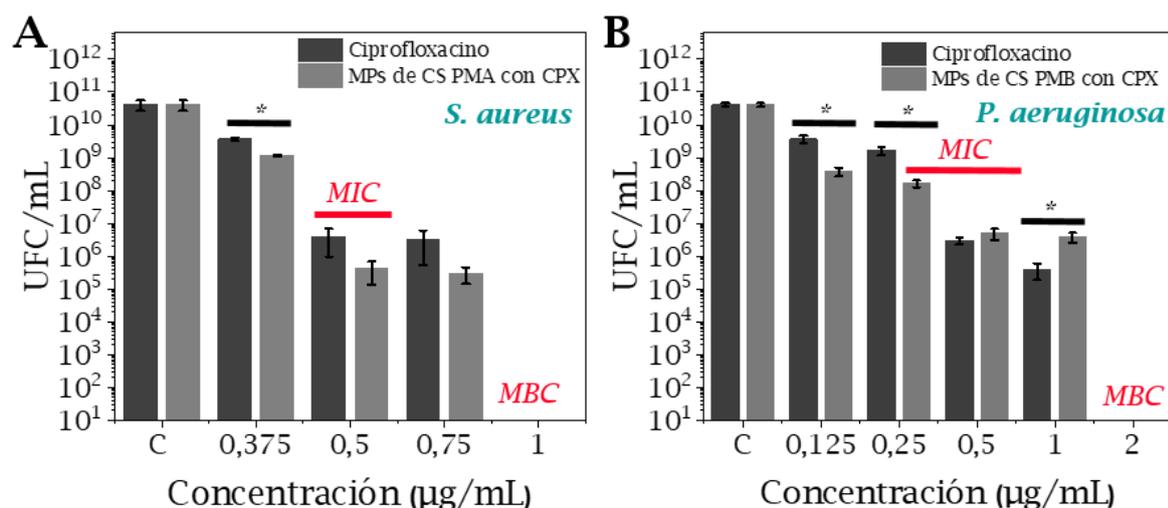
**Figura 4.11.** - Curvas de crecimiento bacteriano de *S. aureus* obtenidas mediante medidas de densidad óptica (600 nm): **(A)** CPX libre; **(B)** MPs de CS PMA con CPX. Las concentraciones en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de antibiótico hacen referencia a la misma cantidad de CPX tanto libre como encapsulado en las MPs. Control A hace referencia a bacterias sin tratamiento; Control B hace referencia a bacterias en contacto con la misma cantidad de disolvente empleado para disolver el CPX puro. Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ).

En el caso de *P. aeruginosa* a una concentración de 0,250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la fase exponencial se retrasó hasta 12 h. Sin embargo, a concentraciones superiores a 0,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no fue posible diferenciar entre las diferentes fases del ciclo de crecimiento bacteriano (Figura 4.12B). Estos resultados mostraron que tanto *S. aureus* como *P. aeruginosa* son ligeramente más susceptibles a la exposición de las micropartículas de quitosano en comparación con el ciprofloxacino puro, posiblemente por la acción sinérgica del quitosano con el antibiótico.



**Figura 4.12.** - Curvas de crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* obtenidas mediante medidas de densidad óptica (600 nm): **(A)** CPX libre; **(B)** MPs de CS PMB con CPX. Las concentraciones en  $\mu\text{g/mL}$  de antibiótico hacen referencia a la misma cantidad de CPX tanto libre como encapsulado en las MPs. Control A hace referencia a las bacterias sin tratamiento; Control B hace referencia a las bacterias en contacto con la misma cantidad de disolvente empleado para disolver el CPX puro. Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ).

Las concentraciones que produjeron una disminución en el crecimiento bacteriano se estudiaron con el método de diluciones seriadas en agar, lo que permitió confirmar los valores de MIC y de MBC tanto para el ciprofloxacino puro como para los dos tipos de micropartículas. En la *Tabla 4.9* y *Figura 4.13* se puede observar que los valores de MIC y de MBC obtenidos fueron los mismos tanto para el ciprofloxacino puro como para el encapsulado, siendo  $1 \mu\text{g/mL}$  y  $2 \mu\text{g/mL}$  las concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano en *S. aureus* y *P. aeruginosa* respectivamente. Los valores obtenidos para las concentraciones de MIC y MBC también coincidieron con lo descrito en bibliografía, donde el ciprofloxacino presentó un rango de valores de MIC de  $0,375 - 0,500 \mu\text{g/mL}$  y de  $0,500 - 1 \mu\text{g/mL}$  para la MBC en la cepa bacteriana *S. aureus*. En el caso de *P. aeruginosa* los valores para la MIC estuvieron en el rango de  $0,250 - 1 \mu\text{g/mL}$  y la  $\text{MBC} > 4 \mu\text{g/mL}$  [251,252].



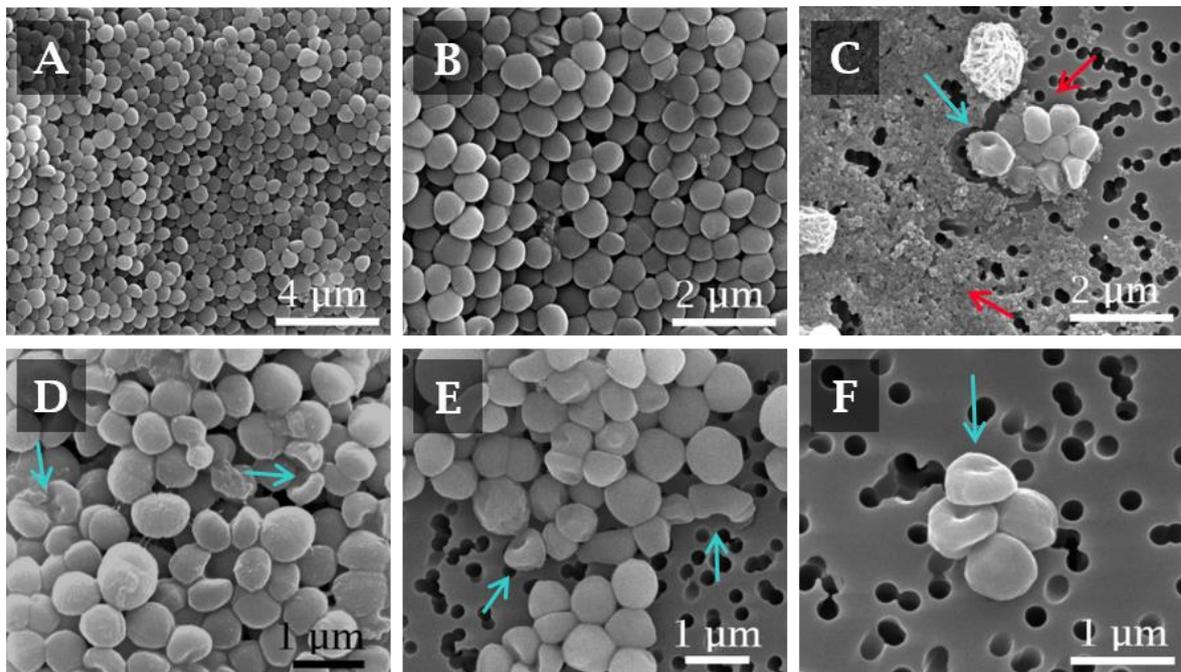
**Figura 4.13.** - Actividad antimicrobiana (UFC/mL) de CPX libre y encapsulado frente a: **(A)** *S. aureus*; **(B)** *P. aeruginosa*. Las concentraciones en µg/mL de antibiótico hacen referencia a la misma cantidad de CPX tanto libre como encapsulado en las MPs. Los resultados se muestran como media ± DE (n = 3); \*Diferencias significativas (p < 0,05).

**Tabla 4.9** - Valores MIC y MBC del ciprofloxacino para *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Bacteria	Ciprofloxacino puro		Ciprofloxacino encapsulado	
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	0,375 - 0,500	1	0,375 - 0,500	1
<i>P. aeruginosa</i>	0,500	2	0,250 - 0,500	2

Finalmente, diferentes muestras de ambas bacterias se observaron por microscopía SEM tras ser incubadas 24 h con ciprofloxacino puro y encapsulado en las micropartículas de quitosano. Las bacterias control de *S. aureus* mostraron una morfología redondeada con la pared bacteriana lisa y con un tamaño que osciló entre 0,8 - 1 µm de diámetro. El mecanismo de acción del ciprofloxacino contra bacterias Gram-positivas está centrado en las enzimas, siendo la Topoisomerasa IV la primera enzima diana y en segundo lugar la enzima ADN girasa. Al contrario que en el caso de las bacterias Gram-negativas, no va a afectar a la permeabilidad de la membrana de manera tan directa [327].

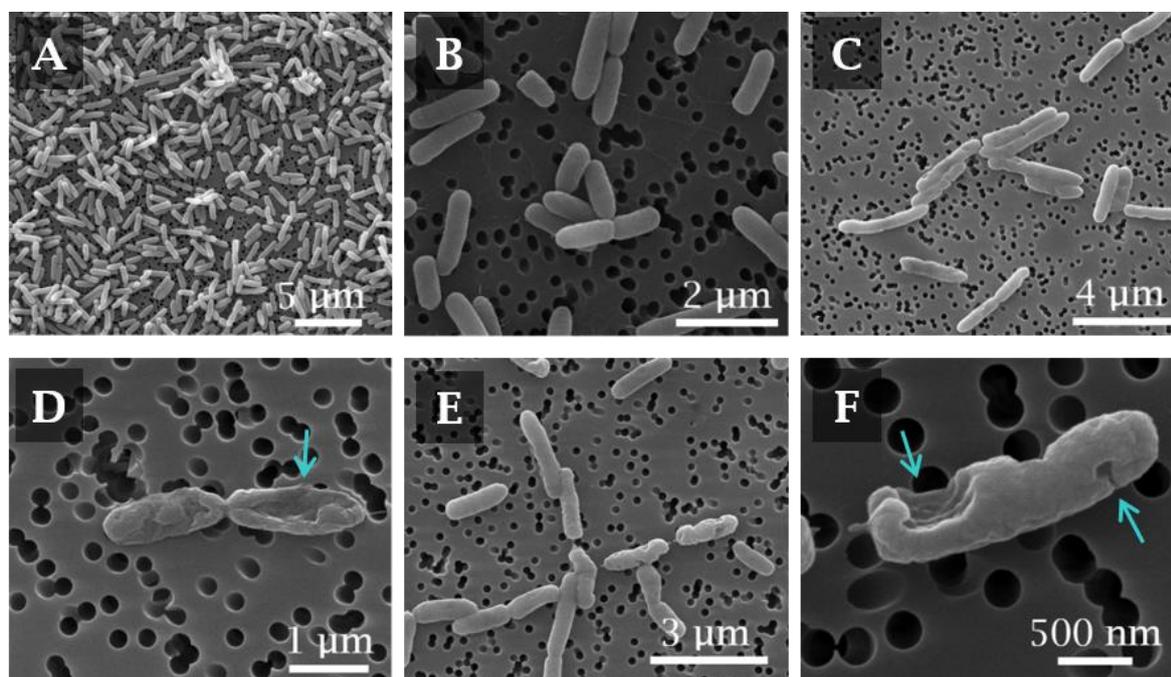
Cuando *S. aureus* es incubado con antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas (como el ciprofloxacino) muestran una tendencia a formar agregados de bacterias embebidas en una estructura de tipo biofilm, lo que les confiere más resistencia a los antibióticos [328,329]. Se pudo observar por microscopía SEM que algunos grupos de células bacterianas estaban cubiertos con esta matriz (*Figura 4.14C*) y otros no (*Figura 4.14F*). Al mismo tiempo, las imágenes de microscopía SEM revelaron un aumento de poros y grietas en la pared celular, indicando la muerte celular bacteriana.



**Figura. 4.14.** – Imágenes de microscopía SEM de *S. aureus*: (A – B) Control positivo; Después del tratamiento con: (C – D) Ciprofloxacino puro; (E – F) MPs de CS PMA con CPX. Las flechas rojas indican la formación de biofilm bacteriano, las flechas azules indican ejemplos de los cambios en la morfología bacteriana.

Las bacterias control de *P. aeruginosa* mostraron una morfología en forma de bastón, con pared bacteriana lisa y un tamaño de 0,5 - 1 μm y 1,5 - 5 μm de diámetro y de longitud respectivamente. En el caso de las bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa*, el mecanismo de acción de las fluoroquinolonas consiste en el empleo de unos canales de porina que permiten atravesar la membrana externa y llegar al lugar de acción (ADN girasa y Topoisomerasa IV). Por este motivo, *P. aeruginosa* tratada con ciprofloxacino a concentraciones cercanas a la MBC muestra una alteración importante en su

morfología, presentando una membrana exterior rugosa y en muchos casos con cavidades e incluso agujeros [330], tal y como se puede observar en la *Figura 4.15* para bacterias tratadas con ciprofloxacino o con las micropartículas.



**Figura 4.15.** – Imágenes de microscopía SEM de *P. aeruginosa*: (A – B) Control positivo; Después del tratamiento con: (C – D) CPX puro; (E – F) MPs de CS PMB con CPX. Las flechas azules indican ejemplos de los cambios en la morfología bacteriana.

Se concluye que el ciprofloxacino encapsulado en las micropartículas de quitosano mantuvo su actividad antimicrobiana siendo igual de efectivo que el fármaco inicial. Al mismo tiempo, se observó que las micropartículas basadas en quitosano fueron efectivas a concentraciones bajas y en cortos periodos de tiempo.

#### 4.5 Propiedades aerodinámicas y generación de aerosoles

Se realizaron dos tipos de ensayos para evaluar la posible aplicación de la formulación desarrollada como terapia inhalatoria suministrando el fármaco ciprofloxacino. El primer tipo de ensayos incluye los realizados con el

generador de aerosoles UNIZAR, desarrollado por la Universidad de Zaragoza (Capítulo 3). En el segundo tipo de ensayo, y con el objetivo de comparar las características del aerosol formado con un inhalador comercial de polvo seco (DPI, Breezhaler®, Novartis, Suiza) y el generador de aerosoles UNIZAR, se realizaron experimentos con el equipo Spraytec® (Malvern Instruments, Reino Unido) (Capítulo 2, Punto 2.4.2) empleando con ambos dispositivos la formulación desarrollada basada en quitosano y el antibiótico ciprofloxacino.

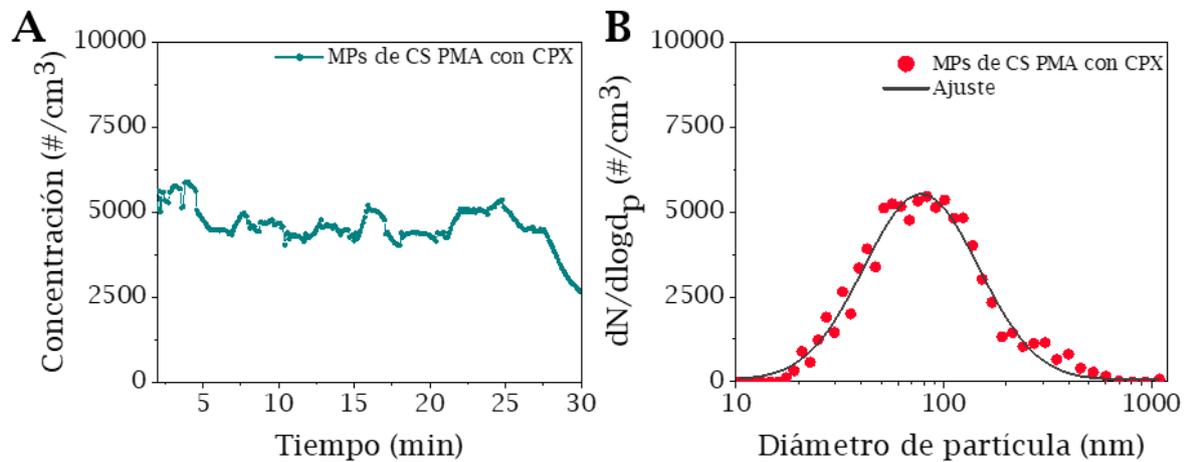
#### 4.5.1 Generación de aerosoles

Para el desarrollo de aerosoles mediante el generador UNIZAR se seleccionaron las micropartículas de quitosano de PMA, ya que permitieron disponer de una formulación con una distribución de tamaño de partícula dentro del rango de 200 - 400 nm, que permitiría su depósito en la zona alveolar.

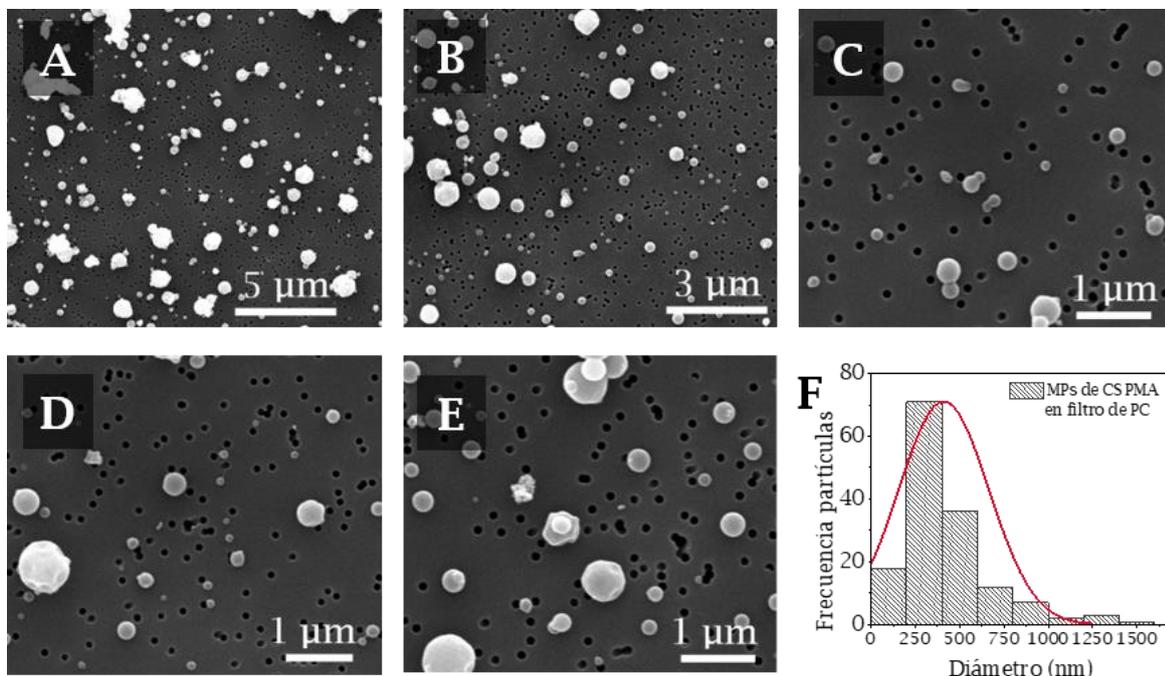
Para la realización de los aerosoles se emplearon muestras de  $15 \pm 2$  mg de micropartículas basadas en quitosano en forma de polvo seco. La cámara principal (cámara de expansión) tuvo una presión inicial de 4 barg y la cámara secundaria (reservorio de aire) de 8 barg. Tras cargar el material en el depósito, se procedió a la apertura rápida de la válvula (V4), que conecta ambas cámaras, produciendo la aerosolización neumática de la muestra en la cámara principal. Mediante la apertura de la válvula (V5), se obtiene una corriente continua de aerosol submicrométrico (Capítulo 3, Esquema 3.1). La caracterización de la corriente de aerosol obtenida en términos de distribución de tamaño de partícula y concentración de número de partícula por  $\text{cm}^3$  ( $\#/\text{cm}^3$ ) se realizó empleando los contadores de partículas OPC y CPC (Anexo I, Sección I.4)

Tras la aerosolización de estas micropartículas se obtuvo una corriente de aerosol con una concentración de partículas de  $5000 \#/\text{cm}^3$ , que se mantuvo relativamente estable durante un tiempo aproximado de casi 30 minutos. Se pudo confirmar mediante imágenes de microscopía SEM que las partículas en fase aerosol se encontraban dispersas de manera individual o en pequeños aglomerados (Figura 4.16A y 4.17). La distribución del tamaño de partícula

obtenido en los filtros de PC fue de  $410,1 \pm 254,1$  nm, coincidiendo con el tamaño de partícula medio de la muestra inicial (Tabla 4.3) ( $d_p = 386,1 \pm 248,5$  nm).

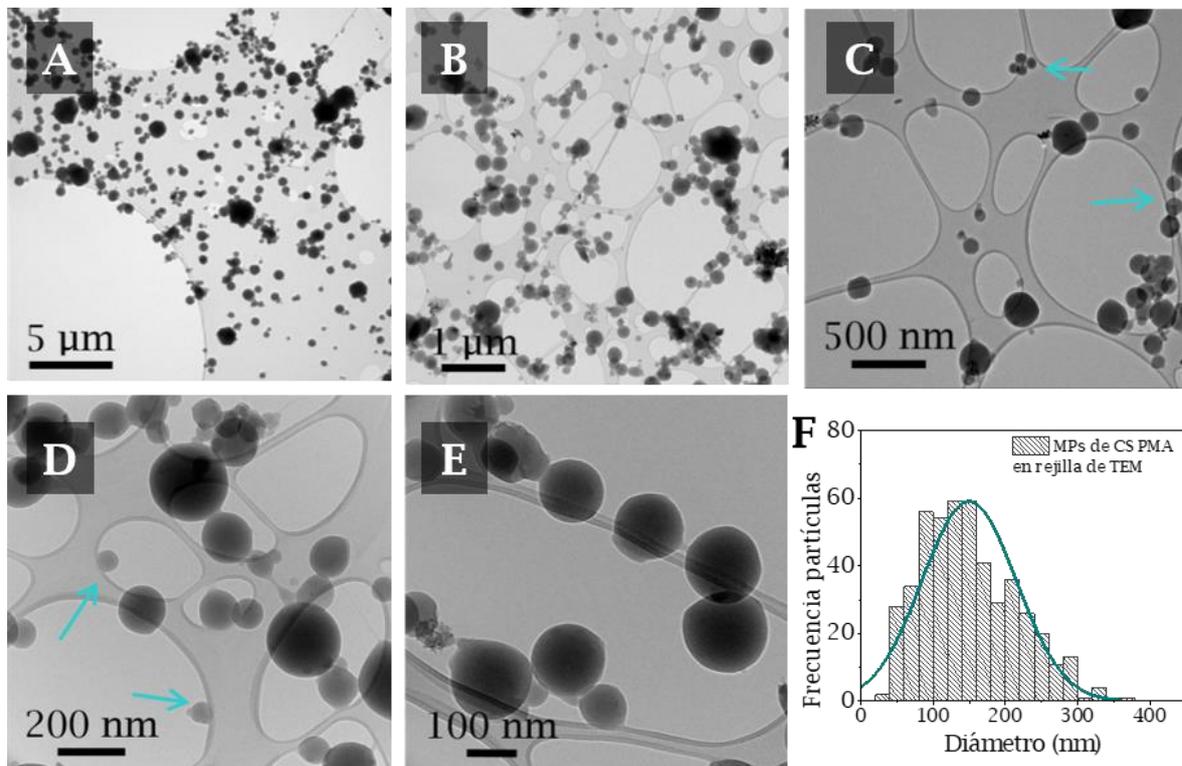


**Figura 4.16.** – Caracterización de la corriente de aerosol con las MPs de CS PMA con CPX: (A) Evolución temporal de la concentración de partículas entre 0,3 - 10  $\mu\text{m}$  medido con el equipo OPC durante un tiempo de 30 minutos; (B) Curva de distribución de tamaño de partículas entre 10 - 1000 nm medido por el equipo CPC.



**Figura 4.17.** – (A - E) Imágenes de microscopía SEM de las MPs de CS PMA con CPX capturadas tras la aerosolización; (F) Histograma de distribución de tamaños de partícula ( $d_p = 410,1 \pm 254,1$  nm) ( $N = 150$ ).

Por otro lado, el equipo de medida CPC reveló la presencia de una población de partículas de tamaño  $< 100$  nm ( $d_p = 82,9 \pm 2,0$  nm) (Figura 4.16B). Esta población de partículas se pudo confirmar a partir de las imágenes de microscopía TEM (Figura 4.18), donde se apreció una distribución de partículas muy polidispersa, con partículas micro y nanométricas ( $d_p = 149,8 \pm 65,2$  nm).



**Figura 4.18** - (A - E) Imágenes TEM de las MPs de CS PMA capturadas tras su aerosolización en forma de polvo seco con el generador de aerosoles UNIZAR; (F) Histograma de distribución de tamaños de partícula de las MPs de CS PMA con CPX ( $d_p = 149,8 \pm 65,2$  nm) ( $N = 450$ ). Las flechas azules indican las nanopartículas de quitosano con  $d_p < 100$  nm.

Los ensayos de aerosolización con las micropartículas de quitosano permitieron obtener dos conclusiones. La primera, que las micropartículas no se vieron afectadas por el golpe de presión durante el proceso de aerosolización. Además, la disgregación del material permitió la obtención de partículas aisladas con tamaños próximos a las prístinas. En segundo lugar, la aerosolización de las micropartículas permitió la observación de una población de partículas  $< 100$  nm que de manera inicial no se pudo observar por microscopía SEM. Esta población de partícula de tamaño nanométrico, puede

resultar de especial interés en el proceso de inhalación, al tener una deposición preferente en la zona alveolar (Capítulo 1, Figura 1.4).

#### 4.5.2 Tamaño efectivo de partículas en un proceso de inhalación

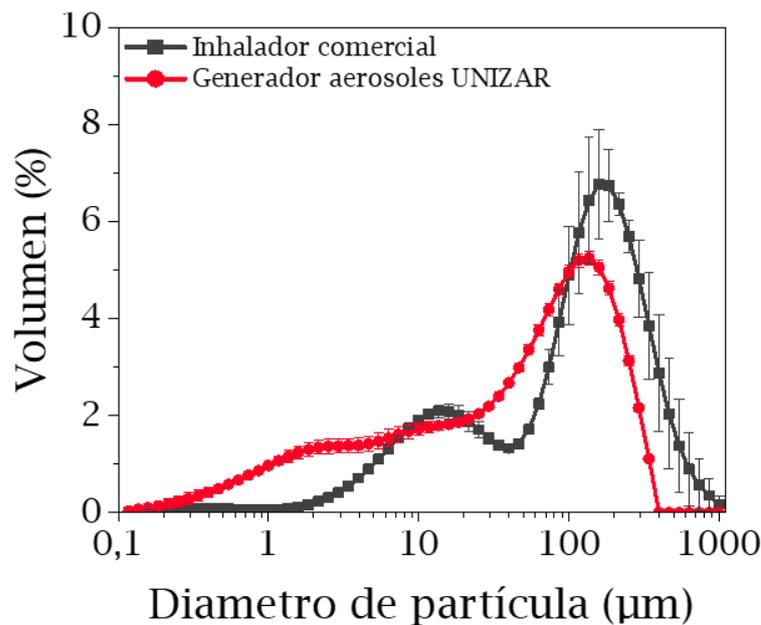
El objetivo de este ensayo fue evaluar la capacidad de aerosolización del generador de aerosoles UNIZAR (Capítulo 3) frente a un inhalador comercial (DPI) empleando las micropartículas basadas en quitosano desarrolladas en este Capítulo. Para ello, se seleccionó como modelo de inhalador comercial el inhalador de polvo seco Breezhaler® (Capítulo 3, Figura 3.6). Estos ensayos se realizaron con el equipo Spraytec® y permitieron obtener los valores de distribución volumétrica y el tamaño físico de partícula.

El protocolo seguido con el generador de aerosoles se describe en el Capítulo 3, Punto 3.3.3. La boquilla del generador de aerosoles UNIZAR se colocó en posición vertical entre ambos láseres del equipo Spraytec® (Esquema 3.2). Se emplearon 15 mg de micropartículas basadas en quitosano de PMA en cada ensayo. La aerosolización de la muestra en forma de polvo seco se realizó empleando una presión de 4 barg en la cámara secundaria. En los ensayos realizados con el inhalador comercial, las micropartículas de quitosano se introdujeron en cápsulas (15 mg/cápsula) y la nube de aerosol se generó con una bomba de vacío a un caudal de 100 L/min. El protocolo seguido para la realización de estos ensayos se encuentra descrito en el Capítulo 2, Punto 2.4.2.

En la Figura 4.19 se observa que en la curva obtenida con el generador de aerosoles UNIZAR existe un primer pico de una distribución amplia que comienza desde 0,1 hasta 10  $\mu\text{m}$  y un segundo pico próximo a las 100  $\mu\text{m}$ . Este primer pico puede corresponder a aglomerados de partículas y el segundo pico a grupos de partículas que no se han podido disgregar de manera individual. Sin embargo, al emplear el inhalador comercial DPI, se observan dos picos anchos, el primero centrado en 10  $\mu\text{m}$  y el segundo pico con un tamaño próximo a 300  $\mu\text{m}$ , lo que es indicativo de que el DPI es incapaz de disgregar las partículas de manera individual o en grupos de menor tamaño. En el caso del

generador UNIZAR se produjo una mejor dispersión de las partículas, estando cerca del tamaño respirable.

En la *Tabla 4.10* se recogen los valores de diámetro volumétrico medio y los valores de amplitud de la curva (Span). Se puede apreciar que con el generador de aerosoles se consigue una mejor dispersión de las partículas, ya que el valor de  $Dv_{10}$  es  $1,66 \pm 0,09 \mu\text{m}$ , mientras que con el inhalador comercial es casi 5 veces más ( $8,44 \pm 0,31 \mu\text{m}$ ). Sin embargo, aunque con el generador de aerosoles la dispersión individual de partículas es mejor, la presencia de aglomerados sigue estando presente en un porcentaje elevado, por lo que sería necesario optimizar su funcionamiento de cara a una posible aplicación práctica.



**Figura 4.19.** - Distribución de las MPs de CS PMA con CPX en el instrumento Spraytec® según su tamaño físico. La curva roja muestra la distribución del tamaño de partícula obtenido con el generador de aerosoles. La curva gris muestra la distribución del tamaño de partícula obtenido con el inhalador comercial de polvo seco Breezhaler®.

**Tabla 4.10** - Valores obtenidos de la nube de aerosol con las micropartículas de quitosano de PMA con ciprofloxacino con el equipo Spraytec®.

Dispositivo	Dv10 (µm)	Dv50 (µm)	Dv90 (µm)	Span
Inhalador comercial polvo seco	8,44 ± 0,31	114,70 ± 11,03	318,15 ± 70,36	2,700
Pluma del generador de aerosoles	1,66 ± 0,09	49,98 ± 3,41	187,20 ± 2,26	3,750

## 4.6 Conclusiones

A continuación, se recogen las conclusiones más importantes de este Capítulo:

- El método desarrollado permite obtener partículas en forma de polvo seco a partir del polímero quitosano en única etapa y sin necesidad de añadir excipientes. Las partículas desarrolladas presentaron una elevada carga de fármaco (~ 75%).
- La actividad antimicrobiana fue diferente para los distintos pesos moleculares empleados (alto y bajo). Las micropartículas cargadas con ciprofloxacino mostraron una potente actividad frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*.
- La cinética de liberación del ciprofloxacino encapsulado en las micropartículas de quitosano reflejó una rápida liberación del antibiótico al medio, alcanzado aproximadamente el 50% en un tiempo de 30 min. Este proceso se caracterizó como una cinética de liberación de primer orden. La rápida liberación del ciprofloxacino se considera favorable en un proceso de suministro inhalado ya que permitiría tratar infecciones pulmonares inmediatamente después del proceso de inhalación.

- Los ensayos de citotoxicidad realizados en dos líneas celulares de pulmón (A549 y Calu-3) revelaron que las micropartículas eran seguras para ser administradas a dosis superiores al valor de MBC obtenido en *S. aureus* y *P. aeruginosa*.
- Los resultados obtenidos de la aerosolización de estas micropartículas, indicaron la capacidad del generador de aerosoles UNIZAR de disgregar las micropartículas de manera individual con mayor eficacia que un inhalador comercial de referencia. Asimismo, el inhalador permitió mantener una corriente de aerosol con una concentración estable de partículas, por un tiempo de unos 30 minutos.
- El tamaño de partícula obtenido (< 500 nm) en combinación con el generador de aerosoles UNIZAR, abre la posibilidad a un tratamiento alternativo frente a infecciones pulmonares, ya que la parte más distal de los pulmones. Los alveolos podrían ser alcanzados a partir de formulaciones con el tamaño de partícula descrito, minimizando la deposición en el resto del sistema respiratorio y reduciendo la toxicidad en otras partes del sistema respiratorio.



# Capítulo 5

## DESARROLLO DE PARTÍCULAS DE DEXTRANO COMO PORTADORES DE CIPROFLOXACINO

---

*Este quinto Capítulo aborda la generación de micropartículas mediante un proceso de gelificación/precipitación, empleando el polímero natural dextrano. Las micropartículas basadas en dextrano obtenidas en forma de polvo seco, presentaron un tamaño medio de partícula próximo a las 5  $\mu\text{m}$ . Del mismo modo que el en capítulo anterior, el antibiótico empleado fue el ciprofloxacino. Las micropartículas se caracterizaron por XPS, XRD, FTIR, EDX y microscopía SEM. La cinética de liberación del ciprofloxacino fue muy rápida, liberando el 80% de fármaco en la primera. La biocompatibilidad de estas partículas se estudió in vitro en tres líneas celulares de pulmón, A549, NCI-H441 y Calu-3. Posteriormente, se evaluó su efectividad frente a biofilms desarrollados por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y frente a bacterias planctónicas. Finalmente, se evaluaron las propiedades aerodinámicas de la formulación, con el objetivo de evaluar su posible aplicación en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio mediante terapia inhalatoria.*



## 5. DESARROLLO DE PARTÍCULAS DE DEXTRANO COMO PORTADORES DE CIPROFLOXACINO

### 5.1 Introducción

Un enfoque prometedor en terapia antibacteriana es utilizar partículas poliméricas como portadores, de manera que protejan el fármaco de una posible inactivación y, al mismo tiempo, aumente su movilidad y absorción en el interior de las secreciones pulmonares [331]. En las últimas décadas, numerosos estudios tanto *in vitro* [332-334] como *in vivo* [335-337] han demostrado el especial interés de formulaciones a base de dextrano (polímero biocompatible) en pacientes con fibrosis quística. Este polímero posee actividad mucolítica, y reduce la adhesión de las bacterias al epitelio pulmonar.

Feng *et al.*, [332] demostraron *in vitro* la capacidad mucolítica del dextrano en secreciones de pacientes con fibrosis quística. Sin embargo, los efectos generados por el dextrano sobre la reducción de la viscosidad en el moco pulmonar no fueron específicos de esta patología, y podría ser aplicado a otras enfermedades pulmonares como la EPOC donde la producción y acumulación de moco es también uno de los principales síntomas. El efecto mucolítico del dextrano parece estar asociado a su naturaleza de polisacárido, ya que posee la capacidad de romper los enlaces (puentes de hidrógeno) entre las macromoléculas de mucina que forman una “red” en el mucus. El dextrano compite en la formación de puentes de hidrógeno con los sitios de unión de las glicoproteínas procedentes del mucus, dando como resultado la sustitución de péptidos de mucina (asociados a un gel mucoso) por oligosacáridos. Cabe destacar que el efecto de reducción de la viscosidad de las secreciones observado en este polímero está principalmente ocasionado por dextransos de peso molecular bajo [338].

Por otro lado, Bargahouthi *et al.*, evaluaron mediante ensayos *in vitro* la capacidad del dextrano de interferir con las bacterias (*P. aeruginosa*) en su adhesión a las células epiteliales A549 [333]. En concreto, el uso de carbohidratos (como el dextrano) para bloquear el reconocimiento de los

receptores bacterianos y prevenir el desarrollo de infecciones bacterianas se ha usado en numerosos sistemas biológicos, ya que bacterias asociadas con patologías como la neumonía (*H. influenzae*, y *S. aureus*) se unen a los receptores de los carbohidratos presentes en el epitelio pulmonar [335]. De manera casi paralela, Chiu *et al.*, [334] desarrollaron un estudio en el que confirmaron la capacidad del dextrano de reducir la adherencia de *Burkholderia cepacia* a células epiteliales del sistema respiratorio. *B. cepacia* es un patógeno oportunista menos frecuente en pacientes con fibrosis quística, pero que comienza su colonización adhiriéndose a las células epiteliales del tracto respiratorio y una vez establecido, rara vez se logra su erradicación al poseer una alta resistencia a los antibióticos [339].

Finalmente, los ensayos *in vivo* realizados permitieron confirmar los resultados obtenidos *in vitro*. Bryan *et al.*, [335] descubrieron que la aerosolización de dextrano prevenía la neumonía y la muerte ocasionada por *P. aeruginosa* en ratones neonatos. Feng *et al.*, [337] realizó un estudio con perros a los que se les administró dextrano en forma de aerosol. Los resultados mostraron una reducción en la densidad de las secreciones, facilitando su eliminación por aclaramiento mucociliar y a través de la tos. Estos resultados fueron confirmados por Sudo *et al.*, [336] en otro ensayo similar con perros.

El fármaco ciprofloxacino (descrito en los [Capítulos 1 y 4](#)) tras su administración por vía intravenosa con dosis de 400 mg/kg, alcanza una concentración pulmonar de 3,84 mg/kg, es decir, un 0,96%. Por ello, se cree que una administración por vía inhalatoria podría ofrecer un tratamiento más eficaz al realizar una administración directa en el lugar de infección, con menor toxicidad sistémica y, permitiendo al mismo tiempo, reducir la dosis total administrada [294]. Del mismo modo, cuando se administra vía oral, se distribuye desde la sangre hasta los alveolos a través de dos tipos de células epiteliales, alveolares y endoteliales. Por el contrario, cuando la administración es inhalatoria, el ciprofloxacino alcanza directamente el sistema respiratorio. Chono *et al.*, [340] realizaron un estudio *in vivo* en el que compararon la administración oral e inhalada del ciprofloxacino. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de ciprofloxacino fue mayor tanto en los

macrófagos alveolares como en el líquido de revestimiento del pulmón con esta vía de administración, mostrando que, el ciprofloxacino resulta un buen candidato para el tratamiento de infecciones respiratorias por vía inhalatoria.

En este Capítulo se desarrolla una formulación basada en el polímero dextrano, por las propiedades ya discutidas anteriormente, al que se ha incorporado el antibiótico ciprofloxacino, en un vector que pretende facilitar la llegada del fármaco al sistema respiratorio.

## 5.2 Generación de micropartículas basadas en el polímero dextrano por gelificación/precipitación

Para la producción de micropartículas de dextrano se empleó la técnica de gelificación/precipitación descrita en el [Capítulo 2 \(Punto 2.1.3\)](#) seguida de un proceso de secado mediante liofilización. El protocolo se basó en el estudio realizado por Stenekes *et al.*, [247], en el que se identificaron las variables que podían afectar a la morfología de las micropartículas resultantes. Las condiciones experimentales estudiadas se recogen en la [Tabla 2.4 \(Capítulo 2, Punto 2.1.3.2\)](#) y se describen en mayor detalle a continuación.

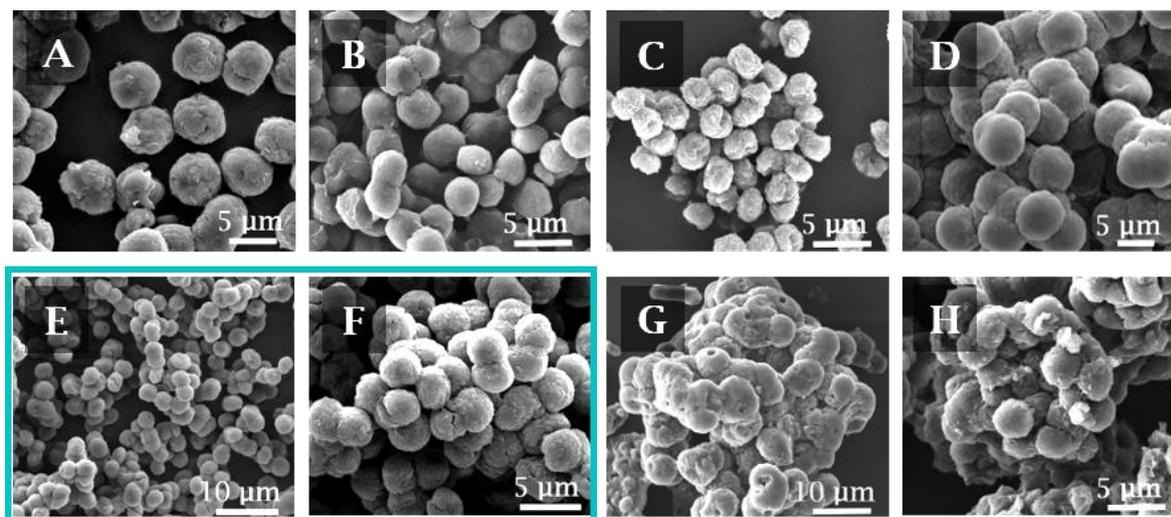
### 5.2.1 Concentración de polímero

Se estudió la formación de micropartículas de dextrano (MPs de DXT) mediante gelificación/precipitación empleando disoluciones acuosas del polímero a tres concentraciones diferentes, 40, 50 y 60% p/p. Los ensayos se realizaron a temperatura constante de 25 °C y sin agitación. Las disoluciones acuosas poliméricas se sonicaron hasta obtener una disolución completa del polímero. Pasado este tiempo, se siguió el protocolo descrito en el [Capítulo 2, Punto 2.1.3.2](#), estudiando la formación del gel y las micropartículas a dos tiempos distintos, 24 y 48 h.

La [Figura 5.1](#) muestra las micropartículas de dextrano obtenidas a las distintas concentraciones y tiempos estudiados. Se observa que las a las 24 h

las micropartículas obtenidas tienen forma esférica. Con la concentración de dextrano más baja (40% p/p) el tamaño de partícula fue de  $5,03 \pm 0,77 \mu\text{m}$  frente a  $2,79 \pm 0,48 \mu\text{m}$  y  $3,38 \pm 0,60 \mu\text{m}$  obtenidos para 50% p/p y 60% p/p de dextrano respectivamente. A las 48 h, las micropartículas seguían manteniendo su forma esférica, a excepción de las obtenidas a la concentración más alta de dextrano (60% p/p) donde se visualizaron grandes aglomerados. Estos resultados son coherentes con un proceso de gelificación progresivo. Si se detiene a una etapa temprana, se pueden obtener precipitados aislados en forma de micropartículas [247]. Mientras que, si el proceso se prolonga, la gelificación continúa y se pierde la individualidad de las partículas.

Basándonos en estos resultados y buscando la obtención de micropartículas en el rango de 1-5  $\mu\text{m}$ , se establecieron como condiciones óptimas una concentración de dextrano del 60% p/p y un tiempo de 24 h.



**Figura 5.1.** - MPs de DXT a distintas concentraciones y tiempos de estudio. DXT 40% p/p: (A) 24 h; (B) 48 h; DXT 50% p/p: (C) 24 h; (D) 48 h; DXT 60% p/p: (E - F) 24 h; (G - H) 48 h. En azul se encuentran recuadradas las imágenes de microscopía SEM correspondientes a las condiciones seleccionadas como referencia

### 5.2.2 Tiempo de gelificación/precipitación

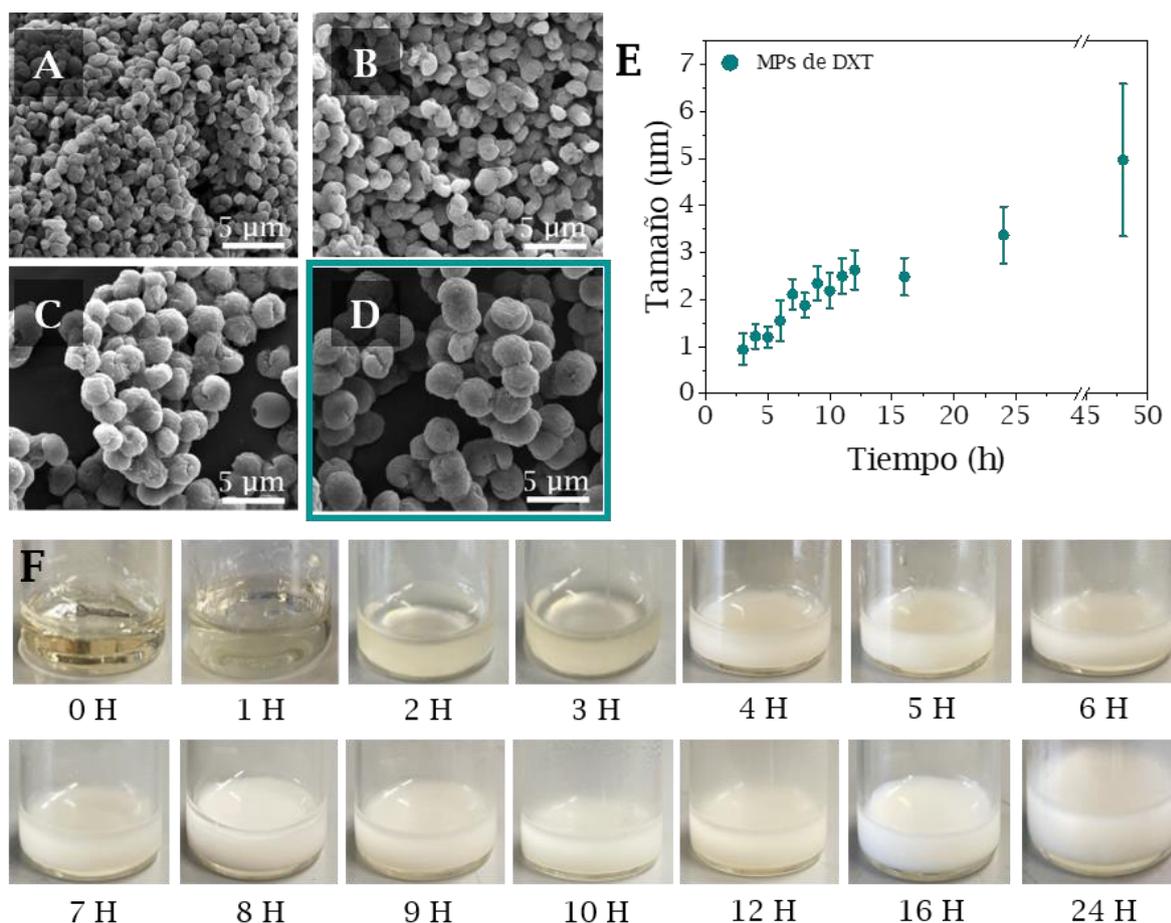
Para la concentración de polímero seleccionada (DXT 60% p/p), se realizó un seguimiento de la formación de gel, la evolución de la morfología y tamaño

de las micropartículas obtenidas a diferentes intervalos de tiempo hasta un máximo de 48 h. El proceso se realizó a temperatura ambiente (25 °C) y sin agitación.

A los tiempos iniciales de 1 y 2 h no se apreció la formación de micropartículas, cuya formación pudo observarse solo a partir de las 3 h. Sin embargo, no fue hasta las 8 h donde se pudieron diferenciar con mayor claridad micropartículas individuales con morfología redondeada (*Figura 5.2*).

Asimismo, el tamaño de las micropartículas fue creciendo en función del tiempo, desde un tamaño de partícula inicial menor de 1  $\mu\text{m}$  ( $d_p = 0,94 \pm 0,33 \mu\text{m}$  a las 3 h) hasta unas 5  $\mu\text{m}$  ( $d_p = 4,97 \pm 1,60 \mu\text{m}$  a las 48 h) (*Figura 5.2*). En la *Figura 5.2F* se muestra cómo se produce la formación del gel con el tiempo. Se puede apreciar que, a las 4 h ( $d_p = 1,20 \pm 0,26 \mu\text{m}$ ) el gel adquirió un color blanquecino, correspondiente al comienzo de la formación de precipitados, coincidiendo con lo observado por microscopía SEM. A partir de las 8 h ( $d_p = 1,75 \pm 0,35 \mu\text{m}$ ) se observa una mayor consistencia lo que se corresponde con la formación completa de micropartículas. Con el tiempo, el rendimiento del proceso también aumenta, desde valores en torno al 4% hasta el 20% para tiempos de 4 y 8 h respectivamente.

A pesar de que a un tiempo de 8 h ya se obtuvieron micropartículas, se decidió fijar el tiempo óptimo a 24 h, coincidiendo con lo descrito en el punto anterior, con el objetivo de obtener un rendimiento mayor (30%). A 24 h el tamaño de partícula fue de  $3,37 \pm 0,35 \mu\text{m}$ , tamaño dentro del rango óptimo (1-5  $\mu\text{m}$ ) para alcanzar la conducción (tráquea - bronquiolos) preferente para el desarrollo de los biofilms bacterianos [84,110].



**Figura 5.2.** – Imágenes de microscopía SEM de las MPs de DXT a diferentes tiempos de formación: (A) 4 h; (B) 8 h; (C) 12 h; (D) 24 h. Proceso de gelificación/precipitación: (E) Relación entre el tamaño de las MPs formadas y el tiempo de gelificación; (F) Imágenes del proceso de formación del gel con el tiempo. En azul se encuentran señaladas las micropartículas seleccionadas.

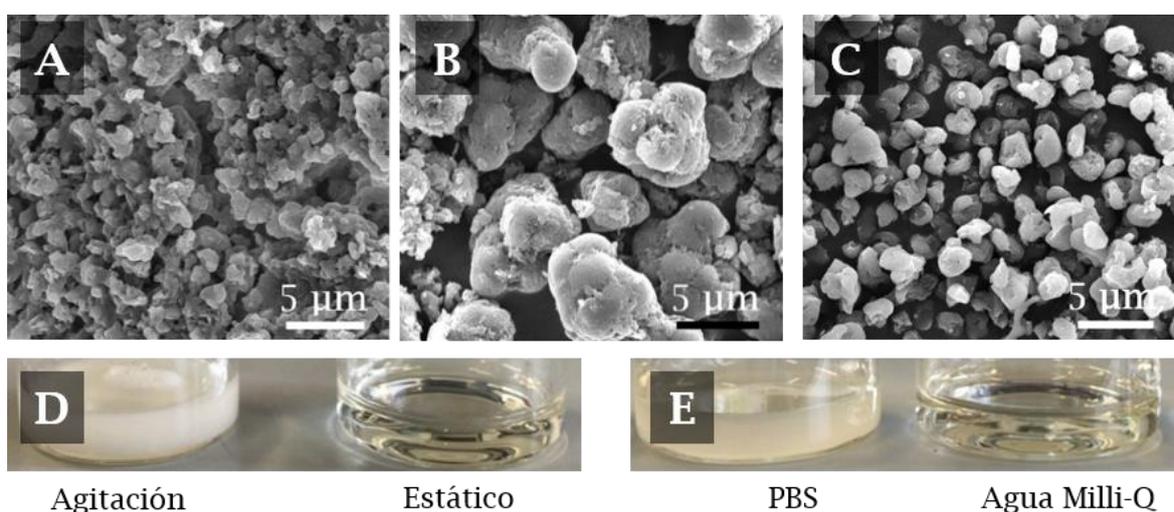
### 5.2.3 Efecto de la agitación, disolvente y temperatura

Para estudiar la influencia del disolvente y la agitación en el proceso de formación de las micropartículas, se mantuvieron constantes el tiempo de gelificación/precipitación en 24 h y la concentración de polímero en 60% p/p.

Según el estudio realizado por Stenekes *et al.*, [247] la presencia de sales en el medio permite reducir el tiempo de gelificación, por lo que el agua Milli-Q se sustituyó por PBS. En efecto, los resultados obtenidos mostraron una reducción en el tiempo de gelificación, y así, dentro de la primera hora de estudio se pudo observar la formación del gel (*Figura 5.3D y 5.3E*). Además, se

añadió agitación al proceso para observar si el desarrollo de micropartículas se producía en un intervalo de tiempo más corto. Esta agitación se llevó a cabo de dos maneras diferentes, mediante agitación intensa utilizando un agitador magnético a 500 rpm y por un método de agitación más suave (250 rpm), empleando un sistema de movimiento por rodillos (Movil-Rod, JP. Selecta, España).

Aunque se confirmó que tanto el empleo de agitación como de PBS producían una aceleración en la formación del gel, la morfología de las micropartículas de dextrano obtenidas no fue esférica ni homogénea en comparación con las obtenidas en disolución acuosa y en ausencia de agitación (*Figura 5.3*).



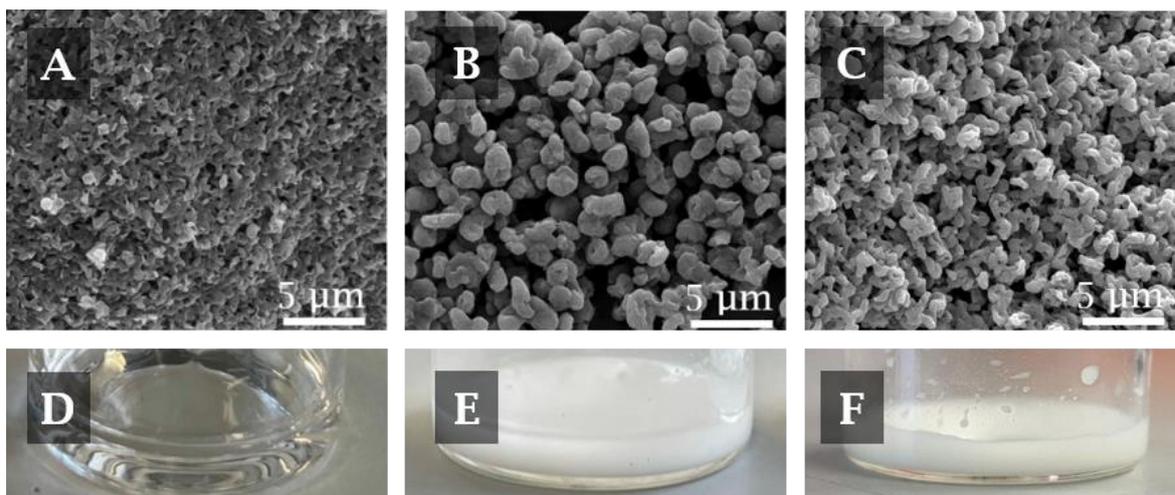
**Figura 5.3.** – MPS de DXT obtenidas a un tiempo de 24 h en forma de polvo seco a distintas condiciones. Medio acuoso y agitación: (A) Agitador magnético (500 rpm); (B) Agitación suave con rodillos (250 rpm); Medio salino y en estático: (C) PBS como disolvente; Comparación de los geles formados: (G) Medio acuoso con agitación y en estático (tiempo 1h); (H) Medio PBS y agua Milli-Q en estático (tiempo 1h). En todos los casos, DXT 60% p/p y temperatura 25 °C.

La hipótesis de Stenekes *et al.*, [247] es que inicialmente las cadenas de dextrano se asocian a través de enlaces puente de hidrógeno, después se produce la nucleación y finalmente el crecimiento de los cristales con forma esférica. La presencia de iones procedentes de las sales del PBS requieren de moléculas de agua para solvatare, facilitando la asociación de las cadenas y,

por lo tanto, la cristalización. Además, la agitación de la disolución induce la orientación de las cadenas, dando como resultado una cristalización acelerada [341]. Sin embargo, esta reorganización de las cadenas de dextrano da lugar a precipitados con formas y tamaños muy heterogéneos lo que sugiere, que, aunque el proceso sea más rápido, la interacción entre cadenas se produce de manera más desordenada. En resumen, la aceleración del proceso por aumento de la fuerza iónica o de la agitación, aumenta el número de eventos nucleación espontáneos sin descartar la nucleación secundaria sobre partículas ya formadas y, por tanto, la heterogeneidad del sistema.

Finalmente, se estudió la influencia de la temperatura sobre la velocidad de formación del gel, suponiendo que un aumento de temperatura también aceleraría la reorganización de las cadenas de dextrano y, por tanto, la obtención de micropartículas. Basándose en los resultados obtenidos a 25 °C, se fijó 4 h como tiempo de estudio, momento a partir del cual se comenzó a observar la formación de partículas (*Figura 5.2*). El intervalo de temperaturas analizado fue de 4°C a 60 °C, manteniéndose el sistema sin agitación.

En la *Figura 5.4* se observa que una bajada de la temperatura (4 °C) no favorece la formación del gel y, en consecuencia, tampoco la generación de micropartículas. Por el contrario, a 37 y 60 °C las micropartículas obtenidas fueron muy similares,  $d_p(37^\circ\text{C}) = 1,60 \pm 0,33 \mu\text{m}$  y  $d_p(60^\circ\text{C}) = 1,00 \pm 0,26 \mu\text{m}$ , a las obtenidas a temperatura ambiente,  $d_p(25^\circ\text{C}) = 1,20 \pm 0,25 \mu\text{m}$  a un tiempo de 4 h. Un aumento en la temperatura favorece la solubilidad del dextrano y reduce la viscosidad, facilitando la interacción entre las cadenas del polímero, dando como resultado un menor tiempo para la formación del gel y, por consiguiente, de los precipitados [342]. Igualmente, parece favorecer la cinética de nucleación aumentando el número de eventos y reduciendo, por tanto, el tamaño de partícula final. Sin embargo, del mismo modo que al añadir sales o agitación durante el proceso de gelificación/precipitación, la velocidad de reorganización de las cadenas poliméricas se produce de manera más desordenada, en este caso el aumento de temperatura también conduce a precipitados algo más heterogéneos. Por esta razón, se mantuvieron las condiciones de temperatura ambiente en el resto del estudio.



**Figura 5.4.** - MPs de DXT (60% p/p) en estático a un tiempo de 4 h en forma de polvo seco a distintas temperaturas: (A) 4 °C; (B) 37 °C; (C) 60 °C. Gel formado en estático a un tiempo de 4h a distintas temperaturas: (D) 4 °C; (E) 37 °C; (F) 60 °C.

#### 5.2.4 Incorporación del antibiótico ciprofloxacino

Se utilizaron las siguientes condiciones: temperatura, 25 °C; concentración de dextrano, 60% p/p; agua Milli-Q como disolvente; tiempo de gelificación/precipitación, 24 h sin agitación.

Para incorporar el antibiótico ciprofloxacino en las micropartículas de dextrano se siguieron dos estrategias, en la primera se incorporó el antibiótico a la disolución polimérica, de manera que quedase atrapado en las micropartículas durante su proceso de formación. En la segunda se incorporó el antibiótico tras la síntesis y liofilización de las micropartículas.

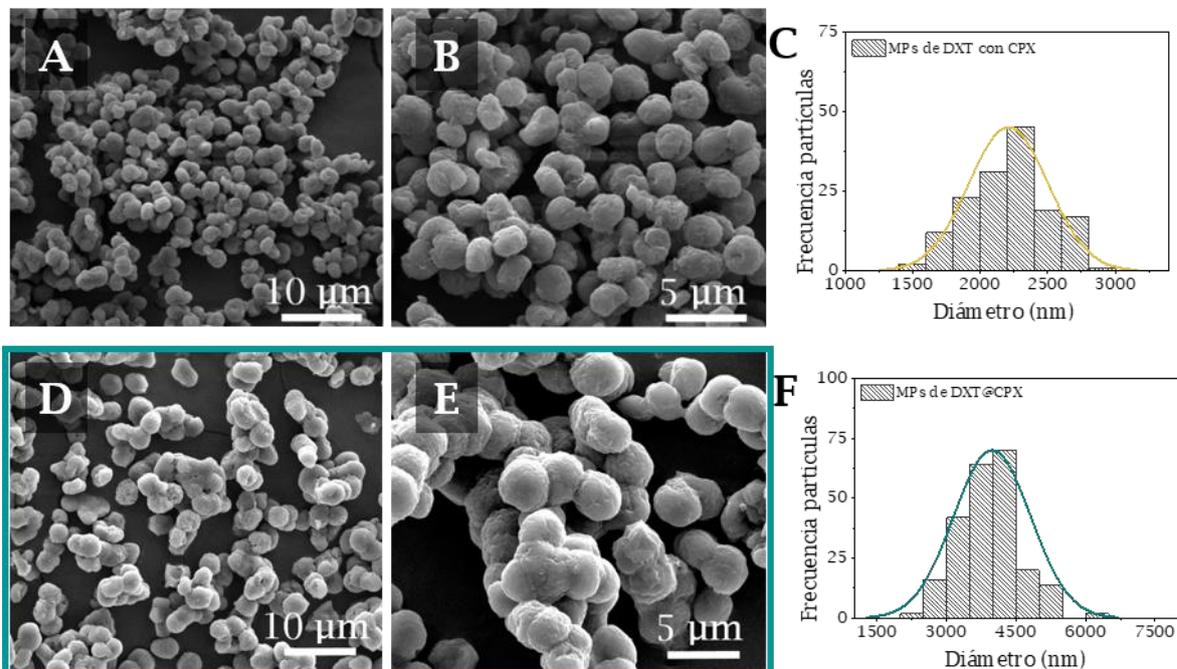
En la primera estrategia, la carga del ciprofloxacino se vio limitada por la solubilidad de este antibiótico en agua (35 mg/mL), lo que restringió la ratio antibiótico/polímero a un máximo de 0,02 mg ciprofloxacino/mg dextrano. Las micropartículas obtenidas se muestran en la *Figura 5.5* y, aunque presentaron un tamaño de partícula y morfología muy similar a las micropartículas de dextrano sin antibiótico, la carga de fármaco (CF) fue muy baja ( $CF = 0,9 \pm 0,3\%$ ). Dicha carga se calculó siguiendo el protocolo descrito en el [Anexo I, Punto I.3.2.](#)

En la segunda estrategia se produjo el anclaje electrostático del ciprofloxacino a la superficie de las micropartículas preformadas en forma de polvo seco. El ciprofloxacino tiene dos grupos funcionales, (-NH<sub>2</sub>) y (-COOH), y presenta dos constantes de disociación correspondientes, con pKa<sub>1</sub> = 6,18 (-COOH) y pKa<sub>2</sub> = 8,76 (-NH<sub>2</sub>) (Capítulo 1, Tabla 1.1), de forma que cada uno de estos grupos funcionales se encuentra ionizado a un pH específico, por lo que este antibiótico puede mostrar carga positiva, neutra o negativa dependiendo del pH del medio. El ciprofloxacino en medio ácido (pH < 6) muestra carga positiva debido a la protonación del grupo amino (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) y en medios básicos (pH > 8) muestra carga negativa por la presencia del grupo carboxílico ionizado (-COO<sup>-</sup>) [343]. Por esta razón, el ciprofloxacino se resuspendió en medio acuoso con pH = 4,4 (ajustado con HCl 0,1M), y se procedió a medir su potencial  $\xi$ . El valor de carga superficial mostró un valor de +12,6 mV. Al mismo tiempo, se midió el potencial  $\xi$  de las micropartículas de dextrano a ese mismo pH (4,4) obteniendo un valor de -16,7 mV, debido a los grupos hidroxilo (-OH) presentes en las moléculas de glucosa.

A la vista de estos resultados, el ciprofloxacino se disolvió en una disolución acuosa a pH = 4,4, añadiéndose con una ratio mg MPs/mg fármaco de 1:1. El ciprofloxacino se mantuvo en contacto con las micropartículas preformadas un tiempo de 16 h, con agitación (100 rpm) y a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, las micropartículas de dextrano se recuperaron mediante una doble centrifugación (6000 rpm, 10 min, 25 °C) que permitió eliminar el antibiótico remanente en la disolución. Dichas micropartículas de dextrano con ciprofloxacino (MPs de DXT@CPX) se secaron siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 2, Punto 2.1.3.2. y representado en el Esquema 2.4.

Las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino (Figura 5.5) presentaron un tamaño medio de partícula,  $d_p = 4,30 \pm 1,30 \mu\text{m}$ , algo mayor que el de las micropartículas sin fármaco ( $d_p = 3,70 \pm 0,60 \mu\text{m}$ ). Sin embargo, ambos tipos de micropartículas basadas en dextrano (con y sin ciprofloxacino) mostraron una morfología muy similar. En comparación con las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino encapsulado, estas

micropartículas mostraron un valor de carga de fármaco cinco veces superior, alcanzando un valor de  $CF = 4,9 \pm 1,0 \%$ . Por tanto, se seleccionó esta estrategia para la producción de micropartículas de dextrano con ciprofloxacino



**Figura 5.5.** - MPs de DXT (60% p/p) con ciprofloxacino encapsulado: (A - B) Imágenes de microscopía SEM; (C) Histograma de la distribución de tamaño de partícula, con un  $d_p = 2,21 \pm 0,30 \mu\text{m}$  ( $N = 150$ ). MPs de DXT (60% p/p) con ciprofloxacino anclado a la superficie: (D - E) Imágenes de microscopía SEM; (F) Histograma de la distribución de tamaño de partícula, con un  $d_p = 4,30 \pm 1,30 \mu\text{m}$  ( $N = 150$ ). En azul se encuentran señaladas las MPs seleccionadas.

## 5.3 Caracterización de las micropartículas basadas en dextrano

### 5.3.1 Caracterización físico-química

La presencia del antibiótico ciprofloxacino en las micropartículas se estudió mediante XPS, EDX y FTIR. La estructura cristalina de las micropartículas producidas se confirmó mediante XRD. La carga superficial de las partículas se obtuvo mediante la medida del potencial  $\xi$  a pH 4,4 (*Tabla 5.3*). Las técnicas, condiciones de caracterización y protocolos empleados en la

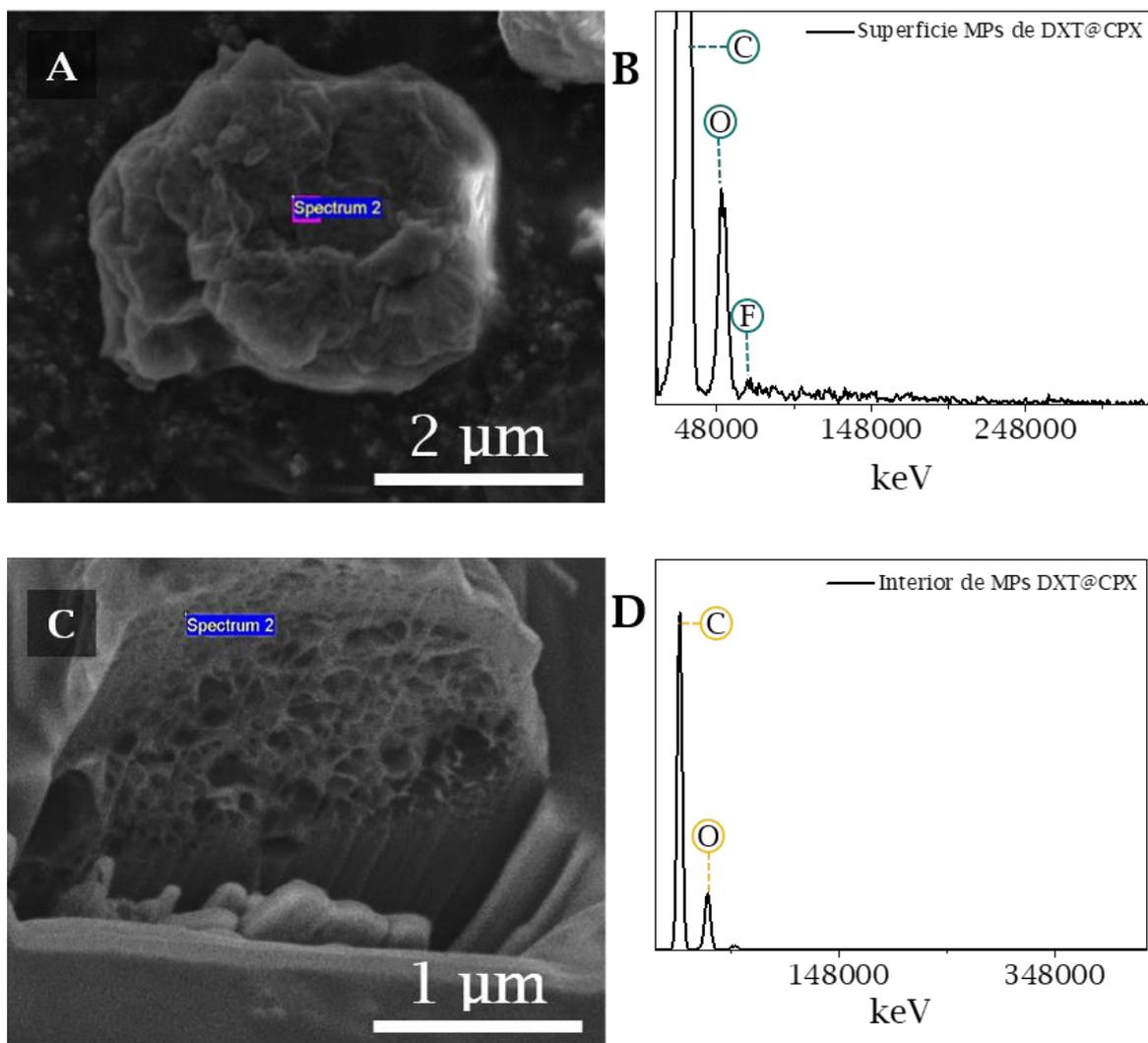
caracterización de las micropartículas basadas en el polímero dextrano se encuentran detalladas en el [Anexo I](#).

La técnica de XPS permitió comprobar la presencia de ciprofloxacino la superficie de las micropartículas de dextrano. En la *Tabla 5.1* se observa la presencia tanto de flúor (F) como de nitrógeno (N) únicamente en las micropartículas con ciprofloxacino, ambos elementos característicos de las fluoroquinolonas ([Capítulo 1](#), *Tabla 1.1*). Del mismo modo, cómo era de esperar, ambas micropartículas (con y sin fármaco) presentaron porcentajes elevados de carbono (C) y oxígeno (O) presentes tanto en las cadenas de polímero como en el antibiótico.

**Tabla 5.1** - Resultados del análisis XPS de las micropartículas basadas en dextrano.

Muestras	Elementos			
	O 1s	C 1s	N 1s	F 1s
<b>Micropartículas de dextrano</b>	40,3 %	59,7 %	-	-
<b>Micropartículas de dextrano con ciprofloxacino</b>	34,9 %	62,7 %	1,7 %	0,7 %

Además, la presencia de fármaco en las micropartículas se comprobó empleando el microscopio SEM Nova NanoLab 200 mediante análisis EDX de la composición química de las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino en la superficie y en el interior. Las micropartículas se seccionaron de manera transversal con un haz de iones y electrones acoplado a este microscopio para analizar su estructura interna. Se observó que las micropartículas poseían una estructura interna porosa (*Figura 5.6*). El análisis elemental revela ausencia de flúor (F) en el interior de las micropartículas, elemento característico del ciprofloxacino, mientras que en la superficie de las micropartículas si se detectó flúor (F). Cabe destacar que el flúor está presente en un porcentaje muy bajo (0,4%), correspondiendo al ciprofloxacino incorporado (*Figura 5.6* y *Tabla 5.1*) lo que coincide con la carga de fármaco ( $CF = 4,9 \pm 1,0\%$ ).



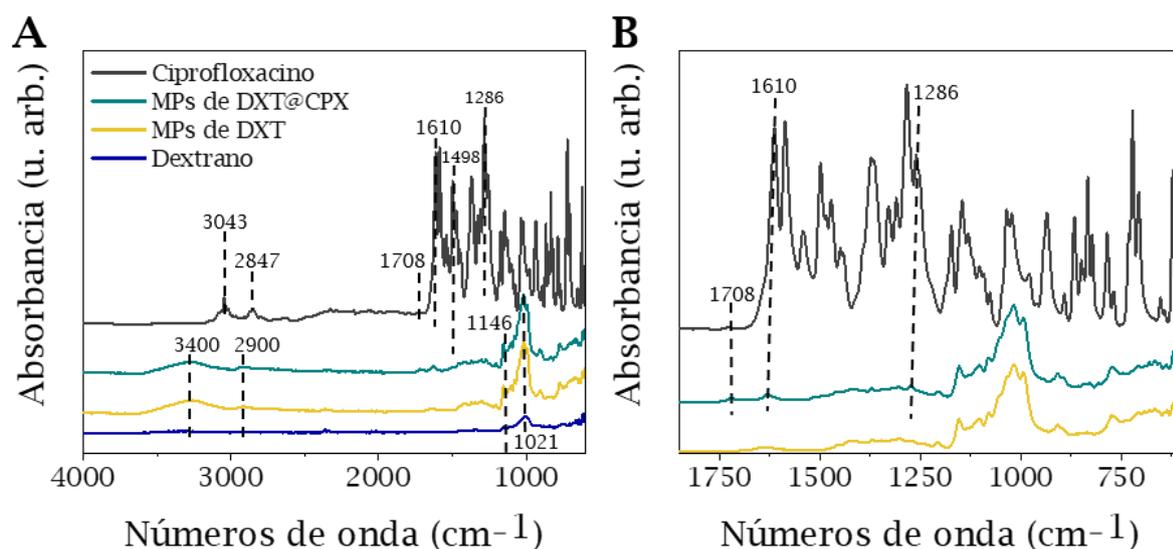
**Figura 5.6.** - Espectro EDX de MPs de DXT@CPX: (A - B) Superficie; (C - D) Interior.

**Tabla 5.2** - Análisis químico mediante EDX de las MPs de DXT@CPX en superficie e interior.

	MPs de DXT@CPX superficie	MPs de DXT@CPX interior
Elemento	% atómico	
C K	88,6	90,1
O K	10,4	9,9
N K	0,6	-
F K	0,4	-
Total	100,0	100,0

La presencia de fármaco en las micropartículas de dextrano se confirmó también mediante el empleo la técnica FTIR. Para ello, se obtuvieron los

espectros del dextrano y del ciprofloxacino puros y de las micropartículas basadas en dextrano con y sin antibiótico (*Figura 5.7*).



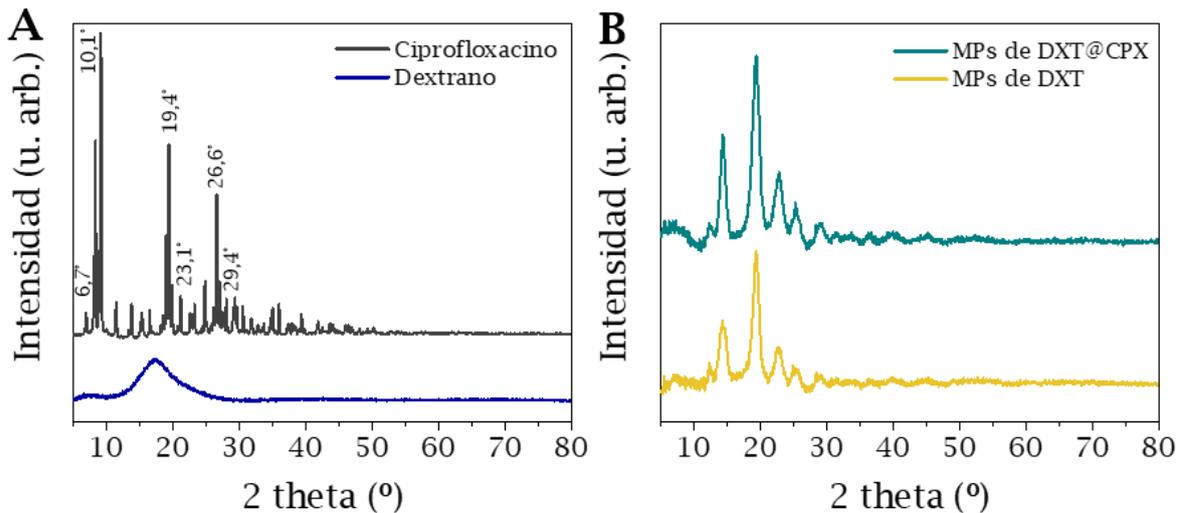
**Figura 5.7.** - Espectros FTIR de dextrano puro, MPs de DXT y MPs de DXT@CPX: **(A)** Espectro FTIR entre 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ ; **(B)** Región ampliada en el rango de 1800 a 600  $\text{cm}^{-1}$ .

En los espectros de las micropartículas basadas en dextrano aparece un pico a 3400  $\text{cm}^{-1}$  atribuido a las vibraciones de los grupos (-OH) característicos de los polisacáridos que forman el dextrano. Además, se distingue otro pico en 2900  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a los grupos C-H. Y otros dos picos más a 1146  $\text{cm}^{-1}$  y 1021  $\text{cm}^{-1}$ , los cuales se atribuyen a las vibraciones de los enlaces C-O y C-C respectivamente [344]. La presencia de los picos a 3400 y 2900  $\text{cm}^{-1}$  en el espectro las micropartículas en comparación con el dextrano puro es indicativo de una estructura cristalina [247].

De manera análoga, se obtuvo el espectro del ciprofloxacino puro. Se observaron dos picos a 1610  $\text{cm}^{-1}$  y 1286  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al grupo fenilo conjugado con (-COOH) y al enlace correspondiente a C-F respectivamente. El pico correspondiente a 1498  $\text{cm}^{-1}$  indicó la presencia de enlaces C=C y el pico en 1708  $\text{cm}^{-1}$  la vibración de los enlaces C=O. Igualmente, también se apreciaron dos picos a 3043 y 2847  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los enlaces C-H procedentes del anillo de fenilo [345,346]. Pese a la baja carga de fármaco en las micropartículas de dextrano, se pudieron observar los picos principales del

ciprofloxacino ( $1610\text{ cm}^{-1}$  y  $1286\text{ cm}^{-1}$ ), lo que confirmó la presencia del antibiótico en las micropartículas desarrolladas.

La técnica de XRD proporciona información sobre la estructura cristalina de un material. *Figura 5.8* se encuentran representados los patrones de XRD obtenidos de las distintas muestras.



**Figura 5.8.** - Difractogramas XRD en estado sólido de: **(A)** Dextrano y ciprofloxacino puros en polvo; **(B)** MPs de DXT y MPs DXT@CPX.

El dextrano puro mostró una estructura amorfa mientras que los resultados obtenidos para las micropartículas basadas en este polímero revelaron que el proceso de gelificación/precipitación daba lugar a micropartículas con estructura cristalina. Por otro lado, el patrón de XRD del ciprofloxacino puro mostró picos estrechos y definidos, revelando su alto grado de cristalinidad, con seis picos principales en diferentes ángulos de difracción:  $6,7^\circ$ ;  $10,1^\circ$ ;  $19,4^\circ$ ;  $23,1^\circ$ ;  $26,6^\circ$  y  $29,4^\circ$ . Su pico más característico se encuentra en  $19,4^\circ$  [347,348]. En el caso de las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino, se observaron los mismos picos que en las micropartículas sin fármaco, confirmando la permanencia de la estructura cristalina del material. Sin embargo, no se pudieron identificar los picos asociados a la presencia de ciprofloxacino en ellas, probablemente por la baja cantidad relativa de fármaco en dichas micropartículas.

Ambas micropartículas basadas en dextrano mostraron un potencial  $\xi$  negativo a diferencia del ciprofloxacino puro, con valor de potencial  $\xi$  positivo. Las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino mostraron un valor de potencial  $\xi$  menos negativo, lo que confirma la presencia de ciprofloxacino en las partículas (*Tabla 5.3*).

**Tabla 5.3** – Caracterización del ciprofloxacino y de las micropartículas basadas en dextrano con y sin ciprofloxacino.

Muestras	SEM				Span	Potencial $\xi$ (mV)*
	$d_p$ (media $\pm$ DE) ( $\mu\text{m}$ )	D10 ( $\mu\text{m}$ )	D50 ( $\mu\text{m}$ )	D90 ( $\mu\text{m}$ )		
<b>Ciprofloxacino</b>	10,40 $\pm$ 6,30	4,85	8,32	17,36	1,50	+12,5
<b>MPs de DXT</b>	3,40 $\pm$ 0,60	3,0 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 0,6	4,4 $\pm$ 0,7	0,35	-16,7
<b>MPs de DXT@CPX</b>	4,30 $\pm$ 1,30	3,3 $\pm$ 1,0	4,1 $\pm$ 1,3	5,1 $\pm$ 1,6	0,41	-5,3

\*Potencial  $\xi$  medido a un pH = 4,4

### 5.3.2 Estudio de la cinética de liberación del antibiótico ciprofloxacino

Los experimentos de liberación de ciprofloxacino se hicieron en medio PBS a 37 °C con agitación (250 rpm). La cuantificación de la cinética de liberación del antibiótico desde las micropartículas de dextrano se realizó mediante UV-Vis (*Anexo I, Sección I.3*).

La presencia de ciprofloxacino anclado electrostáticamente a la superficie de las micropartículas de dextrano o alrededor de ellas descartó el empleo de modelos tradicionales como Peppas - Shalin [320] o Higuchi [349], en los cuales se produce una liberación y difusión del fármaco por procesos de erosión de las partículas. A fin de reflejar de forma más fiel el proceso de liberación del fármaco, se consideró más adecuado el uso de un modelo en el que se produce la transferencia de materia de ciprofloxacino, desde la superficie de las partículas hasta el medio de disolución (PBS). El proceso de anclaje electrostático se produjo a un pH = 4,4, de modo que al entrar en

contacto con el PBS (pH próximo a 7,4), se esperaba un debilitamiento de las interacciones producidas entre el dextrano y el fármaco, favoreciéndose una rápida liberación del ciprofloxacino.

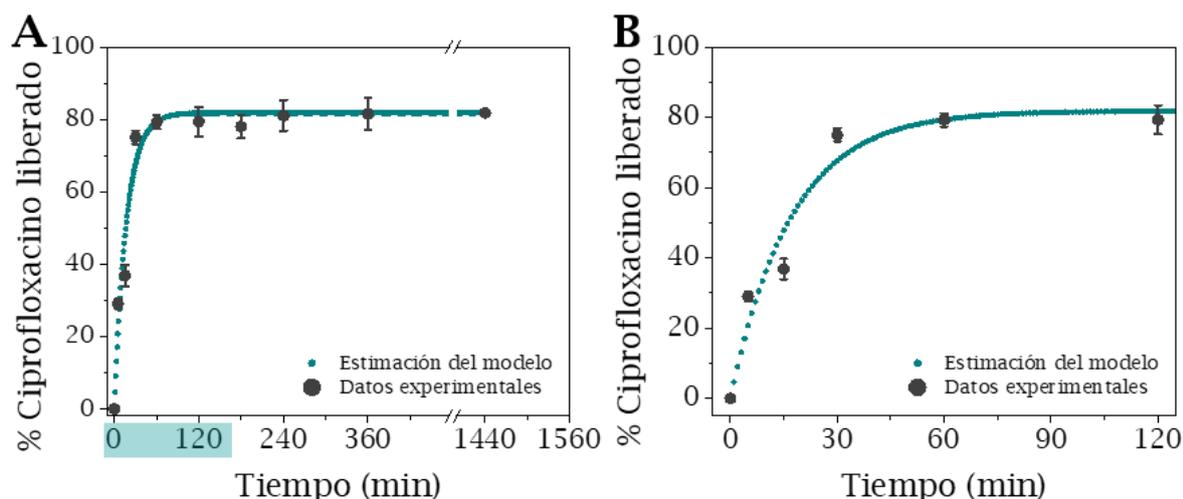
Los datos experimentales se analizaron con el programa gPROMS por el Dr. Álvaro González-Garcinuño empleando la ecuación 5.1. Los parámetros del modelo se estimaron según lo explicado en el Anexo II, Sección II.2, ajustando los datos de concentración del fármaco (ciprofloxacino) en función del tiempo:

$$\frac{dC}{dt} = k \times (C_{\infty} - C) \quad \text{Ec. (5.1)}$$

donde  $k$  es la constante de velocidad de liberación del fármaco,  $C$  representa la concentración del fármaco y  $C_{\infty}$  es la concentración máxima liberada.

El parámetro  $k$  mostró un valor de  $0,058 \text{ min}^{-1}$ , el cual se encuentra dentro del rango de resultados publicados en otros estudios de liberación. García - González *et al.*, [350] realizaron un estudio en el que desarrollaron microesferas a base de polisacáridos junto con los fármacos ketoprofeno y ácido benzoico. Los estudios de liberación *in vitro* realizados mostraron unas constantes de velocidad de liberación de  $0,025 \text{ min}^{-1}$ , situándose dentro del rango del valor obtenido para el antibiótico ciprofloxacino.

En los estudios de liberación de ciprofloxacino desde las micropartículas de dextrano, se puede observar que en los primeros 30 minutos se liberó un  $75,0 \pm 2,9\%$  de fármaco y posteriormente la liberación prosiguió lentamente alcanzándose una concentración máxima de  $81,8 \pm 4,5\%$  de ciprofloxacino en el medio a un tiempo de 24 h (Figura 5.9). La incompleta liberación del fármaco podría deberse a interacciones químicas entre el fármaco y el polímero que retengan una fracción del mismo en los sitios de mayor afinidad.



**Figura. 5.9.** – Liberación acumulada de ciprofloxacino (%) en función del tiempo (min) en PBS a 37 °C para las MPs de DXT@CPX: **(A)** Tiempo hasta 24 h; **(B)** Región ampliada hasta 2 h (media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ).

Este tipo de liberación tan rápida del fármaco ha sido previamente descrita por otros investigadores. Mang *al et al.*, [217] emplearon el estearato de magnesio y la L-leucina como portadores del antibiótico ciprofloxacino. Los estudios de disolución *in vitro* mostraron una disolución del 80% del fármaco dentro de los primeros 5 minutos, independientemente del portador utilizado. De manera análoga, Karimi *et al.*, [43] desarrollaron micropartículas de ciprofloxacino por *spray-drying* con PVA y L-leucina como excipientes. El ciprofloxacino fue liberado de manera completa desde las micropartículas en un tiempo de 3 minutos.

La rápida liberación observada concuerda con la estructura de las micropartículas por microscopía SEM. Las micropartículas de polímero actúan como soporte del ciprofloxacino que se encuentra en su superficie o alrededor de ellas. Este tipo de formulaciones representa el modelo clásico de formulación para inhaladores de polvo seco. Es decir, formulaciones en las que se usa un portador como la lactosa [351], estearato de magnesio [352] o L-leucina [353] para mejorar las propiedades de aerodinámicas del polvo y la dispersión del fármaco en el momento de la inhalación [354]. Un escenario de liberación rápido es adecuado para un suministro inhalatorio, y en cambio, no lo sería para una administración oral o parenteral, donde se produciría la liberación de la mayor parte del fármaco antes de alcanzar el órgano diana.

## 5.4 Ensayos *in vitro* en células pulmonares

Los ensayos *in vitro* con las micropartículas basadas en dextrano se llevaron a cabo siguiendo los protocolos que se encuentran detallados en el Capítulo 2.

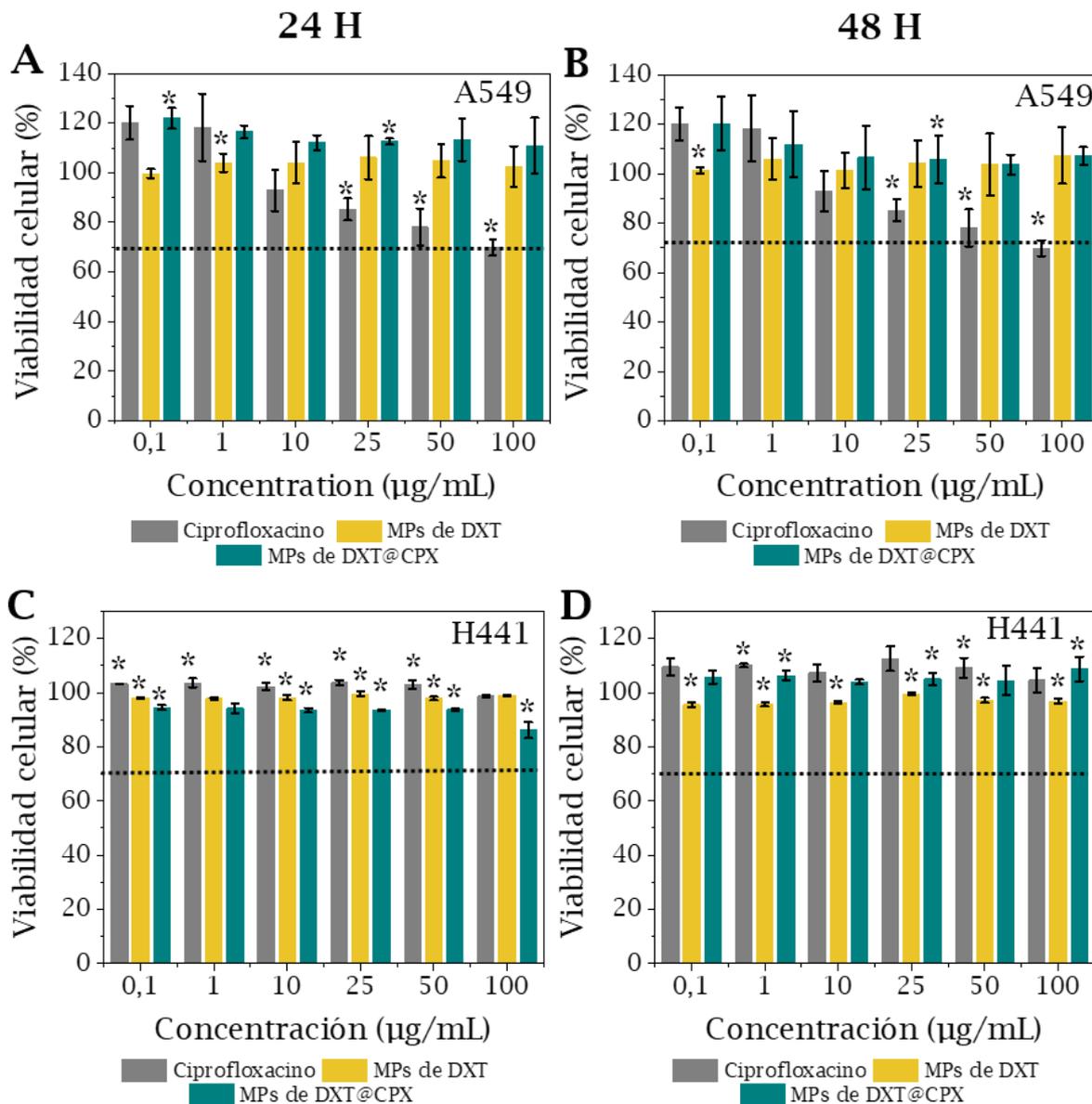
### 5.4.1 Ensayos de citotoxicidad celular

El ensayo de citotoxicidad celular Alamar Blue (Capítulo 2, Punto 2.3.3) se realizó con concentraciones en el rango de 0,1 µg/mL hasta 100 µg/mL, siendo la concentración máxima de ciprofloxacino probada 50 veces superior al valor de MBC en *P. aeruginosa* (2 µg/mL) [252] y 100 veces superior al valor de MIC en *S. aureus* (1 µg/mL) [251].

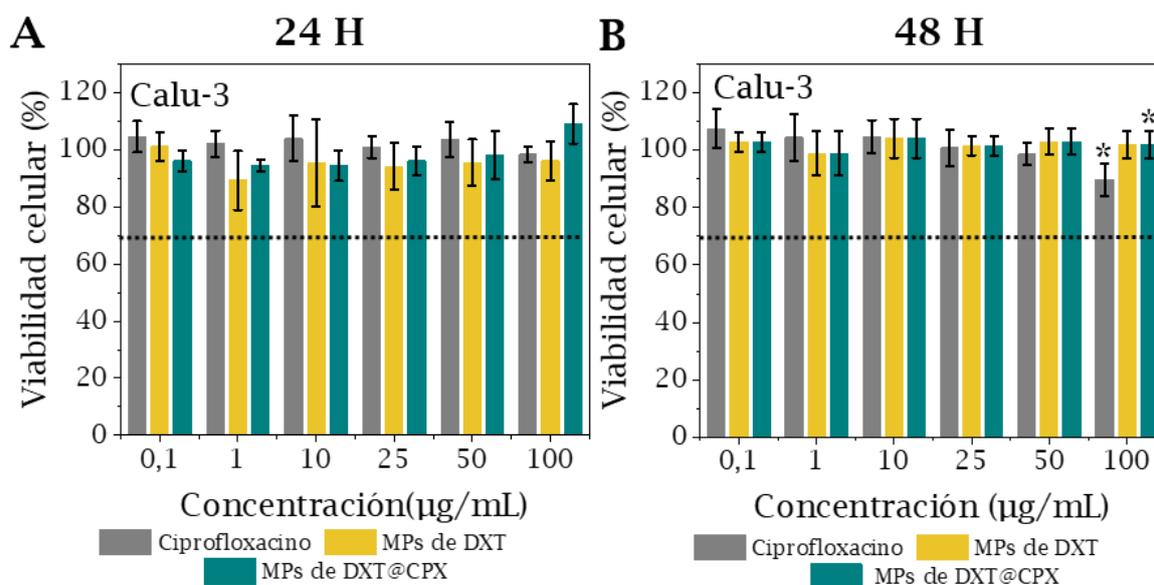
Se observó que a los tiempos de estudio utilizados (24 y 48 h) el ciprofloxacino puro mostraba citotoxicidad a la concentración más alta probada (100 µg/mL) en la línea celular A549 tanto a 24 como a 48 h. Por el contrario, las micropartículas de dextrano no mostraron citotoxicidad en ninguna de las tres líneas celulares independientemente de la cantidad de ciprofloxacino. Por tanto, se fijó la concentración máxima tolerada para el ciprofloxacino en 50 µg/mL para la línea celular A549 y 100 µg/mL para las líneas celulares NCI-H441 y Calu-3. En el caso de las micropartículas basadas en dextrano, la concentración máxima compatible fue  $\leq 100$  µg/mL (Figuras 5.10 y 5.11). Los resultados se explican por la alta biocompatibilidad del dextrano, lo que dio lugar a valores de biocompatibilidad alejados del valor considerado como citotóxico para la línea celular A549.

El efecto citotóxico del ciprofloxacino sobre la línea celular A549 se observó igualmente en el Capítulo 4 (Punto 4.4.1). Esta toxicidad se debe a la inhibición de la Topoisomerasa II, lo que provoca una inhibición de la proliferación celular y una acumulación de las células en la fase G2/M del ciclo celular [323]. Por el contrario, aunque la concentración de ciprofloxacino en las micropartículas fue equivalente al ciprofloxacino puro, estas no resultaron tóxicas. Una posible razón es que tal y como se ha visto en estudios previos

[333,355], el dextrano es capaz de inhibir la adhesión de *P. aeruginosa* a células epiteliales de pulmón (A549), recubriendo de manera no específica las células eucariotas y actuando como una barrera protectora. En base a esta hipótesis, se podría entender que el ciprofloxacino no genere toxicidad cuando es administrado de manera conjunta con el dextrano en la línea celular A549



**Figura 5.10.** - Viabilidad celular tras exposición a CPX y MPs de DXT con y sin CPX a tiempos de 24 y 48 h: (A - B) Línea celular A549; (C - D) Línea celular NCI-H441. Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) entre las muestras en relación al CPX puro. La línea negra discontinua indica el 70% de viabilidad celular de acuerdo con la norma ISO 10993-5.



**Figura 5.11.** – Viabilidad celular tras exposición a CPXy MPs de DXT con y sin CPX a tiempos de 24 y 48 h: (A – B) Línea celular Calu-3. Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) entre las muestras en relación al CPX puro. La línea negra discontinua indica el 70% de viabilidad celular de acuerdo con la norma ISO 10993-5.

Se puede concluir que las micropartículas de dextrano con y sin ciprofloxacino pueden ser consideradas biocompatibles para su administración por vía pulmonar a concentraciones  $\leq 100 \mu\text{g/mL}$  en las tres líneas celulares estudiadas.

#### 5.4.2 Estudios de captación celular e interfase aire-líquido (ALI)

La glicoproteína P (Gp-p) es conocida como una proteína de resistencia a múltiples fármacos (MDR), se encuentra en la membrana celular y actúa como transportador de flujo eliminando toxinas y agentes xenobióticos, como los fármacos [356]. Los niveles de expresión de Gp-p en los pulmones son por lo general bajos, lo que correlaciona con una menor actividad de este transportador en las células respiratorias [357].

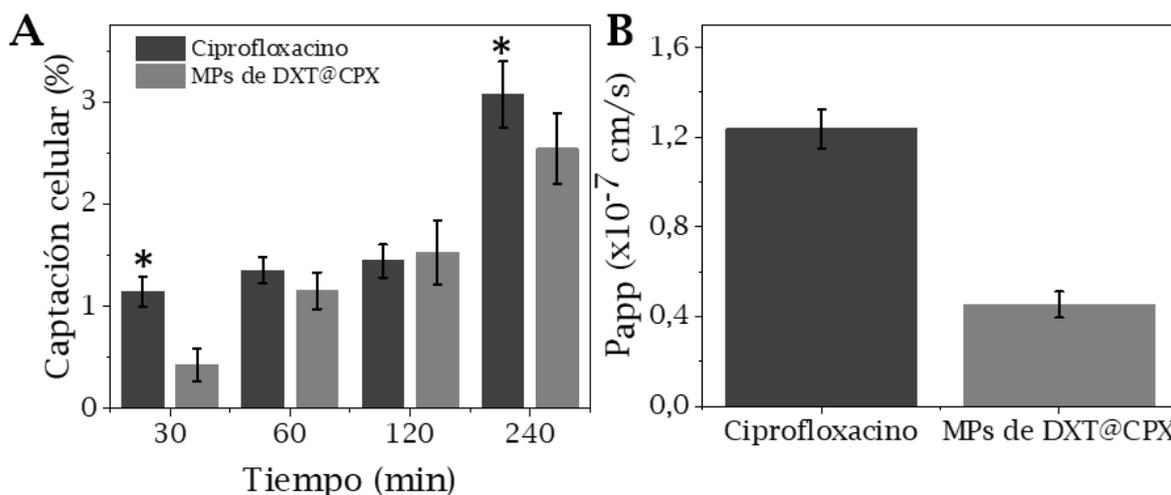
La inhibición de Gp-p resulta una estrategia eficaz para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos que actúan como sustratos de esta proteína, favoreciendo su entrada a la célula [356]. El ciprofloxacino es uno de los

antibióticos que actúa como sustrato de la Gp-p, mientras que el antibiótico azitromicina (Capítulo 7) actúa como inhibidor [358].

En este contexto, se estudió la capacidad tanto del ciprofloxacino puro como de las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino de ser internalizadas por las células NCI-H441. Se realizó un seguimiento de la concentración de ciprofloxacino en el interior celular durante un tiempo máximo de estudio de 2 h. Además, también se evaluó la capacidad de este antibiótico de atravesar una monocapa celular en un cultivo ALI. La concentración de ciprofloxacino ensayada fue de 50 µg/mL, concentración 100 veces superior al valor de MIC (Punto 5.5.2). La medida del transporte del ciprofloxacino se realizó en dirección Apical → Basolateral (A→B). Las muestras con el antibiótico se añadieron en el compartimento apical y las alícuotas procedieron del compartimento basolateral (Capítulo 2, Punto 2.2.4).

En la *Figura 5.12A* se observa como la cantidad de ciprofloxacino detectada en el interior celular al final del estudio (240 minutos), aunque aumentó con el tiempo se mantuvo en valores bajos con un valor final aproximado del 3%. Este resultado confirmó la dificultad del ciprofloxacino de acceder en el interior celular.

Por otro lado, el coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) determinado en sentido A→B mostró un valor  $P_{app} > 1$  para el ciprofloxacino puro (*Figura 5.12B*). Este valor coincide con lo obtenido por Cavet *et al.*, [359] en el estudio desarrollado en células Caco-2 (procedentes de colón) en el que indicaron que los resultados obtenidos podían deberse a la existencia de un transporte activo o una fuerza impulsora desde la membrana apical a la basolateral diferente de un gradiente de concentración. Igualmente, en el estudio realizado por Park *et al.*, [360] sugirieron que, el ciprofloxacino además de ser un sustrato de la Gp-p también era un sustrato de un transportador de absorción que bombeaba en dirección opuesta a Gp-p, haciendo que la concentración de ciprofloxacino aumentase en el compartimento basolateral.



**Figura 5.12.** – Ensayos *in vitro* con la línea celular NCI-H441; **(A)** Ensayo de captación celular del CPX puro y anclado a las MPs de DXT; **(B)** Representación del coeficiente de permeabilidad aparente obtenido de un ensayo ALI.

En todo caso, los valores obtenidos con las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino en ambos estudios fueron inferiores al ciprofloxacino puro. Como se ha mostrado en la *Tabla 5.3*, las micropartículas presentaron una carga superficial negativa ( $-5,3$  mV). La presencia de cargas negativas en las micropartículas va a reducir su interacción con las membranas celulares, también con carga negativa, lo que limita el paso de moléculas con cargas similares [162,361]. Se concluye por tanto que el uso de micropartículas de dextrano como vectores limita aún más la captación de ciprofloxacino por parte de las células y su paso a través de la membrana celular. Por tanto, debido a la escasa capacidad de introducirse en el interior celular, puede ser usadas como tratamiento frente a patógenos extracelulares como *P. aeruginosa* al mismo tiempo que reduce la toxicidad en células pulmonares.

## 5.5 Actividad antimicrobiana, biofilms y bacterias planctónicas

### 5.5.1 Biofilms

Aunque la mayoría de las infecciones agudas producidas por bacterias tienen una buena respuesta al tratamiento con antibióticos, las enfermedades pulmonares crónicas como la fibrosis quística o la EPOC desarrollan de manera

frecuente infecciones a nivel pulmonar, en las cuales la aparición de biofilms bacterianos ocasiona una mayor resistencia al tratamiento [362].

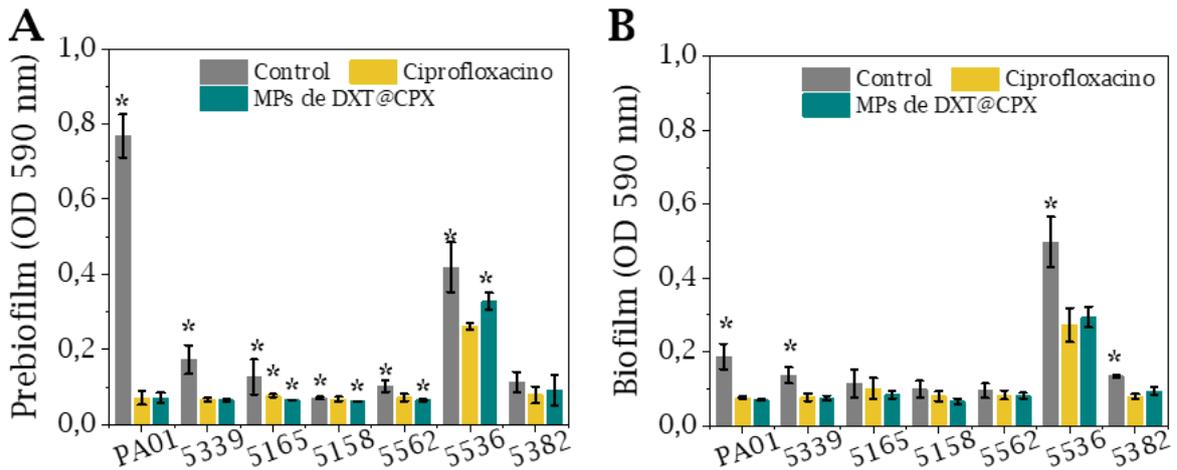
El ciprofloxacino es uno de los antibióticos más usados en el tratamiento frente a *P. aeruginosa*, se administra principalmente por vía oral solo o en combinación con otros antibióticos inhalados como tobramicina o colistina, facilitando una rápida erradicación de esta bacteria cuando hay infecciones en los pulmones [363]. Los biofilms generados por *P. aeruginosa* muestran una mayor susceptibilidad al ciprofloxacino comparado con la tobramicina o colistina [364]. Esto se debe a que la proliferación del biofilm produce una disminución del pH pulmonar, favoreciendo que el ciprofloxacino se encuentre en su forma protonada y por lo tanto mejore su interacción electrostática con la matriz de alginato presente en el biofilm [365].

Respecto al polímero dextrano, tal y como se ha señalado anteriormente, el estudio realizado por Barghouthi, *et al.*, [333] demostró la capacidad del dextrano de inhibir la adhesión de *P. aeruginosa* a células epiteliales de pulmón. Esta inhibición se producía de manera inespecífica, es decir, no interacciona con un ligando o receptor concreto. Este efecto también se ha observado en otros oligosacáridos inhibiendo la adhesión de otros patógenos causantes de infecciones pulmonares como son *S. pneumoniae* y *B. cenocepacia* [366].

Se empleó la bacteria *P. aeruginosa* para comprobar la eficacia de este antibiótico en biofilms desarrollados *in vitro* (Capítulo 2, Tabla 2.6). La concentración de ciprofloxacino empleada (0,5 µg/mL) en ambas muestras (fármaco libre y en las micropartículas de dextrano) para evaluar la susceptibilidad de las cepas bacterianas se obtuvo de EUCAST (EUCAST; *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) [367].

En la Figuras 5.13A y 5.13B se puede observar como la densidad óptica (OD<sub>590</sub>) de las distintas cepas bacterianas disminuyó al ser tratadas con ambos tipos de muestras. El efecto obtenido contra ambos tipos de biofilm fue muy similar. Los biofilms control presentaron una capa mucosa en su superficie que disminuyó al ser tratada con el antibiótico en la mayoría de las cepas, a

excepción de 5536. Dicha cepa mostró una menor reducción de la densidad bacteriana y, por tanto, una mayor resistencia al tratamiento. Esto es debido a que las *Pseudomonas* empleadas tuvieron un origen clínico y, por tanto, diferentes comportamientos tanto a la hora de desarrollar un biofilm, que también se manifiesta en la susceptibilidad mostrada al antibiótico empleado como tratamiento.



**Figura 5.13.** – Comparación de los valores de densidad óptica (OD590) obtenidos a partir de biofilms formados *P. aeruginosa* en dos condiciones de cultivo diferentes. Cultivos tratados con CPX puro y MPs de DXT@CPX: **(A)** Absorbancia correspondiente a la densidad óptica del pre-biofilm; **(B)** Absorbancia correspondiente a la densidad óptica del biofilm. Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) entre las muestras en relación al control.

### 5.5.2 Bacterias planctónicas

*S. aureus* (Gram-positiva), es uno de las primeras bacterias en colonizar los pulmones de los pacientes con fibrosis quística. Es la bacteria más prevalente en los pacientes jóvenes, está asociada a una disminución de la función pulmonar y un aumento en la respuesta inflamatoria [329]. Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, *P. aeruginosa* (Gram-negativa), es la responsable de las infecciones crónicas en el 60-75% de los pacientes adultos con FQ [368]. En el caso de los pacientes con EPOC, los microorganismos más frecuentes son *H. influenza*, *S. pneumonia* y *M. catarrhalis* pero, las bacterias presentes en las vías respiratorias varían dependiendo de la gravedad de la

enfermedad ya que las bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa* se detecta con mayor frecuencia en pacientes con un grado de enfermedad más severo. Por otro lado, *S. aureus* aunque menos frecuente, también es detectada en cultivos bacterianos procedentes de las vías respiratorias de estos pacientes [369].

Como se ha comentado en el [Capítulo 1](#) y [4](#), el ciprofloxacino es un antibiótico de amplio espectro. Con el fin de obtener los valores MIC y MBC de las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino, y poder realizar una comparación con el fármaco puro, se seleccionaron como modelo de bacterias planctónicas *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

En primer lugar, se llevó a cabo un seguimiento del crecimiento de estos modelos bacterianos midiendo el valor de densidad óptica (OD600) de las diferentes suspensiones bacterianas tras ser tratadas con concentraciones equivalentes de ciprofloxacino como fármaco puro y en micropartículas de dextrano. Las curvas de crecimiento para ambos modelos bacterianos expuestas a las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino se encuentran representadas en la [Figura 5.14A](#) y [5.14B](#). Las curvas de crecimiento de ambas bacterias en tratamiento con el ciprofloxacino puro se han mostrado en el [Capítulo 4](#) ([Figuras 4.12](#) y [4.13](#)).

*S. aureus* presentó un retraso en el crecimiento bacteriano a partir de la concentración de 0,375 µg/mL y se atenuó aún más a una concentración de 0,500 µg/mL, ya que hasta las 16 h no se observó un comienzo del crecimiento bacteriano, indicando que éste se encontraba inhibido. Además, a concentraciones  $\geq 0,500$  µg/mL no se pudo distinguir entre la fase exponencial y la fase estacionaria del ciclo de crecimiento bacteriano. Por otro lado, en *P. aeruginosa* a una concentración de 0,250 µg/mL se pudo observar que, aunque la fase logarítmica no se retrasó y siguió la misma tendencia que la bacteria control, el crecimiento bacteriano alcanzó un valor de densidad óptica de  $\sim 42\%$  del valor obtenido por el grupo control. Es decir, el ciprofloxacino presente en las micropartículas disminuyó la densidad bacteriana a menos de

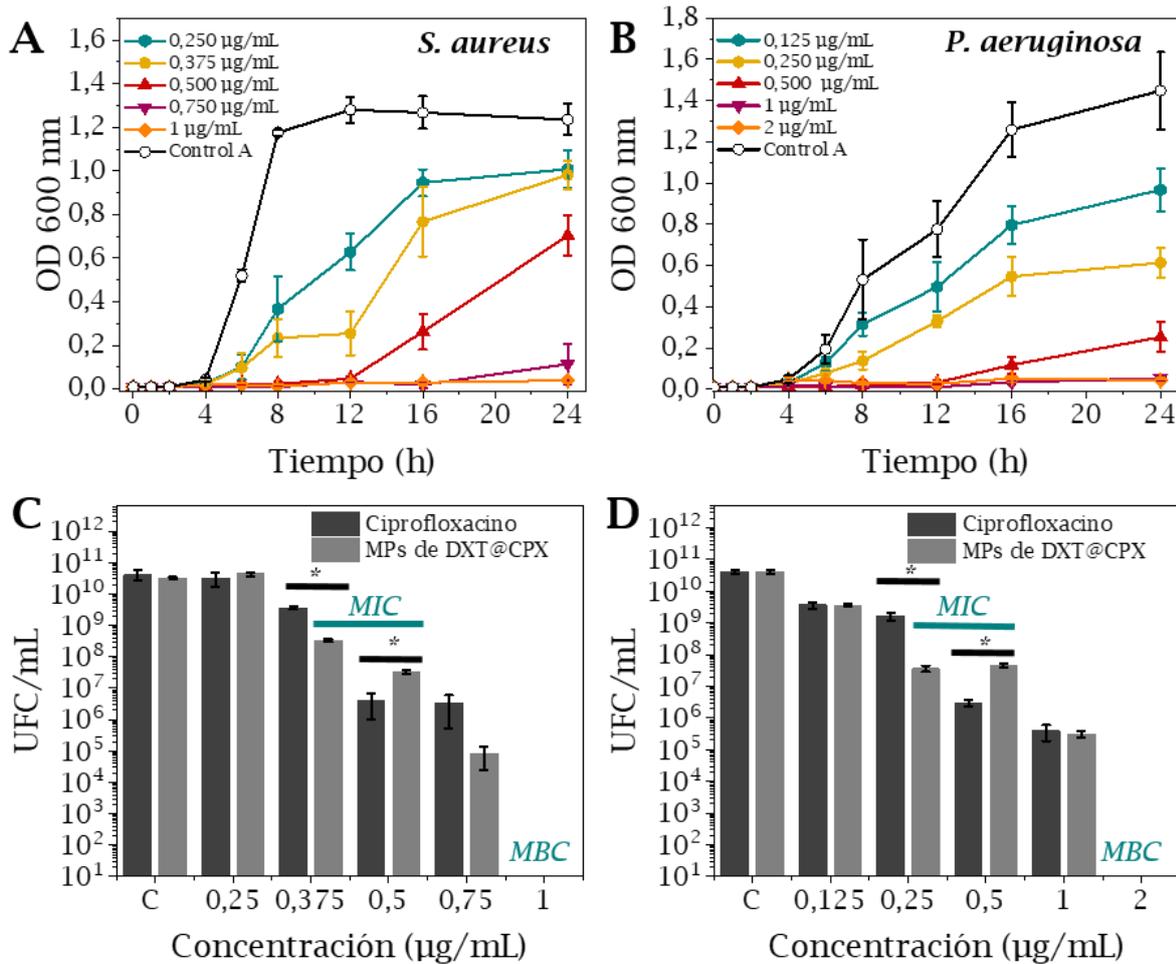
la mitad. A concentraciones  $\geq 0,500 \mu\text{g/mL}$  no hubo crecimiento de la densidad bacteriana.

A la vista de los resultados obtenidos con los ensayos de densidad óptica, las concentraciones que mostraron una disminución en el crecimiento bacteriano se estudiaron con el método de diluciones seriadas en agar y se confirmaron los valores de MIC y de MBC tanto para el antibiótico puro como para las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino. En la *Figura 5.14* se puede observar que los valores de MIC y de MBC obtenidos fueron los mismos para ambas muestras, siendo  $1 \mu\text{g/mL}$  y  $2 \mu\text{g/mL}$  las concentraciones que inhibieron el crecimiento bacteriano en *S. aureus* y *P. aeruginosa* respectivamente.

Por último, las bacterias tratadas se estudiaron con detalle por microscopía SEM. Las imágenes revelaron una acumulación de las bacterias en la superficie de las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino. Este antibiótico posee carga positiva en ambientes ligeramente ácidos, y un ambiente con infección bacteriana posee precisamente un pH acidificado. Es importante puntualizar que el ciprofloxacino presente en la superficie o alrededor de las micropartículas va a permitir la presencia de áreas con carga positiva, y por tanto favorecer su adhesión a la membrana celular bacteriana, con carga negativa, produciendo la muerte bacteriana.

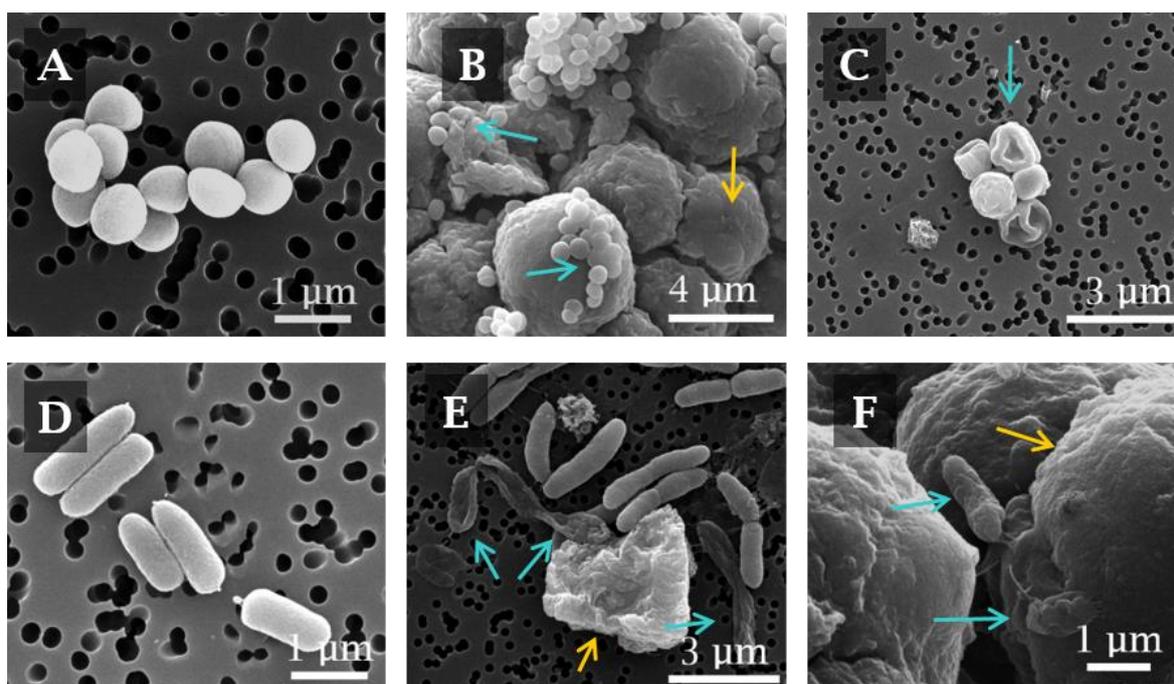
Como se ha comentado en el [Capítulo 4, Punto 4.4.2](#) en el caso de *S. aureus* el mecanismo de acción consiste en la inhibición de la enzima Topoisomerasa IV, mientras que en el caso de *P. aeruginosa* el ciprofloxacino es capaz de atravesar la membrana bacteriana e inhibir las enzimas ADN girasa y Topoisomerasa IV [327,330].

De forma análoga a los resultados mostrados con el ciprofloxacino puro en el [Capítulo 4](#) (*Figura 4.15* y *4.16*), las micropartículas con ciprofloxacino produjeron efectos en la morfología bacteriana, mostrando cambios en su membrana externa en comparación con el grupo control, tales como hendiduras y arrugas (*Figura 5.15*).



**Figura 5.14.** – Actividad antimicrobiana de las MPs de DXT@CPX. Seguimiento del crecimiento bacteriano por densidad óptica (OD600): **(A)** *S. aureus*; **(B)** *P. aeruginosa*. Determinación del valor de la MIC y la MBC por UFC/mL frente a ciprofloxacino puro: **(C)** *S. aureus*; **(D)** *P. aeruginosa*. Los resultados se muestran como media ± DE ( $n = 3$ ). Diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) entre las muestras en relación al CPX puro.

Estos resultados indicaron que *S. aureus* y *P. aeruginosa* fueron igual de susceptibles al ciprofloxacino tanto puro como presente en las micropartículas, es decir, que la actividad antimicrobiana no se vio afectada por la presencia del polímero.



**Figura 5.15.** – Imágenes de microscopía SEM de *S. aureus*: (A) Control; (B – C) Bacterias tratadas con las MPs de DXT@CPX. Imágenes de microscopía SEM de *P. aeruginosa*: (D) Control; (E – F) Bacterias tratadas con las MPs de DXT@CPX. Las flechas amarillas señalan MPs y las flechas azules indican cambios producidos en la morfología bacteriana.

## 5.6 Propiedades aerodinámicas y generación de aerosoles

La eficacia clínica de los fármacos inhalados viene fuertemente influenciada por la región pulmonar en la que el fármaco es depositado. [370]. A continuación, se muestran diferentes estudios con las micropartículas de dextrano de cara a su suministro por vía inhalatoria. Por un lado, se investigó la generación del aerosol con dos dispositivos diferentes. Por otro, se analizó la influencia que tiene el perfil de respiración de los pacientes (con o sin patologías) en el depósito pulmonar de las partículas.

Se realizaron tres tipos de ensayos. En el primer grupo de ensayos se evaluó la deposición pulmonar *in vitro* de la formulación desarrollada con el equipo NGI. Se realizaron tanto los ensayos establecidos por la farmacopea a flujo constante (100 L/min), como los ensayos de simulación con dos perfiles de respiración de pacientes sanos y con EPOC (Capítulo 2, Sección 2.4.3). A continuación, se describen los experimentos realizados con el generador de

aerosoles UNIZAR. La concentración de número de partículas ( $\#/cm^3$ ) en la nube de aerosol generada se midió con el contador de partículas OPC (Anexo I, Sección I.4). Finalmente, un tercer grupo de ensayos empleó el equipo Spraytec® (Capítulo 2, Punto 2.4.2), para medir por difracción láser el tamaño físico de las partículas presentes en la nube de aerosol formada tanto con el generador de aerosoles UNIZAR como con el DPI comercial Breezhaler®.

### 5.6.1 Diámetro aerodinámico

#### 5.6.1.1 Ensayo según farmacopea

Según el ensayo establecido por farmacopea la determinación del DMMA se realiza a flujo de inspiración constante, 100 L/min (Capítulo 2), empleando un DPI comercial (Breezhaler®) y el equipo de impactación (NGI). Los parámetros obtenidos se recogen en la *Tabla 5.4*.

En ese ensayo el valor de DMMA resultó ser ligeramente superior a 5  $\mu m$ . Las partículas con valores de DMMA entre 5–10  $\mu m$ , aunque están asociadas a un mayor depósito en la región orofaríngea, serán capaces de penetrar en el sistema respiratorio y se depositarán por un mecanismo de sedimentación gravitacional predominantemente en sus regiones medias y superiores [371]. Por otro lado, la desviación estándar geométrica (GSD) describe la variabilidad del tamaño de partícula dentro del aerosol, se consideran aerosoles monodispersos aquellos con valores de GSD entre 1 y 1,4 [372]. El aerosol obtenido con el inhalador DPI comercial presenta una GSD > 6, indicando que se trata de un aerosol muy polidisperso.

#### 5.6.1.2 Influencia del perfil de respiración en la administración pulmonar de fármacos

Para estudiar la influencia del perfil de respiración del paciente en la administración pulmonar de la formulación desarrollada se empleó un inhalador comercial de polvo seco, DPI (Breezhaler®) y el equipo de impactación (NGI). Con el objetivo de obtener una correlación más realista de la deposición de las micropartículas desarrolladas en el tracto respiratorio, se obtuvieron dos

perfiles de respiración simulados a partir de datos obtenidos de estudios realizados con pacientes sanos y con EPOC, aplicando las ecuaciones descritas en la *Tabla 2.8* (Capítulo 2) [261,262]. Los perfiles se diferenciaron en la duración de la inspiración y en el flujo inspiratorio máximo alcanzado (*Figura 2.2*, Capítulo 2). Además, con estos perfiles de respiración se empleó la tráquea de Alberta, lo que permitió obtener una simulación más realista de la captación y deposición de las micropartículas en el sistema respiratorio.

En todos los ensayos realizados el valor de la dosis emitida (DE) fue muy similar, alcanzando un valor de más del 97%. Sin embargo, el valor de la fracción fina de partículas (FFP) fue mayor en el caso de ensayo realizado según farmacopea a flujo constante ( $FFP = 7,4 \pm 1,4\%$ ) en comparación con el valor obtenido cuando se emplearon perfiles de respiración (sano y enfermo de EPOC) que alcanzaron valores de FFP del 4 %.

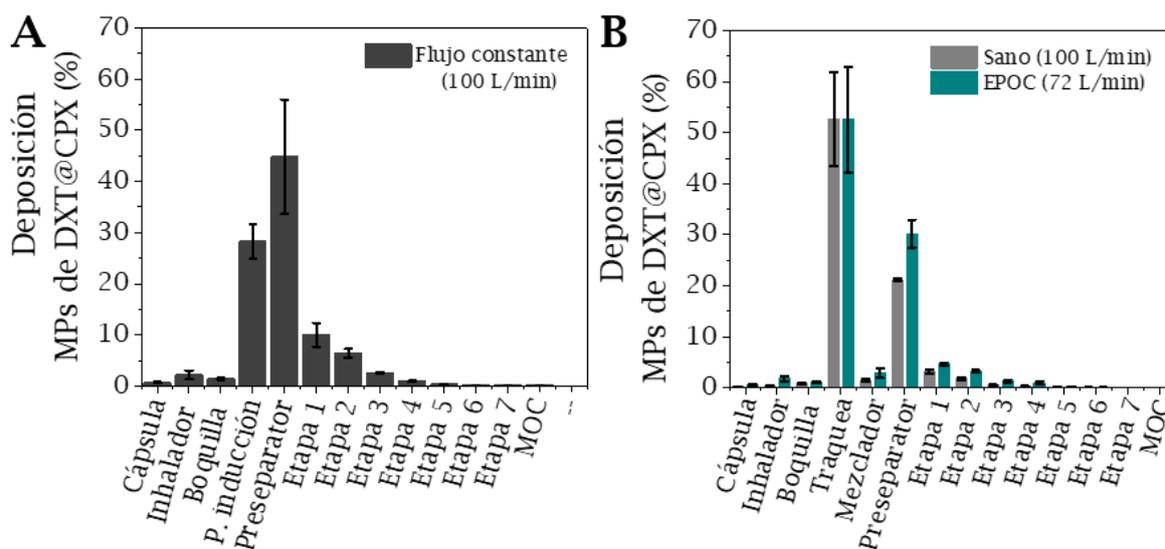
Los valores obtenidos para la dosis emitida, fracción fina de partículas y fracción respirable (DPF, FFP y FR) para las micropartículas de dextrano fueron relativamente bajos en comparación con otros estudios previos en los que también se usó el polímero dextrano para la generación de micropartículas (*Tabla 5.4*). Wang *et al.*, [373] desarrollaron micropartículas de dextrano con cúrcuma encapsulada por la técnica de *spray-drying*. El  $d_p$  obtenido fue  $\sim 1,5 \mu\text{m}$  y los ensayos de deposición *in vitro* revelaron un valor de FFP cercano al 80%. De manera análoga, Waters *et al.*, [150] generaron micropartículas de dextrano con budesonida (corticoide) y, aunque los valores obtenidos de FFP fueron algo menores que los del estudio anteriormente citado, estuvieron próximos a un 50%.

Estos resultados pueden explicarse cómo se podrá ver en el [Punto 5.6.3](#) por el hecho de que el DPI es incapaz de disgregar la formulación en polvo seco en micropartículas de dextrano individuales, haciendo que su tamaño efectivo sea superior a las  $5 \mu\text{m}$ . De este modo, se favorece su retención en la tráquea y en el pre-separador (*Figura 5.16*).

**Tabla 5.4** - Valores obtenidos en los ensayos realizados con el equipo NGI.

Parámetros	Farmacopea			Perfil de respiración	
	Flujo constante (100 L/min)	Sano (100 L/min)	EPOC (72 L/min)		
Dosis Emitida (DE) (%)	98,4 ± 1,2	99,2 ± 0,2	98,0 ± 0,5		
Dosis de Partículas Finas (DPF) (%)	7,2 ± 1,3	3,8 ± 0,1	4,3 ± 1,3		
Fracción Fina de Partículas (FFP) (%)	7,4 ± 1,4	3,8 ± 0,1	4,4 ± 1,3		
Fracción Respirable (FR) (%)	10,4 ± 1,0	5,8 ± 0,2	6,1 ± 0,9		
Diámetro de Masa Media Aerodinámico (DMMA) (µm)	5,8 ± 1,0	6,6 ± 1,8	4,8 ± 1,4		
Desviación Geométrica Estándar (GSD) (µm)	6,3 ± 1,3	6,8 ± 0,3	6,1 ± 0,8		

En la *Figura 5.16* se refleja el porcentaje de micropartículas y su distribución en cada etapa del equipo NGI. Cabe destacar que solo una fracción muy pequeña de la formulación queda retenida en la cápsula, inhalador y boquilla (4,3%, 3,1% y 1,7% para ensayo de farmacopea, paciente sano y enfermo de EPOC respectivamente). Por tanto la dosis que no accedería al tracto respiratorio sería muy baja. Por el contrario, los valores obtenidos de fracción respirable (FR) muestran que la mayor parte de las partículas quedaron retenidas antes de llegar a las distintas etapas del NGI, es decir, no entrarían en las vías respiratorias. En los tres ensayos se puede observar que un elevado porcentaje de micropartículas queda retenido tanto en el puerto de inducción y tráquea de Alberta como en el preseparador. Igualmente, los porcentajes de micropartículas depositados en las diferentes etapas del NGI son muy bajos, siendo las etapas 1 (6,12 µm) y 2 (3,42 µm) las que presentan un mayor porcentaje de retención, lo que concuerda con el tamaño medio de partícula medido mediante las imágenes de microscopía SEM ( $dp = 4,30 \pm 1,30 \mu\text{m}$ ).



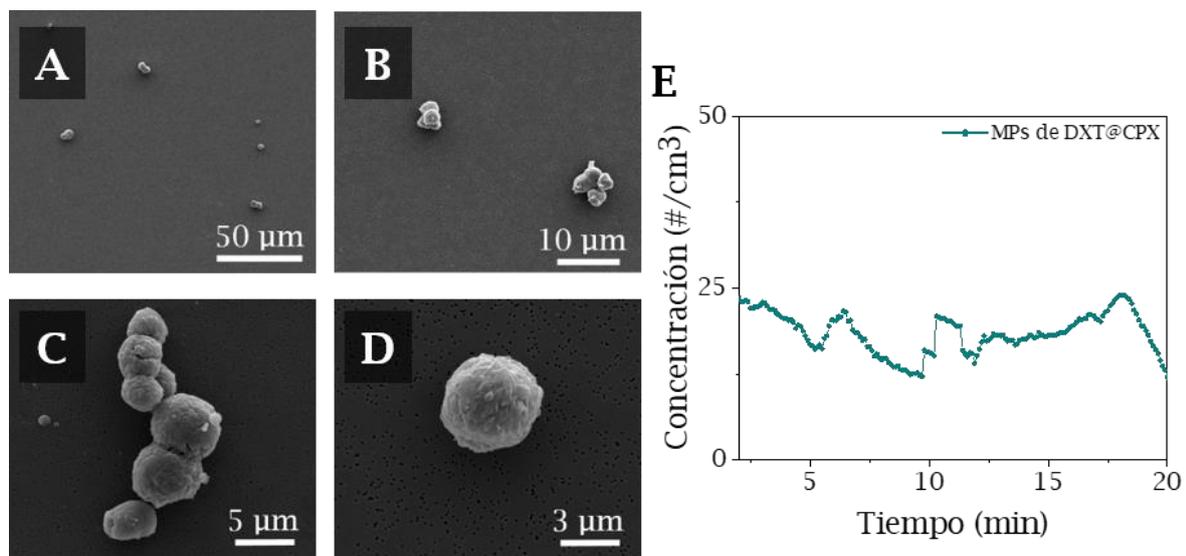
**Figura 5.16.** – Distribución de la masa (%) de las MPs de DXT@CPX en polvo seco en el NGI según su tamaño aerodinámico: **(A)** Flujo constante (100 L/min), ensayo establecido por la farmacopea; **(B)** Simulador de respiración con perfil respiratorio de un paciente sano (100 L/min) y uno con EPOC (72 L/min) (media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ). *Nota: las partes del dispositivo de NGI se han detallado en el Capítulo 2, Punto 2.4.3.*

Estos resultados indican que la formulación de polvo seco diseñada a partir de micropartículas de dextrano con ciprofloxacino no se depositaría de manera óptima en las vías respiratorias empleando un DPI comercial. Por lo que se deduce que, en un ensayo *in vivo* tampoco lograrían distribuirse de manera satisfactoria por la zona más distal del pulmón.

### 5.6.2 Generación de aerosoles

Para la realización de estos ensayos, se empleó el dispositivo de generación de aerosoles UNIZAR, detallado en el Capítulo 3, Punto 3.2.1. Brevemente, la cámara principal tuvo una presión de 4 barg y la cámara secundaria 8 barg. En los ensayos se emplearon muestras de  $15 \pm 2$  mg de micropartículas de dextrano con ciprofloxacino. La corriente de aerosol microparticulado se caracterizó estudiando la evolución temporal de la concentración de partículas en fase aerosol ( $\#/cm^3$ ) empleando el equipo OPC (Anexo I, Sección I.4). Se tomaron muestras del material particulado presente en la fase aerosol en filtros de PC para su posterior análisis por microscopía SEM empleando el soporte descrito en el Anexo I (Sección I.2).

La corriente de aerosol generado se mantuvo durante un tiempo de casi 20 minutos con una concentración de partículas promedio de  $\sim 20 \text{ \#/cm}^3$ , para partículas entre  $0,3$  a  $10 \text{ \mu m}$ . Las imágenes de SEM de las partículas en fase aerosol capturadas en los filtros de PC confirmaron que las micropartículas se encontraban en su mayor parte de manera individual o en aglomerados de varias micropartículas con un tamaño medio de  $4,62 \pm 1,30 \text{ \mu m}$ , coincidiendo con el tamaño medio de las micropartículas de partida ( $d_p = 4,30 \pm 1,30 \text{ \mu m}$ ) (Figura 5.17).



**Figura 5.17.** - (A - D) Imágenes de microscopía SEM de las MPs de DXT@CPX capturadas a partir de los aerosoles obtenidos con el generador de aerosoles UNIZAR; (E) Evolución temporal de la concentración de las MPs de DXT@CPX con tamaños entre  $0,3 - 10 \text{ \mu m}$  medido con el OPC.

### 5.6.3 Tamaño efectivo de partículas en un proceso de inhalación

Las medidas realizadas con el equipo de difracción láser Spraytec®, permitieron evaluar la capacidad de aerosolización tanto del generador de aerosoles UNIZAR como del inhalador comercial de polvo, Breezhaler®. Los ensayos realizados proporcionaron los valores de distribución volumétrica y el tamaño físico de las micropartículas con ambos dispositivos.

El procedimiento seguido con el generador de aerosoles UNIZAR se detalla en el Capítulo 3, Punto 3.3.3, Esquema 3.3. Se emplearon 15 mg de

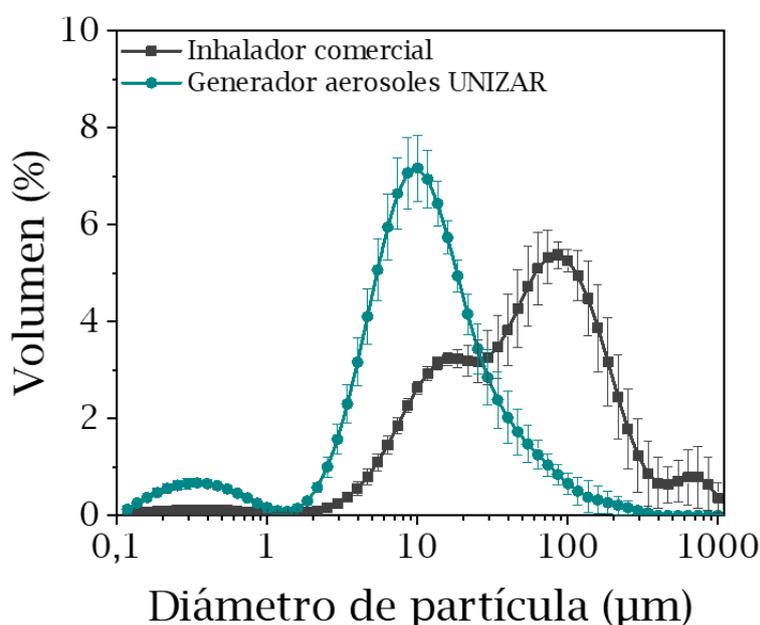
micropartículas de dextrano con ciprofloxacino en cada ensayo. La aerosolización de la muestra en forma de polvo seco se realizó empleando una presión de 4 barg en la cámara secundaria.

Con el inhalador comercial DPI, Breezhaler®, las micropartículas de dextrano con ciprofloxacino se introdujeron en cápsulas de gelatina (15 mg/cápsula) y el polvo se dispersó por la celda de inhalación empleando un flujo de inspiración de 100 L/min. En el [Capítulo 2, Punto 2.4.2](#) se describe de manera más detallada tanto el equipo como el procedimiento empleado para la medida de las muestras.

La [Figura 5.18](#) muestra la curva de distribución de tamaños de partícula obtenida con ambos dispositivos de inhalación. La curva correspondiente al inhalador comercial (DPI, Breezhaler®) muestra un pico ancho con dos máximos, uno cercano a 10  $\mu\text{m}$  ( $8,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$ ) y un segundo máximo aproximadamente en 100  $\mu\text{m}$ , así como un pequeño pico de aglomerados grandes con tamaños mayores de 500  $\mu\text{m}$ . Estos resultados demuestran nuevamente la incapacidad del DPI comercial de dispersar las micropartículas de dextrano de manera eficiente, dificultando su aerosolización e influyendo de manera directa en la deposición de las partículas, como se ha visto anteriormente en el [Punto 5.6.1](#). En contraste, con el generador de aerosoles UNIZAR, aparecen un pico principal que va desde las 2  $\mu\text{m}$  hasta las 50  $\mu\text{m}$ , con un máximo en  $\sim 10 \mu\text{m}$ , el cual se corresponde tanto con partículas individuales como con aglomerados de unas pocas micropartículas, tal y como se observó en las muestras de micropartículas capturadas en fase aerosol analizadas mediante microscopía SEM ([Figura 5.17](#)). El pico presente en el rango de 0,1 - 1  $\mu\text{m}$  podría deberse a fragmentos de polímero presente sobre la superficie de las micropartículas generados durante el proceso de liofilización. En la [Tabla 5.5](#) se encuentran recogidos los valores del diámetro volumétrico medio y los valores de amplitud de curva (Span) obtenidos de la [Figura 5.18](#).

**Tabla 5.5** - Caracterización del aerosol de MPs de DXT@CPX producido con un inhalador comercial (Breezhaler®) y el generador de aerosoles UNIZAR, empleando el equipo Spraytec®.

Dispositivo	Dv10 (µm)	Dv50 (µm)	Dv90 (µm)	Span
Inhalador comercial polvo seco	8,4 ± 0,7	52,3 ± 5,3	194,2 ± 19,7	3,6
Generador de aerosoles UNIZAR	2,8 ± 0,2	9,7 ± 1,0	37,1 ± 9,7	3,6



**Figura 5.18.** - Distribución volumétrica de las MPs de DXT@CPX con el instrumento Spraytec® según su tamaño físico. La curva azul muestra la distribución del tamaño de partícula obtenido con el generador de aerosoles UNIZAR. Y la curva gris la distribución del tamaño de partícula obtenido con el inhalador comercial de polvo seco (Breezhaler®).

### 5.7 Conclusiones

Finalmente, se indican brevemente las conclusiones más importantes de este capítulo:

- Mediante un método de gelificación/precipitación pueden obtenerse micropartículas en forma de polvo seco a partir del polímero dextrano con un tamaño próximo a las 5 µm.

- Mediante un proceso de anclaje electrostático, el antibiótico ciprofloxacino puede incorporarse a la superficie de las micropartículas con alcanzando una carga de fármaco de  $4,9 \pm 1,0\%$ .
- La liberación del ciprofloxacino desde estas micropartículas fue casi inmediata (80% en 30 min). La liberación tan rápida fue de especial utilidad en los ensayos con bacterias, donde mostro una actividad antimicrobiana igual al ciprofloxacino puro.
- Las micropartículas no mostraron citotoxicidad celular en ninguna de las células pulmonares empleadas. Además, se concluye que el dextrano es capaz de proteger a las células procedentes de la línea celular A549 de la toxicidad producida por el ciprofloxacino puro.
- Los resultados en los ensayos *in vitro* tanto con bacterias como con células revelaron la posibilidad de emplear dichas micropartículas con ciprofloxacino como potencial tratamiento para infecciones de patógenos extracelulares, como por ejemplo frente a *P. aeruginosa*.
- El dispositivo de inhalación empleado tiene una gran influencia en las características del aerosol producido, y por tanto condiciona la posible aplicación clínica de una formulación dada.
- El DPI comercial no resultó de utilidad para el suministro de la formulación desarrollada por vía inhalatoria, al ser incapaz de disgregar las partículas en el tamaño adecuado para su inhalación.
- El generador de aerosoles UNIZAR demostró la capacidad de disgregación de la formulación desarrollada, generando un aerosol con micropartículas de un tamaño medio  $< 10 \mu\text{m}$ , valor cercano al tamaño individual de las micropartículas o agregados con un bajo número de partículas ( $4,30 \pm 1,30 \mu\text{m}$ ).

- La formulación desarrollada presenta características adecuadas para el tratamiento de infecciones respiratorias debido al tamaño de las micropartículas, su biocompatibilidad y la actividad antimicrobiana.

# Capítulo 6

## PRODUCCION DE PARTÍCULAS DE ALGINATO COMO VECTORES DE SULFATO DE COLISTINA

---

*En este sexto capítulo se estudia la generación de micropartículas poliméricas de alginato como vectores del antibiótico sulfato de colistina. En la primera parte, se analizan las propiedades reológicas de las disoluciones y geles de alginato empleados, se describe la optimización del proceso de atomización y se caracterizan las micropartículas de alginato obtenidas en forma de polvo seco, las cuales poseen un tamaño de partícula  $\leq 5 \mu\text{m}$ . En la segunda parte, se realizan los estudios in vitro de liberación del fármaco, se analiza la citotoxicidad en líneas celulares de pulmón (Calu-3 y A549) y la actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Finalmente, se describen las propiedades aerodinámicas de esta formulación en polvo seco y los ensayos para la generación de aerosoles*



## 6. PRODUCCION DE PARTÍCULAS DE ALGINATO POR ATOMIZACIÓN COMO VECTORES DE SULFATO DE COLISTINA

### 6.1 Introducción

Las infecciones respiratorias causadas por patógenos Gram-negativos son muy difíciles de tratar y suelen estar asociadas a un riesgo elevado de ingreso hospitalario, morbilidad y mortalidad [36].

La colistina es un antibiótico con excelente actividad antimicrobiana frente a patógenos Gram-negativos destacando entre ellos *P. aeruginosa*. Aunque este antibiótico es muy efectivo frente a infecciones respiratorias, su principal inconveniente es que se requieren dosis muy altas para lograr un tratamiento adecuado. Cuando es administrada por vía intravenosa para el tratamiento de estas infecciones, puede causar efectos adversos graves como nefrotoxicidad y neurotoxicidad [374]. Además, por esta vía de administración solo una pequeña fracción de fármaco es capaz de llegar a los pulmones [59].

Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la administración de colistina inhalada reduce los efectos secundarios, es capaz de alcanzar una mayor concentración en el fluido epitelial, reduce la densidad bacteriana de *P. aeruginosa*, aumenta el tiempo entre exacerbaciones y mejora la calidad de vida de los pacientes [375,376]. Por estas razones, resulta de gran interés el desarrollo de nuevas formulaciones que permitan administrar este antibiótico por vía inhalatoria.

Entre los polímeros naturales usados en la industria farmacéutica y biomédica para procesos de encapsulación de fármacos y generación de nuevas formulaciones podemos destacar el alginato. Como se ha comentado en el [Capítulo 1](#) se trata de un polímero biodegradable, biocompatible y que no genera toxicidad [377]. Entre las técnicas más usadas para generar micropartículas de alginato destacamos tres: emulsión, *spray-drying* y

atomización. La primera técnica involucra numerosos pasos, incluido el uso de disolventes orgánicos, a los cuales se añaden las disoluciones acuosas con el polímero de interés. Estos disolventes pueden afectar a la biocompatibilidad de las micropartículas o al principio activo encapsulado [378–380]. Por otro lado, la técnica de *spray-drying*, aunque es más costosa resulta rentable, ya que permite operar en continuo aumentando el rendimiento del proceso. Esta técnica se basa en disolver el principio activo o polímero y atomizar dicha disolución contra una corriente de aire caliente que favorece la evaporación del disolvente. Sin embargo, se emplean temperaturas elevadas (>100 °C) que pueden afectar al principio activo encapsulado [147,381].

A la vista de los inconvenientes presentados, en este trabajo se ha elegido la técnica de atomización-gelificación (en adelante atomización), que consiste en la generación de un *spray* de disolución polimérica que se recoge en forma de gotas sobre una disolución que contiene un agente entrecruzante. Este proceso, al igual que en el caso del *spray-drying*, tiene un rendimiento muy alto, pero no emplea temperaturas elevadas, lo que favorece la preservación del principio activo. Sin embargo, presenta dos desventajas. La primera, que el rango de tamaños de partícula obtenido (40-100 µm) está muy alejado del adecuado para su administración inhalatoria [246,382]. La segunda, que las partículas generadas se encuentran suspendidas en agua y se requiere un proceso de secado posterior para su futura aplicación como formulación en forma de polvo seco [383].

En este contexto, el objetivo principal de este trabajo es desarrollar una nueva formulación en forma de polvo seco con el antibiótico sulfato de colistina alcanzando tamaños de partícula menores de 5 µm, con la finalidad de ser empleado para administración por vía inhalatoria. Para lograr este objetivo, se empleó el proceso de atomización y como vector de este antibiótico el polímero alginato de sodio.

## 6.2 Propiedades de las disoluciones y geles de alginato

La caracterización de las disoluciones de alginato (ALG) incluyó la obtención de diferentes parámetros como densidad, tensión superficial y viscosidad (Anexo I, Punto I.1.8). La *Tabla 6.1* recoge los resultados obtenidos.

La densidad de las disoluciones de alginato tuvo un valor constante de aproximadamente 1 g/cm<sup>3</sup> en todas las concentraciones estudiadas, mientras que los valores de tensión superficial y de viscosidad sí mostraron diferencias entre ellos. Se destaca un incremento exponencial en los valores de viscosidad, desde 15 hasta 1115 cP, a medida que aumentó la concentración de alginato. Los valores de viscosidad se calcularon como la pendiente del esfuerzo cortante frente a la velocidad de deformación.

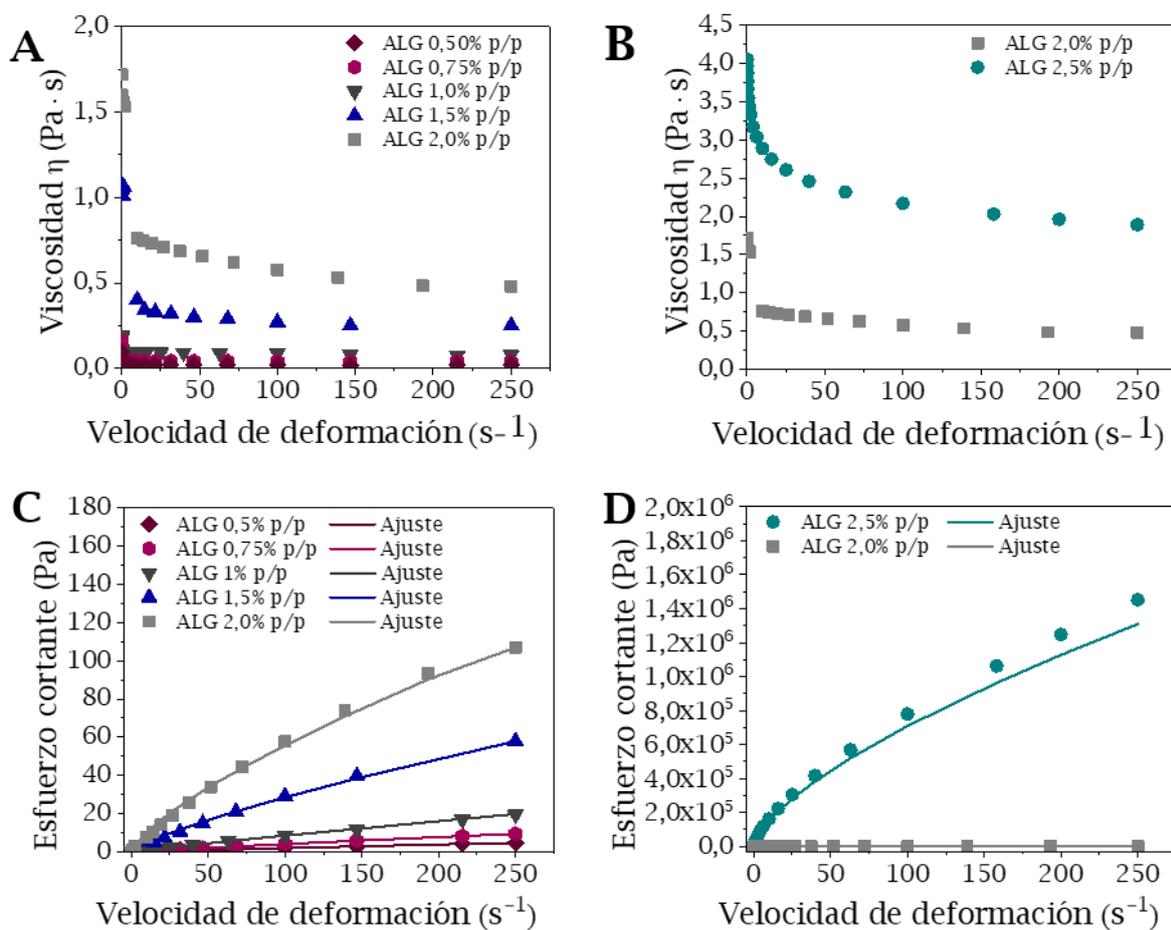
**Tabla 6.1** - Caracterización de las disoluciones de alginato estudiadas.

Alginato (% p/v)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Tensión superficial (N/m <sup>2</sup> )	Viscosidad (cP)
0,50	0,99	0,09	15
0,75	1,00	0,10	40
1,00	1,00	0,11	90
1,50	1,01	0,12	250
2,00	1,01	0,14	610
2,50	1,01	0,18	1115

El análisis reológico de las distintas disoluciones de alginato mostró el carácter pseudoplástico de este polímero (*Figura 6.1A* y *6.1B*). Las curvas de comportamiento de las distintas disoluciones de alginato indican que se trata de fluidos no - newtonianos. El valor de la viscosidad es elevado cuando la velocidad de deformación del fluido es pequeña y las cadenas se encuentran desordenadas y entrelazadas. A medida que aumentamos la velocidad de deformación, las cadenas del polímero se van ordenando y alineando, haciendo que el valor de viscosidad de la disolución disminuya. Este fenómeno ha sido reportado por otros autores tanto con el alginato [384-386] como con otros polímeros como la goma xanthan [387].

Por otro lado, la curva de esfuerzo cortante frente a la velocidad de deformación (*Figura 6.1C y 6.1D*) se ajustó con la ecuación de la Ley de potencia (Ecuación I.1, *Anexo I*).

Los resultados del ajuste (*Tabla 6.2*) muestran como la pseudoplasticidad aumenta con la concentración de alginato, principalmente a partir de una concentración de 1% p/p, donde el índice de comportamiento de flujo  $n$  disminuye desde un valor de 0,94 (1 % p/p) hasta 0,67 (2,5 % p/p).



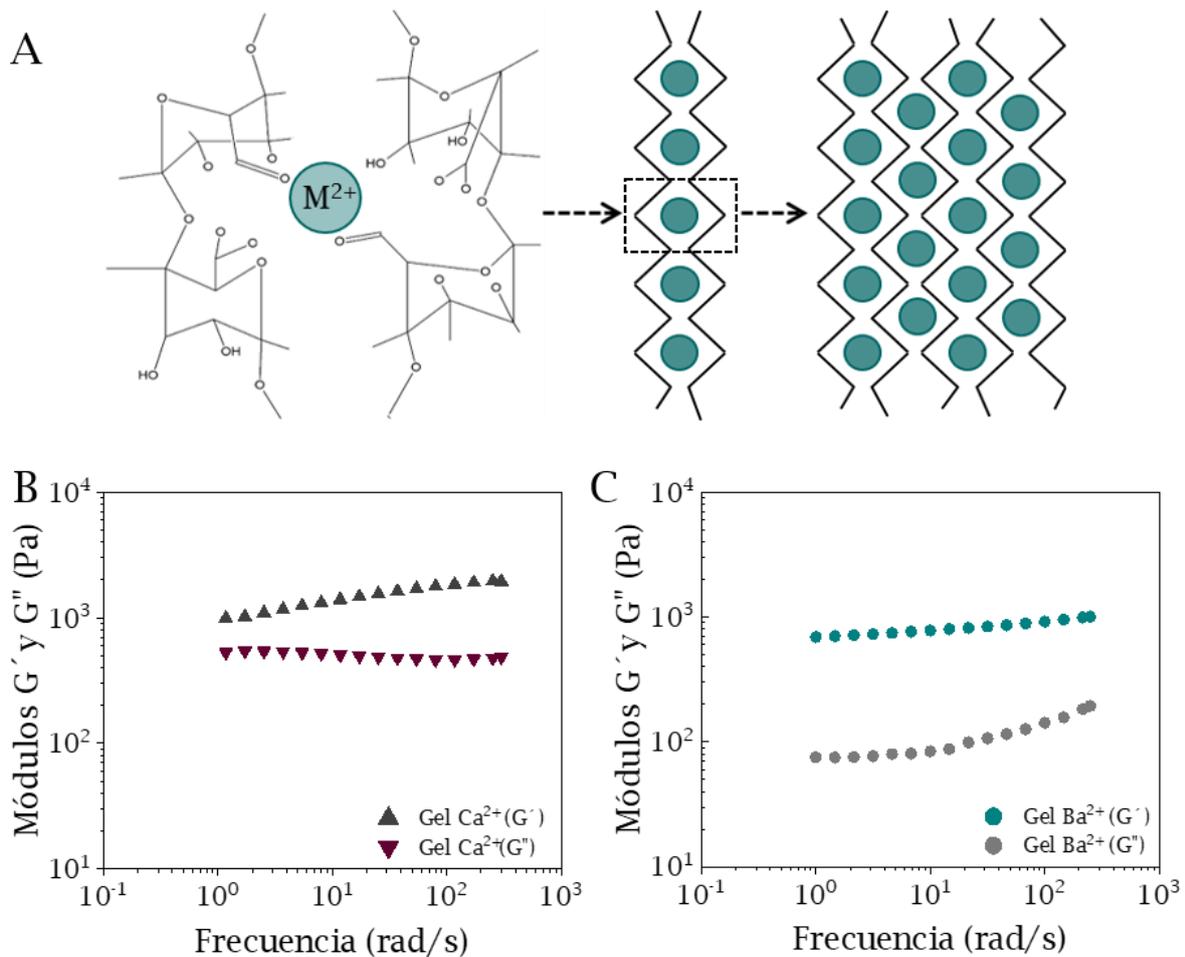
**Figura 6.1.** - Representación de los resultados obtenidos del análisis reológico. Viscosidad frente a  $\dot{\gamma}$  (velocidad de deformación): **(A)** Disoluciones de ALG 0,5 - 2,0% p/p; **(B)** Comparación entre la disolución de ALG 2,0% y 2,5% p/p;  $\tau$  (esfuerzo cortante) frente a  $\dot{\gamma}$  (velocidad de deformación): **(C)** Disoluciones de ALG 0,5 - 2,0% p/p; **(D)** Comparación entre la disolución de ALG 2,0% y 2,5% p/p.

**Tabla 6.2** – Parámetros de pseudoplasticidad de las disoluciones de alginato.

Alginato (% p/p)	K (Pa · s) <sup>n</sup>	n	Error estándar
0,50	0,02	0,96	2,65
0,75	0,04	0,93	4,66
1,00	0,09	0,94	5,63
1,50	0,25	0,78	10,23
2,00	1,90	0,73	18,49
2,50	3,24	0,67	27,13

Una de las propiedades características del alginato es su capacidad para formar hidrogeles mediante un proceso de entrecruzamiento con cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Ba}^{2+}$ . Estos hidrogeles se generan por las interacciones entre los grupos carboxilos del alginato y el catión divalente. Se produce un fenómeno de reticulación iónica que genera una red tridimensional que da lugar a la conformación denominada “caja de huevo” [388] (*Figura 6.2A*). En la mayoría de los estudios se emplea el  $\text{CaCl}_2$  como agente entrecruzante mientras que el uso del  $\text{BaCl}_2$  no es tan frecuente, debido a la toxicidad del catión  $\text{Ba}^{2+}$ . Aunque, se ha demostrado en estudios previos tanto *in vitro* como *in vivo* que, tras el proceso de lavado y la eliminación de los iones  $\text{Ba}^{2+}$  residuales, las micropartículas de alginato resultantes no son tóxicas [389,390]. Por esa razón, se estudió mediante análisis reológico la capacidad del alginato de formar geles con ambos agentes entrecruzantes tanto  $\text{BaCl}_2$  como  $\text{CaCl}_2$ , y a una concentración de polímero del 2% p/p.

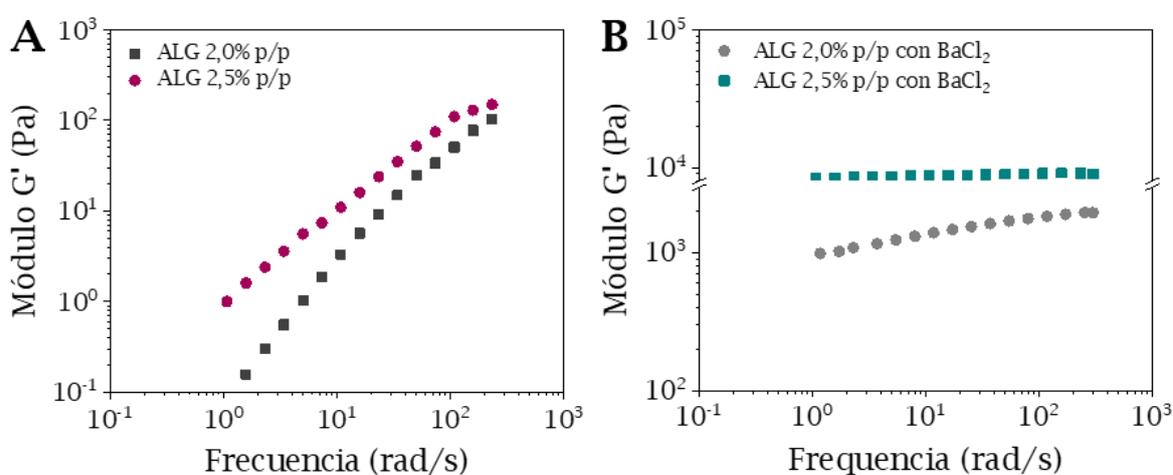
El estudio reológico reflejó que en ambos tipos de geles el módulo correspondiente al almacenamiento de energía ( $G'$ ) fue mayor que el módulo de pérdida de energía ( $G''$ ) (*Figura 6.2*). Estos resultados confirman la existencia de interacciones entre las cadenas de alginato y los cationes divalentes. Además, en el caso del sistema alginato - bario, hay una diferencia mayor entre los valores de ambos módulos ( $G'$  y  $G''$ ) (*Figura 6.2C*). Esto es indicativo de que se trata de un gel más estable y permanente en el tiempo, coincidiendo con estudios realizados con anterioridad [391,392]. Se seleccionó el  $\text{BaCl}_2$  como agente entrecruzante teniendo en cuenta la mayor estabilidad del gel formado.



**Figura 6.2.** – (A) Representación esquemática de las interacciones entre las cadenas de alginato y los iones divalentes, estructura de “caja de huevo”; Concentración de ALG 2% p/p; (B) Módulos  $G'$  y  $G''$  (Pa) del gel formado con  $\text{Ca}^{2+}$ ; (C) Módulos  $G'$  y  $G''$  (Pa) del gel formado con  $\text{Ba}^{2+}$ .

Se realizó un análisis reológico de las disoluciones de alginato con las principales concentraciones empleadas en este estudio, 2% y 2,5% p/p (tal y como se detalla más adelante). Los espectros mecánicos obtenidos son típicos de disoluciones poliméricas y se muestran como módulo de almacenamiento de energía ( $G'$ ) en función de la frecuencia aplicada (*Figura 6.3A*). Se pudo observar que la disolución de alginato de mayor concentración (2,5% p/p) fue la que obtuvo el valor más alto de módulo de almacenamiento de energía ( $G'$ ). Además, se efectuó una comparación entre los hidrogeles formados con las disoluciones de alginato al 2% y 2,5% p/p con el  $\text{BaCl}_2$ . Los resultados se muestran en la *Figura 6.3B*, como módulo de almacenamiento de energía ( $G'$ ) en función de la frecuencia aplicada tras el proceso de reticulación. Se pudo observar que el valor de  $G'$  de los hidrogeles es de varios ordenes de magnitud

mayor que en el caso de las disoluciones poliméricas de partida, y que el comportamiento de los espectros mecánicos de los hidrogeles formados después del proceso de entrecruzamiento es independiente de la frecuencia. En base a estos resultados, se puede concluir que el proceso de entrecruzamiento se realizó con éxito. El gel obtenido a partir de la disolución de alginato a la concentración del 2,5% p/p tuvo un valor del módulo  $G'$  más alto respecto a las otras concentraciones estudiadas, debido a la presencia de un mayor número de grupos  $-\text{COO}^-$  en la disolución y, por tanto, una mayor capacidad de entrecruzarse con el cloruro de bario.



**Figura 6.3.** – Análisis reológico de los módulos  $G'$ : **(A)** Disoluciones de ALG a concentraciones 2 y 2,5% (p/p); **(B)** Geles de ALG a concentraciones de 2 y 2,5% (p/p) con  $\text{BaCl}_2$  como agente entrecruzante.

### 6.3 Optimización del proceso de generación de micropartículas basadas en alginato por atomización

Para la generación de las micropartículas de alginato (MPs de ALG) se empleó la técnica de atomización descrita anteriormente en el [Capítulo 2 \(Punto 2.1.2\)](#). Tal como se indicó, la aplicación de esta técnica requiere optimización, ya que existen numerosos parámetros que pueden afectar al tamaño de partícula obtenido. En este estudio nos hemos centrado principalmente en tres: ratio de presiones aire/líquido (RP), tensión superficial de la disolución de alginato y concentración de polímero empleada. Los parámetros experimentales estudiados para la obtención de las micropartículas se

encuentran recogidos en la *Tabla 2.3* (Capítulo 2, Punto 2.1.2.3). Posteriormente, se procedió a la carga del antibiótico sulfato de colistina (CLS) en las micropartículas de alginato producidas.

### 6.3.1 Ratio presiones aire/líquido (RP)

El primer paso en la optimización del proceso fue el estudio del efecto de la ratio de presiones aire/líquido (RP). Se comenzó con la atomización de la disolución de alginato a una concentración del 2% p/p debido a que había sido estudiada previamente por el grupo de investigación con resultados prometedores [246]. Para determinar la ratio de presiones aire/líquido adecuada, se obtuvo el mapa de presiones en base al tamaño de las micropartículas de alginato en agua. El tamaño de partícula se determinó con el equipo Mastersize2000 (*Anexo I, Sección I.1*).

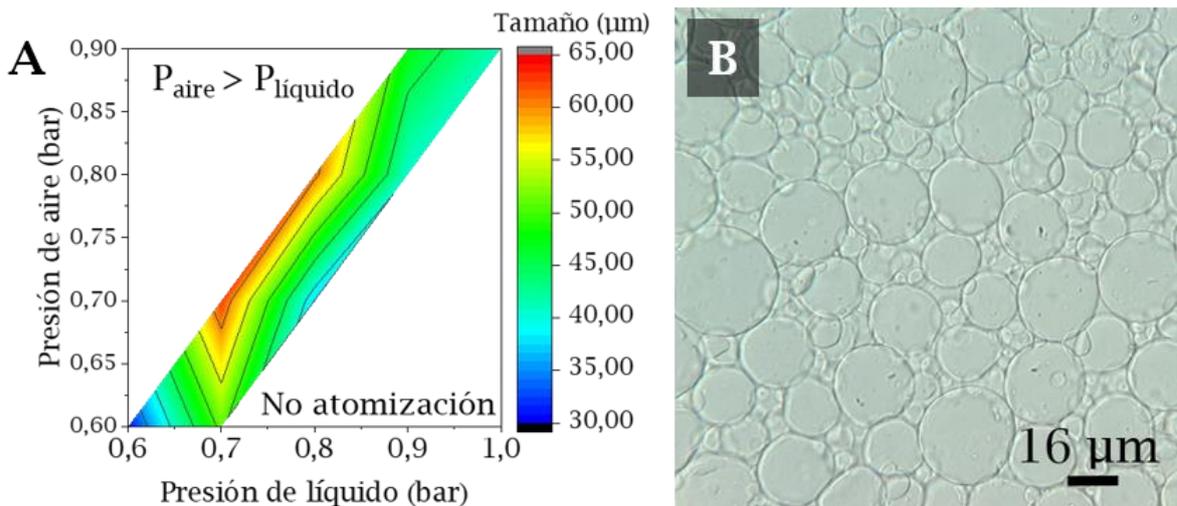
La ratio de presiones aire/líquido se exploró entre valores de 0,83 hasta 1, se decidió agrupar los valores en dos grupos principales (RP: 0,85 y 1) de manera que se facilitase el posterior análisis de los datos (*Tabla 6.3*).

En la *Figura 6.4* se muestra el tamaño de partícula obtenido respecto al mapa de presiones. Se puede observar que, a presiones intermedias tanto de aire como de líquido, el tamaño de partícula fue mayor, mientras que, a relaciones de presiones más altas, el tamaño de partícula disminuyó. Se consideraron como óptimas las condiciones de atomización 9 (A9), dado que el tamaño de partícula obtenido estuvo entre los valores más bajos y, la población de partículas fue más homogénea en comparación con el resto de condiciones estudiadas.

**Tabla 6.3** - Tamaño de partícula obtenido tras la atomización a distintos valores de presión de aire y líquido.

Atomización	SMD ( $\mu\text{m}$ ) [3,2]	Span	D10 ( $\mu\text{m}$ )	D50 ( $\mu\text{m}$ )	D90 ( $\mu\text{m}$ )	Flujo (L/h)	RP**
A1*	237,50	1,30	125,35	312,60	531,70	5,4	0,85
A2	30,75	2,33	20,30	43,90	122,95	5,4	1
A3	50,90	3,15	32,95	74,87	269,07	5,8	0,85
A4	62,60	1,89	27,70	211,90	428,70	5,8	1
A5	37,56	2,02	23,55	58,75	141,60	6,1	0,85
A6	60,94	4,58	27,60	84,74	415,75	6,1	1
A7	40,45	2,17	24,70	64,75	165,09	6,5	0,85
A8	47,38	2,75	23,26	149,61	434,28	6,5	1
A9	41,05	1,59	26,48	60,81	112,02	6,7	0,85
A10*	107,85	2,11	35,85	243,29	548,43	6,7	1

A = Atomización; \* valores eliminados debido a la polidispersidad de la muestra en el mapa de presiones; \*\*RP = ratio de presiones aire/líquido.



**Figura 6.4.** - (A) Influencia de la ratio de presiones en el tamaño de partícula. Mapa de presiones generado con la disolución de ALG al 2% p/p; (B) Imagen de microscopía óptica de las MPs de ALG al 2% p/p en agua obtenidas en las condiciones fijadas como óptimas (condición de atomización A9).

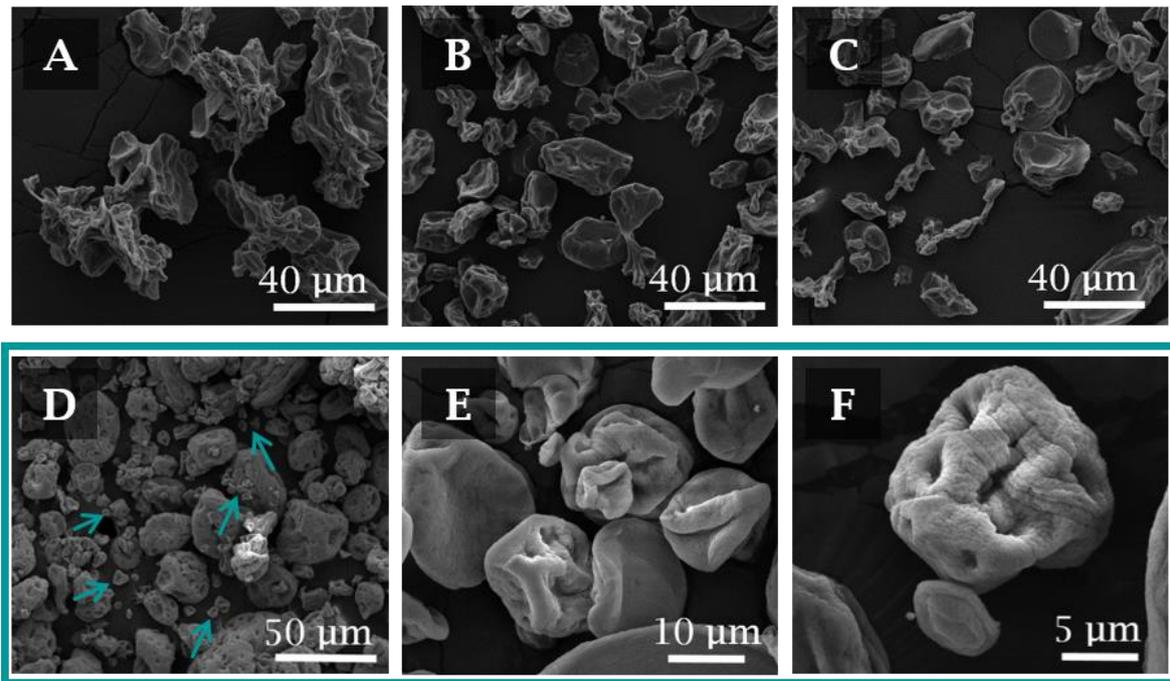
### 6.3.2 Proceso de secado

Tras fijar las condiciones de presión de aire y líquido óptimas ( $RP = 0,85$ ) y el valor del flujo empleado (6,7 L/h) para la producción de las micropartículas de alginato, se procedió a optimizar el proceso de secado para obtener la formulación en forma de polvo seco. Para ello se probaron dos métodos de secado diferentes: liofilización y deshidratación mediante intercambio de disolvente.

La liofilización se realizó mediante una congelación previa de las micropartículas a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 4 h, tras lo cual se introdujeron en el liofilizador (Telstar®, LyoQuest, Japón) en condiciones de  $<0,1$  mBar,  $-50^{\circ}\text{C}$ , 24 h. Se estudió el proceso sin y con crioprotectores (lactosa 1% y sacarosa 1% p/p). Por otro lado, el proceso realizado para la deshidratación mediante intercambio de disolvente etanol-agua y su posterior secado en estufa de vacío se encuentra detallado en el [Capítulo 2, Punto 2.1.2.4](#).

En la *Figura 6.5* se muestran las micropartículas de alginato (2% p/p) en polvo seco tras ambos procesos. Aunque el empleo de los crioprotectores (lactosa y sacarosa) durante el proceso de liofilización sí que pareció contribuir en cierta medida a la conservación de la morfología de las micropartículas, éstas mostraron una superficie arrugada, con hendiduras y en ocasiones con una forma alargada. Por el contrario, las micropartículas de alginato secadas por deshidratación y posterior evaporación en estufa de vacío presentaron una morfología más redondeada, aunque en ocasiones también presentaron hendiduras en su superficie.

El método de deshidratación y posterior evaporación en estufa de vacío consiguió disminuir el tamaño de partícula ( $d_p$ ) desde las 40  $\mu\text{m}$  iniciales que presentaban las micropartículas en suspensión acuosa a una distribución bimodal con una fracción de tamaño medio  $d_p = 11,50 \pm 5,00$   $\mu\text{m}$  (población de menor tamaño), junto a una segunda población de mayor tamaño ( $d_p = 44,80 \pm 17,00$   $\mu\text{m}$ ), tal y como se muestra en las imágenes de SEM (*Figura 6.5D - F*).



**Figura 6.5.** – MPs de ALG 2% p/p en polvo seco. Secadas por liofilización: (A) Sin crioprotector; (B) Lactosa 1% p/p; (C) Sacarosa 1% p/p. Secadas por intercambio de disolvente etanol-agua y estufa de vacío: (D – F) Imágenes de microscopía SEM. Con las flechas azules se indica la población de partículas de menor tamaño; En azul se encuentra recuadradas las imágenes correspondientes a las condiciones seleccionadas como óptimas.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó como óptimo el secado por deshidratación mediante intercambio de disolvente etanol-agua y posterior evaporación en estufa de vacío (37 °C).

### 6.3.3 Modificación de la tensión superficial

La reducción de la tensión superficial facilita la formación del *spray* generado por la disolución polimérica durante el proceso de atomización, y en consecuencia, se genera un tamaño de gota más pequeño [393]. Butler Ellis *et al.* [394] mostraron en su estudio la existencia de una clara correlación entre el valor de la tensión superficial y el tamaño de partícula generado.

Con el objetivo de disminuir el tamaño de gota atomizada se empleó el Surfynol® 440, un surfactante capaz de reducir la tensión superficial sin crear espuma. Con el objetivo de reducir el tamaño de gota y, por ende, de la partícula

final, dicho tensoactivo se incorporó a la disolución de alginato previamente preparada en un rango de concentraciones de 0,05 a 0,20% v/v. Los valores obtenidos de tensión superficial se recogen en la *Tabla 6.4*.

**Tabla 6.4** – Valor de la tensión superficial y tamaño de MPs de ALG obtenido con el tensoactivo Surfynol® 440.

Alginato (% p/p)	Surfynol® 440 (% v/v)	Tensión superficial (N/m)	Tamaño en polvo seco (µm)	
			Secado en CO <sub>2</sub> supercrítico	Estufa de vacío
2	-	0,14	-	11,50 ± 5,00
2	0,05	0,06	20,37 ± 10,04	15,30 ± 5,55
2	0,10	0,05	18,61 ± 8,20	12,85 ± 5,50
2	0,20	0,05	*	19,05 ± 8,20

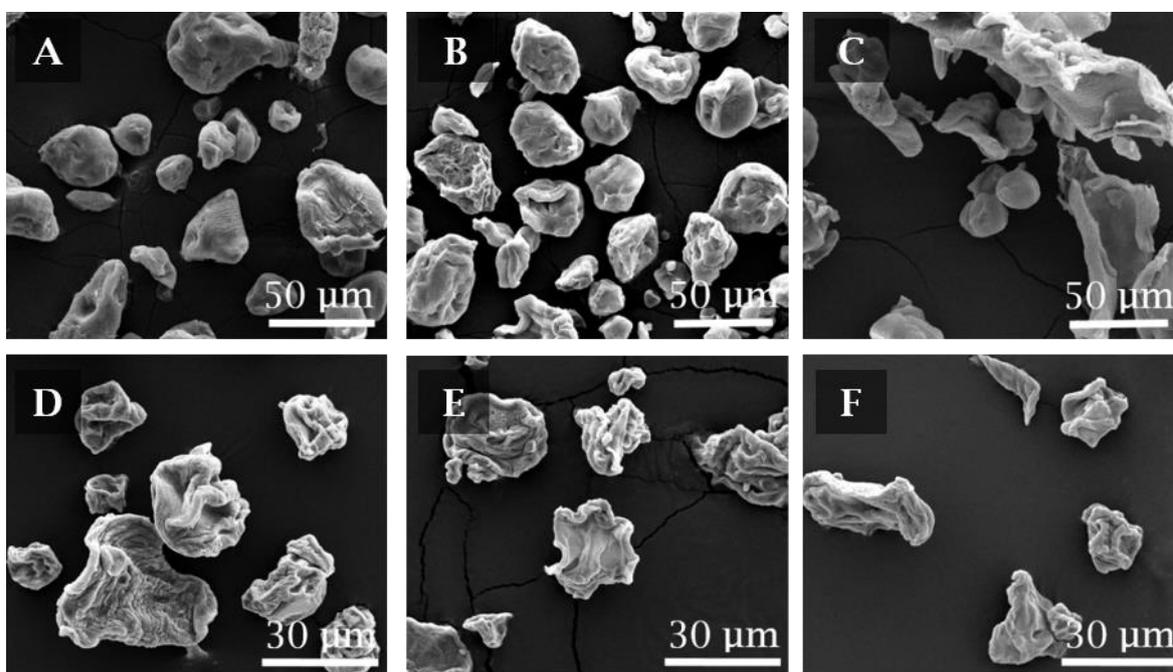
\*No se pudo realizar la medida de la distribución de tamaños, ya que las imágenes obtenidas por microscopía SEM mostraron micropartículas de alginato rotas y deformadas (*Figura 6.6C*).

Tras la incorporación del tensoactivo, se observó por microscopía óptica que el tamaño de partícula en suspensión acuosa disminuía y que las partículas obtenidas mostraban morfología esférica, por lo que se procedió al proceso de secado. Se siguió el protocolo de intercambio de disolvente etanol-agua descrito en el [Punto 2.1.2.4 \(Capítulo 2\)](#). Pero, al contrario que en las micropartículas sin tensoactivo, la morfología de éstas se vio considerablemente afectada (*Figura 6.6*). Por este motivo, se probó a secar las micropartículas por secado en CO<sub>2</sub> supercrítico.

El proceso de secado utilizado con CO<sub>2</sub> supercrítico se realizó en el [Servicio de Microscopía Electrónica de Sistemas Biológicos](#) perteneciente a la [Universidad de Zaragoza](#) empleando el secador Leica EM CPD300 (Leica Microsystems, Alemania). Las muestras se deshidrataron previamente mediante una serie de lavados con etanol absoluto. Los parámetros que se establecieron en el proceso de secado fueron: agitación automática, incorporación de CO<sub>2</sub> lenta (tiempo empleado: 2 min), temperatura 35 °C y presión 74 barg. Al

finalizar el proceso, las muestras se mantuvieron un tiempo de 20 minutos antes de extraerlas del compartimento de secado

Las imágenes obtenidas con el microscopio SEM, revelaron que las partículas mantenían su forma pseudoesférica al secarse en CO<sub>2</sub> supercrítico, excepto con la concentración más alta de tensoactivo (0,20% v/v). Sin embargo, el tamaño obtenido era mayor en comparación con el secado por estufa de vacío (Tabla 6.4 y Figura 6.6). Por esta razón, se descartó el uso de tensoactivo en la disolución polimérica como estrategia para la disminución del tamaño de partícula.



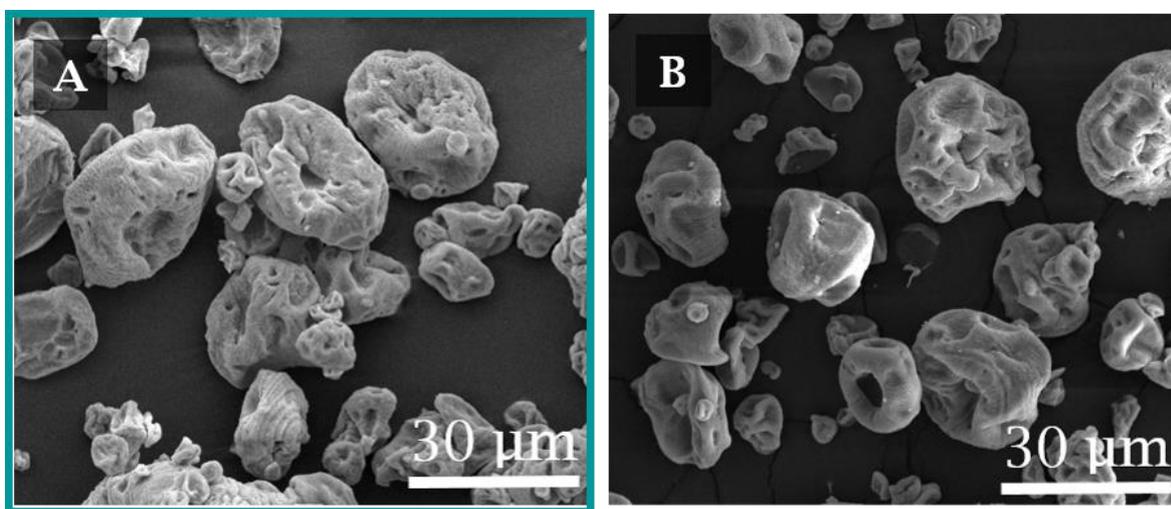
**Figura 6.6.** – MPs de ALG 2% p/p en polvo seco con el tensoactivo Surfylnol® 440. Secadas en CO<sub>2</sub> supercrítico: (A) 0,05% v/v; (B) 0,10% v/v; (C) 0,20% v/v. Secadas por intercambio de disolvente etanol-agua y estufa de vacío: (D) 0,05% v/v; (E) 0,10% v/v; (F) 0,20% v/v.

#### 6.3.4 Concentración de alginato

Tras seleccionar la RP en el proceso de atomización, analizar el proceso de secado y descartar el uso de tensoactivo, se estudió la influencia de la

concentración de alginato en el tamaño de partícula, ya que ésta afecta a las propiedades reológicas de las disoluciones poliméricas (*Tabla 6.1 y 6.2*).

Al atomizar concentraciones de alginato por debajo de 1,5% p/p se observó que cuando las gotas alcanzaban la disolución con BaCl<sub>2</sub> generaban unas cadenas largas de alginato que impedían la formación de micropartículas. Los resultados obtenidos coinciden con el estudio realizado por Mazzitelli *et al.*, [395], en el cual demostraron que a concentraciones bajas de alginato se obtenían micropartículas con formas irregulares. Se probó a atomizar disoluciones de alginato en concentraciones crecientes, 2,5% y 2,7% p/p. Las micropartículas obtenidas se secaron por intercambio de disolvente tal y como se ha explicado en el [Punto 2.1.2.4 \(Capítulo 2\)](#). En la *Figura 6.7* se muestran como las micropartículas obtenidas con ambas concentraciones mostraron una morfología esférica con superficie rugosa debido al proceso de deshidratación. Los tamaños obtenidos en ambos casos fueron muy similares,  $7,60 \pm 4,18 \mu\text{m}$  y  $8,66 \pm 3,70 \mu\text{m}$  para las disoluciones de alginato al 2,5% y 2,7% p/p respectivamente.



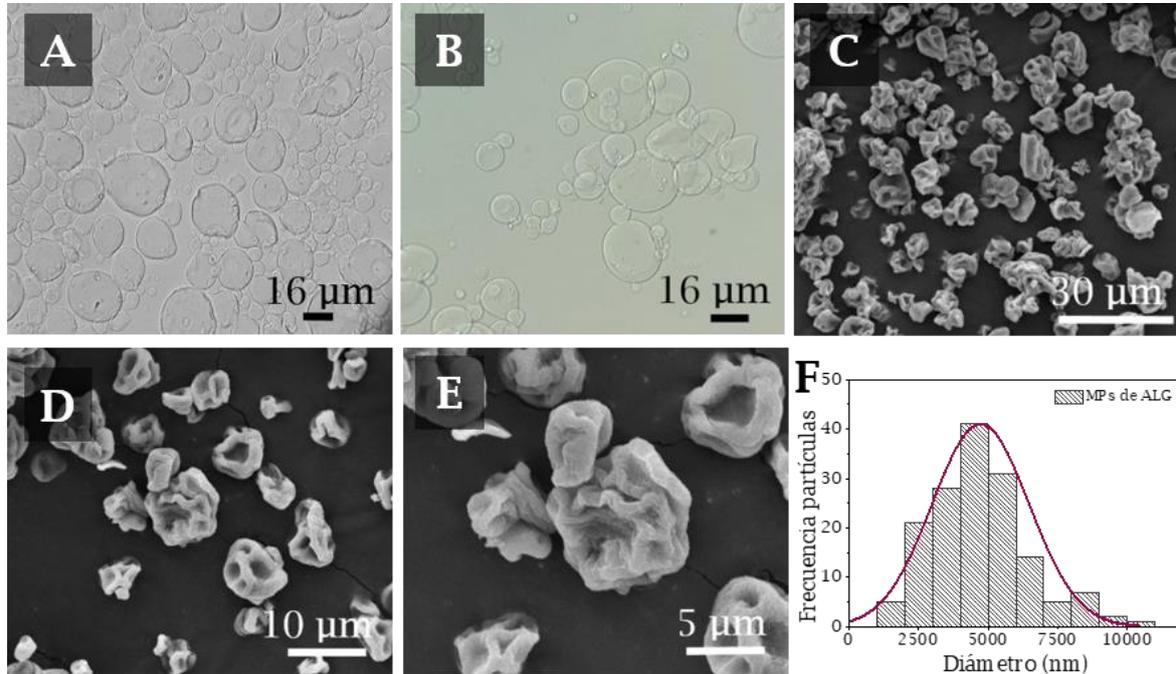
**Figura 6.7.** - Imágenes de microscopía SEM de las MPs de ALG en polvo seco: (A) ALG 2,5% p/p; (B) ALG 2,7% p/p. En azul se encuentra recuadrada la imagen correspondiente a la concentración seleccionada.

Se estableció la concentración de alginato al 2,5% p/p como concentración óptima, ya que permitió obtener un tamaño de partícula ligeramente menor en comparación con el resto de concentraciones ensayadas

(2% y 2,7% p/p). Al mismo tiempo que se evitaba la obstrucción de la boquilla, hecho que se produjo ocasionalmente con la concentración de alginato más alta (2,7% p/p).

### 6.3.5 Tamizado

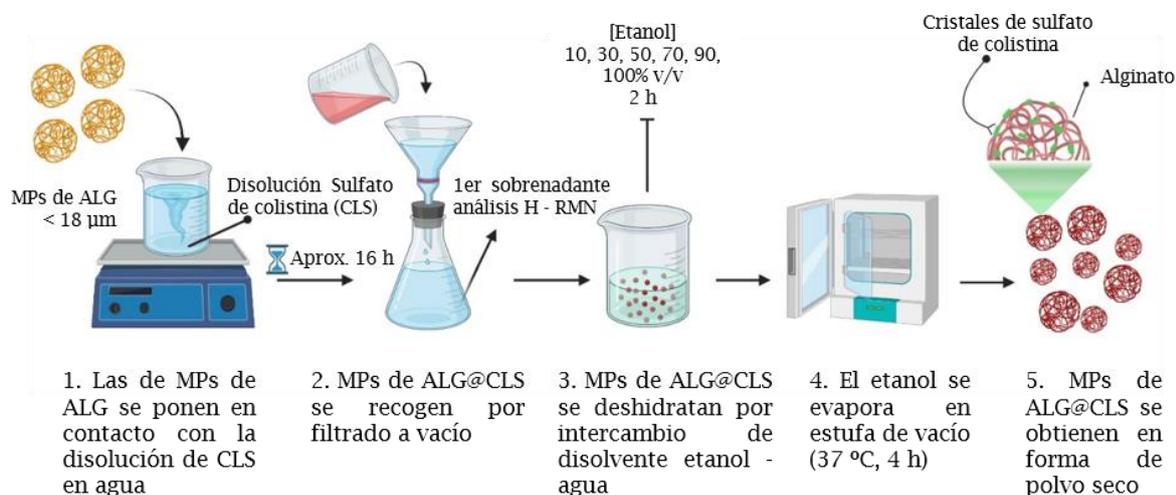
Debido a la existencia de una distribución bimodal en el tamaño de partícula en las micropartículas de alginato, se añadió un último paso antes del proceso de secado. Éste consistió en un proceso de tamizado (luz de malla < 18  $\mu\text{m}$ ) para eliminar las partículas de mayor tamaño (Capítulo 2, Punto 2.1.2.4). El tamaño de las micropartículas de alginato (2,5% p/p) en polvo seco tras el tamizado fue de  $4,80 \pm 1,60 \mu\text{m}$ , por lo que se logró reducir el tamaño de las micropartículas de alginato hasta 4 veces en comparación con las partículas iniciales en suspensión acuosa ( $16,70 \pm 7,90 \mu\text{m}$ ) (Figura 6.8A y 6.8B). A cambio, se descartaron las partículas rechazadas por el tamiz, haciendo que el rendimiento final del proceso de atomización mostrase un valor  $\sim 10\%$ .



**Figura 6.8.** – MPS de ALG (2,5% p/p): (A – B) Imágenes de microscopía óptica de las MPs en agua ( $16,70 \pm 7,90 \mu\text{m}$ ); (C - E) Imágenes de microscopía SEM de las MPs en polvo seco; (F) Histograma de distribución del tamaño de partícula tras el tamizado ( $4,80 \pm 1,60 \mu\text{m}$ ) (N = 150).

### 6.3.6 Carga del antibiótico sulfato de colistina (CLS) en las micropartículas de alginato

Las micropartículas de alginato se pusieron en contacto con una disolución acuosa que contenía el sulfato de colistina a una relación de masa fármaco/masa polímero del 35% p/p. El sulfato de colistina se mantuvo en contacto con las micropartículas durante 16 h y, posteriormente, las micropartículas se recuperaron por filtración. Una vez incorporado el antibiótico, las micropartículas de alginato se secaron siguiendo el protocolo descrito en el [Capítulo 2, Punto 2.1.2.4.](#) y representado en el *Esquema 6.1.*



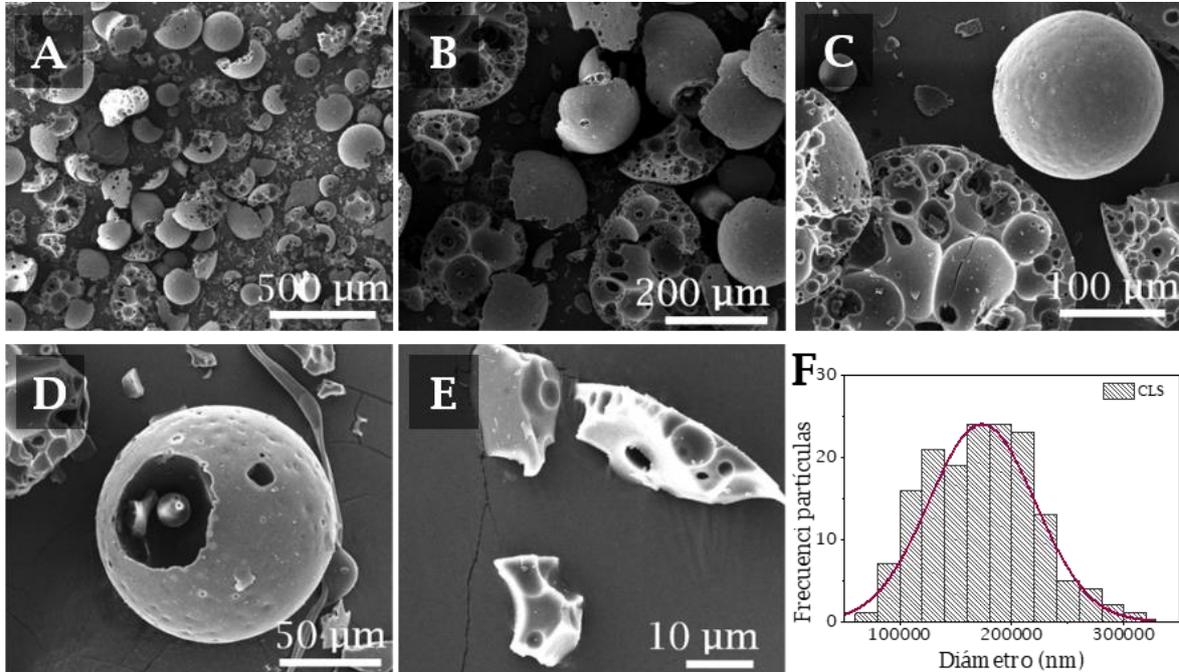
**Esquema 6.1.** – Obtención de las MPs de ALG@CLS en forma de polvo seco.

## 6.4 Caracterización de las micropartículas basadas en alginato

### 6.4.1 Caracterización físico – química

Se estudió la cristalinidad de las micropartículas producidas en comparación con el fármaco puro mediante XRD. La carga superficial de las partículas se obtuvo mediante la medida del potencial  $\xi$  y la presencia del sulfato de colistina en las micropartículas se comprobó mediante EDX y FTIR. Las técnicas, condiciones de caracterización y protocolos seguidos para la caracterización de las micropartículas basadas en el polímero alginato se encuentran descritas en el [Anexo I.](#)

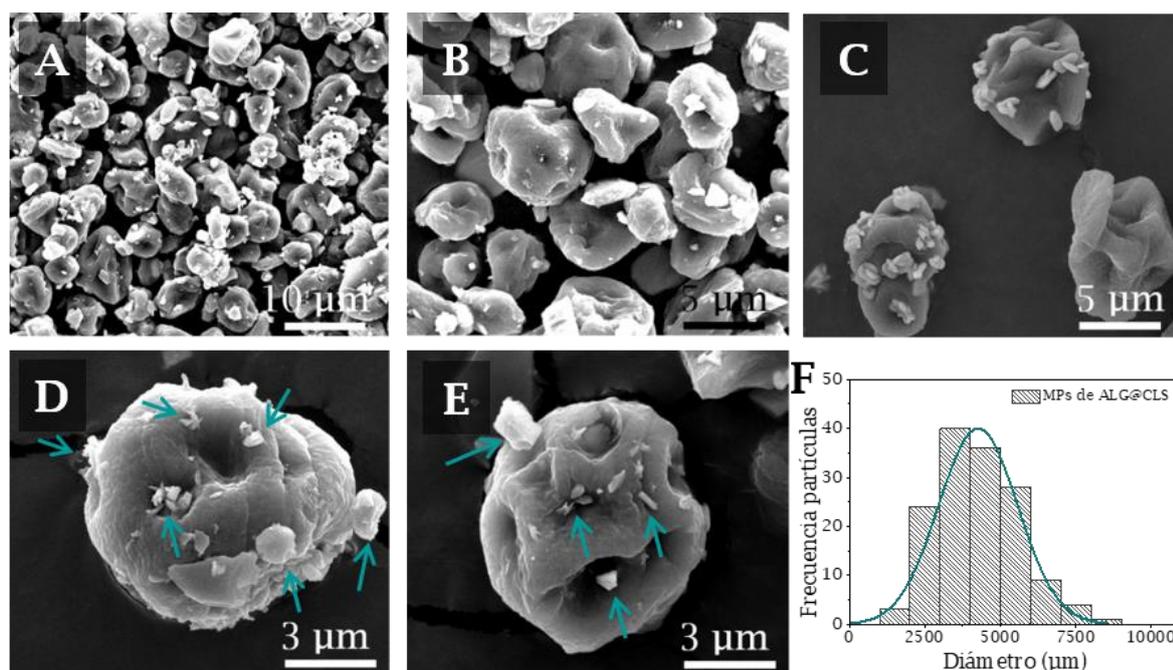
En la *Figura 6.9* se puede observar como el sulfato de colistina (MP Biomedicals, LLC, EE. UU.) presenta una morfología esférica con huecos en su interior con un tamaño medio en torno a 170  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6.9.** - (A - E) Imágenes de microscopía SEM del CLS puro; (F) Histograma de distribución del tamaño de partícula del antibiótico puro ( $d_p = 173,30 \pm 47,50 \mu\text{m}$ ) (N= 150).

En la *Figura 6.10* se muestran imágenes de microscopía SEM de las micropartículas de alginato con sulfato de colistina obtenidas en forma de polvo seco. La distribución de tamaños de las micropartículas de alginato con y sin antibiótico fue muy similar, con tamaños de  $4,80 \pm 1,60$  y  $4,45 \pm 1,40 \mu\text{m}$  respectivamente (*Tabla 6.6*).

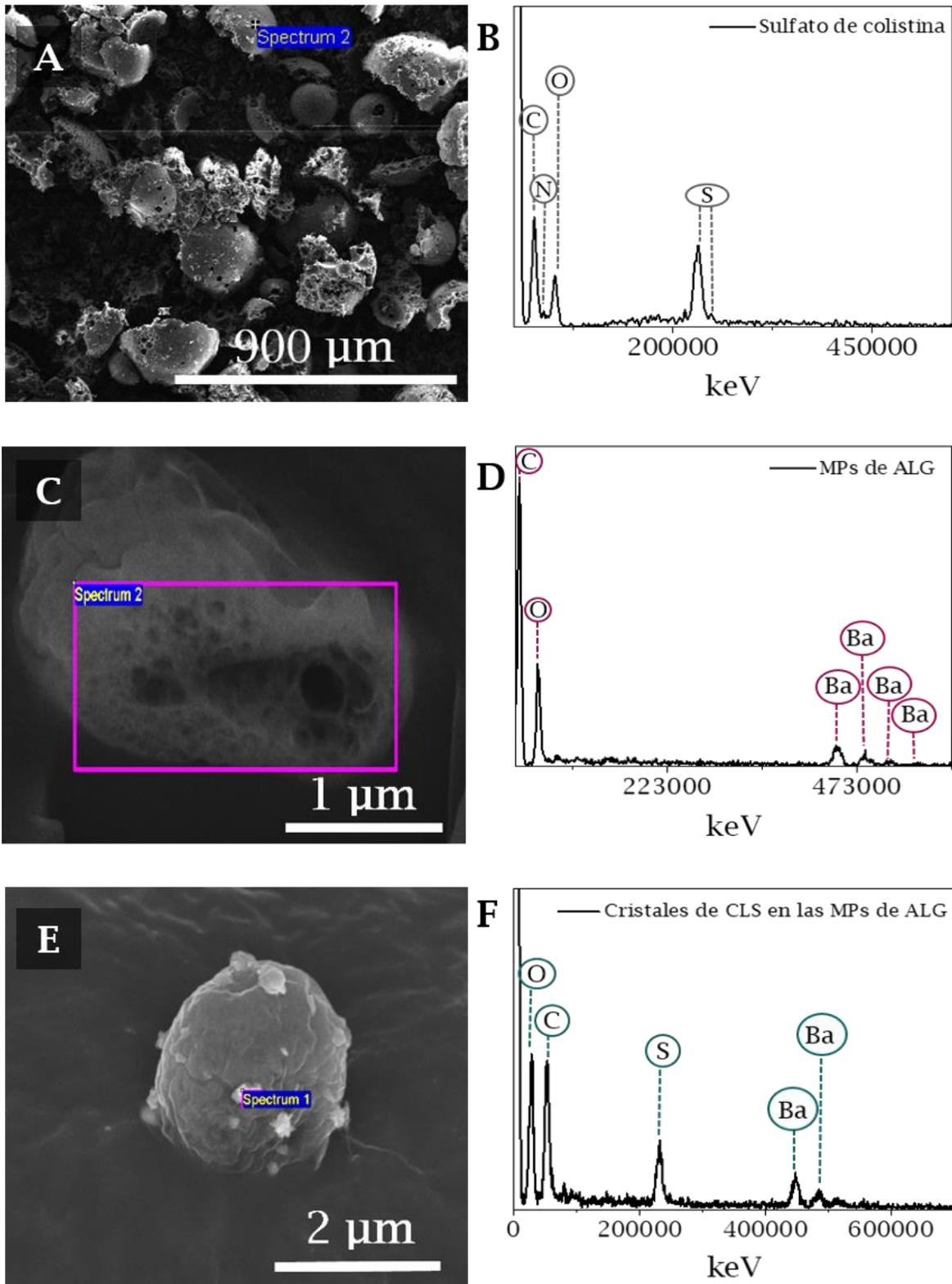
El tamaño de partícula obtenido es adecuado para su administración por vía inhalatoria ( $\leq 5 \mu\text{m}$ ). De forma similar a lo observado anteriormente, las micropartículas de alginato con sulfato de colistina también mostraron una morfología con forma redondeada. Además de la presencia de cavidades y hendiduras en la superficie debido al proceso de secado.



**Figura 6.10.** -MPs de ALG@CLS: (A - E) Imágenes de microscopía SEM, las flechas azules señalan los cristales de CLS en la superficie de las MPs; (F) Histograma de distribución del tamaño de partícula ( $4,45 \pm 1,40 \mu\text{m}$ ) ( $N = 150$ ).

Por otro lado, resultan de especial interés los cristales que se observan en la superficie de las micropartículas de alginato con sulfato de colistina. Se realizó un mapeo de composición química de las micropartículas basadas en alginato, así como del fármaco puro analizando la señal de azufre mediante EDX. Los análisis composicionales revelaron que el azufre (S) solo estaba presente en el fármaco puro (CLS) y no en las micropartículas de alginato vacías.

En el caso de las micropartículas de alginato con sulfato de colistina los cristales presentes en la superficie de las micropartículas contenían S (*Figura 6.11* y *Tabla 6.5*), correspondiendo por tanto al fármaco incorporado a las micropartículas de alginato. Los cristales mostraron una morfología variada y su tamaño se midió basándose en el eje mayor ( $0,79 \pm 0,35 \mu\text{m}$ ) y el eje menor ( $0,43 \pm 0,14 \mu\text{m}$ ). Es decir, el sulfato de colistina recristalizado sobre las micropartículas de alginato mostró un tamaño 175 veces más pequeño en comparación con el fármaco inicial (*Figura 6.9*).

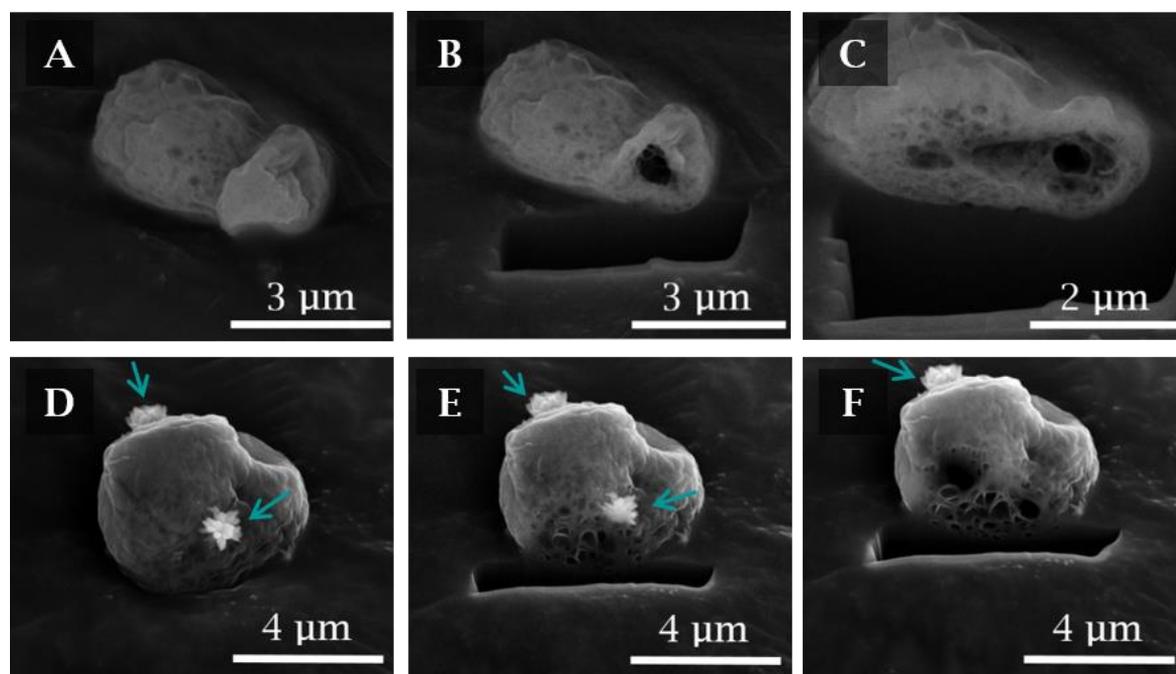


**Figura 6.11.** - (A) CLS comercial; (B) Espectro EDX del CLS; (C) MPs de ALG; (D) Espectro EDX de las MPs de ALG; (E) MPs de ALG@CLS en su superficie; (F) Espectro EDX de los cristales de CLS en la superficie de las MPs de ALG

**Tabla 6.5** - Análisis químico mediante EDX del fármaco comercial y de las micropartículas de alginato antes y después de la carga de sulfato de colistina.

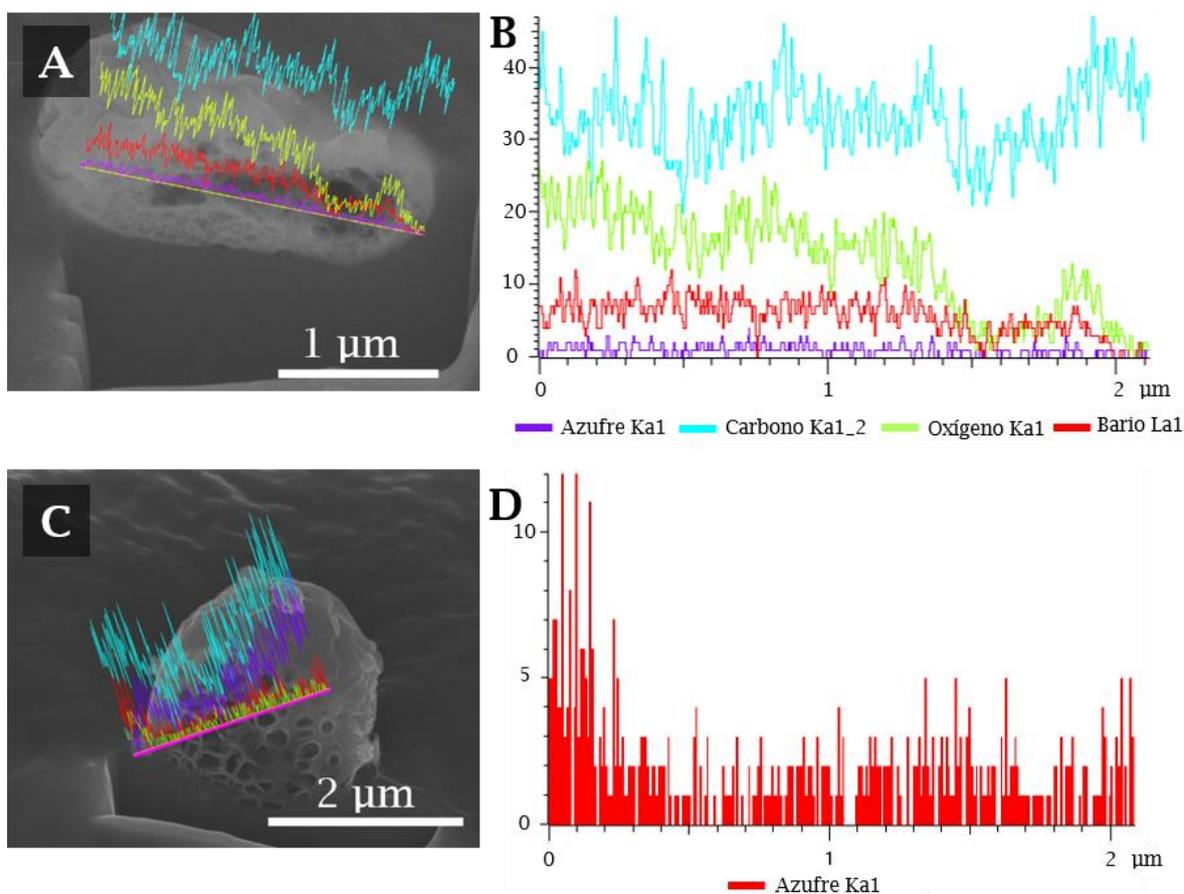
	Sulfato de colistina	MPs de ALG	MPs ALG@CLS
<b>Elemento</b>		<b>% atómico</b>	
C K	54,2	68,7	66,1
N K	19,3	25,6	13,6
O K	18,2	5,7	17,8
S K	8,3	-	0,9
Ba L	-	-	1,6
<b>Total</b>	100,0	100,0	100,0

Para estudiar la morfología interior de las micropartículas, éstas se seccionaron transversalmente con un haz de iones y electrones acoplados al microscopio SEM Nova NanoLab 200 enfocado sobre la superficie de las partículas. En la *Figura 6.12*. Se puede observar una estructura interna porosa y carente de fármaco en su interior para los dos tipos de micropartículas de alginato a partir de las secciones transversales realizadas.



**Figura 6.12.** - Vista de la estructura interna de las MPs después de realizar varios cortes de sección con el microscopio Dual - Beam en progresión: (A - C) MPs de ALG; (D - F) MPs de ALG@CLS (las flechas azules indican los microcristales de sulfato de colistina en la superficie).

Finalmente, el análisis composicional a lo largo de la sección transversal de las micropartículas de alginato con sulfato de colistina reveló un aumento en la señal de azufre solo en la superficie, correspondiente a la presencia de cristales del antibiótico (*Figura 6.13*). Estos resultados coincidieron con lo obtenido mediante los espectros EDX (*Figura 6.11*) y por las imágenes de microscopía SEM (*Figura 6.10* y *6.12*).



**Figura 6.13.** - Análisis interno de la composición a lo largo de la trayectoria marcada con una línea rosa en la figura: (A) MPs de ALG; (B) Análisis composicional (códigos de color: Azul = Oxígeno, verde = Bario, púrpura = Nitrógeno, rojo = Azufre); (C) MPs de ALG@CLS; (D) Detalle del perfil de azufre con altas concentraciones en la superficie de la partícula.

Las micropartículas basadas en alginato mostraron un potencial  $\xi$  negativo a diferencia del sulfato de colistina puro, con un valor de potencial  $\xi$  positivo debido a la presencia de numerosos grupos amino en su estructura (*Capítulo 1, Tabla 1.2*). Se observó que las micropartículas de alginato tenían un potencial  $\xi$  más negativo que las micropartículas unidas a los cristales de

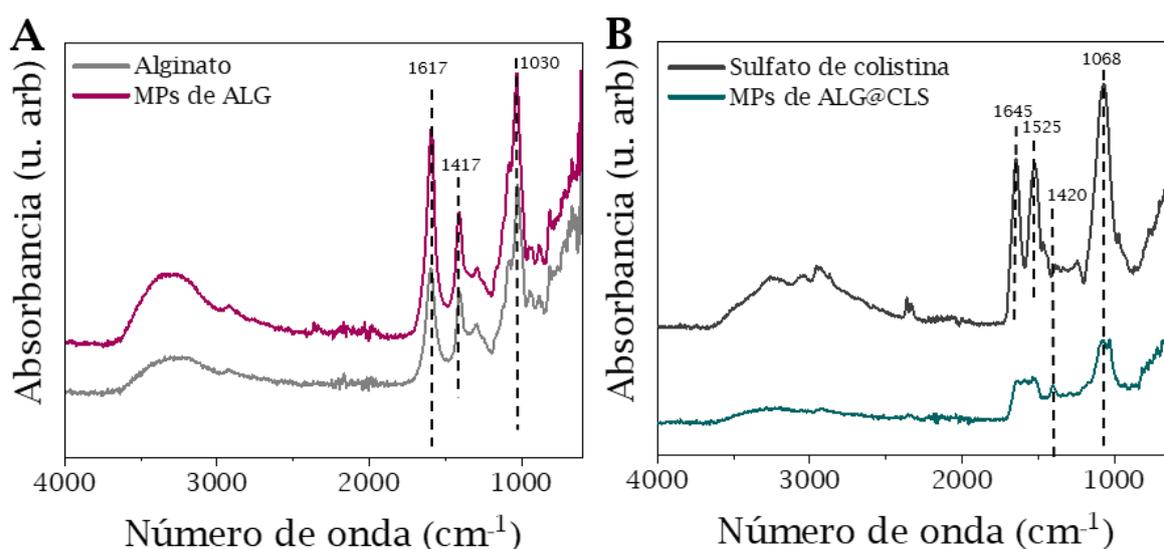
sulfato de colistina (*Tabla 6.6*). Una posible explicación de esta diferencia de carga superficial se debe a que los grupos carboxilo ( $-\text{COO}^-$ ) presentes en la superficie del alginato podrían encontrarse unidos a los grupos amino ( $-\text{NH}_3^+$ ) presentes en el sulfato de colistina, haciendo que disminuyese el valor del potencial  $\xi$  negativo de las micropartículas con fármaco.

**Tabla 6.6** - Caracterización del fármaco sulfato de colistina (CLS) y de las micropartículas de alginato con y sin fármaco.

Muestras	SEM					Potencial
	$d_p$ (media $\pm$ DE) ( $\mu\text{m}$ )	D10 ( $\mu\text{m}$ )	D50 ( $\mu\text{m}$ )	D90 ( $\mu\text{m}$ )	Span	$\xi$ (mV)
<b>Sulfato de Colistina</b>	173,3 $\pm$ 47,5	108,9	177,1	229,9	0,68	+7,40
<b>MPs de ALG</b>	4,80 $\pm$ 1,60	2,9 $\pm$ 0,3	4,6 $\pm$ 0,8	6,7 $\pm$ 0,8	0,84	-35,14
<b>MPs de ALG@CLS</b>	4,45 $\pm$ 1,40	2,8 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,1	0,85	-14,14
<b>Cristales de sulfato de colistina</b>						
Eje mayor	0,79 $\pm$ 0,35	0,41	0,70	1,30	1,27	-
Eje menor	0,43 $\pm$ 0,14	0,26	0,42	0,63	0,88	-

Las interacciones entre los grupos  $-\text{COO}^-$  y  $-\text{NH}_3^+$  comentadas anteriormente se confirmaron mediante espectroscopia FTIR (*Figura 6.14*). En los espectros de alginato puro tanto en el polvo comercial como en las partículas de alginato producidas se pueden observar dos picos principales en  $1617\text{ cm}^{-1}$  y  $1417\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a los estiramientos asimétricos y simétricos de los grupos carboxilos procedentes de la sal de alginato. Se observa un tercer pico en  $1030\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye a su estructura de polisacárido (estiramiento C-O-C) [396,397]. En el caso del fármaco sulfato de colistina, se identificaron tres bandas principales. Dos picos a  $1645\text{ cm}^{-1}$  y  $1525\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la amina I (estiramiento C=O) y la amina II (flexión N-H) respectivamente, y un tercer pico correspondiente al estiramiento C-N a

1068  $\text{cm}^{-1}$  [56]. Sin embargo, en el caso de las micropartículas de alginato con sulfato de colistina, el análisis reveló la aparición de un nuevo pico en 1420  $\text{cm}^{-1}$  atribuido a la interacción producida entre los grupos  $-\text{NH}_3^+$  del sulfato de colistina con los grupos  $-\text{COO}^-$  procedentes del alginato. Este pico se ha podido observar en otros estudios como resultado de la interacción entre los grupos  $-\text{NH}_3^+$  del quitosano y los grupos  $-\text{COO}^-$  procedentes del alginato [398]. Se puede concluir por tanto que se produjo la interacción entre ambos grupos.

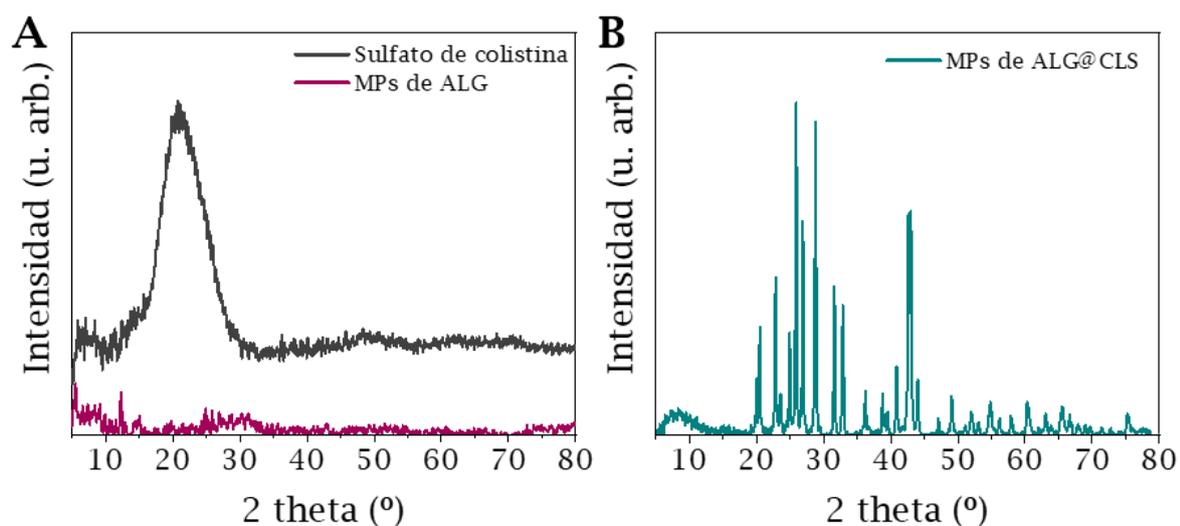


**Figura 6.14.** – Espectros FTIR: (A) Alginato en polvo y MPs de ALG; (B) Sulfato de colistina puro y MPs de ALG@CLS.

El patrón de XRD obtenido para el fármaco sulfato de colistina mostró un pico ancho y poco intenso próximo a  $20,2^\circ$ , mientras que el patrón de las micropartículas de alginato no reveló la presencia de ningún pico característico, lo que concuerda con la naturaleza amorfa de ambas sustancias (*Figura 6.15A*). Sin embargo, el protocolo seguido para la obtención de las MPs de Alg@CLS compuesto por (i) disolución del fármaco en disolución acuosa y (ii) posterior intercambio etanol-agua, generó una recristalización del sulfato de colistina, provocando una conversión desde su forma amorfa a su forma cristalina tal y como se observa en la *Figura 6.15B*.

El proceso de cristalización habitualmente se divide en tres etapas: (1) sobresaturación; (2) nucleación; (3) crecimiento de los cristales. Raghavan *et al.*, [399] estudiaron el papel que desempeñaban los polímeros en los procesos de

cristalización de los fármacos. En su estudio sugirieron que en las dos últimas etapas del proceso de cristalización se produce la interacción a través de puentes de hidrógeno entre el fármaco y el polímero empleado. Los cristales que se forman en presencia de polímeros son por lo general más pequeños que aquellos que se forman en ausencia de éstos. Este fenómeno se ha estudiado en fármacos como el acetato de hidrocortisona (corticoesteroide) [399] o en la carbamazepina (antiepiléptico) [400]. Por otro lado, en fármacos como el ibuprofeno (antiinflamatorio no esteroideo) se ha examinado la influencia de los disolventes empleados en el proceso de cristalización, revelando que el uso de etanol muestra un crecimiento de los cristales en forma poliédrica o con forma de grano mientras que con el uso de hexano, los cristales muestran un crecimiento en forma de aguja (*Figura 6.10*) [401].



**Figura 6.15.** - Difractogramas XRD en estado sólido de: (A) CLS y MPs de ALG; (B) MPs de Alg@CLS.

Las imágenes obtenidas por microscopía SEM mostraron que los microcristales de sulfato de colistina están presentes en la superficie externa de las micropartículas de alginato, lo que sugiere que el proceso de sobresaturación del medio y posteriormente una nucleación heterogénea en sitios favorables de la superficie sean los pasos iniciales en este proceso.

Las estructuras amorfas son sistemas de menor orden que las cristalinas, y termodinámicamente tienen un exceso de energía libre cuando se comparan

con ellas, que mejora la solubilidad y biodisponibilidad del fármaco [402]. Sin embargo cuando se trata de un fármaco que ya presenta altos valores de solubilidad en medio acuoso como es el sulfato de colistina (~ 50 mg/mL), su estructura cristalina muestra una mayor estabilidad físico-química en comparación con su forma amorfa [403]. La forma amorfa de un fármaco favorece una mayor absorción de agua a valores altos de humedad relativa produciendo aglomeración y, en consecuencia, una disminución de la cantidad de fármaco respirable, además de un posible deterioro del fármaco inducido por la humedad. Por estas razones, la mayoría de los inhaladores comerciales están basados en principios activos con estructura cristalina, ya que poseen una mayor estabilidad con el tiempo, aunque en ocasiones, su solubilidad en agua se vea reducida [404].

#### **6.4.2 Estudio de la cinética de liberación del antibiótico sulfato de colistina**

El sulfato de colistina presente en el sobrenadante tras el proceso de anclaje se determinó mediante H-RMN, permitiendo calcular la cantidad de sulfato de colistina en las micropartículas (Punto 6.3.6). También se calcularon los valores de carga de fármaco ( $CF = 8,5 \pm 1,5\%$  p/p) y de eficiencia de encapsulación ( $EE = 28,80 \pm 1,1\%$  p/p) del proceso. La cinética de liberación del antibiótico en las micropartículas de alginato con sulfato de colistina se siguió mediante UPLC (Anexo I, Sección I.3).

La presencia del sulfato de colistina únicamente en la superficie de las micropartículas de alginato (Punto 6.4.1) sugirió no utilizar modelos tradicionales como son Peppas - Shalin [320] o Higuchi [349], ya que en este tipo de modelos se incluye la difusión del fármaco desde el interior de la partícula y/o involucran procesos de erosión. Se consideró más adecuado el empleo de modelos de disolución para explicar el proceso de liberación en este caso. Los datos experimentales fueron analizados por el Dr. Álvaro González-Garcinuño con el programa gPROMS empleando el modelo de Noyes - Whitney [405], el cual se encuentra resumido en el Anexo II, Punto II.3.

Los experimentos para determinar la cinética de liberación se hicieron en medio PBS ([Anexo I, Punto I.3.1](#)), se observó que el 100% del fármaco se liberó de las MPs de Alg@CLS en un tiempo máximo de 4 h. La mayor parte del sulfato de colistina (aproximadamente un 70%) se liberó dentro de la primera hora. La *Figura 6.16* muestra la liberación acumulada del antibiótico (%) desde las micropartículas de alginato con sulfato de colistina a 37 °C en función del tiempo y la predicción aportada por el modelo propuesto.

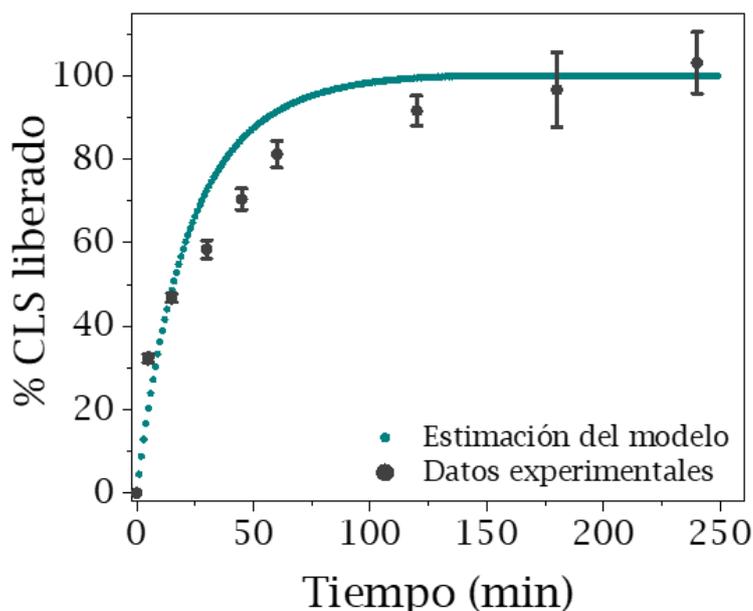
Los parámetros del modelo se estimaron de acuerdo a lo descrito en el [Anexo II, Punto II.3](#). Aplicando el modelo Noyes-Whitney [405] resumido en la ecuación 6.1:

$$\frac{dC}{dt} = k \times S_w \times (C_\infty - C) \quad \text{Ec. (6.1)}$$

donde  $C$  representa la concentración del fármaco,  $C_\infty$  es la concentración máxima liberada,  $k$  es la velocidad de disolución intrínseca y  $S_w$  es el área de la sección transversal del cristal de sulfato de colistina (*Tabla 6.6*).

Los resultados obtenidos de los tres parámetros estimados ( $D$ ,  $k$ , y  $m$ ) y del análisis estadístico del ajuste realizado se encuentran recogidos en las ecuaciones II.3 y II.5 y en la *Tabla II.1* ([Anexo II](#)). El valor calculado para la velocidad de disolución intrínseca ( $k$ ) fue de  $2,35 \times 10^8$  1/m<sup>2</sup>s, el cual se encuentra dentro del rango de los resultados publicados para otros fármacos. Skinner et al., [406] describen en su estudio la disolución del fármaco josamicina en forma cristalina (antibiótico perteneciente al grupo de los macrólidos). La constante de disolución intrínseca tuvo un valor de  $5,1 \times 10^8$  1/m<sup>2</sup>s muy similar al obtenido para la disolución del sulfato de colistina cristalino.

Esta liberación tan rápida se debe a la alta solubilidad del sulfato de colistina en medios acuosos (~ 50 mg/mL) y es de especial interés para el tratamiento de infecciones respiratorias.



**Figura 6.16.** – Liberación acumulada de fármaco (%) en función del tiempo (min) en PBS y estimación del modelo (media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ).

## 6.5 Ensayos *in vitro* en células pulmonares y actividad antimicrobiana

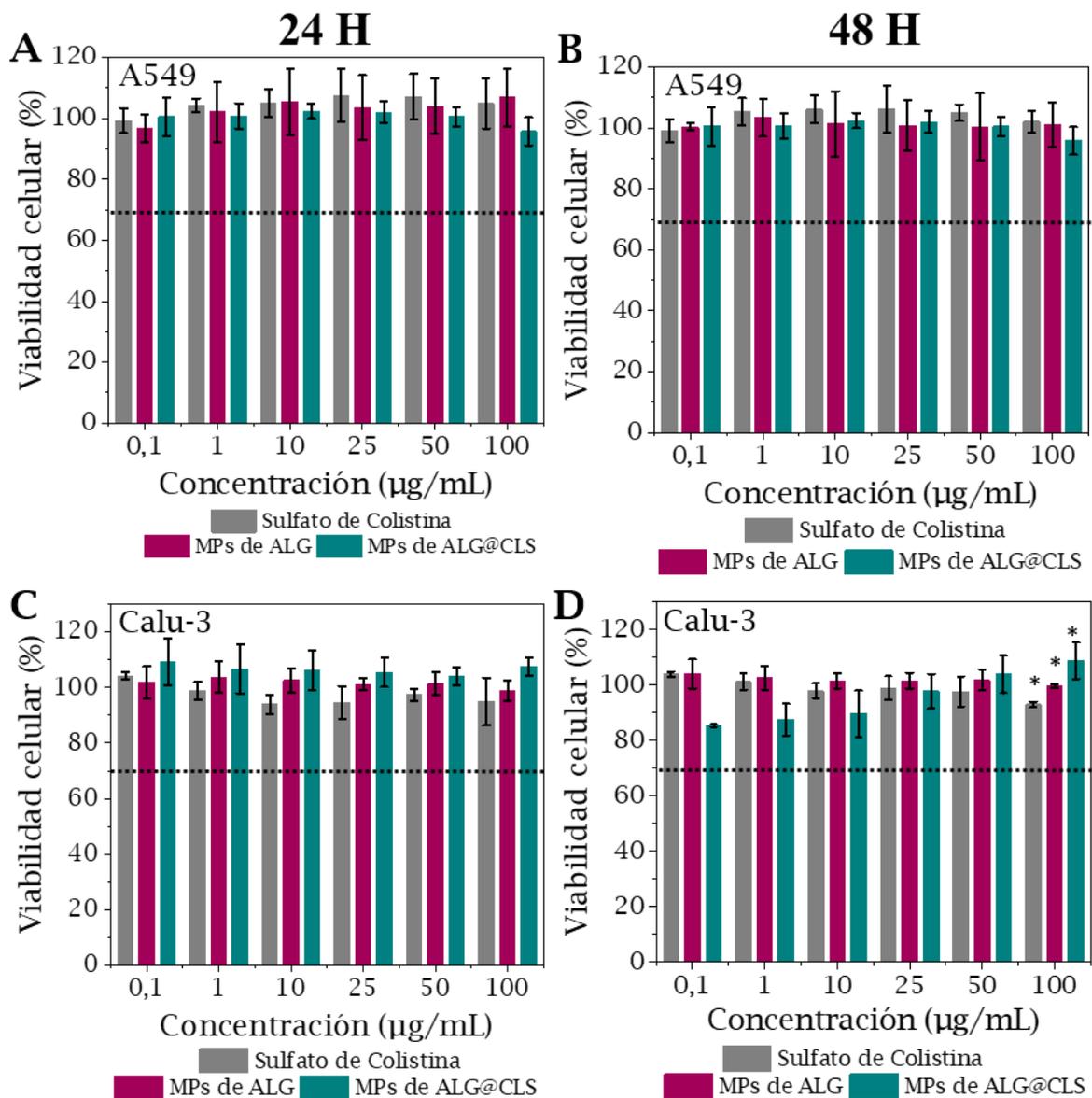
Los ensayos *in vitro* realizados con las micropartículas basadas en alginato se llevaron a cabo con dos líneas celulares procedentes de pulmón, A549 y Calu-3. Además, se evaluó la actividad antimicrobiana de los cristales de sulfato de colistina en el modelo bacteriano *P. aeruginosa* (Gram-negativa). Los protocolos seguidos para el desarrollo de los ambos estudios *in vitro* se encuentran detallados en el [Capítulo 2](#).

### 6.5.1 Ensayos de citotoxicidad celular

La evaluación de la viabilidad celular y el posible efecto citotóxico del antibiótico puro y de las micropartículas de alginato con y sin sulfato de colistina se efectuó realizando el ensayo de Alamar Blue.

Las células tratadas con las micropartículas de alginato con sulfato de colistina mostraron una viabilidad muy similar a las células tratadas con las micropartículas de alginato libres de antibiótico (*Figura 6.17*). Además, ninguna

muestra estudiada mostró un efecto supresor sobre los valores de viabilidad celular de A549 y Calu-3 ya que los valores obtenidos fueron superiores al 70%. Ambos tipos de micropartículas y el antibiótico libre, se consideraron biocompatibles a una concentración  $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ .



**Figura 6.17.** – Viabilidad celular tras exposición al CLS y a las MPs de ALG con y sin CLS a 24 y 48 h: (A – B) Línea celular A549; (C – D) Línea celular Calu-3. Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). \*Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras en relación al CLS libre. La línea negra discontinua indica el 70% de viabilidad celular, de acuerdo a la norma ISO 10993-5.

Es importante destacar que la concentración más alta analizada fue de  $100 \mu\text{g/mL}$ , aproximadamente 25 veces mayor que el valor de MBC ( $4 \mu\text{g/mL}$ )

para *P. aeruginosa* [407]. De esta forma, la administración de estas micropartículas permitiría eliminar la infección provocada por esta bacteria utilizando una concentración superior a la MBC sin generar citotoxicidad en las células epiteliales de las vías respiratorias humanas.

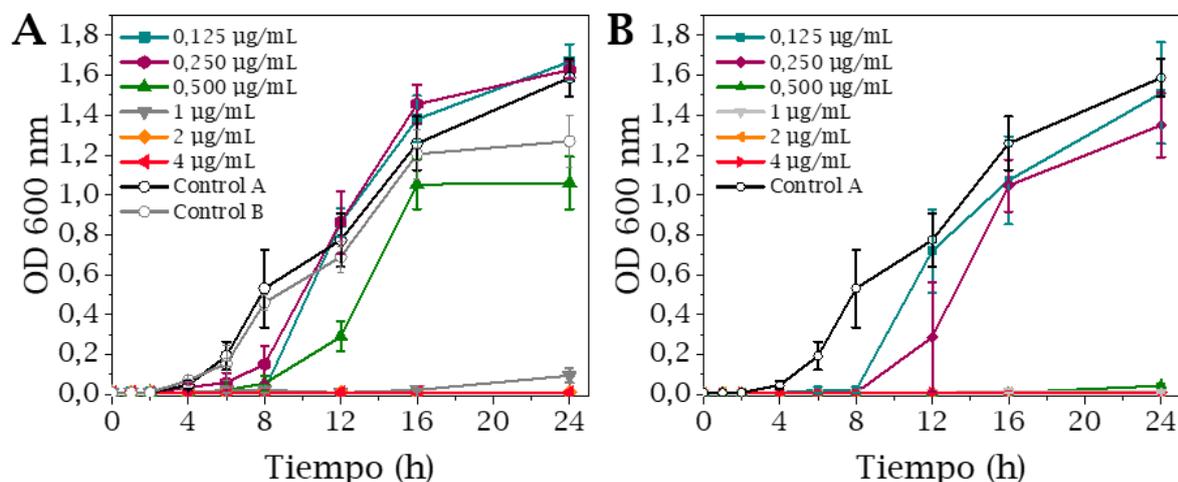
### 6.5.2 Actividad antimicrobiana en *P. aeruginosa*

La actividad antimicrobiana tanto del antibiótico puro como de los microcristales de sulfato de colistina se evaluó de tres maneras diferentes

En primer lugar, se hizo un seguimiento del crecimiento de *P. aeruginosa* midiendo el valor de la densidad óptica (OD600) de diferentes suspensiones bacterianas en tratamiento con concentraciones crecientes equivalentes de sulfato de colistina libre y anclado a las micropartículas. Las curvas de crecimiento (*Figura 6.18*) mostraron una reducción del crecimiento bacteriano con un aumento de la concentración de antibiótico en el medio. Las micropartículas de alginato con sulfato de colistina provocaron un retraso en la aparición de la fase logarítmica en el ciclo de crecimiento bacteriano a la concentración de 0,250 µg/mL. Sin embargo, en el caso del antibiótico libre, el retardo en el crecimiento se observó a una concentración mayor, 0,500 µg/mL. Los resultados reflejan que en presencia de concentraciones > 0,250 µg/mL existe una fase de latencia hasta las 8 h en comparación con el grupo control, cuyo crecimiento comienza a partir de las 4 h. A esta misma concentración, en el caso de las bacterias tratadas con el antibiótico libre, la fase de crecimiento (logarítmica) no comenzó hasta las 12 h, mostrando la sensibilidad de *P. aeruginosa* frente al sulfato de colistina.

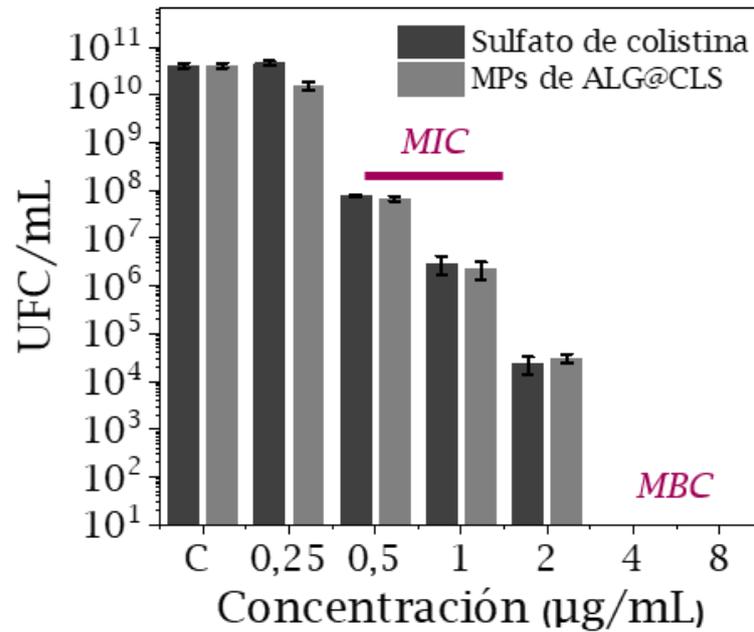
En base a estos resultados, el valor de MIC se fijó en 0,500 - 1 µg/mL, rango de concentraciones a las que se comenzó a observar una inhibición del crecimiento bacteriano. El valor de la MBC se estableció en 4 - 8 µg/mL concentración a la que se observó una ausencia de crecimiento. Los valores de MIC y MBC obtenidos coincidieron con lo reportado previamente en bibliografía [407,408] y confirmaron que el proceso de anclaje del fármaco a las micropartículas, no afectó a su actividad antimicrobiana frente a *P. aeruginosa*.

Los valores de MIC y MBC se confirmaron mediante el método de diluciones seriadas en agar (*Figura 6.19*). Los valores de MIC y MBC fueron de 0,500 a 1  $\mu\text{g/mL}$  y  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  respectivamente para ambas muestras.



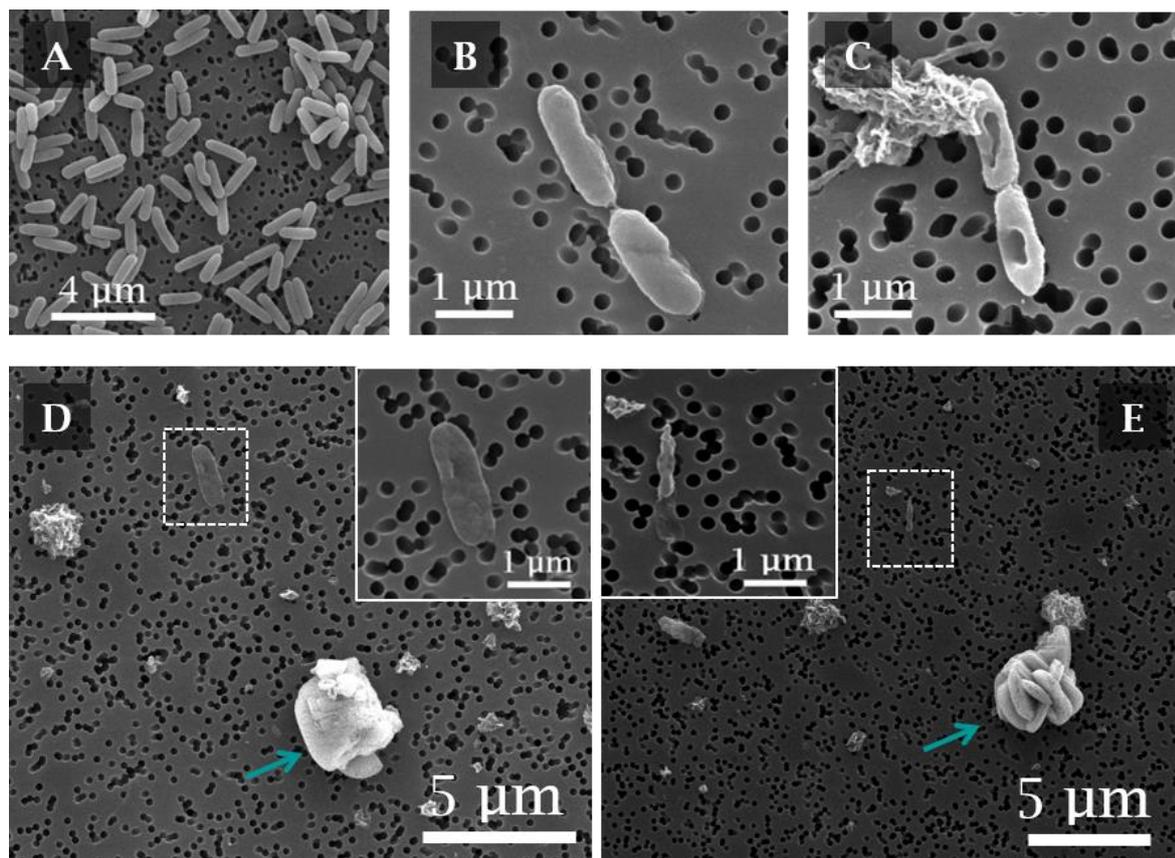
**Figura 6.18.** - Curvas de crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* obtenidas mediante medidas de la densidad óptica (600 nm): (A) CLS libre; (B) MPs de ALG@CLS. Las concentraciones en  $\mu\text{g/mL}$  de antibiótico hacen referencia al CLS tanto libre como anclado en las MPs de Alg.

Finalmente, los cambios morfológicos en *P. aeruginosa* tras el tratamiento con las diferentes muestras se estudiaron mediante microscopía SEM. El grupo control (bacterias sin tratamiento) reveló una morfología normal con forma de bastón y un tamaño aproximado de 0,5 - 1  $\mu\text{m}$  de ancho y de 1,5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo. La membrana de estas bacterias fue lisa, sin presencia de hendiduras o arrugas (*Figura 6.20A*). Por el contrario, tras 24 h de incubación de las bacterias con sulfato de colistina, ya fuese libre o en las micropartículas de alginato con sulfato de colistina, se observaron grandes cambios en su morfología. La integridad de la membrana de *P. aeruginosa* se vio afectada, con orificios y deformaciones claramente visibles por microscopía SEM. Además, cuando las bacterias estuvieron en contacto con las micropartículas de alginato con sulfato de colistina a concentraciones superiores al valor de MIC, se produjo la muerte celular bacteriana (*Figuras 6.20D y 6.20E*).



**Figura 6.19.** - UFC/mL del CLS frente a *P. aeruginosa* (media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ; \*Diferencias significativas ( $p < 0,05$ )). Las concentraciones en  $\mu\text{g/mL}$  hacen referencia al CLS tanto libre como anclado a las MPs de ALG.

El sulfato de colistina se libera de las micropartículas de alginato en un corto periodo de tiempo, aproximadamente 4 h, (Figura 6.16) por lo que es capaz de mostrar actividad antimicrobiana desde el momento en el que se añade al cultivo bacteriano. Diversos estudios han revelado [53,409] que los grupos amino presentes en el sulfato de colistina, con carga positiva a pH fisiológico, desempeñan un papel central por su interacción con los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana bacteriana cargados negativamente. De esta forma, el sulfato de colistina interactúa con la membrana externa de las bacterias Gram-negativas desplazando de manera competitiva los cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) que tienen como objetivo la unión de los lípidos de la membrana proporcionando estabilidad [53,409]. Las imágenes observadas por microscopia SEM (Figura 6.20) han mostrado un claro efecto del sulfato de colistina sobre la membrana externa bacteriana.



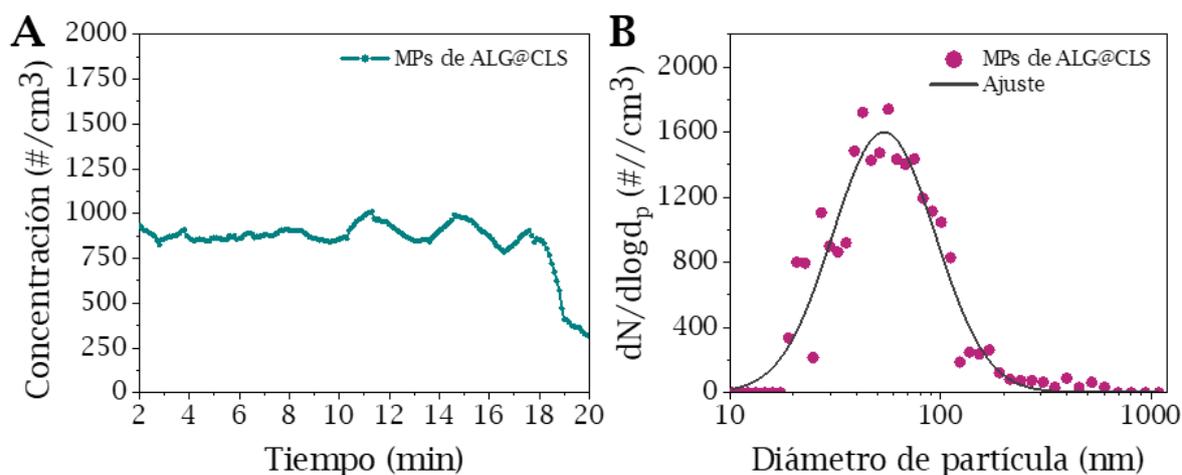
**Figura 6.20.** – Imágenes microscopía SEM de *P. aeruginosa*: (A) Muestra control (no tratada); (B) Después del tratamiento con CLS libre; (C) Después del tratamiento con MPs de ALG@CLS; (D - E) Tras el contacto con MPs de ALG@CLS. La zona ampliada muestra a *P. aeruginosa* muerta, las flechas azules indican las MPs de ALG@CLS presentes en el cultivo bacteriano.

## 6.6 Generación de aerosoles

Para la realización de los experimentos se empleó el generador de aerosoles UNIZAR descrito en [Capítulo 3, Sección 3.2](#). Brevemente, las condiciones de aerosolización empleadas fueron de 4 barg en la cámara principal (cámara de expansión) y de 8 barg en la cámara secundaria (reservorio de aire). En el depósito situado entre ambas cámaras se colocaron  $15 \pm 2$  mg de micropartículas de alginato con sulfato de colistina en forma de polvo seco. Tras la aerosolización neumática de la muestra, se extrajo una corriente continua de aerosol microparticulado de la cámara de expansión. La caracterización de la corriente de aerosol obtenida se realizó en términos de distribución de tamaño de partícula y concentración de número de partículas

por  $\text{cm}^3$  ( $\#/\text{cm}^3$ ) y se midió con los contadores de partículas OPC y CPC (Anexo I, Sección I.4).

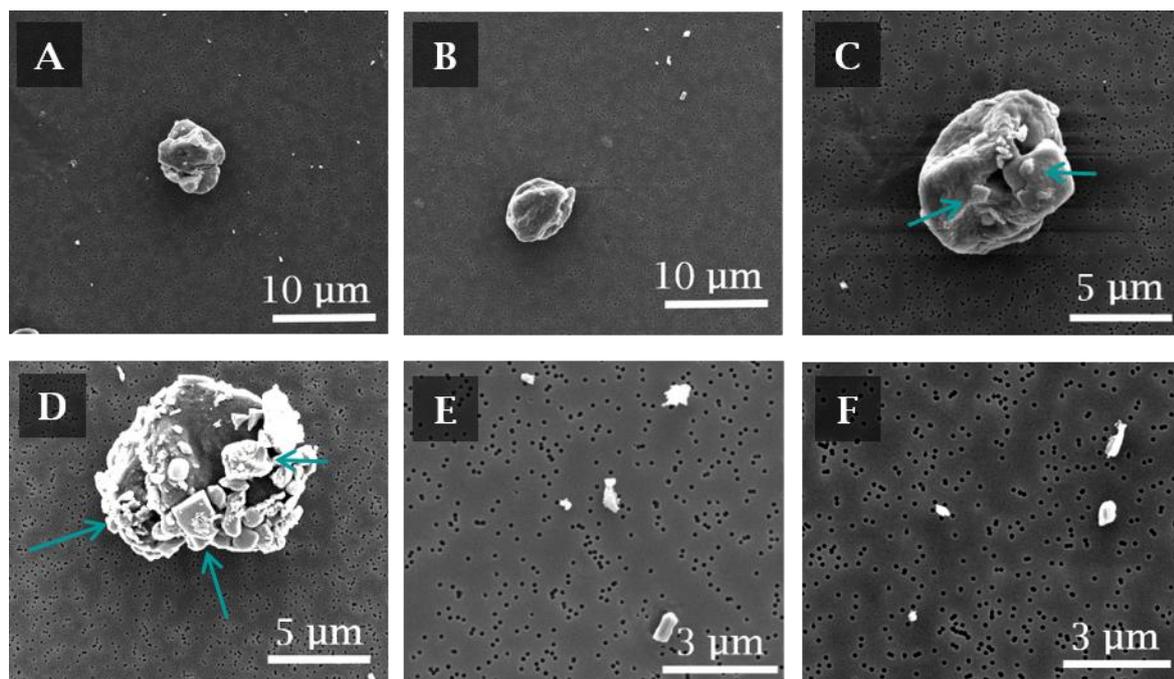
La corriente obtenida se ajustó a un flujo de 0,5 L/min, con una concentración de partículas en el intervalo de 0,3 a 20  $\mu\text{m}$  (medida por el OPC) de aproximadamente  $850 \#/\text{cm}^3$ , logrando una rápida estabilización del flujo que pudo mantenerse constante durante al menos 20 minutos (*Figura 6.21A*). Por otro lado, la concentración de partículas de menor tamaño, cristales de sulfato de colistina, que se separaron de las partículas de alginato durante el proceso de aerosolización se cuantificaron por CPC (fracción de 10 a 1000 nm). Se obtuvo la curva de distribución de tamaños que se muestra en la *Figura 6.21B*, en la cual se puede observar que hay un máximo en la distribución alrededor de  $56,7 \pm 1,8 \text{ nm}$ . Este tamaño corresponde a los cristales de sulfato de colistina más pequeños y, se atribuye al efecto erosivo del proceso de aerosolización, el cual es capaz de romper los cristales en fragmentos de tamaño nanométrico (*Figura 6.23*).



**Figura 6.21.** – Caracterización de la corriente de aerosol con las MPs de ALG@CLS: (A) Evolución temporal de la concentración de partículas entre 0,3 - 10  $\mu\text{m}$  medido por OPC; (B) Curva de distribución de tamaño de partículas entre 10 a 1000 nm medido por CPC.

En la *Figura 6.22* se muestran las imágenes SEM de las micropartículas capturadas en fase aerosol. Se observa como parte de los cristales de colistina aparecen aislados tras el proceso de aerosolización, mientras que otros se

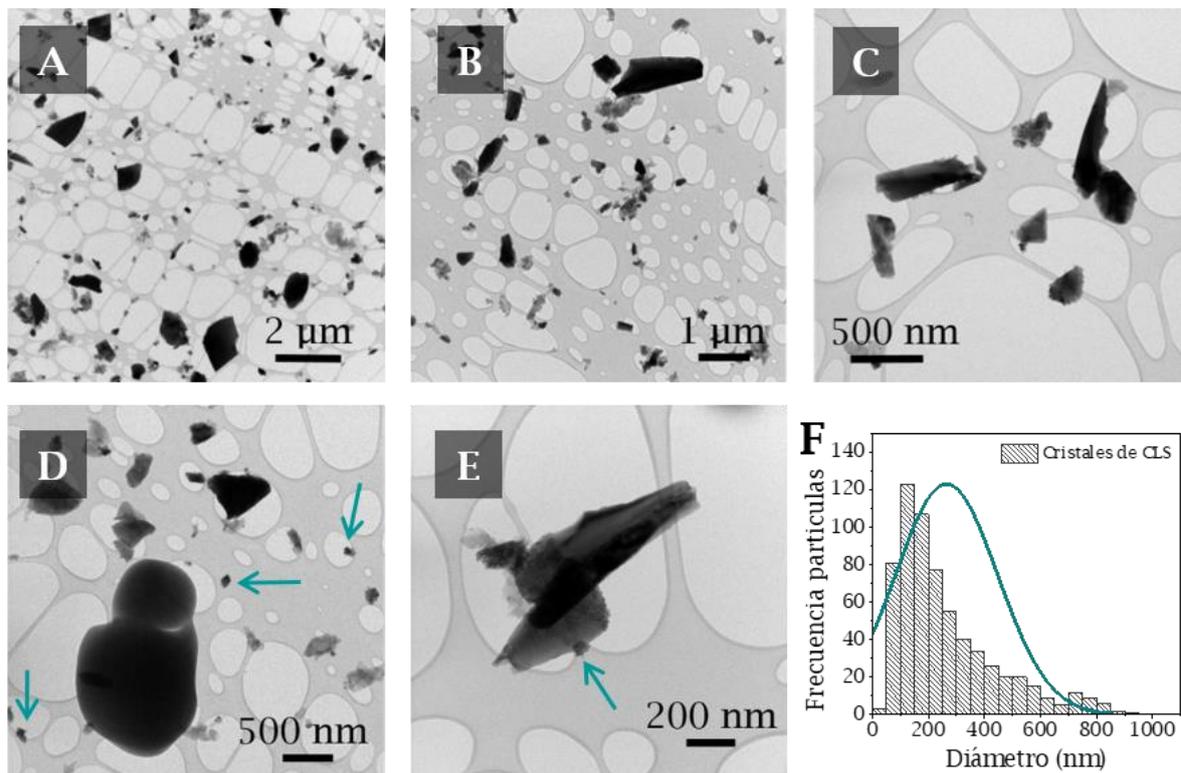
mantuvieron unidos a la superficie de las micropartículas. Los cristales de sulfato de colistina que se separaron de las micropartículas y que quedaron retenidos en el filtro de PC (*Figura 6.22E y 6.22F*), presentaron un tamaño medio  $< 1 \mu\text{m}$  ( $d_p = 436,8 \pm 259,9 \text{ nm}$ ). Sin embargo, estos cristales se pudieron observar mejor con la muestra de aerosol recogida en rejilla para su posterior observación por microscopía TEM (*Figura 6.23*).



**Figura 6.22.** -Imágenes de microscopía SEM de las MPs de ALG@CLS capturadas en tras su aerosolización en forma de polvo seco con el generador de aerosoles UNIZAR: (A - B) Vista general del filtro de policarbonato; (C - D) MPs de ALG@CLS (los cristales de CLS se han señalado con flechas azules); (E - F) Cristales de CLS disgregados de las MPs de ALG@CLS.

En la *Figura 6.22* se observa que los cristales de sulfato de colistina disgregados de las micropartículas de alginato mostraron formas y tamaños muy heterogéneos, semejantes a los observados previamente en la formulación de partida sobre la superficie de las micropartículas (*Figura 6.10, Punto 6.4.1*). La distribución del tamaño de los microcristales mostró una población muy polidispersa,  $d_p = 264,6 \pm 182,4 \text{ nm}$ , en la cual la población con un tamaño menor de 100 nm representó aproximadamente un 13% de la muestra capturada (*Figura 6.23F*).

Esta población de partículas de tamaño nanométrico, aunque representa una fracción muy pequeña, puede tener gran importancia en relación a la mejora de la efectividad del fármaco, ya que es un tamaño con deposición preferente en la zona alveolar. Las micropartículas de alginato sirven, por lo tanto, como portadores de los microcristales de sulfato de colistina facilitando su aerosolización y disgregación en un tamaño adecuado ( $< 1 \mu\text{m}$ ) para su suministro por vía inhalatoria.



**Figura 6.23.** – Imágenes de microscopía TEM de las MPs de ALG@CLS capturadas tras su aerosolización con el generador de aerosoles UNIZAR: (A – E) Cristales de CLS; (F) Histograma de distribución del tamaño de partícula de los cristales de CLS ( $d_p = 264,6 \pm 182,4 \text{ nm}$ ) ( $N = 650$ ). Las flechas azules indican los cristales de CLS con  $d_p < 100 \text{ nm}$ .

## 6.7 Conclusiones

Del estudio realizado en este Capítulo se obtienen las siguientes conclusiones:

- El proceso de atomización, tamizado y secado descrito permite obtener partículas de alginato en forma de polvo seco con un tamaño  $< 5 \mu\text{m}$ .
- Las micropartículas de alginato cargadas con sulfato de colistina mostraron un tamaño adecuado para su administración directa por vía inhalatoria. El valor de carga de fármaco fue alto, aproximadamente un 8% p/p, y el valor de eficiencia de encapsulación (%) del 28,80% p/p.
- Las micropartículas poseen una estructura interna porosa y los microcristales de sulfato de colistina están presentes únicamente en la superficie de las micropartículas de alginato.
- El pequeño tamaño de dichos microcristales, (alrededor de  $1 \mu\text{m}$ ), y su disposición superficial favorecen una rápida disolución del fármaco tras ponerse en contacto con la disolución de PBS que simuló el medio fisiológico.
- El 100% del sulfato de colistina asociado a las MPs se libera en un tiempo máximo de 4 h en PBS. Este perfil de liberación resulta de especial interés en el tratamiento de infecciones pulmonares bacterianas, donde la rápida disponibilidad del antibiótico desempeña un papel clave para impedir la propagación de la infección.
- El sulfato de colistina en las micropartículas mantuvo su mecanismo de acción antimicrobiana y mostró una fuerte actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* inhibiendo el crecimiento en concentraciones comparables o incluso más bajas que el antibiótico libre.
- Tanto el fármaco libre como las micropartículas con y sin fármaco mostraron una excelente biocompatibilidad en líneas celulares de pulmón, A549 y Calu-3.

- Los ensayos realizados con el generador de aerosoles UNIZAR revelaron la capacidad de disgregar los microcristales de colistina de la superficie de las micropartículas de alginato



# Capítulo 7

## OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS BASADAS EN EL ANTIBIÓTICO AZITROMICINA

---

*En este séptimo capítulo se desarrollan dos tipos de formulaciones inhalables en forma de polvo seco compuestas por micropartículas basadas en el antibiótico azitromicina. Una primera formulación incluye únicamente el antibiótico sin empleo de excipientes, y una segunda está formada por azitromicina junto con el fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Ambas micropartículas se obtuvieron por la técnica de electropulverización. El objetivo principal fue estudiar ambas formulaciones en vista a su posible aplicación como tratamiento inhalatorio de infecciones pulmonares. Al mismo tiempo, se evaluó si la incorporación de dicho fosfolípido en la segunda formulación proporcionaba alguna ventaja en la solubilidad y eficacia respecto al fármaco de partida. Por este motivo, tanto la caracterización como su estudio in vitro en células pulmonares se realizó con ambos tipos de micropartículas. Se concluyó que los mejores resultados se obtuvieron con las micropartículas de azitromicina sin DPPC, siendo éstas seleccionadas para su estudio en ensayos in vitro de deposición pulmonar y generación de aerosoles.*



## 7. OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS BASADAS EN EL ANTIBIÓTICO AZITROMICINA

### 7.1 Introducción

La azitromicina es un antibiótico perteneciente al grupo de los macrólidos con actividad antimicrobiana de amplio espectro frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [410]. Desde su descubrimiento en la década de los 70, la FDA ha aprobado su uso para el tratamiento de enfermedades respiratorias como la neumonía adquirida, exacerbaciones provocadas por la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o como terapia antiinflamatoria en pacientes con fibrosis quística [411]. La OMS clasifica la azitromicina como uno de los antibióticos más seguros dentro del sistema nacional de salud por los escasos efectos secundarios reportados en los estudios realizados con pacientes con enfermedades respiratorias [65,412]

Aunque la azitromicina es ampliamente usada en el tratamiento de infecciones respiratorias, cuando se administra por vía oral los valores de biodisponibilidad que presenta son bajos (~ 37%) [61]. Sin embargo, este antibiótico posee propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas que le confieren una alta capacidad de penetración en los tejidos, acumulándose en ellos [413]. Esta capacidad de acumulación en macrófagos y neutrófilos es muy importante para el desarrollo de los efectos inmunomoduladores que posee sobre bacterias intracelulares como *S. aureus* [414]. De los pacientes a los que se les administra azitromicina solo un pequeño porcentaje (1-5%) experimenta efectos secundarios, entre los más comunes se destacan malestar gastrointestinal, problemas auditivos, dolor de cabeza y/o mareos [415]. A pesar de que los macrólidos tienen un potencial riesgo cardiaco debido a una prolongación del intervalo QT<sup>c</sup>, no existen estudios hasta el momento que indiquen que la azitromicina produzca este efecto secundario, ya que no

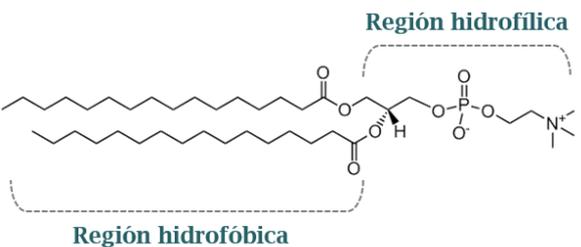
---

<sup>c</sup> En un electrocardiograma, el intervalo QT describe la despolarización y repolarización ventricular. El intervalo QT es medido desde el inicio de la onda Q hasta el final de la onda T. Si este intervalo se encuentra alterado, puede dar lugar a arritmias cardiacas [456].

interacciona con el citocromo CYP3A4 [416]. Por todos estos motivos, la azitromicina se considera un fármaco seguro y de alta tolerabilidad por parte de los pacientes [60].

En los tratamientos administrados por vía inhalatoria, el surfactante pulmonar es la primera barrera biológica en el sistema respiratorio [417] (Capítulo 1). El surfactante pulmonar está compuesto por una mezcla de fosfolípidos (~ 80%), lípidos neutros (~ 10%) y proteínas (~ 10%), donde el componente más abundante (~ 40%) es el fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) [418]. Las propiedades físico - químicas de este lípido se recogen en la *Tabla 7.1*. Los fosfolípidos son sustancias biocompatibles y biodegradables que poseen la característica de mejorar la migración de las partículas inhaladas hacia la periferia pulmonar [419]. La principal función fisiológica del surfactante pulmonar consiste en reducir la tensión superficial al final del proceso de exhalación a valores próximos a cero. De esta manera, la existencia de un pequeño volumen de aire favorece la estabilidad de los pulmones y evita su colapso, al mismo tiempo que minimiza el trabajo generado durante el proceso de respiración [418].

**Tabla 7.1 - (A)** Estructura molecular del lípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). En su estructura se encuentra marcada la región hidrofóbica y la hidrofílica; **(B)** Propiedades físico-químicas del fosfolípido DPPC (información obtenida de la base de datos PubChem® y Avanti Polar Lipids®).

A. Estructura molecular	B. Propiedades físico - químicas		
 <p>The image shows the chemical structure of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). It consists of two long hydrophobic palmitic acid chains (indicated by a dashed box and labeled 'Región hidrofóbica') and a hydrophilic head group containing a phosphate and a choline moiety (indicated by a dashed box and labeled 'Región hidrofílica').</p>	Peso molecular	734,0 g/mol	
	Punto de fusión	> 41 °C	
	Descomposición	> 75 °C	
	Forma	Sólido cristalino	
	pKa	~ 1,0	
	<b>Solubilidad (25 °C)</b>		
	Etanol, acetona, DMSO, cloroformo	~ 30 mg/mL	
Agua	Insoluble		

La administración conjunta del fosfolípido DPPC junto con otros fármacos presenta numerosas ventajas, siendo la principal su naturaleza endógena, lo que reduce el rechazo o toxicidad de la formulación. Por otro lado, las interacciones que se producen entre el fármaco y/o polímero y el surfactante pulmonar van a influir en el tratamiento inhalatorio. Los surfactantes favorecen la solubilidad de determinados fármacos y, en consecuencia, su biodisponibilidad y absorción en el sistema pulmonar [420].

Por todas las razones comentadas anteriormente, el uso de fosfolípidos en la administración pulmonar puede resultar de gran interés. En este capítulo se emplea la electropulverización como método de generación de partículas. Se desarrollan dos tipos de formulaciones en forma de polvo seco a partir del antibiótico azitromicina, incorporando en una de ellas el fosfolípido DPPC con el objetivo de incrementar su solubilidad y sus propiedades antimicrobianas.

## 7.2 Optimización del proceso de electropulverización

Para la generación de las micropartículas se empleó la técnica de electropulverización o *electrospray* descrita previamente en el [Capítulo 2 \(Punto 2.1.1\)](#) y empleada anteriormente en el [Capítulo 4](#). Tal y como se indicó, esta técnica requiere la optimización de numerosos parámetros que van a afectar a la morfología y distribución del tamaño de las micro- o nanopartículas resultantes. En este estudio nos centramos principalmente en 3 parámetros que juegan un papel importante en la formación de las partículas: disolvente empleado, caudal de alimentación y concentración de fármaco. Los parámetros experimentales empleados para la optimización de las micropartículas de azitromicina con la morfología y el tamaño buscados ( $\leq 5 \mu\text{m}$ ) se encuentran recogidos en la [Tabla 2.2 \(Capítulo 2, Punto 2.1.1.4\)](#).

### 7.2.1 Disolvente

La selección del disolvente empleado es un factor clave en el proceso de electropulverización, tanto por sus características de viscosidad, tensión

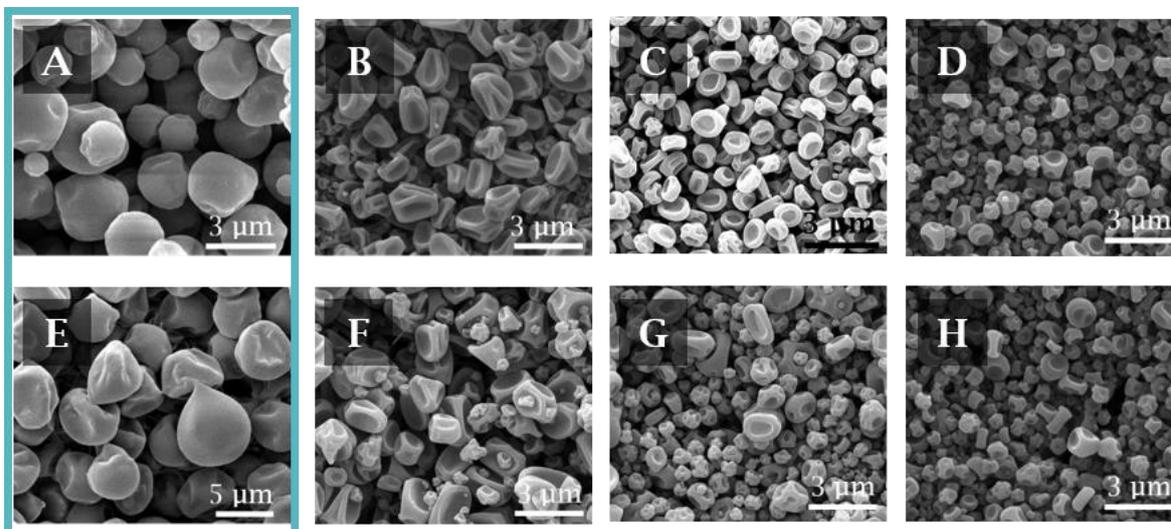
superficial, constante dieléctrica y conductividad como por su influencia en el tamaño y forma de las micropartículas generadas.

El uso de disolventes con temperaturas de ebullición más bajas, que favorezcan un proceso rápido de evaporación puede generar la aparición de cavidades en la superficie de las micropartículas y facilitar su fragmentación. Si la disolución tiene un valor de tensión superficial alto, se requiere un mayor potencial para superar ese valor, lo que da lugar a partículas de mayor tamaño. Por el contrario, si el valor de la tensión superficial es bajo, las gotas de la disolución podrán fisionarse de manera más rápida y generar partículas de menor tamaño [421].

La conductividad eléctrica depende de la naturaleza del material que permite el paso de carga eléctrica a través de él. Del mismo modo que la viscosidad, también influyen otros parámetros como el caudal o el voltaje eléctrico aplicado. Por lo general, disolventes con valores de conductividad bajos tienen una mayor dificultad para aumentar las fuerzas electrostáticas de Coulomb y, por lo tanto, para superar el valor de la tensión superficial de la disolución, generando partículas con un tamaño mayor [237]. Una tendencia análoga se observa con la constante dieléctrica, donde un valor más bajo genera partículas de mayor tamaño [422]. Las propiedades de los disolventes empleados en este estudio se encuentran recogidas en la *Tabla 2.1* (Capítulo 2, punto 2.1.1.3).

En los ensayos para la selección del disolvente, se mantuvieron constantes la concentración de azitromicina en 10% p/p y un caudal de alimentación de 1,0 mL/h. En la *Figura 7.1* se observa como las partículas obtenidas con etanol y acetona mostraron una superficie rugosa debido a la rápida evaporación del disolvente. Las partículas obtenidas con el cloroformo como disolvente mostraron un mayor tamaño en todos los caudales de alimentación ensayados, corroborando que un valor de constante dieléctrica más bajo conduce a un mayor tamaño de partícula (*Tabla 7.2*). En base a estos resultados, se fijó el cloroformo como disolvente óptimo para la obtención de las micropartículas

tanto por la morfología (forma redondeada) como por el tamaño promedio obtenido (aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 7.1.** – Imágenes de microscopía SEM de las MPs de AZT al 10% p/p obtenidas del proceso de electropulverización con diferentes disolventes a un caudal de 1,0 mL/h: (A) Cloroformo; (B) Etanol; (C) Acetona; (D) Etanol/acetona (1/1). Caudal de 2,5 mL/h: (E) Cloroformo; (F) Etanol; (G) Acetona; (H) Etanol/acetona (1/1). En azul se indica el disolvente seleccionado como óptimo.

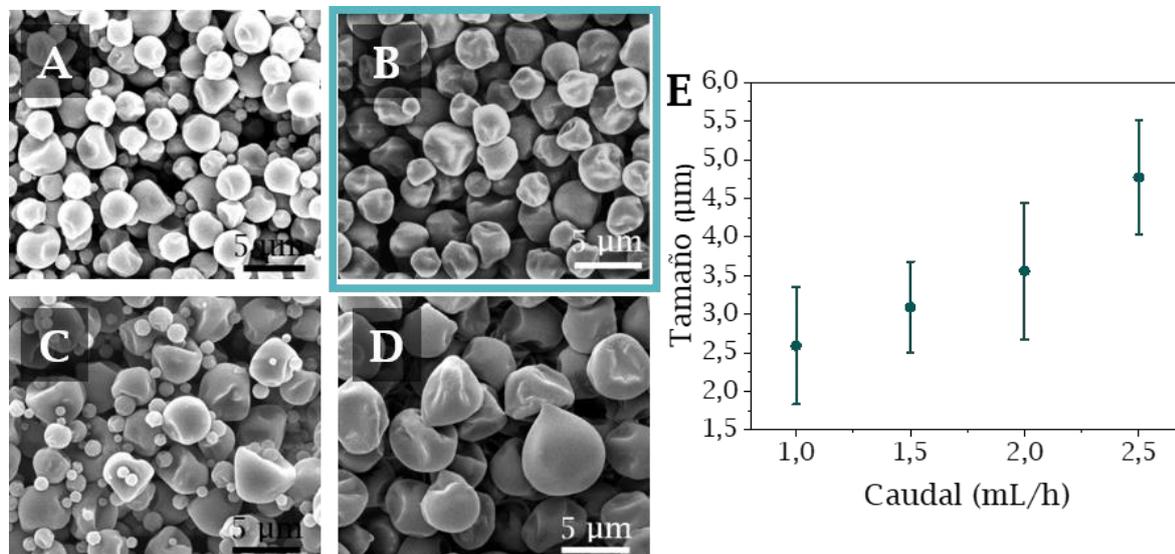
**Tabla 7.2** – Azitromicina al 10% p/p. Tamaño de partícula obtenido en función de los parámetros experimentales estudiados (disolvente y caudal).

10% p/p azitromicina		
Disolvente	Caudal (mL/h)	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )
Cloroformo	1,0	$2,06 \pm 0,76$
	1,5	$3,10 \pm 0,59$
	2,0	$3,55 \pm 0,88$
	2,5	$4,75 \pm 0,80$
Etanol	1,0	$1,40 \pm 0,36$
	1,5	$2,30 \pm 0,40$
	2,0	$1,80 \pm 0,36$
	2,5	$2,00 \pm 0,35$
Acetona	1,0	$1,10 \pm 0,19$
	1,5	$1,15 \pm 0,30$
	2,0	$1,65 \pm 0,28$
	2,5	$0,90 \pm 0,28$
Etanol/Acetona (1/1)	1,0	$0,86 \pm 0,26$
	1,5	$0,87 \pm 0,27$
	2,0	$0,85 \pm 0,21$
	2,5	$0,75 \pm 0,30$

### 7.2.2 Caudal de alimentación

Tras establecer el cloroformo como disolvente óptimo, el siguiente paso fue el estudio de la influencia del caudal de alimentación en el tamaño de partícula. El tamaño de partícula generada es proporcional al valor del caudal de flujo empleado. Un aumento en la velocidad del caudal de alimentación ocasiona una acumulación de la disolución en la punta del capilar, ya que este proceso no es compensado por la evaporación del disolvente, dando como resultado un incremento en el tamaño de partícula [237,423].

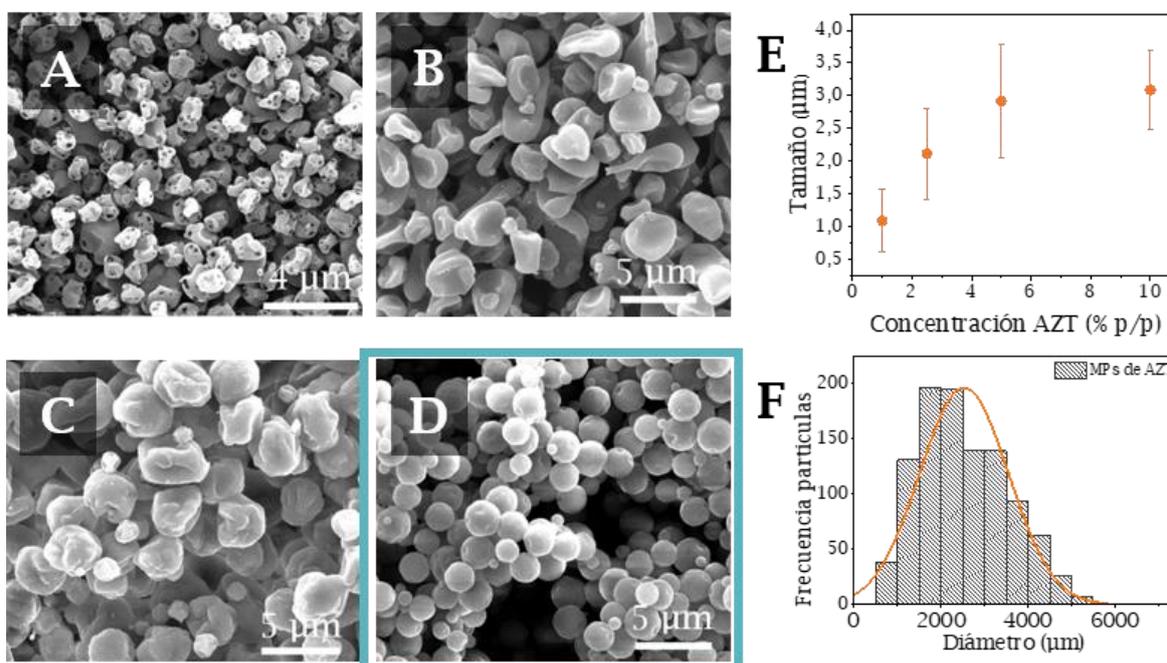
Los resultados obtenidos tras el estudio de la influencia del caudal en el tamaño de partícula se recogen en la *Tabla 7.3*. En la *Figura 7.2* se pueden observar imágenes de microscopía SEM de las micropartículas obtenidas a los distintos caudales empleados. Se estableció en 1,5 mL/h, el valor óptimo de velocidad de flujo, ya que permitió obtener una población de partículas con tamaños más homogéneos (menor polidispersidad).



**Figura 7.2.** – Imágenes de microscopía SEM de las MPs de AZT obtenidas en función del caudal (mL/h) a una concentración de 10% p/p con cloroformo como disolvente: (A) 1 mL/h; (B) 1,5 mL/h; (C) 2 mL/h; (D) 2,5 mL/h; (E) Influencia del caudal de alimentación en la distribución del tamaño de partícula (media  $\pm$  DE  $\mu\text{m}$ ). En azul se encuentra recuadrada la imagen correspondiente a las condiciones seleccionadas como óptimas.

### 7.2.3 Concentración de fármaco

Una vez fijado como disolvente el cloroformo y el valor del caudal (1,5 mL/h), el último paso se centró en el determinar la concentración adecuada de azitromicina. La concentración probada fue desde 1% p/p hasta 10% p/p. En la *Figura 7.3* se observa como al aumentar la concentración de fármaco los valores del tamaño de partícula obtenidos fueron mayores.



**Figura 7.3.** – Imágenes de microscopía SEM de las MPs de AZT obtenidas en función de la concentración (% p/p) a un flujo de 1,5 mL/h con cloroformo como disolvente: (A) 1% p/p; (B) 2,5% p/p; (C) 5% p/p; (D) 10% p/p; (E) Influencia de la concentración en la distribución del tamaño de partícula; (F) Histograma de distribución de las MPs de AZT (10% p/p) ( $d_p = 3,10 \pm 0,6 \mu\text{m}$ ;  $N = 150$ ). En azul se encuentra señalada las condiciones establecidas como óptimas.

El tamaño de gota generado es dependiente tanto del caudal de alimentación empleado (Punto 7.2.2) como de las propiedades de la disolución (conductividad, tensión superficial o concentración). Es interesante observar que a partir de concentraciones mayores de 5% p/p el tamaño de partícula obtenido no aumenta, manteniéndose en un tamaño próximo a las 3  $\mu\text{m}$ . Ijsebaert *et al.*, [423] mostraron en su estudio que cuando el valor de la tensión superficial y de la conductividad de la disolución son similares, el tamaño de

partícula obtenida también lo es. La conductividad y la tensión superficial tienden a aumentar a concentraciones más altas de fármaco, lo que podría explicar porque a concentraciones mayores de 5% p/p el tamaño de partícula (próximo a las 3  $\mu\text{m}$ ) obtenido es similar. Sin embargo, la morfología de las partículas obtenidas mejora notablemente frente al resto de concentraciones estudiadas. Esto concuerda con estudios previos que han demostrado que un incremento en la concentración de polímero o de fármaco tiene como efecto un aumento en el tamaño de las partículas generadas [230]. Los tamaños obtenidos para las diferentes concentraciones ensayadas se recogen en la *Tabla 7.3*.

**Tabla 7.3** – Disolvente cloroformo. Tamaño de partícula obtenido en función de los parámetros experimentales estudiados (concentración de azitromicina y caudal).

Cloroformo		
Concentración (% p/p)	Caudal (mL/h)	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )
1	1,0	1,07 $\pm$ 0,49
	1,5	1,10 $\pm$ 0,49
	2,0	2,50 $\pm$ 0,51
2,5	1,0	1,80 $\pm$ 0,72
	1,5	2,10 $\pm$ 0,70
	2,0	2,75 $\pm$ 1,01
5	1,0	1,70 $\pm$ 0,36
	1,5	2,90 $\pm$ 0,87
	2,0	2,40 $\pm$ 0,54
10	1,0	2,06 $\pm$ 0,76
	1,5	3,10 $\pm$ 0,59
	2,0	3,55 $\pm$ 0,88

Finalmente, se determinaron como óptimas las siguientes condiciones, cloroformo como disolvente, concentración de azitromicina a 10% p/p y caudal de alimentación del 1,5 mL/h.

#### 7.2.4 Influencia del fosfolípido DPPC

Debido a las propiedades comentadas anteriormente del fosfolípido DPPC a nivel pulmonar, éste se añadió a diferentes concentraciones a la disolución de azitromicina establecida como óptima antes de ser electropulverizada. Este hecho permitió evaluar su efecto como surfactante tanto en el tamaño de partícula obtenido como en sus propiedades físico-

químicas y su eficacia en estudios *in vitro* con en líneas celulares de pulmón y en biofilms creados por *P. aeruginosa*.

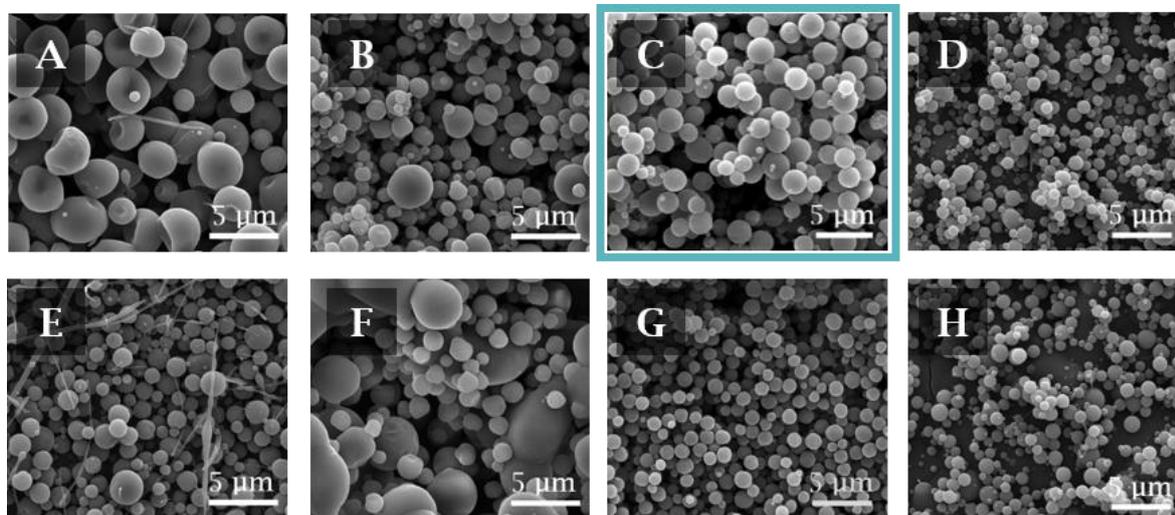
El rango de concentraciones de DPPC estudiadas fue de 0,05% p/p hasta un valor máximo de 0,4% p/p, ya que se empezó a observar que el proceso de secado no se producía correctamente. De igual modo, se varió el rango de caudales (desde 1,0 mL/h hasta 2,5 mL/h) con el objetivo de favorecer un correcto proceso de secado. La *Tabla 7.4* y la *Figura 7.4* recogen los tamaños obtenidos para las micropartículas de azitromicina con DPPC (MPs de AZT con DPPC).

**Tabla 7.4** - Disolvente cloroformo. Concentración de azitromicina del 10 % p/p. Tamaño de partícula obtenido en función de los parámetros experimentales estudiados (concentración de DPPC y caudal).

Cloroformo		
Concentración DPPC (% p/p)	Caudal (mL/h)	Tamaño ( $\mu\text{m}$ )
0	1,0	2,06 $\pm$ 0,76
	1,5	3,10 $\pm$ 0,59
	2,0	3,55 $\pm$ 0,88
	2,5	4,75 $\pm$ 0,60
0,05	1,0	2,55 $\pm$ 1,00
	1,5	2,25 $\pm$ 0,96
	2,0	1,65 $\pm$ 0,35
	2,5	1,30 $\pm$ 0,31
0,1	1,0	2,10 $\pm$ 0,63
	1,5	1,95 $\pm$ 0,71
	2,0	1,80 $\pm$ 0,60
	2,5	1,60 $\pm$ 0,29
0,2	1,0	1,80 $\pm$ 0,53
	1,5	1,65 $\pm$ 0,48
	2,0	1,48 $\pm$ 0,40
	2,5	1,25 $\pm$ 0,22
0,4	1,0	0,95 $\pm$ 0,26
	1,5	1,05 $\pm$ 0,25
	2,0	1,05 $\pm$ 0,24
	2,5	1,05 $\pm$ 0,23

El uso del surfactante tuvo el efecto esperado sobre la morfología de las partículas. Kavadiya y Biswas [232] han mostrado recientemente que la cantidad de surfactante añadido afecta al valor de la tensión superficial, y, por

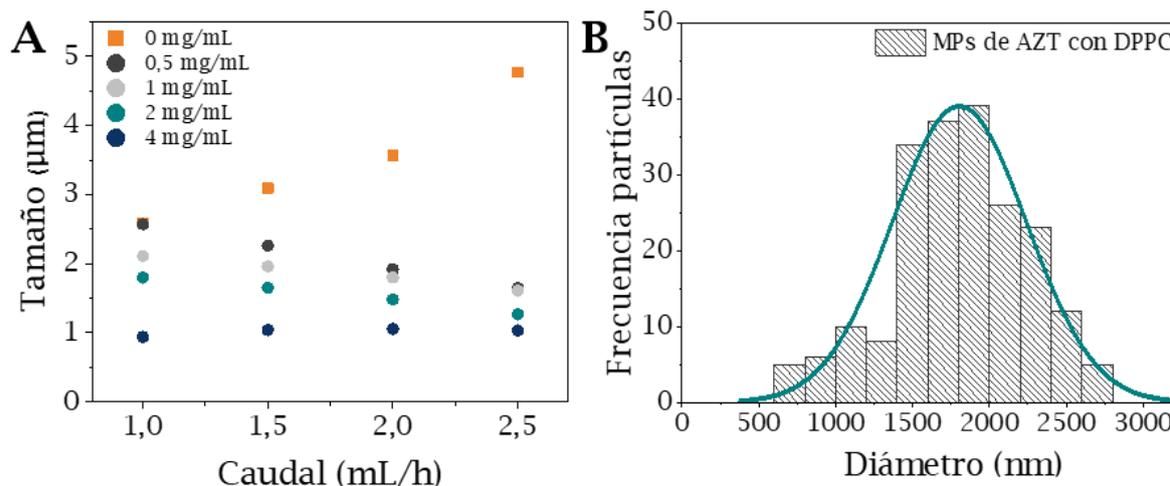
tanto, una concentración alta de surfactante da como resultado pequeñas partículas no aglomeradas (*Figura 7.4*).



**Figura 7.4.** - Imágenes de microscopía SEM de las MPs de AZT obtenidas con diferentes concentraciones de DPPC. A un caudal de 1 mL/h con: (A) 0,05 % p/p; (B) 0,1 % p/p; (C) 0,2 % p/p; (D) 0,4 % p/p. Y caudal de 2,5 mL/h: (E) 0,05 % p/p; (F) 0,1 % p/p; (G) 0,2 % p/p; (H) 0,4 % p/p. En azul se encuentra señalada la imagen correspondiente a las condiciones seleccionadas como óptimas.

Duong *et al.*, [424] realizaron un estudio para la obtención de micropartículas a partir del polímero dextrano mediante la técnica de electropulverización al mismo tiempo que emplearon como surfactantes Tween 20 y Tween 80. Ambos surfactantes incrementaron el valor de la conductividad eléctrica de las disoluciones, lo que contribuyó a un cambio en la morfología de las partículas (ligeramente más esféricas) y a una reducción del tamaño de la gota y, por ende, del tamaño de partícula generado. En otro estudio realizado por Xie *et al.*, [425] se empleó el surfactante Pluronic F127, mostrando una reducción en el valor de la tensión superficial y la generación de partículas de menor tamaño.

En la *Figura 7.5* se observa como un aumento del caudal y de la concentración del surfactante (DPPC) produjo en las micropartículas de azitromicina el mismo efecto que lo observado en estudios previos, generando una disminución en el tamaño de partícula hasta valores próximos a 1 µm.



**Figura 7.5.** – (A) Influencia del caudal (mL/h) en el tamaño de partícula según la concentración de DPPC; (B) Histograma de distribución del tamaño de partículas con DPPC (0,2% p/p) y caudal 1 mL/h ( $d_p = 1,80 \pm 0,53 \mu\text{m}$ ;  $N = 150$ ).

Las condiciones establecidas para las micropartículas de azitromicina con DPPC se seleccionaron basándose en aquellas que permitieron obtener un tamaño mayor, es decir, más similar a las micropartículas de azitromicina sin DPPC y, al mismo tiempo, se favoreciese un correcto secado del fosfolípido.

## 7.3 Caracterización de las micropartículas de azitromicina

### 7.3.1 Caracterización físico – química

La técnica de XPS se empleó para determinar los elementos presentes en las muestras y confirmar la ausencia de restos de disolvente. La caracterización se completó mediante DSC que permitió comprobar la estabilidad de las micropartículas y por FTIR, que proporcionó información sobre las interacciones entre el antibiótico y el fosfolípido. Además, se realizó un análisis de la cristalinidad de las micropartículas producidas en comparación con el fármaco puro mediante XRD. La carga superficial de las partículas se obtuvo mediante la medida del potencial  $\xi$ . La cuantificación de azitromicina en las diferentes muestras se realizó mediante UPLC o HPLC. Las técnicas, condiciones de caracterización y protocolos seguidos se encuentran descritos en el [Capítulo 2](#) y [Anexo I](#).

Una vez generadas las micropartículas de azitromicina, fue necesario conocer el contenido de los disolventes residuales en la formulación, en este estudio, el cloroformo. El cloroformo es un disolvente de Clase 2, es decir, es un disolvente cuya presencia debe ser limitada en fármacos o excipientes debido a su toxicidad inherente. El límite de concentración o el límite de exposición diaria permitida (VLA-ED) es de 3,6 mg/día o 60 PPM respectivamente [310].

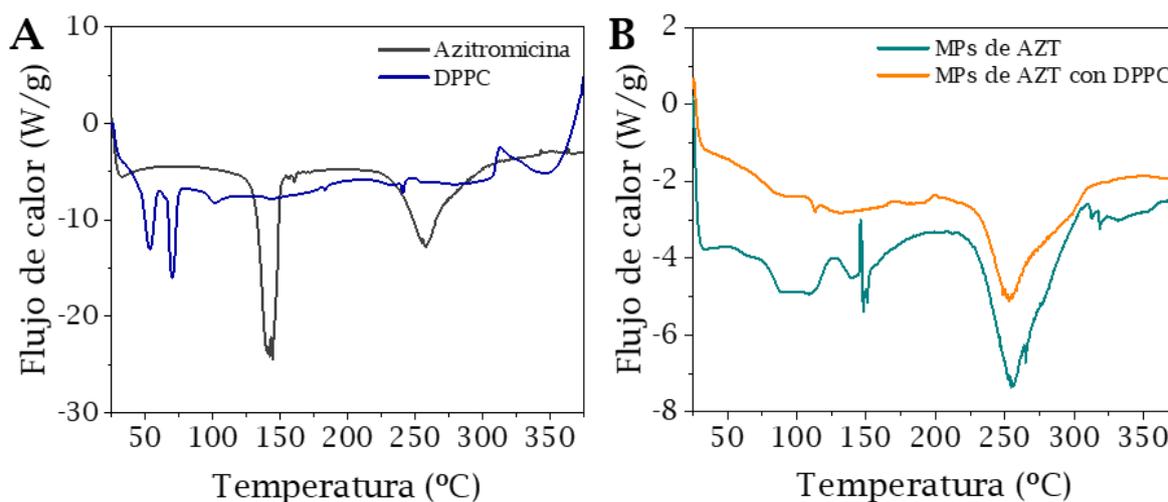
La técnica de XPS permitió comprobar la presencia de posibles trazas de cloroformo en las micropartículas siguiendo la concentración del cloroformo residual. Se obtuvo información de los elementos que componían las distintas muestras analizadas. En la *Tabla 7.5* se muestra que la presencia de cloro (Cl) en las micropartículas de azitromicina fue prácticamente cero (encontrándose a una concentración similar al ruido de fondo del análisis) y, que en el caso de las micropartículas con DPPC, ni siquiera se llegó a detectar. Por otro lado, las micropartículas con DPPC mostraron la presencia de fósforo (P), elemento característico de los fosfolípidos, mientras que en el resto de muestras no se detectó.

**Tabla 7.5** - Valores obtenidos del análisis por XPS.

Muestras	Elementos				
	O 1s	C 1s	N 1s	Cl 2p	P 2p
<b>Disolvente</b>					
<b>Azitromicina</b>	22,1 %	73,9 %	4,1 %	-	-
<b>Micropartículas de Azitromicina</b>	21,2 %	74,7 %	3,4 %	0,02 %	-
<b>Micropartículas de Azitromicina con DPPC</b>	17,5 %	79,1 %	2,9 %	-	0,5 %

El análisis por DSC permitió comprobar la estabilidad de las formulaciones desarrolladas frente a la azitromicina pura. Los análisis termoanalíticos obtenidos por DSC a partir de las medidas realizadas se recogen en la *Figura 7.6*. La azitromicina pura mostró dos picos endotérmicos, el primer pico característico del proceso de deshidratación y recristalización a

130 - 140 °C, y un segundo pico a 250 °C correspondiente a la fusión del fármaco en estado sólido con la consecuente degradación del anillo que forma su estructura [426]. Este segundo pico también pudo observarse en las micropartículas de azitromicina con y sin DPPC. Sin embargo, el pico a 130 - 140 °C desapareció, confirmando que la azitromicina ya se había deshidratado tras el proceso de electropulverización. El fosfolípido DPPC mostró dos picos endotérmicos a 67 °C correspondientes a una pre-transición del gel a bicapa y otro a 73 °C asociado a una transición principal, es decir, a un proceso de fusión de la cadena acilo presente en su estructura [427]. A pesar de la presencia del DPPC en una de las formulaciones de micropartículas estudiadas, su análisis por DSC no mostró ningún pico endotérmico característico de este fosfolípido, debido a la baja concentración de DPPC en las micropartículas (masa de fármaco/masa de fosfolípido de 50/1), lo que dificultó su detección por esta técnica.

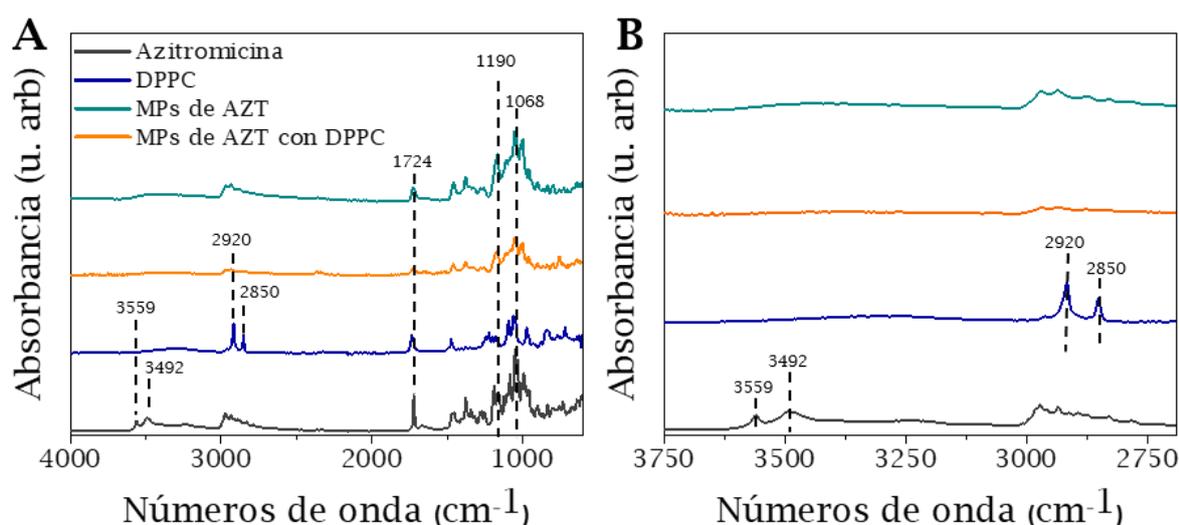


**Figura 7.6.** - Curvas obtenidas del análisis por DSC: **(A)** AZT y fosfolípido DPPC puros; **(B)** MPs de AZT con y sin el fosfolípido DPPC.

El análisis por FTIR se empleó para investigar tanto la conversión de la azitromicina dihidratada a su forma anhidra como las posibles interacciones entre el DPPC y la azitromicina a nivel molecular en las formulaciones desarrolladas. En la *Figura 7.7* se observan los espectros de las distintas muestras analizadas por FTIR. El espectro de la azitromicina pura presentó picos característicos a  $1724\text{ cm}^{-1}$  (enlace C=O),  $1190\text{ cm}^{-1}$  (enlace asimétrico C-O-C) y  $1068\text{ cm}^{-1}$  (enlace simétrico C-O-C) [428]. Además, presentó dos picos

característicos de su forma dihidratada en  $3559\text{ cm}^{-1}$  y  $3492\text{ cm}^{-1}$ , asociados a los enlaces O-H por la presencia de agua formando parte de su red cristalina. Sin embargo, se produce una desaparición de estos picos en ambos tipos de micropartículas producidas mediante electropulverización, confirmando de nuevo su transformación de azitromicina dihidratada a su forma anhidra.

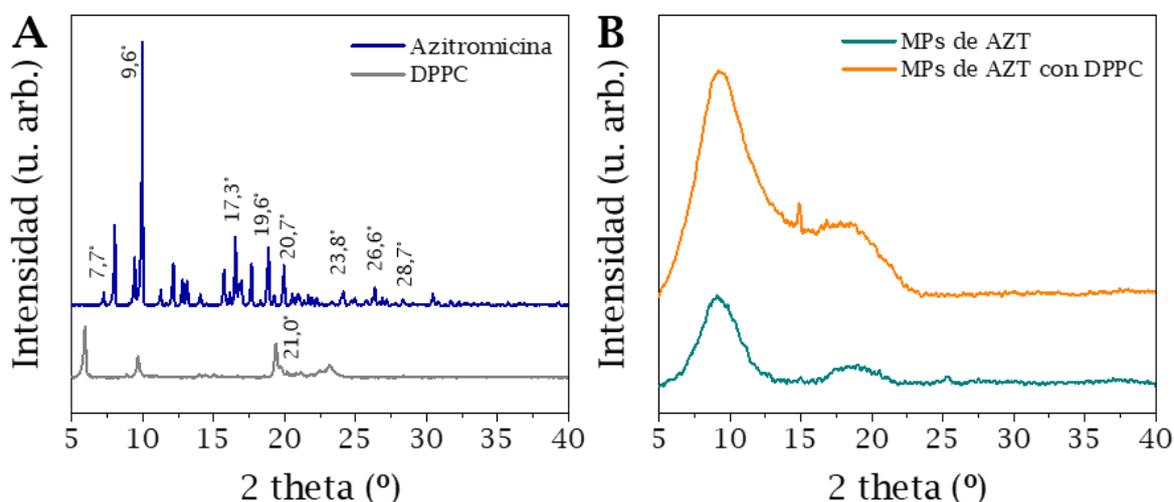
El DPPC mostró dos picos característicos por las vibraciones simétricas y asimétricas del grupo  $\text{CH}_2^-$  en la cadena acilo ( $2850\text{ cm}^{-1}$  y  $2920\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente) [429]. Pero, estos picos no se observaron con claridad en las micropartículas con DPPC, lo que llevó a pensar nuevamente en que la concentración de este fosfolípido en las micropartículas fue muy baja, dificultando su detección, tal y como se ha indicado anteriormente.



**Figura 7.7.** – Espectros FTIR de AZT y fosfolípido DPPC puros, MPs de AZT con y sin el fosfolípido DPPC, con sus picos más característicos: **(A)** Espectro FTIR entre  $4000$  y  $600\text{ cm}^{-1}$ ; **(B)** Región ampliada en el rango de  $3750$  a  $2750\text{ cm}^{-1}$ .

El análisis por XRD es un método directo que permite obtener información sobre la estructura cristalina o amorfa del material (*Figura 7.8*). Los diferentes picos presentes en los espectros de las sustancias puras (AZT y DPPC) revelan su estructura cristalina. Se observan varios picos estrechos en diferentes ángulos de difracción  $2\theta$  en el caso de la azitromicina pura,  $7,7^\circ$ ,  $9,6^\circ$ ,  $17,3^\circ$ ,  $19,6^\circ$ ,  $20,7^\circ$ ,  $23,8^\circ$ ,  $26,6^\circ$  y  $28,7^\circ$  estando el pico más característico a  $9,6^\circ$  [428]. Del mismo modo, el análisis por XRD reveló que el pico característico  $2\theta$

del fosfolípido DPPC en estado sólido se encontraba aproximadamente a  $21,0^\circ$  [427]. En el caso de las micropartículas generadas a partir de la técnica de electropulverización con y sin DPPC se observan difractogramas característicos de estructuras amorfas. La naturaleza amorfa de estas micropartículas anhidras concuerda con lo reportado en estudios previos [430]. En ambas formulaciones, los picos correspondientes a la azitromicina cristalizada de la formulación inicial desaparecen completamente, a excepción del pico presente a  $9,6^\circ$ . En la *Figura 7.8B* se puede observar igualmente la ausencia de cristalinidad en la estructura, pero con la diferencia de que el pico correspondiente al ángulo de difracción a  $21,0^\circ$ , se ve incrementando debido a la presencia del DPPC en la muestra.



**Figura 7.8.** - Difractogramas XRD en estado sólido de: **(A)** AZT y fosfolípido DPPC; **(B)** MPs de AZT con y sin el fosfolípido DPPC.

Finalmente, se midió el potencial  $\xi$  de ambos tipos de micropartículas y de la azitromicina pura. Las tres muestras mostraron un valor negativo (*Tabla 7.6*). El valor de las micropartículas de azitromicina con el fosfolípido DPPC fue ligeramente más negativo, la posible razón de ello fue la presencia del fosfolípido, el cual también posee carga negativa.

**Tabla 7.6** – Caracterización del fármaco azitromicina (AZT) y de las MPs de AZT con y sin el fosfolípido DPPC.

Muestras	SEM					Potencial $\xi$
	$d_p$ (media $\pm$ DE) ( $\mu\text{m}$ )	D10 ( $\mu\text{m}$ )	D50 ( $\mu\text{m}$ )	D90 ( $\mu\text{m}$ )	Span	(mV)
AZT	173,30 $\pm$ 47,50	70,2	144,7	246,1	1,22	-39,90
MPs de AZT	3,10 $\pm$ 0,59	2,0 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,1	0,63	-17,00
MPs de AZT con DPPC	1,80 $\pm$ 0,53	0,9 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 0,7	0,75	-23,66

### 7.3.2 Estudio de la cinética de disolución de las micropartículas

Uno de los principales problemas del antibiótico azitromicina es su escasa solubilidad en fluidos biológicos, lo que tiene como consecuencia una baja biodisponibilidad tras su administración [429]. Recientes investigaciones han demostrado que los fármacos cristalinos pueden sufrir una transformación desde su estructura cristalina a su estructura amorfa a través de diferentes procesos de producción de partículas (por ejemplo, por *spray-drying* [56,68]). Esto es una consecuencia lógica en un proceso que transcurre a una velocidad tan alta que no permite la ordenación implícita de un mecanismo de cristalización.

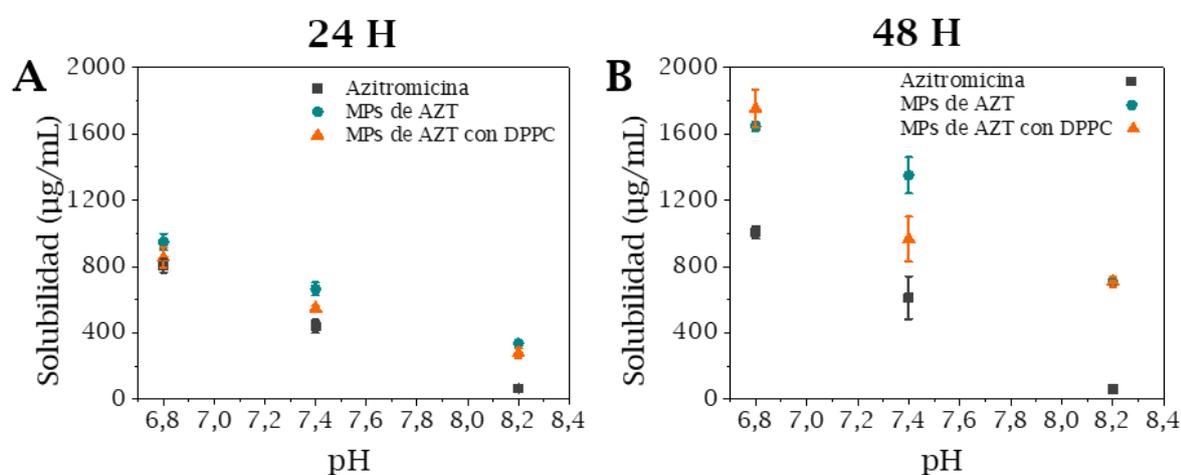
En el estudio realizado recientemente por Yaqoubi *et al.*, [230] muestran la capacidad de la técnica de electropulverización de producir esta conversión de cristalino a amorfo en la estructura del fármaco budesonida (corticoide). Del mismo modo, como se ha demostrado en nuestro trabajo, también es capaz de producir esta transformación en la estructura de la azitromicina, permitiendo obtener micropartículas con estructura amorfa. Esta propiedad supone una ventaja importante cuando se quieren administrar fármacos poco solubles en agua por vía inhalatoria.

El área superficial de la forma amorfa es por lo general mayor que la de la forma cristalina y, por lo tanto, tiende a incrementar la velocidad de disolución. Además, la forma cristalina tiene una estructura más organizada, de modo que su velocidad de disolución es más lenta. Una de las consecuencias es que, dado que las partículas se eliminan de los pulmones por aclaramiento mucociliar, esta baja velocidad de disolución puede hacer que se eliminen antes de disolverse, y el efecto terapéutico puede verse reducido [431]. Tanto es así, que en el caso de los antibióticos poco solubles en agua se prefiere su forma amorfa cuando se administran mediante inhaladores de polvo seco [403].

Los procesos de inflamación e infección promueven una acidificación del ambiente pulmonar, esta variación en el pH ha sido reportada en numerosas enfermedades inflamatorias como la fibrosis quística [432]. En esta enfermedad, el pH del líquido que recubre la superficie de las vías respiratorias se vuelve más ácido. La reducción del pH puede disminuir el efecto antimicrobiano de determinados fármacos, impidiendo la eliminación de las bacterias causantes de la infección [433]. Sin embargo, dentro del grupo de los macrólidos, la azitromicina se caracteriza por tener baja solubilidad en agua pero, buena estabilidad en medios ácidos [64].

Por esa razón, se evaluó la solubilidad de las formulaciones de micropartículas de azitromicina sintetizadas frente a la del fármaco puro. Los ensayos de equilibrio de solubilidad se realizaron en medio PBS para simular el líquido de revestimiento del pulmón, y se estudió la influencia del pH del medio. Los medios fueron: PBS (pH = 7,4), PBS ligeramente acidificado (pH = 6,5; ajustado con ácido clorhídrico) y PBS ligeramente básico (pH = 8,2; ajustado con hidróxido de sodio). Las diferentes muestras se añadieron en exceso ( $3,0 \pm 0,250$  mg/mL) en 1 mL de disolución y se mantuvieron en agitación a  $37 \pm 1$  °C (Thermo-Shaker, Biosan, Letonia) durante un tiempo de estudio de 24 y 48 h. Pasado este tiempo, las suspensiones de micropartículas se centrifugaron a 12.000 rpm, 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se filtró mediante un filtro de Nylon de 0,22  $\mu$ m (Millipore, Irlanda) y la concentración de azitromicina presente en las muestras se cuantificó mediante cromatografía UPLC.

Los resultados alcanzados muestran que en todos los casos la solubilidad de las micropartículas alcanza a un tiempo determinado fue siempre mayor que la del fármaco puro (*Figura 7.9*). Además, se pudo observar que en todas las muestras la cantidad disuelta disminuyó con el aumento del pH, lo que se puede relacionar con el valor de  $pK_a$  (8,5) de la azitromicina y su disociación en medio ácido. Para ambos tiempos de estudio, la cantidad disuelta de las micropartículas de azitromicina (estructura amorfa) fue casi el doble que para el fármaco puro (estructura cristalina). Sin embargo, la incorporación del fosfolípido DPPC a las micropartículas de azitromicina no mostró una mejora en su solubilidad respecto a las micropartículas de azitromicina sin excipiente, pese a que el resultado esperado era que actuase como tensoactivo y mejorase los valores de solubilidad alcanzados. La posible explicación reside en que la cantidad de este fosfolípido incorporada fue demasiado baja, siendo insuficiente para mostrar una mejora en la solubilidad, ya que los valores que se obtuvieron fueron muy similares a los obtenidos con las micropartículas de azitromicina sin DPPC.



**Figura 7.9.** - Experimentos de solubilidad: AZT pura y MPs de AZT con y sin fosfolípido DPPC a diferentes pH (6,8 - 8,2): (A) 24 h; (B) 48 h (media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ).

A partir de estos resultados se puede concluir que la incorporación del fosfolípido DPPC a las condiciones utilizadas no induce una mejora significativa en la solubilidad de las micropartículas de azitromicina. Por el contrario, la transformación de su estructura de cristalina a amorfa y su morfología de partículas redondeadas con un tamaño medio de aproximadamente 2,5  $\mu\text{m}$  son claves para mejorar la solubilidad del antibiótico.

El tamaño de la azitromicina pura ( $> 100 \mu\text{m}$ ) se redujo en casi 40 veces con la formación de las micropartículas y, por tanto, se aumentó la superficie de contacto en la misma proporción, ya que la superficie por unidad de volumen es inversamente proporcional al radio (en partículas esféricas).

## 7.4 Ensayos *in vitro* en células pulmonares

Los ensayos *in vitro* realizados con las micropartículas de azitromicina se llevaron a cabo con tres líneas celulares procedentes de pulmón, dos alveolares (A549 y NCI-H441) y una bronquial (Calu-3).

### 7.4.1 Ensayos *in vitro* en células pulmonares

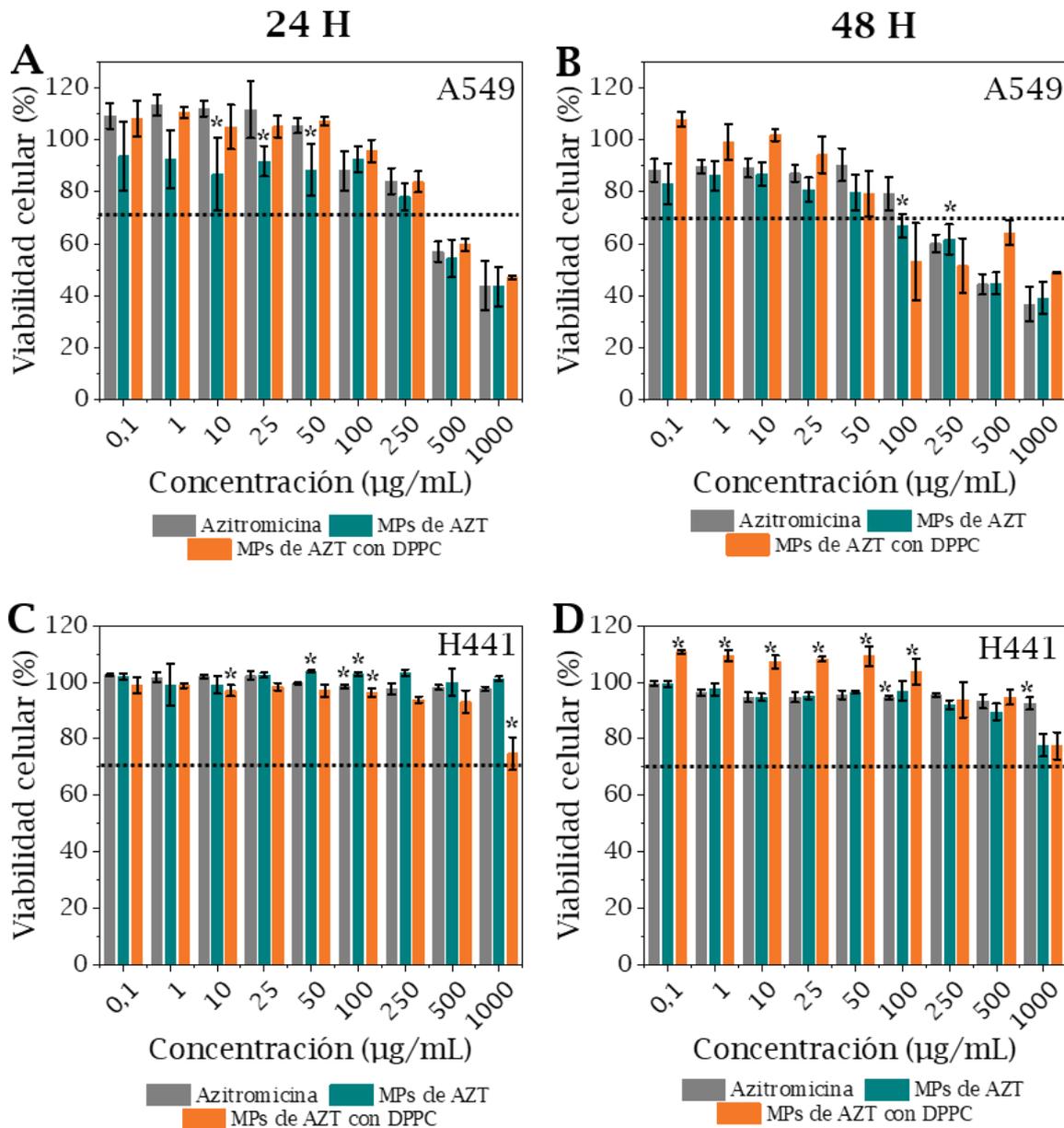
Con el objetivo de evaluar el posible efecto citotóxico de las micropartículas de azitromicina con y sin DPPC, así como del fármaco puro de partida, se realizó el ensayo Alamar Blue (Capítulo 2, Punto 2.2.3).

En la *Figura 7.10* se muestran los porcentajes de viabilidad en la línea celular A549 cuando se ven expuestos a distintas concentraciones tanto de fármaco puro como de micropartículas. Los valores de viabilidad de estas células se vieron afectados a partir de concentraciones  $\geq 500 \mu\text{g/mL}$  a un tiempo de 24 h. De igual modo, a un tiempo de estudio de 48 h se pudo observar que la viabilidad celular también se vio afectada, pero en este caso, a partir de una concentración de  $100 \mu\text{g/mL}$ .

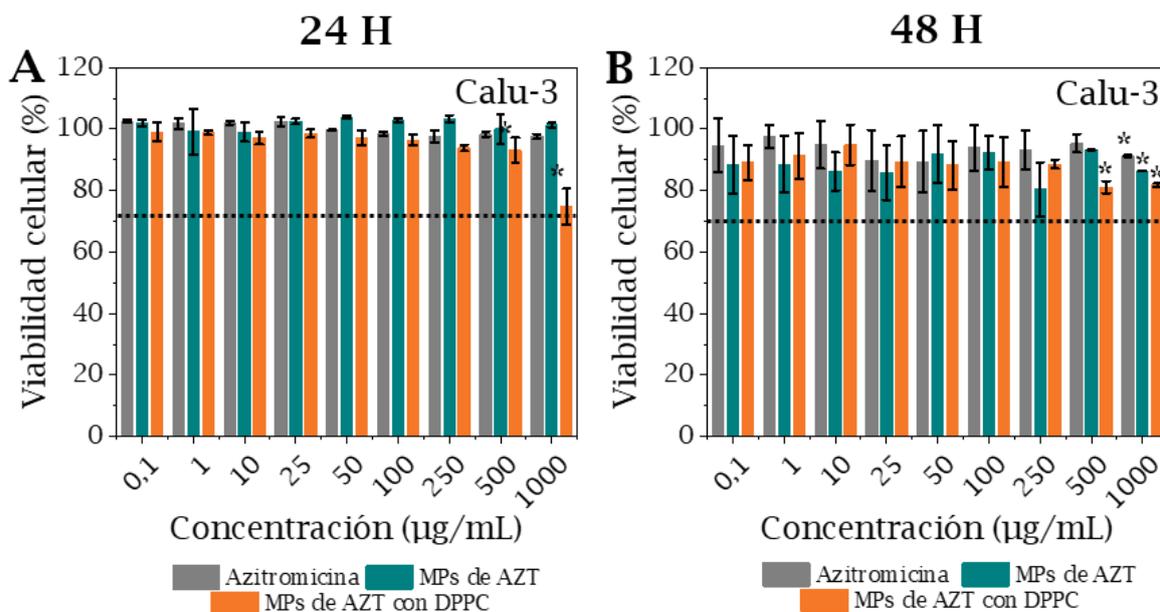
Por el contrario, en la segunda línea celular procedente de alvéolo, NCI-H441, no se observó una disminución en la viabilidad de las células a ninguna de las concentraciones estudiadas (*Figura 7.10C* y *7.10D*).

Del mismo modo que en la línea celular NCI-H441, las células procedentes de bronquio, Calu-3, tampoco mostraron disminución de su viabilidad cuando se expusieron a las diferentes muestras y concentraciones ensayadas (*Figura 7.11*).

Se puede concluir que, tanto el antibiótico puro como las micropartículas de azitromicina con y sin DPPC puede ser consideradas biocompatibles para su administración por vía pulmonar a concentraciones inferiores a 100 µg/mL en las tres líneas celulares.



**Figura 7.10.** - Viabilidad celular del fármaco AZT y de las MPs de AZT con y sin el fosfolípido DPPC a tiempos de 24 y 48 h: (A - B) Línea celular A549; (C - D) Línea celular NCI-H441. Los resultados se muestran como media ± DE (n = 3). Diferencias significativas (\*p < 0,05) entre las muestras en relación a la AZT libre. La línea negra discontinua indica el 70% de viabilidad celular de acuerdo a la norma ISO 10993-5.



**Figura 7.11.** – Viabilidad celular del fármaco AZT y de las MPs de AZT con y sin el fosfolípido DPPC en la línea celular Calu-3: (A) 24 h; (B) 48 h. Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Diferencias significativas ( $*p < 0,05$ ) entre las muestras en relación a la AZT libre. La línea negra discontinua indica el 70% de viabilidad celular de acuerdo a la norma ISO 10993-5.

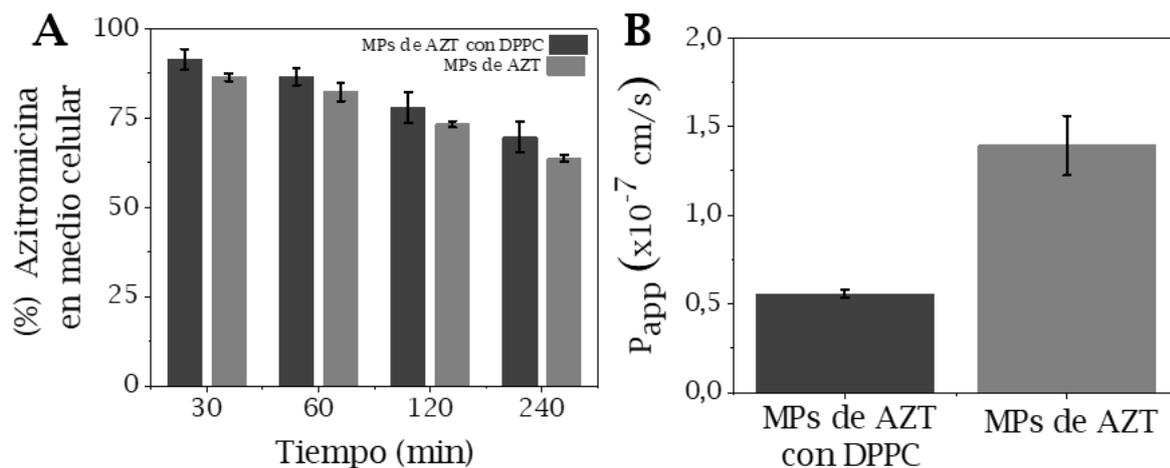
#### 7.4.2 Estudios de captación celular e interfase aire – líquido (ALI)

La glicoproteína-p (Gp-p) es una proteína de membrana presente en gran cantidad de células cuya función consiste en expulsar las sustancias de desecho al exterior. Esta expulsión se produce por un flujo dependiente de ATP con amplia especificidad de sustrato [434]. Aunque el mecanismo por el que se produce la acumulación de azitromicina en el interior de las células no se conoce con exactitud, se considera que esta acumulación puede darse por dos mecanismos: (1) Un mecanismo pasivo en el que, tras el proceso de absorción a pH fisiológico, la azitromicina es capaz de atravesar las membranas celulares, y debido a su naturaleza básica, es atrapada en el interior de los compartimentos lisosomales, los cuales tienen pH ácido [60]; (2) Un mecanismo activo en el que la azitromicina, que es un inhibidor de la Gp-p, bloquea dicha proteína favoreciendo su acumulación en el interior celular [435].

La capacidad de las micropartículas de azitromicina de atravesar la membrana celular se evaluó mediante la realización de dos ensayos *in vitro* en

la línea celular NCI-H441. En un primer ensayo se realizó un seguimiento de la concentración de azitromicina en contacto con las células respecto al tiempo. Por otro lado, se evaluó la capacidad de atravesar una capa celular en un cultivo ALL. La concentración de azitromicina ensayada fue de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , concentración superior al valor de MIC (Punto 7.5.2).

En la *Figura 7.12A* se observa como la concentración de azitromicina en el medio de cultivo celular fue disminuyendo con el paso del tiempo (estudio hasta 240 min) indicando la entrada del antibiótico en el interior celular. Los valores de las micropartículas en el medio de cultivo celular son comparables para ambas formulaciones, pero ligeramente inferiores en el caso de las MPs de azitromicina. Por otro lado, en la *Figura 7.12B* se muestra el coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{\text{app}}$ ) determinado en sentido apical-basolateral (A→B), que fue mayor para las micropartículas de azitromicina frente a las micropartículas con DPPC.



**Figura 7.12.** – Ensayos *in vitro* con la línea celular NCI-H441: (A) Ensayo de captación celular de las MPs de AZT con y sin el fosfolípido DPPC; (B) Representación del coeficiente de permeabilidad aparente obtenido de un ensayo de interfase aire -líquido.

En base a los resultados obtenidos, se puede descartar que el fosfolípido ayude a la entrada del antibiótico al interior celular. Sin embargo, debido a la mayor capacidad de penetración en el interior celular de las micropartículas de azitromicina, podría resultar interesante su uso en bacterias intracelulares como *S. aureus*.

## 7.5 Actividad antimicrobiana, biofilms y bacterias planctónicas

Los protocolos seguidos para el desarrollo de los estudios *in vitro* en bacterias se encuentran detallados en el [Capítulo 2](#).

### 7.5.1 Biofilms

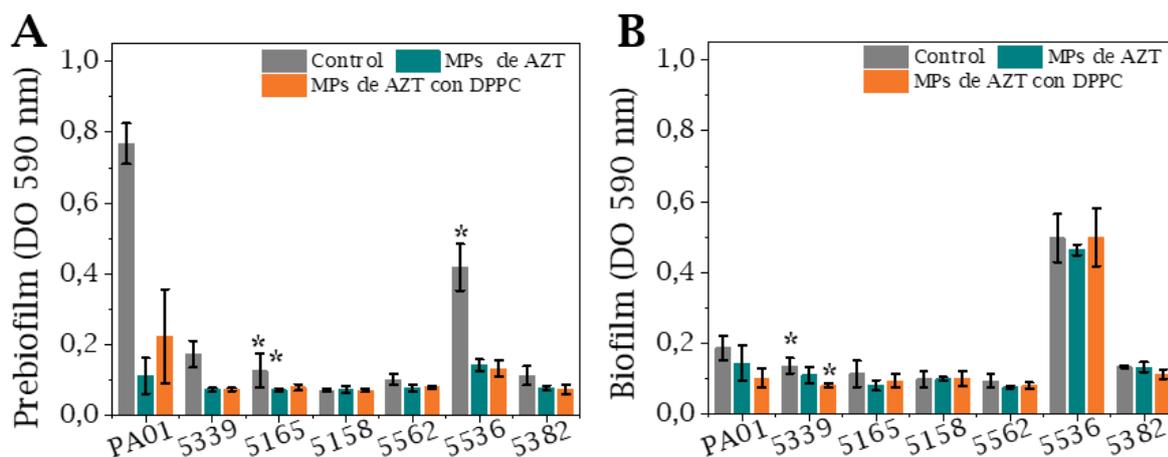
*P. aeruginosa* es la bacteria más prevalente en las vías respiratorias de los adultos con FQ, siendo la primera causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes que padecen dicha patología. Una vez que *Pseudomonas* se ha establecido en las vías respiratorias su erradicación es muy difícil, por lo que el objetivo principal del tratamiento consiste en reducir la densidad bacteriana [436].

Muchas especies bacterianas producen polímeros extracelulares que facilitan de manera no específica su adhesión a superficies y promueven la formación de biofilms. *Pseudomonas* tiene la habilidad de producir biofilms generadores del polímero alginato, que proporciona una mayor resistencia a los tratamientos [437]. El polisacárido alginato es uno de los mayores factores de virulencia de *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, donde la infección es evidente debido al desarrollo de esta enfermedad [438]. Los pacientes con fibrosis quística sufren un recurrente ciclo caracterizado por infección pulmonar e inflamación, esta última está dirigida a proteger frente al proceso de infección. Los macrólidos, entre ellos la azitromicina, se encuentran en primera línea de tratamiento para dicha respuesta antiinflamatoria debido a sus múltiples capacidades relacionadas con la limitación de la producción de citoquinas, inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas, disminución de los factores de virulencia bacterianos y la reducción de la formación de biofilms [439,440].

Para comprobar la eficacia de las micropartículas de azitromicina con y sin DPPC contra biofilms, se seleccionaron 6 cepas clínicas de *P. aeruginosa* que se aislaron de pacientes hospitalizados con fibrosis quística ([Capítulo 2, Tabla 2.6](#)). La concentración empleada para la realización de los ensayos se obtuvo

de bibliografía [65,254]. Los valores MIC encontrados se situaron en el rango de 128 - 256  $\mu\text{g/mL}$  [421], por lo que se fijó 256  $\mu\text{g/mL}$  como la concentración de estudio.

En la *Figura 7.13* se puede observar como la densidad óptica de las distintas cepas bacterianas disminuyen al ser tratadas con las micropartículas de azitromicina, siendo el efecto muy similar en ambos tipos de biofilm. Los biofilms control presentaron una capa mucosa en su superficie que disminuyó al ser tratada con las micropartículas. Se ha demostrado que la azitromicina es capaz de retrasar la formación de los biofilms creados por *Pseudomonas* debido a la capacidad que tiene de alterar la producción de proteínas que forman la membrana externa de la bacteria y la formación de determinadas sustancias, por ejemplo, de alginato. Las alteraciones provocadas en la producción de estas sustancias pueden influir en la adhesión bacteriana, dando como resultado una reducción en la formación de los biofilms [441,442].



**Figura 7.13.** - Comparación de los valores de densidad óptica obtenidos a partir de biofilms formados *P. aeruginosa* en dos condiciones de cultivo diferentes. Cultivos tratados con MPs de AZT con y sin el fosfolípido DPPC: (A) Absorbancia correspondiente a la densidad óptica del pre-biofilm; (B) Absorbancia correspondiente a la densidad óptica del biofilm; Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Diferencias significativas (\* $p < 0,05$ ) entre las muestras en relación al control.

Aunque se demostró la capacidad de la azitromicina de reducir la formación de estos biofilms, no se pudo apreciar una diferencia significativa

entre las micropartículas de azitromicina con y sin el fosfolípido DPPC. Debido a los resultados anteriormente descritos y los obtenidos en los ensayos *in vitro*, se concluyó que la presencia del fosfolípido DPPC no suponía una notable mejoría, por lo que se descartó estas micropartículas y se realizó el resto de ensayos únicamente con las micropartículas de azitromicina sin DPPC.

### 7.5.2 Bacterias planctónicas

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las micropartículas de azitromicina, se realizaron los ensayos en bacterias planctónicas modelo se realizaron empleando *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Las curvas de crecimiento bacteriano frente a distintas concentraciones de fármaco se evaluaron mediante la medición de la densidad óptica (OD600), lo que permitió obtener las concentraciones MIC y MBC. Estos valores se comprobaron con la realización del método de dilución en agar (Capítulo 2, Punto 2.3.3)

El antibiótico azitromicina presenta unos valores de MIC y MBC de 1 - 2 µg/mL y > 64 µg/mL respectivamente para *S. aureus* [8,9], mientras que para *P. aeruginosa* los valores correspondientes a la MIC están en el rango de 128 - 256 µg/mL y el valor de MBC es >512 µg/mL [65,254].

Una de las características a destacar de la azitromicina es que se caracteriza por tener un efecto post-antibiótico (EPA) muy alto (2,3 - 4,7 h) frente a algunos patógenos respiratorios. El EPA hace referencia a un periodo de tiempo en el que, tras la eliminación completa del antibiótico o a valores de concentración inferiores a la MIC, el crecimiento bacteriano se encuentra inhibido. El conocimiento sobre la duración del EPA podría ser útil para fijar el tiempo entre dosis reduciendo de manera favorable el riesgo de producir daño en los pulmones o la aparición de resistencias bacterianas [444].

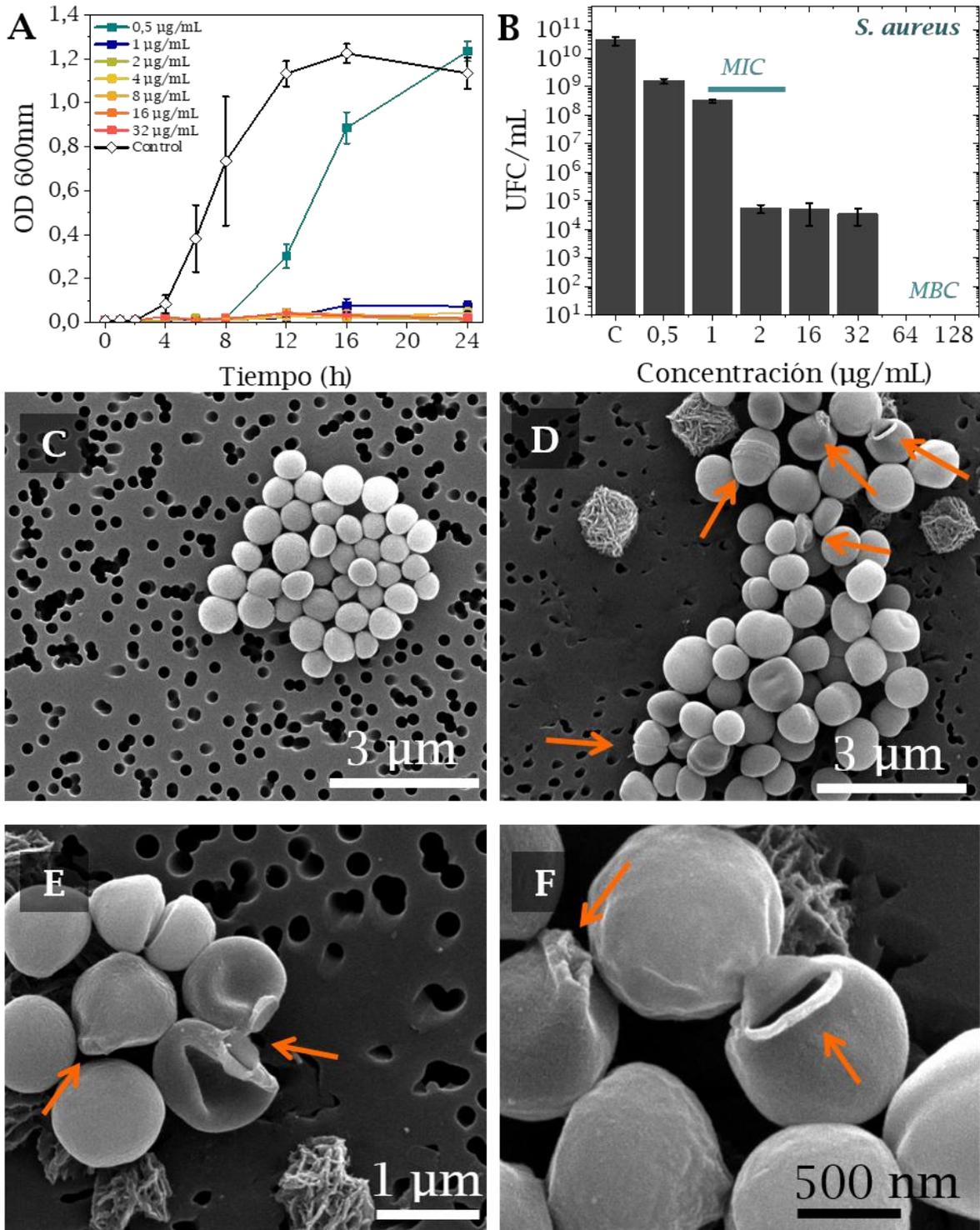
Las curvas de crecimiento bacteriano en ambos tipos de bacterias (*S. aureus* y *P. aeruginosa*) se muestran en las Figuras 7.14A y 7.15A. El efecto producido por el antibiótico es muy similar en ambas bacterias, ya que se observa una disminución en el crecimiento cuando la suspensión bacteriana es

tratada a concentraciones próximas al valor de la MIC. En el caso de *S. aureus*, mientras que a concentraciones  $\leq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$  el crecimiento bacteriano fue similar al grupo control, a concentraciones  $\geq 1$   $\mu\text{g/mL}$  no fue posible distinguir entre la fase exponencial y la fase estacionaria, mostrando la inhibición del crecimiento bacteriano. Por otro lado, cuando *P. aeruginosa* estuvo en contacto con concentraciones del rango de 16 hasta 128  $\mu\text{g/mL}$ , el crecimiento bacteriano disminuyó en aproximadamente un 40 % respecto al grupo control. A partir de la concentración 256  $\mu\text{g/mL}$ , la fase exponencial se retrasó hasta las 12 h y a partir de las 16 h se observó la fase estacionaria.

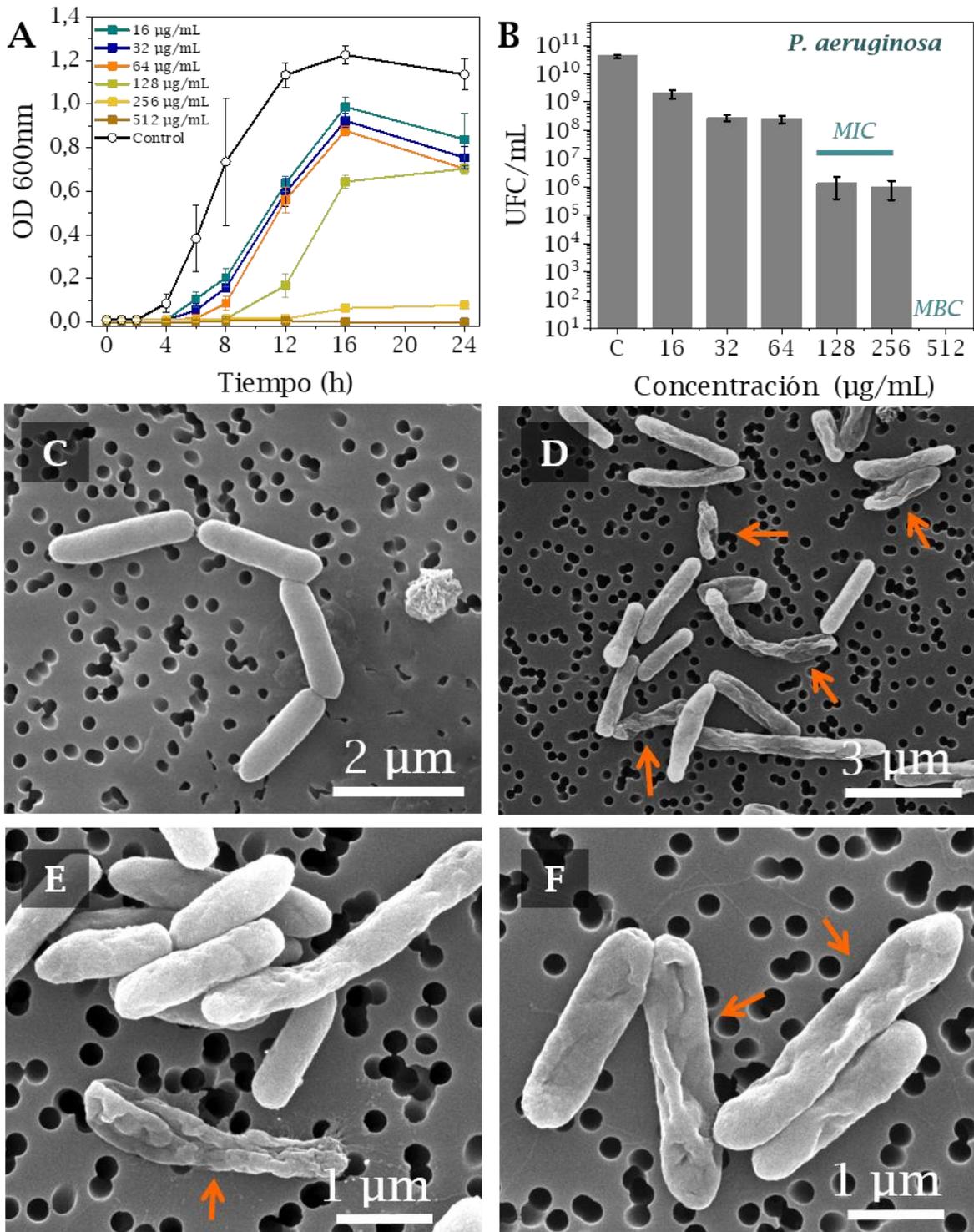
Las concentraciones probadas en las curvas de crecimiento también se estudiaron mediante el método de dilución en agar, lo que permitió confirmar los valores MIC y MBC obtenidos para las micropartículas de azitromicina. Las UFC/mL obtenidas para cada concentración se muestran reflejadas en las Figuras 7.14B y 7.15B.

Finalmente, las morfologías de los dos tipos de bacterias se observaron por microscopía SEM tras estar en contacto con las micropartículas de azitromicina a un tiempo de 24 h. Las imágenes obtenidas de los controles de *S. aureus* y *P. aeruginosa* reflejaron una alta concentración de bacterias viables que mostraban una morfología sin alteraciones (Figura 7.14C y 7.15C).

La bacteria *S. aureus* tratada con las micropartículas de azitromicina, Figura 7.14 (D-F) mostró una clara alteración en su morfología, presentando una membrana externa rugosa y en algunos casos también perforada. Ding *et al.*, [445] mostraron en su investigación, que la azitromicina es capaz de establecer uniones reversibles con las subunidades 50S del ribosoma bacteriano afectando a la síntesis de nuevas proteínas. Al mismo tiempo, estas mismas uniones podrían ser las causantes de las deformaciones ocasionadas en la pared bacteriana debido a la falta de proteínas necesarias para un correcto crecimiento de la membrana.



**Figura 7.14.** - Actividad antimicrobiana de las MPs de AZT frente a *S. aureus*: (A) Seguimiento del crecimiento bacteriano por densidad óptica (OD<sub>600</sub>); (B) Determinación de la MIC y la MBC por UFC/mL; Imágenes de microscopía SEM de las bacterias después de 24 h: (C) Control; (D - F) Bacterias en contacto con las MPs de AZT. Se indican con flechas naranjas ejemplos de los cambios producidos en la morfología bacteriana. Los resultados se muestran como media ± DE ( $n = 3$ ).



**Figura 7.15.** - Actividad antimicrobiana de las MPs de AZT frente a *P. aeruginosa*: (A) Seguimiento del crecimiento bacteriano por densidad óptica (OD600); (B) Determinación de la MIC y la MBC por UFC/mL; Imágenes de microscopía SEM de las bacterias después de 24 h: (C) Control; (D - F) Bacterias en contacto con las MPs de AZT. Se indican con flechas naranjas ejemplos de los cambios producidos en la morfología bacteriana. Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ).

En el caso de *P. aeruginosa*, la azitromicina afecta directamente a la membrana externa de la bacteria (*Figura 7.15 (D-F)*), ya que se pueden observar diferentes alteraciones en su morfología como hendiduras, plegamientos y agujeros. La razón de esto se debe a la capacidad que tiene la azitromicina de unirse de manera reversible a la subunidad ribosómica 50S e inhibir la síntesis de proteínas, igual que se ha explicado en el caso de *S. aureus*. Además, Imamura *et al.*, [446] sugirieron en el estudio que llevaron a cabo, que la azitromicina es capaz de desplazar a los cationes divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ...) y, por tanto, evitar su unión al lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa bacteriana. Se produce así una mayor permeabilización de la membrana incrementando su sensibilidad tanto para la azitromicina como frente a otros agentes antimicrobianos.

## 7.6 Propiedades aerodinámicas y generación de aerosoles

Se realizaron tres tipos de ensayos. En primer lugar, los ensayos que evaluaron la deposición pulmonar de las micropartículas de azitromicina se llevaron a cabo con el equipo NGI (*Capítulo 2, Punto 2.4.3*). En el segundo grupo de ensayos, se engloban aquellos experimentos que se realizaron con el generador de aerosoles UNIZAR (*Capítulo 3, Sección 3.2*). Finalmente, el tercer grupo de experimentos se llevaron a cabo con el equipo Spraytec® (*Capítulo 2, Punto 2.4.2*).

### 7.6.1 Diámetro aerodinámico

Las formulaciones en polvo seco destinadas para inhalación requieren un tamaño aerodinámico adecuado para su correcta distribución en las vías respiratorias (DMMA). La determinación del DMMA se realiza según un ensayo establecido por farmacopea que se realiza a flujo de inspiración constante (*Capítulo 2, Punto 2.4.3.1*). Sin embargo, para estimar la deposición de las micropartículas de azitromicina en las diferentes regiones de las vías respiratorias con más precisión, se empleó una simulación de respiración dada por el simulador BRS 3000 (*Capítulo 2, Punto 2.4.3.2*). Dependiendo del flujo inspiratorio del paciente la cantidad de fármaco depositado en los pulmones

variará. Por este motivo, a partir de los datos recogidos de diversos perfiles de respiración, se obtuvieron dos perfiles de respiración diferentes, representativos de un paciente sano y un paciente con EPOC, permitiendo obtener una comparación entre ambos. Al mismo tiempo, con estos perfiles de respiración se empleó la tráquea de Alberta, lo que proporcionó obtener una simulación más real de la “entrada” y deposición de las micropartículas en el sistema respiratorio.

#### 7.6.1.1 Ensayo según farmacopea

Empleando un inhalador comercial de polvo seco (DPI) (Breezhaler®) y el equipo NGI se determinaron entre otros parámetros, el diámetro de masa media aerodinámico (*Tabla 7.7*). En todos los ensayos realizados el valor del DMMA resultó tener un tamaño menor de 2  $\mu\text{m}$ . Las partículas con un tamaño inferior a 3  $\mu\text{m}$  se depositan principalmente en la parte distal del tracto respiratorio, es decir, en las vías inferiores y alveolos. Las partículas con valores de DMMA entre 5 - 10  $\mu\text{m}$  están asociadas a una mayor deposición en la región orofaríngea y las vías respiratorias superiores. Las micropartículas de azitromicina en forma de polvo seco mostraron por lo tanto un tamaño aerodinámico apropiado para administrar como tratamiento ante una infección pulmonar.

La desviación estándar geométrica (GSD) describe la variabilidad del tamaño de partícula dentro del aerosol, de forma que convencionalmente se consideran aerosoles monodispersos aquellos con valores de GSD entre 1 y 1,4 [372]. Los valores de GSD fueron en los tres casos mayores de 3, indicando que la distribución de tamaños de partículas en el aerosol generado fue polidisperso, característica muy frecuente en la mayoría de los aerosoles farmacéuticos.

#### 7.6.1.2 Influencia del perfil de respiración en la administración pulmonar de fármacos

Los perfiles de respiración simulados se basan en los datos obtenidos de estudios realizados con un inhalador de polvo seco (DPI) de baja resistencia

(0,02020 L/min) y donde la población de estudio estuvo formada tanto por pacientes femeninos como masculinos [262] (Capítulo 2, Figura 2.2.). En el caso del perfil de respiración con la patología de EPOC, los pacientes tenían un diagnóstico clínico de leve a grave [261]. Las ecuaciones para desarrollar ambos perfiles de respiración se recogen en el Capítulo 2, Tabla 2.8.

En todos los ensayos realizados, las micropartículas de azitromicina mostraron un valor de la DE muy similar, adquiriendo un valor mayor del 84%. El valor de la FFP tuvo un valor alrededor del 15%. De igual modo, el valor de la fracción respirable, es decir, la cantidad de fármaco que se inhala e ingresa en el tracto respiratorio fue parecida en los tres ensayos (~ 30%), aunque ligeramente menor para el perfil de simulación del paciente con EPOC, con un valor del 28% (Tabla 7.7).

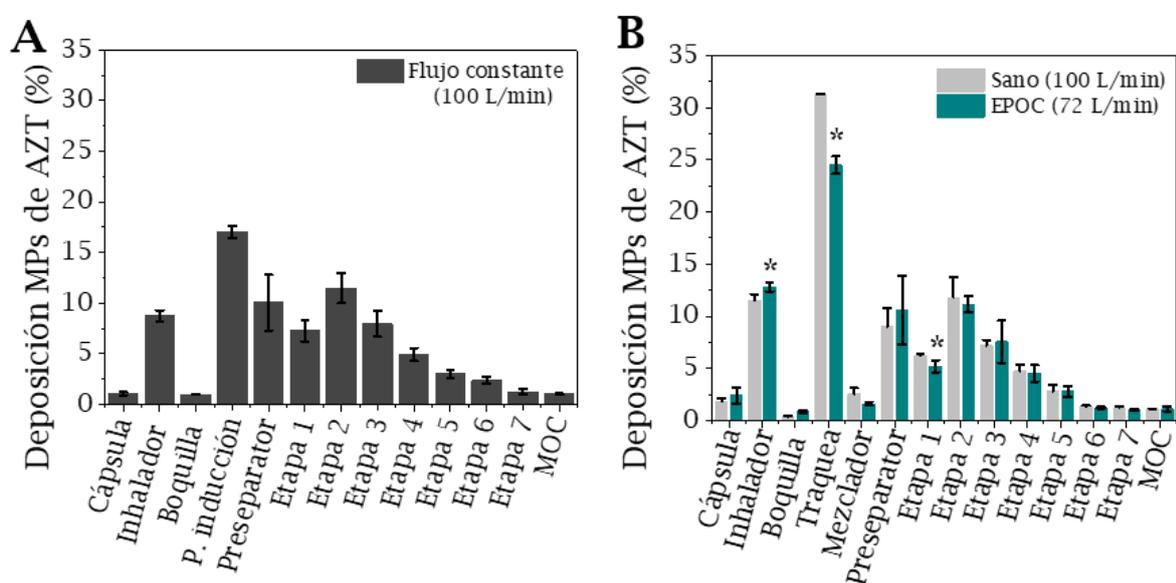
**Tabla 7.7** - Valores obtenidos a partir de los ensayos realizados con el equipo NGI.

Parámetros	Farmacopea	Perfil de respiración	
	Flujo constante 100 L/min	Sano 100 L/min	EPOC 72 L/min
Dosis Emitida (DE) (%)	90,2 ± 0,4	86,6 ± 0,8	84,9 ± 0,8
Dosis de Partículas Finas (DPF) (%)	17,5 ± 1,0	12,6 ± 2,7	12,9 ± 3,4
Fracción Fina de Partículas (FFP) (%)	19,4 ± 1,1	14,5 ± 3,1	15,3 ± 4,1
Fracción Respirable (FR) (%)	31,0 ± 4,2	29,1 ± 3,8	28,3 ± 4,1
Diámetro de Masa Media Aerodinámico (DMMA) (µm)	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Desviación Estándar Geométrica (GSD) (µm)	3,4 ± 0,3	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,3

Sin embargo, cuando se emplearon los perfiles de respiración, la distribución del antibiótico fue diferente. Como se puede observar en la Figura 7.16, tras el ensayo realizado a flujo constante de inspiración (100 L/min) la mayor parte de las micropartículas de azitromicina se depositaron en el puerto de inducción y en el preseparador (Capítulo 2, Esquema 2.10). Aunque

en los ensayos de perfil de simulación la configuración del sistema fue algo diferente al emplear la tráquea de Alberta, se observó que la mayor cantidad de micropartículas se retuvieron en la tráquea y en el preseparator. En ambos casos también se pudo observar que las micropartículas de azitromicina quedaron retenidas en el inhalador.

Respecto a la deposición de la formulación en las diferentes etapas del NGI, en todos los ensayos la mayor parte del polvo seco se quedó en la etapa 2 correspondiente al diámetro de corte de 3,42  $\mu\text{m}$  coincidiendo con el tamaño medio de partícula obtenido por microscopía SEM ( $3,10 \pm 0,60 \mu\text{m}$ ; *Tabla 7.6*).



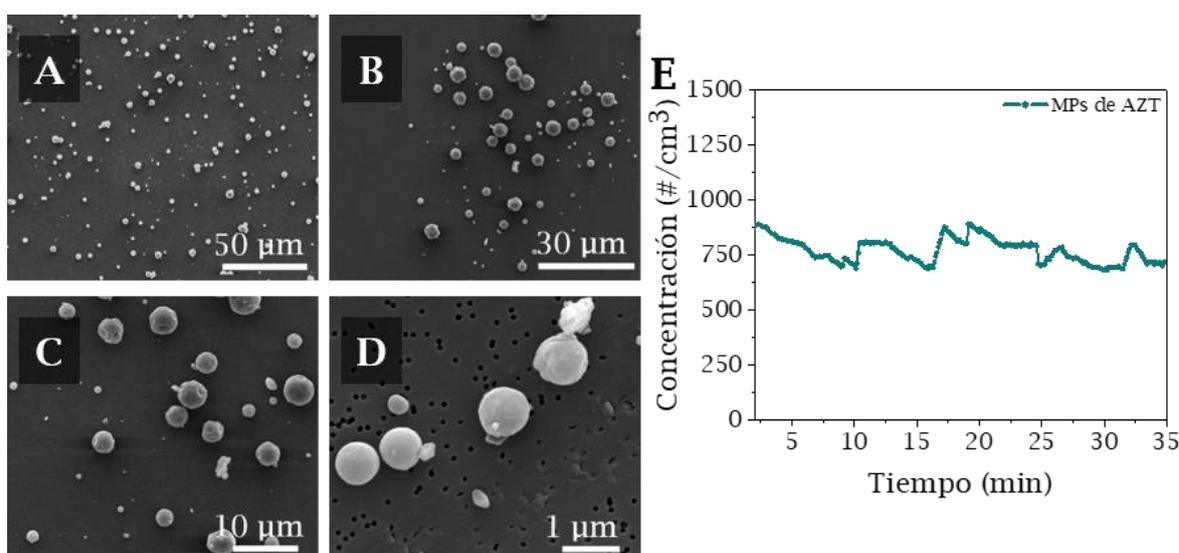
**Figura 7.16.** – Distribución de la masa (%) de las MPs de AZT en polvo seco en el NGI según su tamaño aerodinámico: **(A)** Flujo constante (100 L/min), ensayo establecido por la farmacopea; **(B)** Simulador de respiración con perfil respiratorio de un paciente sano (100 L/min) y uno con EPOC (72 L/min) (media  $\pm$  DE,  $n = 3$ ). *Nota: las partes del dispositivo de NGI se han detallado en el Capítulo 2, Punto 2.4.3.*

### 7.6.2 Generación de aerosoles

Se empleó el generador de aerosoles UNIZAR (*Capítulo 3, Punto 3.2.1*) para producir la dispersión de las micropartículas de azitromicina en forma de polvo seco a una nube de aerosol inhalable. En los ensayos se emplearon muestras de  $15 \pm 2$  mg de micropartículas, los pulsos de presión se realizaron

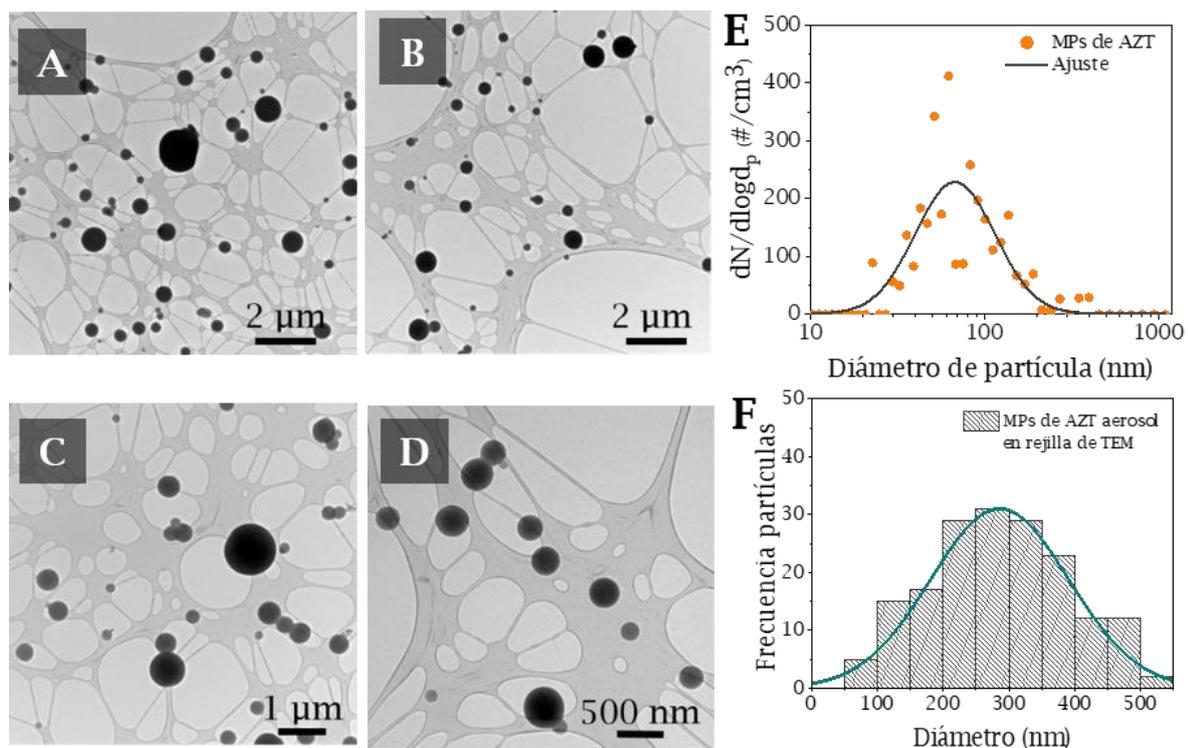
con presiones de 8 barg en la cámara secundaria (reservorio de aire) y 4 barg en la cámara principal (cámara de expansión). El aerosol se produjo siguiendo el protocolo descrito en el [Capítulo 3, Punto 3.2.2](#) y representado en el *Esquema 3.1*. La caracterización de la corriente de aerosol obtenida se realizó en términos de distribución del tamaño de partícula y concentración de número de partícula por  $\text{cm}^3$  ( $\#/\text{cm}^3$ ) empleando los equipos de medida OPC y CPC ([Anexo I, Sección I.4](#)). La caracterización por microscopía se realizó mediante la toma de muestras del material particulado en filtros de PC y en rejillas de cobre empleando los soportes descritos en el [Anexo I, Sección I.2](#).

El resultado obtenido fue un aerosol de una concentración de partículas ( $\#/\text{cm}^3$ ) de  $775 \#/\text{cm}^3$  que se mantuvo durante un tiempo aproximado de 35 minutos con una concentración constante de partículas, la concentración osciló de  $700 - 800 \#/\text{cm}^3$  (*Figura 7.17E*). Se pudo confirmar por microscopía SEM (*Figura 7.17*) que las micropartículas presentes en la corriente de aerosol tenían tamaños próximos al de las partículas individuales con un  $d_p = 2,80 \pm 1,30 \mu\text{m}$ , valor muy similar al obtenido en el material de partida (*Tabla 7.6*,  $d_p = 3,10 \pm 0,59 \mu\text{m}$ ) evidenciando la capacidad de disgregación del material en polvo de partida que posee el generador de aerosoles UNIZAR.



**Figura 7.17.** - (A - D) Imágenes de microscopía SEM de las MPs de AZT capturadas a partir de los aerosoles generados; (E) Evolución temporal de la concentración de MPs de AZT entre  $0,3 - 10 \mu\text{m}$  medido con el instrumento OPC durante un tiempo de 35 min.

Las imágenes de microscopía TEM mostraron resultados similares a los obtenidos por microscopía SEM, reflejando la existencia de partículas disgregadas de manera individual (*Figura 7.18*). Sin embargo, la distribución del tamaño de las partículas presentes en la corriente del aerosol y recogidas en dichas rejillas, tuvieron un tamaño menor al observado tanto en los filtros de PC como en el material inicial,  $d_p = 285,9 \pm 104,9$  nm (*Figura 7.18F*). Análogamente, la curva de tamaños de partícula obtenida por CPC indicó la existencia de una población de partículas con un tamaño  $< 200$  nm. Aunque esta población de menor tamaño no se observó en la muestra inicial por microscopía SEM y estuvo a una menor concentración respecto al resto de partículas ( $460 \text{ \#/cm}^3$ ) en la corriente de aerosol, si pudo cuantificarse y detectarse con la generación del aerosol.



**Figura 7.18.** - (A - D) Imágenes de microscopía TEM de capturas del aerosol generado a partir de las MPs de AZT; (E) Curva de distribución del tamaño de partículas entre 0,01 - 1 μm medido por CPC durante el proceso de aerosolización; (F) Histograma de distribución de tamaños de partícula de las MPs de AZT recogidas en rejilla de TEM ( $d_p = 285,9 \pm 104,9$  nm).

### 7.6.3 Diámetro efectivo de partículas en un proceso de inhalación

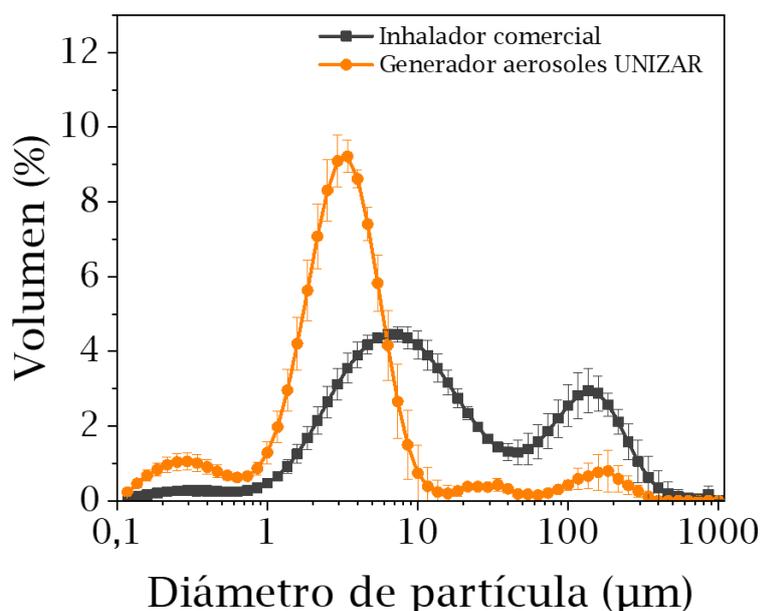
Tanto la distribución volumétrica como el tamaño físico de partícula se obtuvieron con el equipo Spraytec®. Estas medidas se realizaron con el objetivo principal de medir el tamaño de partícula en la nube de aerosol generada tanto con el inhalador comercial de polvo seco empleado anteriormente como con el generador de aerosoles UNIZAR.

Para los ensayos realizados con el inhalador comercial DPI (Breezhaler®), el polvo formado por las micropartículas de azitromicina se introdujo previamente en cápsulas (15 mg/cápsula) y se dispersó empleando un flujo de inspiración constante de 100 L/min. El procedimiento seguido para el desarrollo de estos ensayos se encuentra descrito en el [Capítulo 2, Punto 2.4.2](#). En el caso de los ensayos con el generador de aerosoles UNIZAR se midió directamente la pluma generada a la salida de boquilla del generador, el protocolo empleado se encuentra descrito en el [Capítulo 3, Punto 3.3.3](#).

La curva de distribución de tamaños obtenida con ambos dispositivos de inhalación se encuentra recogida en la *Figura 7.19*. La curva correspondiente al inhalador comercial (DPI) (en gris) muestra dos picos principales. Un primer pico próximo a las 10  $\mu\text{m}$  ( $9,96 \pm 0,50 \mu\text{m}$ ) el cual se asocia a partículas individuales o aglomerados de varias micropartículas, y un segundo pico cercano a las 120  $\mu\text{m}$  ( $144,83 \pm 16,95 \mu\text{m}$ ) que se relaciona con aglomerados de micropartículas que el DPI y el flujo aplicado es incapaz de disgregar. Por el contrario, en la curva obtenida con el generador de aerosoles UNIZAR el pico de 100  $\mu\text{m}$  desaparece casi por completo y aparece un pico principal próximo a las 3  $\mu\text{m}$ , que corresponde a las micropartículas de azitromicina individuales, tal y como se ha podido observar en las imágenes de microscopía SEM (*Figura 7.17*). Finalmente, se puede observar un pico inicial de muy poca intensidad desde 0,1-1  $\mu\text{m}$  que puede asociarse a la población de micropartículas detectadas por CPC y observadas por microscopía TEM (*Figura 7.18*). La *Tabla 7.8* se muestra el diámetro volumétrico medio y los valores de amplitud de la curva (Span).

**Tabla 7.8** - Valores obtenidos de la nube de aerosol con las micropartículas de azitromicina con el equipo Spraytec®.

Dispositivo	Dv10 (µm)	Dv50 (µm)	Dv90 (µm)	Span
<b>Inhalador comercial polvo seco</b>	2,09 ± 0,06	9,96 ± 0,50	144,83 ± 16,95	14,33
<b>Generador de aerosoles UNIZAR</b>	0,72 ± 0,23	2,87 ± 0,16	10,41 ± 5,38	3,37



**Figura 7.18.** - Distribución de las MPs de AZT en polvo seco con el instrumento Spraytec® según su tamaño físico. La curva naranja muestra la distribución del tamaño de partícula obtenido con el generador de aerosoles UNIZAR. La curva gris muestra la distribución del tamaño de partícula obtenido con el inhalador comercial de polvo seco (DPI) Breezhaler®.

Estos resultados permiten obtener dos conclusiones, en primer lugar, que el generador de aerosoles fue capaz de dispersar las micropartículas de manera individualizada evitando o minimizando fuertemente la formación de aglomerados. En segundo lugar, que la nube de aerosol que se forma consigue una distribución de tamaños de partícula más monodispersa con un pico máximo a  $2,87 \pm 0,16 \mu\text{m}$ , adecuado para administración pulmonar. Se concluye, por tanto, que el generador de aerosoles UNIZAR es capaz de dispersar de forma más eficiente la formulación desarrollada.

## 7.7 Conclusiones

A continuación, se indican las conclusiones principales de este capítulo:

- Se han obtenido micropartículas de azitromicina, tanto sin excipientes como con el fosfolípido DPPC, en forma de polvo seco con un tamaño menor de 5  $\mu\text{m}$ .
- Las micropartículas presentaron una forma homogénea, uniforme y el proceso mostró un valor de rendimiento material alto (próximo al 85%).
- Los resultados obtenidos con las micropartículas de azitromicina conteniendo DPPC no mostraron las ventajas esperadas. Se seleccionaron las micropartículas de azitromicina sin DPPC como formulación óptima para un posible tratamiento inhalatorio.
- Los ensayos de citotoxicidad realizados en las líneas celulares de pulmón revelaron que las micropartículas eran seguras para ser administradas a dosis próximas al valor de MIC. Además, los ensayos de captación celular indicaron que la azitromicina era internalizada por las células, siendo de especial interés en el tratamiento de patógenos intracelulares como *S. aureus*.
- La actividad antimicrobiana de la azitromicina se confirmó mediante la inhibición o reducción del crecimiento en biofilms desarrollados por *P. aeruginosa* y en bacterias planctónicas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.
- Los ensayos *in vitro* llevados a cabo para evaluar la deposición de las micropartículas en el sistema respiratorio indicaron que la dosis de antibiótico que alcanzaría el sistema respiratorio sería muy similar tanto en pacientes sanos como con EPOC.

- Los ensayos realizados con el generador de aerosoles UNIZAR demostraron la capacidad de generar una nube de aerosol con una concentración estable de partículas individuales con un tamaño adecuado para ser administradas por vía inhalatoria.
- La formulación desarrollada podría resultar de especial interés como alternativa a los tratamientos actuales frente a infecciones respiratorias, empleando para su administración la vía inhalatoria.

# Capítulo 8

## CONCLUSIONES GENERALES/ GENERAL CONCLUSIONS

---

*En este último Capítulo se recogen las conclusiones más relevantes obtenidas en esta Tesis Doctoral.*

*The last chapter summarizes the main conclusions obtained in this Doctoral Thesis.*



## 8. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en esta Tesis y su discusión, junto con las conclusiones específicas se ha presentado a lo largo de los distintos Capítulos. A continuación, se recogen de manera conjunta las principales conclusiones de esta Tesis.

### 8.1 Desarrollo de partículas basadas en polímeros naturales en forma de polvo seco para administración inhalatoria

- Los procesos de electropulverización (MPs de CS y MPs de AZT), liofilización (MPs de DXT) o secado en estufa de vacío (MPs de ALG) permiten obtener formulaciones en forma de polvo seco en las que el antibiótico empleado mantiene su actividad. No obstante, el proceso de producción de las micropartículas de azitromicina es el que presenta un rendimiento más alto (85%) en las condiciones estudiadas.
- Los procedimientos anteriores permiten obtener micropartículas con tamaños adecuados para el suministro por vía inhalatoria, siendo las MPs de CS las más adecuadas para alcanzar la región alveolar ( $< 1 \mu\text{m}$ ), las MPs de AZT los bronquiolos y bronquios secundarios ( $1-3 \mu\text{m}$ ) y, las MPs de ALG y MPs de DXT los bronquios primarios y secundarios ( $1-10 \mu\text{m}$ ).
- La carga de fármaco en cada una de las micropartículas depende de su naturaleza y del proceso utilizado para su fabricación. Las micropartículas de azitromicina han estado formadas únicamente de fármaco, seguidas en concentración de fármaco por las micropartículas de quitosano ( $\sim 75\%$ ), las de alginato ( $\sim 8,5\%$ ) y finalmente las micropartículas de dextrano ( $\sim 5\%$ ).
- Las cinéticas de liberación de los antibióticos presentes en las micropartículas poliméricas han reflejado una liberación rápida, alcanzando en todas ellas una concentración próxima al 80% en los

primeros 60 minutos de estudio. Esta liberación tan rápida es beneficiosa para el tratamiento de infecciones respiratorias, donde se necesitan altas concentraciones de fármaco en un periodo de tiempo corto, siempre y cuando se suministren por un procedimiento de acceso rápido (como es el suministro pulmonar directo por vía inhalatoria) para evitar pérdidas en el trayecto.

## 8.2 Biocompatibilidad de las formulaciones generadas y eficacia frente a infecciones típicas en las vías respiratorias

- Todas las micropartículas estudiadas fueron compatibles en la línea celular Calu-3. Igualmente, las MPs estudiadas en la línea NCI-H441 (MPs de AZT y MPs de DXT) mostraron una alta biocompatibilidad.
- En la línea celular A549 el CPX mostró toxicidad para concentraciones mayores de 50 µg/mL y, las micropartículas basadas en quitosano con ciprofloxacino a concentraciones mayores de 10 µg/mL. Las micropartículas de azitromicina mostraron toxicidad a concentraciones mayores de 100 µg/mL. Sin embargo, las concentraciones a las que mostraron biocompatibilidad fueron superiores a los valores de MIC y MBC de ambos antibióticos, posibilitando tanto su empleo como tratamiento de infecciones respiratorias.
- El ciprofloxacino (tanto libre como en las micropartículas de dextrano) mostró una mayor actividad anti-biofilms que las micropartículas de azitromicina. Sin embargo, ambos antibióticos y las micropartículas estudiadas que los contenían fueron capaces de reducir la densidad bacteriana de ambos tipos de biofilms respecto al grupo control.
- Los ensayos realizados en bacterias planctónicas (*S. aureus* y *P. aeruginosa*) con las micropartículas conteniendo antibióticos mostraron una reducción de la densidad óptica (OD600) y de las unidades formadoras de colonias en un valor igual o superior al

antibiótico libre respecto al grupo control. Igualmente, las alteraciones morfológicas en la membrana celular pudieron observarse claramente tras el tratamiento con las micropartículas.

### 8.3 Generación de aerosoles particulados adecuados para el suministro inhalado de fármacos

- Los experimentos de aerosolización de tres formulaciones comerciales (Seebri<sup>®</sup>, Ultibro<sup>®</sup> y Foster<sup>®</sup>) utilizando el generador de aerosoles UNIZAR revelaron su capacidad para disgregar las micropartículas de fármaco en un tamaño adecuado para su deposición a nivel alveolar.
- La medida del tamaño de partícula en el aerosol generado mediante el dispositivo UNIZAR reveló una considerable mejora en la capacidad de disgregación de formulaciones en forma de polvo seco en comparación con un DPI comercial.
- El dispositivo UNIZAR permite obtener corrientes de aerosol con concentraciones estables de micropartículas poliméricas durante al menos 20 minutos. Las MPs de CS mostraron los aerosoles con mayor concentración, seguido por las MPs de ALG y las MPs de AZT y, finalmente las MPs de DXT, las cuales mostraron la menor capacidad de aerosolización.
- Se puede concluir que el generador de aerosoles UNIZAR permite avanzar en la solución de los principales problemas de los actuales inhaladores de polvo seco: limitada capacidad de disgregación del polvo, empleo de excipientes y dependencia del flujo inspiratorio del paciente.

## 8. GENERAL CONCLUSIONS

The results obtained in this Thesis and their discussion, together with specific conclusions have been presented in the different Chapters. Next, only the main conclusions of the Thesis are summarized.

### 8.1 Development of polymeric particles as dry powder for inhaled therapy

- The processes of: electrospray (Chitosan MPs and Azithromycin MPs), freeze-drying (Dextran MPs), and conventional drying on stove (Alginate MPs) allow to obtain particle formulations as dry powder in which the antibiotic maintains its activity. However, under the conditions studied the process with the highest yield value (85%) was electrospray, used to obtain Azithromycin MPs.
- The above procedures allow to obtain microparticles with sizes suitable for inhaled administration. Chitosan MPs were the most appropriate to reach the alveoli ( $< 1 \mu\text{m}$ ), Azithromycin MPs for the bronchial and secondary bronchiole ( $1 - 3 \mu\text{m}$ ), and Alginate and Dextran MPs for primary and secondary bronchial ( $1 - 10 \mu\text{m}$ ).
- Drug loading in each of the microparticles prepared depends on its nature and on the process used to fabricate them. Azithromycin MPs had the highest value, as they were made of drug only, followed by Chitosan MPs ( $\sim 75\%$ ), Alginate MPs (8,5%), and Dextran MPs ( $\sim 5\%$ ).
- Drug release kinetics show a fast release in all particles, (about 80% of the drug was released in the first hour). This fast release could be beneficial for the treatment of respiratory infections, that often requires high concentrations to be reached in a short time. However, this must be associated to a fast-access procedure, such as inhaled delivery, to avoid on-the-way drug losses.

## 8.2 Biocompatibility of the formulations developed and efficiency against infections typical of the respiratory tract

- All the particles developed were biocompatible with Calu - 3. Also, the particles tested in the cell line NCI-H441 (Azithromycin and Dextran MPs) showed a high biocompatibility.
- In the A549 cell line, ciprofloxacin showed toxicity at concentrations higher than 50 µg/mL. In the same way, Chitosan MPs loaded with ciprofloxacin were toxic at concentrations > 10 µg/mL. Azithromycin MPs displayed cytotoxicity with concentrations above 100 µg/mL. However, the concentrations required for cytotoxicity were higher than the MBC and MIC values for both antibiotics (ciprofloxacin and azithromycin) enabling their use as a treatment for respiratory infections.
- Both ciprofloxacin and Dextran MPs loaded with ciprofloxacin expressed a higher antibiofilm activity compared to azithromycin. However, both types of antibiotics and the microparticles containing them were able to decrease the optical density of biofilm with regard to the control group.
- The experiments with planktonic *S. aureus* and *P. aeruginosa* showed that antibiotic-loaded microparticles were able to decrease the optical density and the colony forming capacity with the same or higher efficiency than the free antibiotic when compared to the control group. SEM images of treated bacteria corroborated the damage caused by clear alterations of cell membrane morphology.

### 8.3 Generation of particulate aerosols suitable for inhaled treatments

- Aerosolization experiments using three commercial formulations (Seebri<sup>®</sup>, Ultibro<sup>®</sup> and Foster<sup>®</sup>) showed the capacity of UNIZAR aerosol generator to disaggregate the drug microparticles to an adequate size for alveolar deposition.
- Particle size measurements of aerosol emerging from the nozzle of the UNIZAR generator showed a clear improvement in the ability to disaggregate the powder formulation when compared to a commercial dry powder inhaler (Breezhaler<sup>®</sup>).
- The aerosol generated using the UNIZAR device applied to polymeric microparticles allowed to obtain aerosol streams with stable concentrations for at least 20 minutes. Aerosols of chitosan MPs showed the highest concentration, followed by Alginate MPs, Azithromycin MPs, and lastly, Dextran MPs, which exhibited the lowest aerosolization ability.
- In summary, the UNIZAR aerosol generator allows to advance towards a solution to the main problems of current dry powder inhalers such as the limited capacity to disperse the powder, the need to use excipients, and the strong dependence on the inspiratory capacity of the patient.

# Anexos

---



# I. EQUIPOS Y TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

## I.1 Caracterización físico - química

### I.1.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC; *Differential Scanning Calorimetry*) es de gran utilidad en el análisis de biopolímeros y fármacos para la determinación de su estabilidad oxidativa, degradación térmica y pérdida de agua.

Los análisis realizados mediante la técnica de DSC se llevaron a cabo en el equipo DSC822e (Mettler Toledo, EE. UU.) equipado con la tecnología TZero® y un sistema de refrigeración RSC-90. Las muestras analizadas (Capítulos 7) se introdujeron en crisoles de aluminio (100 µL de tamaño) y se cerraron herméticamente empleando el sellador Tzero (Mettler Toledo, EE. UU.). Para los experimentos realizados se utilizó nitrógeno como gas, tanto para el proceso de purga como para el análisis de las diferentes muestras. En todos los experimentos se empleó como referencia un pocillo de aluminio vacío. Las muestras se calentaron desde 30-400 °C a una velocidad constante de 10 °C/min, empleando un caudal de nitrógeno de 50 mL/min.

### I.1.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR; *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) permite analizar la composición de materiales tanto orgánicos como inorgánicos (sólidos, líquidos o gaseosos) en función de los diferentes enlaces químicos presentes en ellos.

El equipo empleado para los análisis fue el espectrómetro Vertex 70 (Bruker, EE. UU.). Este equipo dispone de un accesorio Golden Gate Diamond para reflectancia total atenuada (ATR; *Attenuated Total Reflectance*). Los espectros de los distintos materiales se obtuvieron con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup> en el intervalo de 600 a 4000 cm<sup>-1</sup>, realizando un total de 40 barridos. Para

el análisis se colocó una cantidad aproximada de 2 mg de muestra en forma de polvo seco directamente en el porta-muestras del equipo.

### I.1.3 Difracción de Rayos X (XRD)

La información sobre la estructura cristalográfica de las sustancias puras (tanto fármacos como polímeros) y de las micropartículas generadas se obtuvo mediante la técnica de Difracción de Rayos X (XRD; *X-Ray Diffraction*).

La caracterización se llevó a cabo con un difractómetro de rayos X PANalytical (Empyrean, Malvern Panalytical, Reino Unido). Este equipo empleado en los Capítulos 5, 6 y 7 pertenece al Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), CSIC-Universidad de Zaragoza. Las muestras de polvo se analizaron a temperatura ambiente, se extendieron sobre un porta-objetos de vidrio y se analizaron empleando una fuente de radiación de Cu-K $\alpha$  y un ultradetector de D/tex. Los difractogramas se registraron en un rango de 5 a 40° (valores de 2 $\theta$  (°)) a una velocidad de 0,013/200 segundos. Se empleó un voltaje de 45 kV y una corriente de 40 mA. Finalmente, las medidas se analizaron con el software de análisis HighScorePlus.

### I.1.4 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) y Potencial Zeta ( $\xi$ )

La Dispersión Dinámica de la Luz (DLS; *Dynamic Light Scattering*) permite determinar el diámetro hidrodinámico de las partículas en suspensión acuosa o en otros disolventes. Esta técnica de caracterización se basa en la medida de la intensidad de luz producida por la dispersión Rayleigh en una suspensión de partículas proporcionando información sobre su distribución de tamaño de partícula hidrodinámico, es decir, el tamaño eficaz de los aglomerados en suspensión y su polidispersidad. La medida se realiza con un láser que atraviesa la disolución coloidal y analiza la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo.

El potencial  $\xi$  es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas coloidales, y es de especial importancia porque puede afectar a su estabilidad en el coloide. Además, se relaciona con algunas de sus propiedades como su carga superficial. Ésta desempeña un papel fundamental en la adhesión tanto a la pared celular como a la bacteriana. Un potencial  $\xi$  positivo va a promover la mucoadhesión de las partículas por interacciones electrostáticas entre los grupos cargados positivamente de la partícula y las células y bacterias con carga negativa [447,448].

Para la medida del diámetro hidrodinámico y el potencial  $\xi$  de las partículas en suspensión acuosa se empleó el equipo Brookhaven 90 Plus (EE. UU.). El diámetro hidrodinámico se midió únicamente en las micropartículas de quitosano (Capítulo 4), lo que permitió realizar una comparación con el tamaño obtenido por microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, las micropartículas de quitosano se diluyeron en agua Milli-Q y se sonicaron un tiempo aproximado de 5 minutos antes de cada medida.

En el caso del potencial  $\xi$ , las muestras se introdujeron en una celda electroforética y se diluyeron previamente en una mezcla de agua y KCl 1 mM. La carga iónica requerida en la suspensión se obtuvo por la adición del KCl 1 mM. Los resultados se obtuvieron a 25 °C partir de 5 medidas de 25 ciclos cada una. Se midió el potencial  $\xi$  de todos los materiales utilizados (Capítulos 4, 5, 6 y 7).

### **I.1.5 Distribución del Tamaño de Partícula en Agua**

El equipo Mastersizer2000 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) empleado en esta Tesis Doctoral pertenece al Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca.

Este equipo es un analizador del tamaño de partícula (para el rango de 0,06 - 2000  $\mu\text{m}$ ) mediante tecnología de difracción láser. Permite obtener la

curva de distribución de tamaños, el índice de polidispersidad (PDI) y el diámetro medio de Sauter (SMD o D [3,2]). El SMD indica el diámetro medio de partícula y se define como el diámetro de una esfera que tiene la misma relación volumen/área que la partícula de interés. Este equipo se empleó para la medida del tamaño de las micropartículas de alginato en agua (Capítulo 6). Las micropartículas se sonicaron un tiempo aproximado de 10 minutos y posteriormente se añadieron a la celda de medida hasta observar que la concentración se encontraba en el rango óptimo.

### I.1.6 Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

La composición superficial tanto de los fármacos puros como de las micropartículas se ha estudiado por Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS; *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*). Esta técnica se basa en el empleo de los fotoelectrones emitidos por la superficie de un sólido al ser irradiado con fotones de energías entre 200-2000 eV. Dado que cada elemento presenta una energía de enlace característica asociada con sus orbitales atómicos, el espectro de las energías emitidas tras la irradiación del material con rayos X proporcionará un conjunto de picos característicos a energías cinéticas relativas a la energía del fotón emitido y las respectivas energías de enlace. De esta manera, se puede confirmar la información obtenida de forma cualitativa, identificando las especies atómicas presentes en el sólido.

Los análisis mediante XPS se realizaron en un espectrómetro de fotoelectrones AXIS Ultra DLD (Kratos Analytica, Ltd, Reino Unido) perteneciente al LMA del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón (INMA), CSIC-Universidad de Zaragoza. Las muestras analizadas (Capítulo 4, 5 y 7) se colocaron sobre una cinta de carbono de doble cara para su análisis, manteniéndose a vacío en una pre-cámara a temperatura ambiente. El equipo empleó una fuente monocromática de Al ( $K\alpha = 1486,6$  eV) a 15 kV y 10 mA. Para los análisis de perfil de concentraciones se ha empleado un cañón de Ar operando a 3 kW, con una superficie barrida real (*raster*) de 5x5 mm.

### I.1.7 Análisis reológico

Los análisis reológicos se realizaron con el objetivo de conocer tanto las características de las disoluciones de alginato (por ejemplo, el grado de pseudoplasticidad) como para determinar la naturaleza elástica o viscosa de los geles formados entre el alginato y los agentes entrecruzantes empleados (Capítulo 6), ya que las propiedades reológicas juegan un papel central en los procesos de atomización.

El reómetro empleado, AR 1500 ex (TA Instruments, España) pertenece al Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca, los ensayos se realizaron en colaboración con el Dr. Antonio Taberero durante la estancia de investigación.

En todos los ensayos se usó la misma geometría: plato de aluminio de 4 cm de diámetro con *gap* de 1 mm. Las condiciones experimentales que se emplearon para el análisis de las disoluciones de alginato a distintas concentraciones (5 mg/mL hasta 25 mg/mL) fueron: temperatura constante de 25 °C, rango de velocidad de cizallamiento entre 0,1 a 250 s<sup>-1</sup>, frecuencia de barrido de 0,5 a 500 rad·s<sup>-1</sup> y una frecuencia angular constante de 1,0 rad·s<sup>-1</sup>. Posteriormente, los resultados se ajustaron a la ecuación de la Ley de la potencia (Ecuación I.1) obteniendo los diferentes parámetros,

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad \text{Ec. (I.1)}$$

donde  $\tau$  es el esfuerzo cortante,  $K$  es el índice de consistencia de flujo,  $\dot{\gamma}$  es la velocidad de deformación y  $n$  es el índice de comportamiento de flujo.

Por otro lado, se estudió el comportamiento de los hidrogeles de alginato formados en función del agente entrecruzante (BaCl<sub>2</sub> o CaCl<sub>2</sub>). En este caso las condiciones de medida fueron, 25°C, frecuencia de barrido de 0,5 a 500 rad·s<sup>-1</sup> a una deformación fija dentro de la región viscoelástica. Esta deformación se seleccionó tras realizar un barrido del análisis de deformación (de 0,5% a 300%)

a una frecuencia angular constante de  $1,0 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ . De los resultados obtenidos de éste análisis, se fijó como óptimo, una deformación del 1%, valor empleado para el posterior análisis oscilatorio. Dicho análisis permitió determinar el módulo de almacenamiento de energía ( $G'(\omega)$ ) y el módulo de pérdida ( $G''(\omega)$ ) de las disoluciones y geles de alginato estudiados.

Los resultados del barrido de frecuencia mediante la determinación del módulo de almacenamiento de energía  $G'(\omega)$  y el módulo de pérdida  $G''(\omega)$  proporcionaron información de la fuerza de las interacciones moleculares establecidas entre el alginato y los agentes entrecruzantes empleados ( $\text{BaCl}_2$  y  $\text{CaCl}_2$ ), además de informar de la naturaleza predominante de los hidrogeles, tipo sólido o viscoso [449].

### **I.1.8 Medida tensión superficial y densidad**

La caracterización de las disoluciones de alginato empleadas en el Capítulo 6 se completó con la medida de la tensión superficial. Ésta se midió con un estalagmómetro de vidrio con una capacidad máxima  $10,274 \text{ cm}^3$  (Isolab, Alemania). Y con la medida de la densidad, la cual se midió con un picnómetro también de vidrio (Isolab, Alemania).

Ambos aparatos de medida pertenecen al [Departamento de Ingeniería Química y Textil](#) de la [Universidad de Salamanca](#), y las medidas se realizaron durante la estancia de investigación realizada.

## **I.2 Caracterización morfológica**

Los microscopios electrónicos SEM, FIB-SEM y TEM empleados pertenecen al [LMA del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón](#), [CSIC-Universidad de Zaragoza](#). Dichos microscopios permitieron obtener imágenes de la morfología de las partículas y adquirir información sobre la composición química de las muestras mediante un sistema de espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDX; *Energy Dispersive X-Ray*). Finalmente, el

microscopio óptico empleado pertenece al Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca.

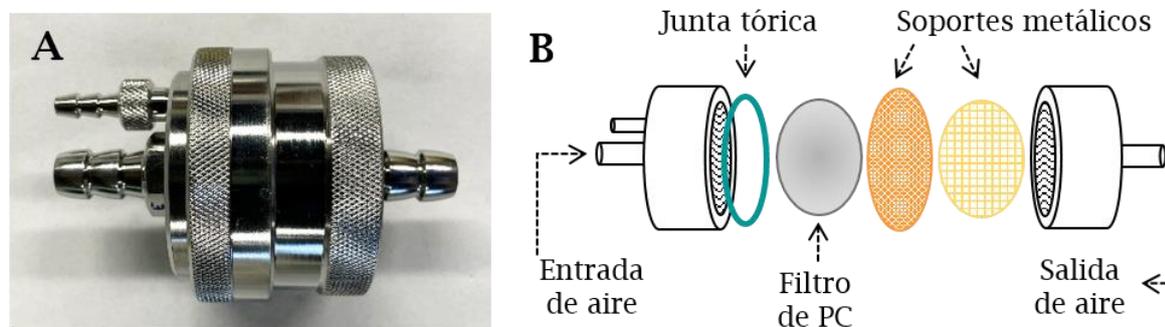
### I.2.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La Microscopía Electrónica de Barrido (SEM; *Scanning Electron Microscope*) se basa en el uso de un haz de electrones enfocado mediante lentes magnéticas y requiere el uso de alto vacío. El haz de electrones barre la superficie de la muestra provocando interacciones con su superficie. Como consecuencia, se emiten electrones secundarios de menor energía que los incidentes, electrones retrodispersados. Los electrones secundarios son detectados, formando una imagen tridimensional de la superficie. Debido al sistema de adquisición de la imagen, un microscopio SEM permite el análisis de la topografía de muestras con dimensiones del orden de varias decenas de milímetros.

Las imágenes de SEM que aparecen a lo largo de esta Tesis Doctoral se realizaron en el microscopio SEM INSPECT-F50 (FEI Company, EE. UU.). Para la observación de las muestras en este microscopio, se hizo uso de portamuestras metálicos recubiertos con cinta de carbono de doble cara. Se empleó un voltaje entre 5-10 kV y un *spot size* de 3,5. Todas las muestras observadas en este microscopio fueron no conductoras, por lo que se necesitó un recubrimiento con paladio (Pd) previo a su análisis (grosor del recubrimiento de aproximadamente 20 nm). Dicho recubrimiento se realizó con el recubridor Leica EM ACE200 (Leica Microsystems, Alemania).

Las partículas en fase aerosol se analizaron entre otras técnicas mediante microscopía SEM, para lo cual dichas partículas se capturaron en filtros de policarbonato (PC) (con poros homogéneamente distribuidos de 0,1  $\mu\text{m}$ , 47 mm de diámetro, modelo VCTP04700, Merck-Millipore, EE. UU.). Estas muestras se recogieron empleando un portafiltros de acero inoxidable (Sartorius, Alemania) que permitió colocar los filtros en posición perpendicular al flujo (*Figura I.1*). Para su observación, los filtros se pegaron directamente sobre los portamuestras recubiertos con cinta de carbono de doble cara.

Las imágenes obtenidas en este microscopio se analizaron con el software ImageJ permitiendo obtener la curva de distribución de tamaños de partícula, utilizándose para ello al menos 4 imágenes SEM de regiones diferentes de la muestra analizada.



**Figura I.1.** – Soporte para filtros de policarbonato (PC) utilizados en la recogida de muestra para análisis por microscopía SEM: (A) Imagen del soporte compacto; (B) Esquema del soporte con sus diferentes partes.

### I.2.2 Dual Beam (FIB-SEM)

Este instrumento consta de un microscopio electrónico de barrido (SEM) y una columna de haz de iones focalizados (FIB). En el haz se emplean iones  $\text{Ga}^+$  en vez de electrones, lo cual proporciona mayor energía y permite modificar la estructura de las muestras observadas mediante la realización de cortes, y estimar la composición de la muestra a través de un análisis EDX.

El equipo criogénico Dual Beam empleado en esta Tesis Doctoral (Capítulo 5 y 7) fue el modelo Nova NanoLab 200 (FEI Company, EE. UU.). Las muestras se recubrieron con carbono para la realización de análisis EDX (Punto I.2.1) tras ser depositadas sobre cinta de carbono de doble cara. Previamente a su observación, las muestras se enfriaron hasta una temperatura de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aproximadamente, permitiendo la realización de cortes que expusieron la estructura interna de las micropartículas para su observación. Se empleó una corriente de  $0,1\text{ nA}$  y  $50\text{ pA}$  con un voltaje de  $30\text{ kV}$ .

El análisis elemental de las micropartículas de dextrano (Capítulo 5) permitió confirmar la presencia del antibiótico ciprofloxacino en el exterior. Se

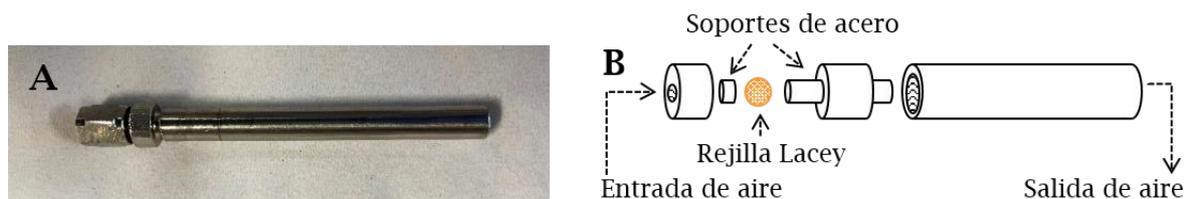
analizó mediante EDX la composición de las partículas en la superficie y tras la realización de cortes. Los elementos detectados fueron, Flúor (F), Nitrógeno (N), Carbono (C) y Oxígeno (O).

El análisis elemental de las micropartículas de alginato ([Capítulo 6](#)) permitió confirmar la presencia de los cristales de colistina en su superficie. Se realizó inicialmente un análisis de la composición de las partículas superficiales y posteriormente, en el interior tras la realización de cortes. Los elementos detectados fueron, Bario (Ba), Azufre (S), Nitrógeno (N), Carbono (C) y Oxígeno (O).

### **I.2.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM; *Transmission Electron Microscopy*) utiliza un haz de electrones generado al someter un metal como el wolframio a un intenso campo eléctrico. De esta forma, se obtiene un haz de electrones cuya energía y frecuencia dependen del voltaje aplicado y que se focaliza sobre la muestra. Si la muestra se encuentra lo suficientemente cargada, al atravesarla algunos de los electrones son absorbidos, dispersados o cambian su energía debido a interacciones inelásticas, por lo que el haz transmitido es menos intenso que el haz incidente. Estas diferencias de intensidad se recogen en un detector CCD, creando un mapa de contrastes que forma la imagen. Dichos contrastes dependen a su vez de la densidad, espesor y número atómico de la muestra.

Todas las muestras observadas por microscopía TEM se realizaron en un microscopio Tecnai® T20 (FEI Company, EE. UU.). Las muestras observadas se obtuvieron durante los ensayos de generación de aerosoles desarrollados a lo largo de esta Tesis Doctoral. Para la captura de las partículas en fase aerosol se empleó el sistema diseñado previamente por el [Dr. Alberto Clemente](#) [450] ([Figura I.2](#)), en el cual se incorporó en su interior una rejilla Lacey FCF200-Cu (Electron Microscopy Sciences, EE. UU.) compuesta por fibras de carbono. Las muestras se observaron empleando voltajes en el rango de 20 a 200 kV.



**Figura I.2.** – Soporte para rejillas de microscopía TEM para recogida de muestra del material particulado presente en el aerosol: **(A)** Imagen del soporte compacto; **(B)** Esquema del soporte con sus diferentes partes.

Las imágenes obtenidas en este microscopio se analizaron con el software ImageJ permitiendo obtener la distribución de tamaños de partícula, utilizándose para ello al menos 4 imágenes TEM de regiones diferentes de la muestra analizada.

#### I.2.4 Microscopio Óptico

El microscopio óptico emplea la luz visible y un sistema de lentes que permiten ampliar imágenes a partir de muestras pequeñas.

Las micropartículas de alginato en suspensión acuosa ([Capítulo 6](#)) se observaron en el microscopio óptico DM1000 Leica (Leica Microsystems, Alemania), que dispone de un sistema con cámara (Leica DFC280) acoplado que permitió obtener imágenes de las muestras analizadas.

El protocolo seguido para la observación de las muestras consistió en sonicar durante un tiempo de 5 minutos una disolución de las micropartículas de alginato (concentración  $\sim 250$  mg/mL), tras lo que se depositó una gota de la suspensión sobre un portaobjetos de vidrio. La cámara se calibró previamente con la finalidad de estimar el tamaño de partícula observada empleando el software Measure IC. La curva de distribución de tamaños se obtuvo mediante el conteo de las partículas con el software ImageJ, lo que permitió obtener la curva de distribución de tamaños de partícula, utilizándose para ello al menos 4 imágenes de regiones diferentes de la muestra analizada.

## I.3 Determinación y cuantificación de fármacos

### I.3.1 Estudios de liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro* de los distintos antibióticos (Capítulos 4, 5 y 6) se realizaron en el medio Buffer Salino Fosfato (PBS; *Phosphate Buffered Saline*). Las micropartículas se incubaron en suspensiones de concentraciones 1 mg/mL a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , con agitación horizontal (Thermo-Shaker, Biosan, Letonia) a 250 rpm. Se cogieron muestras a distintos tiempos de estudio y se centrifugaron (12500 rpm, 10 minutos a temperatura ambiente). El pellet obtenido de la centrifugación se dispersó en 1 mL de PBS nuevo. La concentración de los fármacos en las muestras se midió por Espectroscopía de Absorción UV-Vis (ciprofloxacino, Capítulos 4 y 5) y por Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento (sulfato de colistina, Capítulo 6).

### I.3.2 Espectrofotometría de Absorción Ultravioleta visible (UV-vis)

La espectroscopia de absorción UV-Vis es una técnica de caracterización molecular que se basa en la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, concretamente en el fenómeno de absorción. Esta técnica permite un análisis cuantitativo ya que, según la Ley de Beer-Lambert (ecuación I.2):

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon l C} \quad \text{Ec. (I.2)}$$

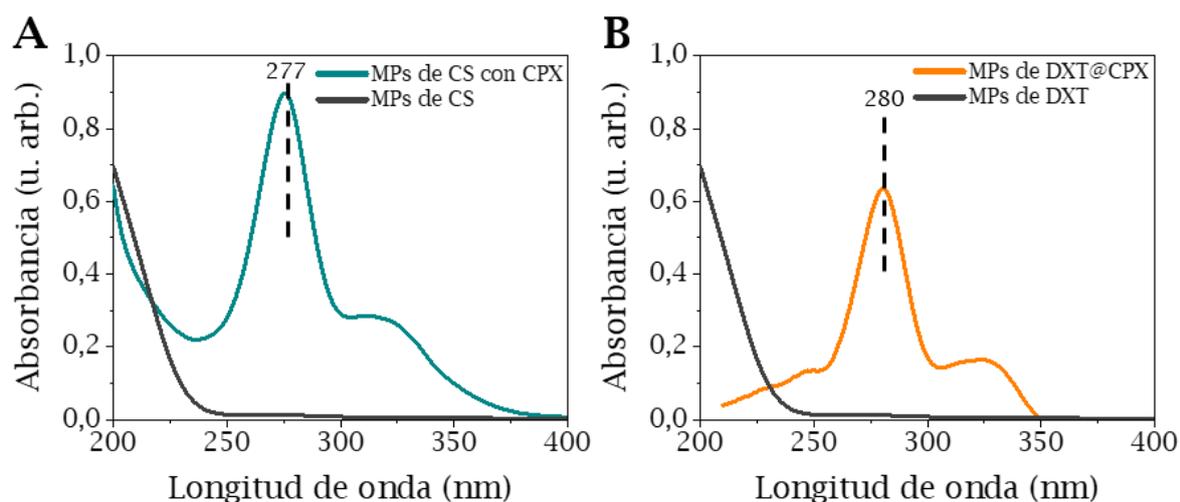
puede establecerse una relación entre la cantidad de luz absorbida y la concentración,  $C$ , de un compuesto, siendo  $l$  la longitud del paso de la luz a través de la muestra y  $\varepsilon$  el coeficiente de absorción propio de cada sustancia.

La técnica UV-Vis se empleó para la cuantificación y detección del antibiótico ciprofloxacino (pureza  $\geq 99\%$ , Fluka analytical, España), el cual presenta un pico máximo de absorción característico a una longitud de onda de 277 nm en agua. Dicho pico se ve ligeramente desplazado dependiendo del disolvente empleado. Las medidas se realizaron en el espectrofotómetro Jasco

V-670 (Jasco, España) que tiene un rango de medida de longitudes de onda de 190 a 1100 nm. Para la realización de las medidas se empleó una cubeta de cuarzo de 1 mL con una longitud de paso de 10 mm.

En el caso de las micropartículas de quitosano (Capítulo 4) el contenido de ciprofloxacino (carga de fármaco, CF) se determinó poniendo las partículas en medio ligeramente ácido (HCl, 0,1 M), para obtener la disolución completa del polímero y la extracción del fármaco presente en ellas. Las suspensiones de partículas se agitaron a 500 rpm durante 48 h a temperatura ambiente. Finalmente, la suspensión se centrifugó 10 min a 12.500 rpm y el sobrenadante se recogió para su posterior análisis (Figura I.3A).

Por otro lado, en el caso de las micropartículas de dextrano (Capítulo 5) la carga de fármaco se determinó poniendo las partículas en dimetilsulfóxido (DMSO), con el objetivo de disolver el polímero. Las partículas se mantuvieron un tiempo mínimo de 30 minutos, suficiente para la disolución completa de las partículas a temperatura ambiente. Finalmente, la suspensión se centrifugó 10 min a 12500 rpm y el sobrenadante se recogió para su posterior análisis. Se observó que en este disolvente la longitud de onda del pico característico que presenta el ciprofloxacino se desplazó hasta los 280 nm (Figura I.3B).



**Figura I.3.** – Espectro UV-vis, disolución de: (A) MPs de CS con y sin ciprofloxacino en HCl 0,1 M; (B) MPs de DXT con y sin ciprofloxacino en DMSO.

Las curvas de calibrado se recogen en la *Tabla I.1* y se generaron a partir de un estándar de ciprofloxacino comercial en los diferentes medios estudiados. El valor de absorbancia asociada al pico característico del ciprofloxacino permitió calcular la cantidad de antibiótico presente en las partículas (carga de fármaco, CF) y la eficacia de encapsulación (EE) del fármaco, ambos valores se calcularon siguiendo las ecuaciones I.3 y I.4 respectivamente,

$$CF (\%) = \frac{\text{Mg de fármaco medidos}}{\text{Mg MPs iniciales}} \times 100 \quad \text{Ec. (I.3)}$$

$$EE (\%) = \frac{\text{Mg de fármaco medidos}}{\text{Mg MPs fármaco teóricos}} \times 100 \quad \text{Ec. (I.4)}$$

**Tabla I.1** – Rectas de calibrado de ciprofloxacino en los distintos disolventes.

Medio	Rango de concentraciones	Recta de calibrado*
HCl 0,1 M	0,05 - 10 µg/mL	$y = 99,62x + 0,0042$ ( $R^2 = 0,999$ )
DMSO	0,5 - 10 µg/mL	$y = 0,106x - 0,0274$ ( $R^2 = 0,999$ )
PBS	0,312 - 10 µg/mL	$y = 95,694 x - 0,0108$ ( $R^2 = 0,999$ )

\*y = absorbancia; x = concentración (µg/mL)

### I.3.3 Espectroscopia de Fluorescencia

El antibiótico ciprofloxacino presenta autofluorescencia a valores de  $\lambda_{\text{excitación}}$  de 340 nm y de 445 nm. En esta Tesis Doctoral, durante los ensayos realizados con células (Capítulo 2, Sección 2.2) y con las MPs de dextrano (Capítulo 5) se empleó un lector de placas (FLUOstar Optima, BM Labtech, Offenburg, Alemania), perteneciente al Trinity Biomedical Science Institute (TSBI). Este equipo permitió medir la autofluorescencia del ciprofloxacino para su posterior cuantificación. Se generó una curva de calibrado a partir de un estándar de ciprofloxacino comercial (pureza  $\geq 99\%$ ) ( $y = 0,0076x - 5,259$ ;  $R^2 > 0,991$ ) con un rango de concentración comprendido entre 0 - 62,5 µg/mL en KRB (KRB; *Krebs Ringer Buffer*). La medida se realizó en condiciones de

excitación/emisión 340/360 nm a temperatura ambiente y con un factor de amplificación de 1200.

### I.3.4 Cromatografía Líquida de Ultra Alto Rendimiento (UPLC)

La cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC; *Ultra Performance Liquid Chromatography*) permite identificar, separar y cuantificar compuestos. Las muestras pasan a través de la columna cromatográfica a alta presión con ayuda de la fase móvil. De este modo, el tiempo necesario para que las diferentes moléculas fluyan a través de la columna, tiempo de retención, va a depender de la interacción específica de la sustancia el material de la columna cromatográfica.

El equipo UPLC Waters ACQUITY system H-Class (Waters Corporation, EE. UU.) se empleó para la cuantificación del sulfato de colistina ([Capítulo 6](#)) y azitromicina ([Capítulo 7](#)). Está formado por una bomba binaria, un automuestreador, una columna con controlador de temperatura y un detector de matriz de fotodiodos (PDA; *Photodiode Array Detector*). Todo este sistema está acoplado a un espectrómetro de masas que posee un detector (ACQUITY QDa) de ionización por electropulverización (ESI; *Electrospray Ionization*). La columna, fase móvil y condiciones de análisis empleadas variaron en función del fármaco a cuantificar. Todas las muestras se filtraron (filtros de 0,2  $\mu\text{m}$ , Merck-Millipore, EE. UU.) previo a su análisis. Finalmente, la adquisición y procesamiento de los datos se realizó utilizando el software MASSLYNX (Waters Corporation, EE. UU.).

Con los dos fármacos, el método de UPLC desarrollado se validó con respecto al límite de detección (LOD; *Limit Of Detection*) y al límite de cuantificación (LOQ; *Limit Of Quantification*). Ambos parámetros se definieron dependiendo de las condiciones experimentales fijadas para cada caso. El LOD y LOQ [451,452] se calcularon a partir de la curva de calibrado, siguiendo las ecuaciones I.5 y I.6:

$$\text{LOD} = 3 \times \left(\frac{\sigma}{s}\right) \quad \text{Ec. (I.5)}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \left(\frac{\sigma}{s}\right) \quad \text{Ec. (I.6)}$$

donde  $\sigma$  es la desviación estándar de las intersecciones en el eje-Y y  $s$  la pendiente de la curva de calibración.

Específicamente, la cuantificación del sulfato de colistina (Capítulo 6) se realizó empleando una columna cromatográfica PREMIER HSS T3 UPLC (1,8  $\mu\text{m}$ , 2,1  $\times$  100mm, ACQUITY). Las medidas se realizaron a 80 °C empleando un flujo isocrático de 0,5 mL/min que contenía acetonitrilo/agua Milli-Q (70/30 v/v). Para ambos disolventes se empleó como modificador de la fase móvil ácido fórmico al 0,1% v/v. La absorbancia del sulfato de colistina (en  $\lambda = 210 \text{ nm}$ ) se controló durante el análisis empleando un detector PDA. Sin embargo, la cuantificación del fármaco se realizó con el detector de masas ACQUITY QDa a partir del ión más abundante correspondiente a una relación masa/carga ( $m/z$ ) de 578,6 ( $[\text{M}-2\text{H}^+]^{2+}$ ). Bajo estas condiciones de medida, el tiempo de retención para el sulfato de colistina fue de 0,45 minutos. La recta de calibrado se realizó utilizando estándares comerciales de sulfato de colistina ( $R^2 > 0,994$ ) dentro del rango de concentración requerido (1 - 20  $\mu\text{g/mL}$ ) en agua Milli-Q (Tabla I.2). El valor de LOD y el de LOQ fueron 0,373 y 1,244 ppm respectivamente para las condiciones y el método analítico empleado.

El segundo fármaco cuantificado por UPLC fue la azitromicina (Capítulo 7). En concreto, para su análisis se empleó la columna cromatográfica CORTECS UPLC C18 (90 Å, 1,6  $\mu\text{m}$  2,1  $\times$  100 mm, WATERS, EE. UU.). Las medidas se realizaron a una temperatura de 40°C empleando un flujo isocrático de 0,5 mL/min que contenía acetonitrilo/agua Milli-Q (70/30 v/v). Para ambos disolventes se utilizó una concentración constante de modificador que se añadió a la fase móvil. Dicho modificador consistió en una disolución de cloruro de amonio en amoniaco (10 mM). Se empleó para monitorizar la absorbancia de la azitromicina (en  $\lambda = 210 \text{ nm}$ ) el detector PDA. Sin embargo, al igual que en el caso anterior, para obtener una cuantificación más precisa se empleó el detector de masas ACQUITY QDa, a partir del ión más abundante

correspondiente a la relación  $m/z$  de 375,26 ( $[M-2H^+]^{2+}$ ). En estas condiciones de medida, el tiempo de retención de la azitromicina fue de 5,75 minutos. La curva de calibrado se generó a partir de un estándar de azitromicina comercial ( $R^2 > 0,991$ ) con un rango de concentración comprendido entre 0,50 - 10  $\mu\text{g/mL}$  en etanol absoluto (Tabla I.2). El valor de LOD y el de LOQ fueron 0,300 y 1,001 ppm respectivamente para las condiciones y el método analítico empleado.

**Tabla I.2** - Rectas de calibrado de la azitromicina y sulfato de colistina en los distintos medios por UPLC.

Fármaco	Medio	Rango de concentraciones	Recta de calibrado*
Sulfato de colistina	Agua Milli-Q	1 - 20 $\mu\text{g/mL}$	$y = 3215,3x + 6421,5$ ( $R^2 = 0,994$ )
Azitromicina	Etanol	0,50 - 10 $\mu\text{g/mL}$	$y = 410840x - 186959$ ( $R^2 = 0,991$ )

\*y = absorbancia; x = área bajo la curva

### I.3.5 Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC)

El equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC; *High Performance Liquid Chromatography*) empleado en el Capítulo 7 pertenece al Trinity Biomedical Science Institute (TSBI), Dublín.

El equipo HPLC Waters Alliance 2695 (Waters Corporation, EE. UU.) se utilizó para el análisis de las muestras de azitromicina procedentes de los ensayos con células pulmonares (línea celular NCI-H441) (Capítulo 2, Puntos 2.2.4 y 2.2.5). Dicho equipo consta de un detector Light Scattering Waters 2424, un módulo de separación Waters 2695, un detector de absorbancia de doble longitud de onda Waters 2487 y una Hypersil™ BDS HPLC (C18, 250 × 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Thermo Scientific™). El protocolo de medida se adaptó de Mangal *et al.*, [430]. La temperatura que se empleó para la medida de las muestras fue de 40 °C, la velocidad del flujo fue de 1 mL/min y la fase móvil estuvo formada por una mezcla de 20% v/v (A) buffer fosfato de potasio (pH = 7, pH ajustado con hidróxido de sodio) y 80% v/v (B) metanol. La azitromicina se detectó a una

longitud de onda de 210 nm durante el análisis. En estas condiciones de medida, los cromatogramas tuvieron una duración total de 15 min y el tiempo de retención de la azitromicina fue de 9,75 min. La curva de calibrado se generó a partir de un estándar de azitromicina comercial ( $y = 1052,8x - 290,87$ ;  $R^2 > 0,996$ ) con unos rangos de concentración comprendidos entre 1 - 100  $\mu\text{g/mL}$  en Krebs Ringer Buffer (KRB).

### I.3.6 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (H-RMN)

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN; *Nuclear Magnetic Resonance*) se basa en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos, cuando se someten a un campo magnético externo, absorbiendo radiación electromagnética, dando lugar a la generación de diferentes niveles energéticos. Esta técnica puede emplearse tanto para análisis cuantitativos elementales como para la realización de estudios cinéticos y termodinámicos.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear se empleó para la detección del antibiótico sulfato de colistina (Capítulo 6). Los ensayos se desarrollaron en el Servicio de RMN (NUCLEUS) perteneciente a la Universidad de Salamanca por el Dr. Álvaro González-Garcinuño. Para el análisis de las muestras se empleó el espectrómetro Varian 400 (Bruker, EE. UU.). Los espectros H-RMN de las muestras se registraron a temperatura ambiente utilizando el equipo Avance NEO 400 MHz (Bruker, EE. UU.), el cual tiene incorporado un espectrómetro Prodigy CPPBBO BB-H & F con una crio-sonda de gradiente z.

La optimización del método de detección del antibiótico sulfato de colistina se puso a punto empleando un patrón de glicerina y dicho fármaco en agua deuterada. Se observó que al obtener el espectro e integrar los picos correspondientes a ambos compuestos, la señal (área bajo la curva) obtenida fue 5 veces mayor para la glicerina que para el sulfato de colistina. Se determinó el parámetro de proporcionalidad de la señal sobre la concentración con la ecuación I.7. Una vez obtenido este valor ( $k = 2,42$ ), sabiendo el peso molecular del sulfato de colistina (1253,53 g/mol) y la concentración de las

micropartículas de alginato y de sulfato de colistina inicial, se pudo cuantificar la carga de fármaco (CF) en las MPs con la ecuación I.3 (Punto I.3.2)

$$\frac{\text{señal sulfato de colistina}}{\text{señal glicina}} = k \times \frac{[\text{sulfato de colistina}]}{[\text{glicina}]} \quad \text{Ec. (I.7)}$$

## I.4 Caracterización de aerosoles

### I.4.1 Contador de partículas óptico (OPC)

Los contadores de partículas ópticos (OPC; *Optical Particle Counters*) son equipos de monitorización de aerosoles de tamaño intermedio. Las partículas presentes en el aerosol se miden por la dispersión de la luz dentro de la celda de medición. Dependiendo de la intensidad de la señal de luz dispersada, las partículas se clasifican por tamaños.

Durante la realización de esta Tesis se ha utilizado un contador de partículas óptico para la monitorización de la concentración y el tamaño de partícula presente en los aerosoles generados. El equipo empleado ha sido el modelo 1.108 de Grimm Aerosol-Technik (Ainring, Alemania), el cual posee un láser de 780 nm capaz de detectar un rango de tamaño de partícula desde 0,3 a 20  $\mu\text{m}$ . El volumen de muestreo fue de 1,2 L/min y la velocidad de adquisición de datos fue de 12 medidas/minuto presentando una reproducibilidad de  $\pm 2\%$ .

### I.4.2 Contador de núcleos de condensación (CPC)

Los contadores de núcleos de condensación (CPC; *Condensation Particle Counters*) son equipos de monitorización de aerosoles, que permiten la detección de partículas de muy bajo tamaño, inferior a 300 nm.

En estos equipos, las partículas que forman el aerosol se exponen a un ambiente saturado en vapor de un disolvente, además, en nuestro caso de butanol. Mediante un descenso de la temperatura, se produce una

condensación del vapor sobre las partículas, lo que produce un crecimiento del tamaño de las mismas hasta valores en el rango de las micras (10  $\mu\text{m}$ ) que son fácilmente detectados por un contador óptico. La concentración final de gotas va a ser la misma que la presente en el aerosol, ya que cada partícula crece de manera individual.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se ha utilizado un contador de núcleos de condensación para la monitorización de la concentración y el tamaño de partícula presente en los aerosoles generados (a excepción del [Capítulo 5](#)). El equipo empleado ha sido el modelo 5.401 de Grimm Aerosol-Technik (Ainring, Alemania). El butanol (1-butanol,  $\geq 99,4\%$ ) fue adquirido en Sigma-Aldrich. Las temperaturas de las cámaras de saturación y condensación fueron 35 °C y 10 °C respectivamente. El rango de partículas detectables estuvo entre 5 y 1083 nm, el caudal de aspiración fue de 0,3 L/min y la velocidad de adquisición de datos fue de 1 medida/segundo.

## II. MODELOS MATEMÁTICOS DE LIBERACIÓN

### II.1 Cálculo de la cinética de liberación del ciprofloxacino desde las micropartículas de quitosano

La simulación de la cinética de liberación del ciprofloxacino desde las micropartículas de quitosano, Capítulo 4, fue realizada con la asistencia del Prof. Antonio Monzón.

Para el análisis de los datos, se asumió que la tasa de ciprofloxacino liberada de las micropartículas de quitosano ( $dm_t^{CS}/dt$ ) siguió un proceso de primer orden y, por lo tanto, el contenido de ciprofloxacino en las partículas de quitosano disminuyó exponencialmente con el tiempo (ecuación II.1):

$$-\frac{dm_t^{CS}}{dt} = k_R \times m_t^{CS} \rightarrow m_t^{CS} = m_0^{CS} \times \exp(-k_R \times t) \quad (\text{Ec. II.1})$$

donde  $m_0^{CS}$  representa la concentración de ciprofloxacino inicial en las micropartículas de quitosano y  $k_R$  es la constante cinética de liberación del fármaco. Este parámetro es dependiente de la interacción específica que se establece entre el polímero (quitosano) y el fármaco liberado (ciprofloxacino), así como de las condiciones experimentales.  $k_R$  fue el único parámetro que se calculó mediante regresión no lineal del modelo.

La cantidad de ciprofloxacino que se liberó al medio (PBS) se calculó directamente a partir del balance de masa con la ecuación II.2:

$$m_t = m_0^{CS} - m_t^{CS} \rightarrow m_t = m_0^{CS} \times (1 - \exp(-k_R \times t)) \quad (\text{Ec. II.2})$$

$$m_0^{CS} = m_\infty$$

donde se deduce que la máxima concentración de ciprofloxacino que es posible alcanzar en el medio,  $m_{\infty}$ , corresponde a la cantidad inicial de ciprofloxacino cargado en las micropartículas de quitosano,  $m^{CS}_0$ .

Estas ecuaciones se emplearon en una hoja de cálculo Excel habilitada para macros de Microsoft (versión 2016) para calcular los parámetros del modelo propuesto. Los tres parámetros ( $k_R$ ,  $m_{\infty}$  y  $R^2$ ) calculados y los datos relativos a la bondad del ajuste se recogen en la *Tabla 4.7* (Capítulo 4).

## II.2 Cálculo de la cinética de liberación del ciprofloxacino desde las micropartículas de dextrano

El análisis de los parámetros que describen el modelo de liberación del ciprofloxacino desde las micropartículas de dextrano (Capítulo 5) fue realizada por el Dr. Álvaro González-Garcinuño.

Se empleó la ecuación II.3 para modelar los datos experimentales, modelo que representa la evolución de la concentración del fármaco (ciprofloxacino) en función del tiempo:

$$\frac{dC}{dt} = k \times (C_{\infty} - C) \quad \text{Ec. (II.3)}$$

donde  $k$  es la constante de velocidad de liberación del fármaco,  $C$  representa la concentración del fármaco en cada instante y  $C_{\infty}$  es la concentración máxima liberada.

Tanto la ecuación como los datos experimentales obtenidos de la liberación se introdujeron en el programa de simulación gPOMS Modelo Builder 7.1. (PSE). El parámetro  $k$  mostró un valor de  $0,058 \text{ min}^{-1}$  (varianza con un valor constante del 6,27%). Las pruebas de bondad de ajuste mostraron un valor de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) = 10,0 ( $\chi^2$  crítica = 15,5) y las pruebas de ausencia de ajuste un valor de  $F = 0,25$  ( $F$  crítica = 3,07). Ambos valores ( $\chi^2$  y  $F$ ) fueron menores

que el valor crítico respectivo, por lo que el parámetro obtenido fue satisfactorio. La precisión del modelo propuesto se evaluó mediante dos pruebas (prueba de bondad de ajuste y prueba de falta de ajuste). La representación de la curva obtenida con la simulación del ajuste se encuentra en la *Figura 5.9* (Capítulo 5).

### II.3 Cálculo de la cinética de liberación del sulfato de colistina desde las micropartículas de alginato

La estimación de los parámetros que describen el modelo de liberación del sulfato de colistina desde las micropartículas de alginato, *Capítulo 6*, fue realizada por el Dr. *Álvaro González-Garcinuño*.

Se empleó el modelo de Noyes-Whitney [405] para representar los datos experimentales. Dicho modelo se encuentra resumido en la ecuación II.4 en la cual se representa la evolución de la concentración del fármaco (sulfato de colistina) en función del tiempo:

$$\frac{dC}{dt} = k \times S_w \times (C_\infty - C) \quad \text{Ec. (II.4)}$$

donde  $C$  representa la concentración del fármaco,  $C_\infty$  es la concentración máxima liberada,  $k$  es la velocidad de disolución intrínseca y  $S_w$  es el área de la sección transversal del cristal de colistina.  $S_w$  es una función del tiempo ya que el radio del cristal se reduce a medida que avanza la disolución. Para estimar el área del cristal ( $S_w$ ) se utiliza como aproximación el área de la sección transversal de una esfera (ecuación II.5)

$$S_w = 4\pi \times r^2 \quad \text{Ec. (II.5)}$$

la variación del radio ( $r$ ) a lo largo del tiempo viene dada por la ecuación de Aaron [453] para la disolución de precipitados esféricos (ecuación II.6)

$$\frac{dr}{dt} = -m \times \frac{D}{r} - m \sqrt{\frac{D}{\pi \times t}} \quad \text{Ec. (II.6)}$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión del sulfato de colistina en el medio (PBS) y  $m$  es la constante experimental.

Del mismo modo que en el caso de la [Sección II.2](#), estas ecuaciones se introdujeron en el programa de simulación gPOMS Modelo Builder 7.1. (PSE) así como los datos experimentales obtenidos de la liberación. Los valores de los tres parámetros ( $k$ ,  $D$  y  $m$ ) determinados se encuentran recogidos en la [Tabla II.1](#) (varianza con un valor máximo del 15% del valor de referencia). La precisión del modelo propuesto se evaluó mediante dos pruebas (prueba de bondad de ajuste y prueba de falta de ajuste). La representación del modelo calculado junto con los datos experimentales obtenidos se encuentra representado en la [Figura 6.16](#)

Los parámetros del ajuste resultaron satisfactorios ya que, por un lado, el valor del promedio ponderado fue menor que el valor de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) (10,98 frente a 11,07) y por otro, el valor F también fue menor que el valor de F-crítico (0,069 frente a 3,326) ([Tabla II.1](#)).

**Tabla II.1** – Parámetros estimados del modelo de liberación del antibiótico sulfato de colistina.

Parámetros estimados			Pruebas de bondad de ajuste		Pruebas de falta de ajuste	
$D$ (m <sup>2</sup> /s)	$k$ (1/m <sup>2</sup> s)	$m$	Promedio ponderado	$\chi^2$	Valor de F	F crítico
7,84 $\times 10^{-9}$	$2,35 \times 10^8$	1,81 $\times 10^{-9}$	10,98	11,07	0,069	3,326
Intervalo de confianza 95%						
$D$			$k$		$m$	
(7,73 $\times 10^{-9}$ - 7,89 $\times 10^{-9}$ )			(2,30 $\times 10^8$ - 2,40 $\times 10^8$ )		(1,77 $\times 10^{-9}$ - 1,85 $\times 10^{-9}$ )	

### III. PUBLICACIONES, CONGRESOS Y ESTANCIAS

#### III.1 Publicaciones

Arauzo B.; Lobera M.P.; Monzon A.; Santamaria J. Dry powder formulation for pulmonary infections: Ciprofloxacin loaded in chitosan sub-micron particles generated by electrospray. *Carbohydrate Polymers* 2021, 273.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118543>. IF = 9,381.

Arauzo B.; Lopez-Mendez T.B.; Lobera M.P.; Calzada-Funes J.; Pedraz J.L.; Santamaria J. Excipient-Free Inhalable Microparticles of Azithromycin Produced by Electrospray: A Novel Approach to Direct Pulmonary Delivery of Antibiotics. *Pharmaceutics* 2021, 13, 1988.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13121988>. IF = 6,321.

Arauzo B.; Gonzalez - Garcinuño A.; Tabernero A.; Lobera M.P.; Santamaria J.; Martin del Valle E.M. Tuning alginate microparticle size via atomization of non-newtonian fluids. *Materials* 2021, 14(24)

<https://doi.org/10.3390/ma14247601>. IF = 3,623.

Arauzo B.; Gonzalez - Garcinuño A.; Tabernero A.; Calzada - Funes J.; Lobera M.P.; Martin del Valle E.M.; Santamaria J. Engineering alginate - based dry powder microparticles to a size suitable for direct pulmonary delivery of antibiotics. 2022 (en revisión por *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*)

#### III.2 Congresos

“Desarrollo de vectores para la liberación de fármacos basados en nanopartículas de quitosano en polvo seco”. B. Arauzo, M.P. Lobera, F. Balas, M. Arruebo, J. Santamaría. **I Congreso sobre Materiales Multifuncionales para Jóvenes “MultiMat”**. Granada, septiembre 2018. Contribución: Póster.

“Encapsulación de ciprofloxacino en nanopartículas de quitosano mediante electrospray”. B. Arauzo, M.P. Lobera, F. Balas, M. Arruebo, J. Santamaría. **8ª Jornada de Jóvenes investigadores (Química y Física) de Aragón**. Zaragoza, noviembre 2018. Contribución: Póster.

“Nanopartículas de quitosano como vehículo para la liberación controlada de antibióticos”. B. Arauzo, M.P. Lobera, M. Arruebo, J. Santamaria. **36 Jornadas Nacionales de Ingeniería química**. Zaragoza, septiembre 2019. Contribución: Póster.

“Alginate microparticles produced by atomization system: Biomedical applications”. B. Arauzo, Á. González-Garcinuño, A. Tabernero, M. Arruebo, M.P. Lobera, J. Santamaría, E.M. Martín del Valle. **NanoBioMed (NBMO)**. Conferencia Online, julio 2020. Contribución: Flash - Póster.

“Tracking inhaled nanoparticles: IR820 encapsulated in chitosan microparticles for nanoparticle imaging”. B. Arauzo, M.P. Lobera, M. Arruebo, J. Santamaría. **Nanosafety**. Conferencia Online, octubre 2020. Contribución: Póster.

### III.3 Estancias

Estancia de tres meses, enero - marzo 2020, Salamanca. Departamento de Ingeniería Química y Textil, **Universidad de Salamanca**. Investigador Principal del grupo: Eva María Martín del Valle. Estancia cofinanciada por el programa Ibercaja - CAI de estancias de investigación (Ref. IT 13/19) y por ayudas de movilidad CIBER. Los resultados obtenidos de esta estancia se encuentran recogidos en el [Capítulo 6](#).

Estancia de un mes, dividida en dos periodos, abril 2021 y febrero 2022, Vitoria. Departamento de Tecnología Farmacéutica, **Universidad del País Vasco**. Grupo NanoBioCel, investigador principal: José Luis Pedraz. Estancias financiadas por las ayudas de movilidad CIBER. Los resultados obtenidos de

esta estancia, ensayos de deposición pulmonar *in vitro*, se encuentran recogidos a lo largo de los diferentes Capítulos que componen esta Tesis Doctoral.

Estancia de cuatro meses, septiembre - diciembre 2021, Dublín. Trinity Biomedical Science Institute, **Trinity College Dublin**. Investigador Principal del grupo: Carsten Ehrhardt. Estancia cofinanciada por el programa Ibercaja - CAI de estancias de investigación (Ref. IT 4/21) y por la ayuda para la realización de prácticas en instituciones europeas dentro del marco del programa Erasmus+ de Campus Iberus. En los **Capítulos 5 y 7** se encuentran representados los resultados obtenidos de los experimentos realizados durante esta estancia.

# Bibliografía

---



## Bibliografía

- [1] S. Azarmi, W.H. Roa, R. Löbenberg, Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 863–875. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.11.006>.
- [2] Q. Deng, L. Deng, Y. Miao, Y. Li, Particle deposition in the human lung: Health implications of particulate matter from different sources, *Environ. Res.* 169 (2018) 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.014>.
- [3] Y. Guo, H. Bera, C. Shi, L. Zhang, D. Cun, M. Yang, Pharmaceutical strategies to extend pulmonary exposure of inhaled medicines, *Acta Pharm. Sin. B.* 11 (2021) 2565–2584. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.05.015>.
- [4] J.S. Patton, P.R. Byron, Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 67–74. <https://doi.org/10.1038/nrd2153>.
- [5] E.R. Weibel, On the tricks alveolar epithelial cells play to make a good lung, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191 (2015) 504–513. <https://doi.org/10.1164/rccm.201409-1663OE>.
- [6] R.J. Mason, R.G. Crystal, Pulmonary cell biology, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157 (1998) S72–S81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.4.nhlbi-3>.
- [7] R. Siekmeier, G. Scheuch, Systemic treatment by inhalation of macromolecules - Principles, problems, and examples, *J. Physiol. Pharmacol.* 59 (2008) 53–79.
- [8] M. Sakagami, In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1030–1060. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.07.012>.
- [9] Societies FoIR, The global impact of respiratory disease, in: *Eur. Respir. Soc.*, Second edi, Sheffield, UK, 2017.
- [10] J.Y. Yhee, J. Im, R.S. Nho, Advanced therapeutic strategies for chronic lung disease using nanoparticle-based drug delivery, *J. Clin. Med.* 5 (2016). <https://doi.org/10.3390/jcm5090082>.
- [11] World Health Organization (WHO), Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), (2021). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic->

- obstructive-pulmonary-disease-(copd) (accessed March 23, 2022).
- [12] World Health Organization (WHO), The top 10 causes of death, (2020). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed March 23, 2022).
- [13] World Health Organization (WHO), COVID-19 Dashboard, (2022). <https://covid19.who.int/> (accessed May 30, 2022).
- [14] Z. Huang, S.N. Kłodzińska, F. Wan, H.M. Nielsen, Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: state of the art towards efficient treatment of recalcitrant respiratory tract bacterial infections, *Drug Deliv. Transl. Res.* 11 (2021) 1634–1654. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00954-1>.
- [15] C. Velino, F. Carella, A. Adamiano, M. Sanguinetti, A. Vitali, D. Catalucci, F. Bugli, M. Iafisco, Nanomedicine approaches for the pulmonary treatment of cystic fibrosis, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00406>.
- [16] N. Alhaji, N.J. O'Reilly, H. Cathcart, Developing ciprofloxacin dry powder for inhalation: A story of challenges and rational design in the treatment of cystic fibrosis lung infection, *Int. J. Pharm.* 613 (2022) 121388. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121388>.
- [17] S. Moreau-Marquis, B.A. Stanton, G.A. O'Toole, *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 21 (2008) 595–599. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.12.001>.
- [18] E.E. Bernardy, R.A. Petit, V. Raghuram, A.M. Alexander, T.D. Read, J.B. Goldberg, Genotypic and phenotypic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates from cystic fibrosis patient lung infections and their interactions with *Pseudomonas aeruginosa*, *Am. Soc. Microbiol.* 11 (2020) e00735-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00735-20>.
- [19] K. Kovach, M. Davis-fields, Y. Irie, K. Jain, S. Doorwar, K. Vuong, N. Dhamani, K. Mohanty, A. Touhami, V.D. Gordon, Evolutionary adaptations of biofilms infecting cystic fibrosis lungs promote mechanical toughness by adjusting polysaccharide production, *Npj Biofilms Microbiomes.* 3 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41522-016-0007-9>.
- [20] A. Lopes da Silva, F.F. Cruz, P.R.M. Rocco, M.M. Morales, New perspectives in nanotherapeutics for chronic respiratory diseases, *Biophys. Rev.* 9 (2017) 793–803. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0319-x>.
- [21] D. Cipolla, H.K. Chan, Inhaled antibiotics to treat lung infection, *Pharm. Pat.*

- Anal. 2 (2013) 647-663. <https://doi.org/10.4155/ppa.13.47>.
- [22] M.C. Gaspar, J.J.S. Sousa, A.A.C.C. Pais, O. Cardoso, D. Murtinho, M.E.S. Serra, F. Tewes, J.C. Olivier, Optimization of levofloxacin-loaded crosslinked chitosan microspheres for inhaled aerosol therapy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96 (2015) 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.07.010>.
- [23] J. Ferreira-Coimbra, C. Sarda, J. Rello, Burden of community-acquired pneumonia and unmet clinical needs, *Adv. Ther.* 37 (2020) 1302-1318. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01248-7>.
- [24] S.J. Aston, Pneumonia in the developing world: Characteristic features and approach to management, *Respirology.* 22 (2017) 1276-1287. <https://doi.org/10.1111/resp.13112>.
- [25] J.M. Galván, O. Rajas, J. Aspa, Review of non-bacterial infections in respiratory medicine: Viral pneumonia, *Arch. Bronconeumol.* 51 (2020) 590-597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arbr.2015.09.015>.
- [26] A. Safdar, S.A. Shelburne, S.E. Evans, B.F. Dickey, Inhaled therapeutics for prevention and treatment of pneumonia, *Expert Opin. Drug Saf.* 8 (2009) 435-449. <https://doi.org/10.1517/14740330903036083>.
- [27] L.A. Mandell, Community-acquired pneumonia: An overview, *Postgrad. Med.* 127 (2015) 607-615. <https://doi.org/10.1080/00325481.2015.1074030>.
- [28] W.I. Sligl, T.J. Marrie, Severe community-acquired pneumonia, *Crit. Care Clin.* 29 (2013) 563-601. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2013.03.009>.
- [29] D. Snijders, J.M.A. Daniels, C.S. De Graaff, T.S. Van Der Werf, W.G. Boersma, Efficacy of corticosteroids in community-acquired pneumonia: A randomized double-blinded clinical trial, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181 (2010) 975-982. <https://doi.org/10.1164/rccm.200905-0808OC>.
- [30] P.J. Barnes, S.D. Shapiro, R.A. Pauwels, Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms, *Eur. R.* 22 (2003) 672-688. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00040703>.
- [31] J.C. Hogg, F. Chu, S. Utokaparch, R. Woods, M. Elliott, L. Buzatu, R. Cherniack, R.M. Rogers, F.C. Sciurba, M.D. Harvey, P.D. Paré, The nature of small-airway obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *N. Engl. J. Med.* 350 (2015). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032158>.
- [32] W. Davidson, T.R. Bai, Lung structural changes in Chronic Obstructive

- Pulmonary Diseases, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*. 4 (2005) 643-649. <https://doi.org/10.2174/156801005774912842>.
- [33] W. Zhong, X. Zhang, Y. Zeng, D. Lin, J. Wu, Recent applications and strategies in nanotechnology for lung diseases, *NanoResearch*. 14 (2021) 2067-2089. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12274-020-3180-3>.
- [34] J.M. Madison, R.S. Irwin, Chronic obstructive pulmonary disease, *Lancet*. 352 (1998). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)11081-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)11081-9).
- [35] M. Macleod, A. Papi, M. Contoli, B. Begh , B.R. Celli, J.A. Wedzicha, L.M. Fabbri, Chronic obstructive pulmonary disease exacerbation fundamentals: Diagnosis, treatment, prevention and disease impact, *Respirology*. 26 (2021) 532-551. <https://doi.org/10.1111/resp.14041>.
- [36] N. Shetty, P. Ahn, H. Park, S. Bhujbal, D. Zemlyanov, A. Cavallaro, S. Mangal, J. Li, Q.T. Zhou, Improved physical stability and aerosolization of inhalable amorphous ciprofloxacin powder formulations by incorporating synergistic colistin, *Mol. Pharm.* 15 (2018) 4004-4020. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00445>.Improved.
- [37] M. Cazzola, J. Ora, L. Calzetta, P. Rogliani, M.G. Matera, The future of inhalation therapy in chronic obstructive pulmonary disease, *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* 3 (2022) 100092. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2022.100092>.
- [38] C.J.L. Murray, K.S. Ikuta, F. Sharara, L. Swetschinski, G. Robles Aguilar, A. Gray, C. Han, C. Bisignano, P. Rao, E. Wool, S.C. Johnson, A.J. Browne, M.G. Chipeta, F. Fell, S. Hackett, G. Haines-Woodhouse, B.H. Kashef Hamadani, E.A.P. Kumaran, B. McManigal, R. Agarwal, et al., Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis, *Lancet*. 399 (2022) 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- [39] M.I. Restrepo, H. Keyt, L.F. Reyes, Aerosolized antibiotics, *Respir. Care*. 60 (2015) 762-770. <https://doi.org/10.4187/respcare.04208>.
- [40] V.A. Spirescu, C. Chircov, A.M. Grumezescu, E. Andronescu, Polymeric nanoparticles for antimicrobial therapies: An up-to-date overview, *Polymers (Basel)*. 13 (2021) 724. <https://doi.org/10.3390/polym13050724>.
- [41] P.C. Sharma, A. Jain, S. Jain, R. Pahwa, M.S. Yar, Ciprofloxacin: Review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25 (2010) 577-589. <https://doi.org/10.3109/14756360903373350>.

- [42] S.A. Breda, A.F. Jimenez-Kairuz, R.H. Manzo, M.E. Olivera, Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives, *Int. J. Pharm.* 371 (2009) 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.026>.
- [43] K. Karimi, E. Pallagi, P. Szabó-Révész, I. Csóka, R. Ambrus, Development of a microparticle-based dry powder inhalation formulation of ciprofloxacin hydrochloride applying the quality by design approach, *Drug Des. Devel. Ther.* 10 (2016) 3331–3343. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S116443>.
- [44] I. Turel, P. Bukovec, M. Quirids, Crystal structure of ciprofloxacin hexahydrate and its characterization, *Int. J. Pharm.* 152 (1997) 59–65. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)04913-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)04913-2).
- [45] R. Pignatello, A. Leonardi, V. Fuochi, G.P. Petronio, A.S. Greco, M.F. Pio, A method for efficient loading of ciprofloxacin hydrochloride in cationic solid lipid nanoparticles: Formulation and microbiological evaluation, *Nanomaterials*. 8 (2018) 304. <https://doi.org/10.3390/nano8050304>.
- [46] H. Zhao, Y. Le, H. Liu, T. Hu, Z. Shen, J. Yun, J.F. Chen, Preparation of microsized spherical aggregates of ultrafine ciprofloxacin particles for dry powder inhalation (DPI), *Powder Technol.* 194 (2009) 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2009.03.031>.
- [47] J. Weers, Comparison of phospholipid-based particles for sustained release of ciprofloxacin following pulmonary administration to bronchiectasis patients, *Pulm. Ther.* 5 (2019) 127–150. <https://doi.org/10.1007/s41030-019-00104-6>.
- [48] M.E. Falagas, S.K. Kasiakou, Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies, *Crit. Care.* 10 (2006). <https://doi.org/10.1186/cc3995>.
- [49] C.Y. Wu, L.Z. Benet, Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system, *Pharm. Res.* 22 (2005). <https://doi.org/10.1007/s11095-004-9004-4>.
- [50] N. Grégoire, V. Aranzana-Climent, S. Magréault, S. Marchand, W. Couet, Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of Colistin, *Clin. Pharmacokinet.* 56 (2017) 1441–1460. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0561-1>.
- [51] T. Velkov, P.E. Thompson, R.L. Nation, J. Li, Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics, *J. Med. Chem. Perspect.* 53 (2010) 1898–1916. <https://doi.org/10.1021/jm900999h>.

- [52] N. V. Dubashynskaya, Y.A. Skorik, Polymyxin delivery systems: Recent advances and challenges, *Pharmaceutics*. 13 (2020). <https://doi.org/10.3390/ph13050083>.
- [53] N.H. O'Driscoll, T.P.T. Cushnie, K.H. Matthews, A.J. Lamb, Colistin causes profound morphological alteration but minimal cytoplasmic membrane perforation in populations of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Arch. Microbiol.* 200 (2018) 793-802. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1485-3>.
- [54] F. Tewes, J. Brillault, N. Gregoire, J.C. Olivier, I. Lamarche, C. Adier, A.M. Healy, S. Marchand, Comparison between colistin sulfate dry powder and solution for pulmonary delivery, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 557. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060557>.
- [55] Q.T. Zhou, D.A. V. Morton, H.H. Yu, J. Jacob, J. Wang, J. Li, H.K. Chan, Colistin powders with high aerosolisation efficiency for respiratory infection: Preparation and in vitro evaluation, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 3736-3747. <https://doi.org/10.1002/jps.23685>.
- [56] S. Mangal, H. Park, L. Zeng, H.H. Yu, Y.W. Lin, T. Velkov, J.A. Denman, D. Zemlyanov, J. Li, Q.T. Zhou, Composite particle formulations of colistin and meropenem with improved in-vitro bacterial killing and aerosolization for inhalation, *Int. J. Pharm.* 548 (2018) 443-453. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.010>.
- [57] Y.H. Liu, S.C. Kuo, B.Y. Yao, Z.S. Fang, Y.T. Lee, Y.C. Chang, T.L. Chen, C.M.J. Hu, Colistin nanoparticle assembly by coacervate complexation with polyanionic peptides for treating drug-resistant gram-negative bacteria, *Acta Biomater.* 82 (2018) 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.013>.
- [58] W. Wang, Q.T. Zhou, S.P. Sun, J.A. Denman, T.R. Gengenbach, N. Barraud, S.A. Rice, J. Li, M. Yang, H.K. Chan, Effects of surface composition on the aerosolisation and dissolution of inhaled antibiotic combination powders consisting of colistin and rifampicin, *AAPS J.* 18 (2016) 372-384. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9848-z>.
- [59] Q.T. Zhou, S.P. Sun, J.G.Y. Chan, P. Wang, N. Barraud, S.A. Rice, J. Wang, J. Li, H.K. Chan, Novel inhaled combination powder containing amorphous colistin and crystalline rifampentine with enhanced antimicrobial activities against planktonic cells and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* for respiratory infections, *Mol. Pharm.* 12 (2015) 2594-2603. <https://doi.org/10.1021/mp500586p>.
- [60] M.J. Parnham, V.E. Haber, E.J. Giamarellos-Bourboulis, G. Perletti, G.M. Verleden, R. Vos, Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications, *Pharmacol. Ther.* 143 (2014) 225-245.

- <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.03.003>.
- [61] S. Sheybani, T. Hosseinifar, M. Abdouss, S. Mazinani, Mesoporous molecularly imprinted polymer nanoparticles as a sustained release system of azithromycin, *RSC Adv.* 5 (2015) 98880–98891. <https://doi.org/10.1039/C5RA11970G>.
- [62] T. Kauss, A. Gaubert, C. Boyer, B.B. Ba, M. Manse, S. Massip, J.M. Léger, F. Fawaz, M. Lembege, J.M. Boiron, X. Lafarge, N. Lindegardh, N.J. White, P. Olliaro, P. Millet, K. Gaudin, Pharmaceutical development and optimization of azithromycin suppository for paediatric use, *Int. J. Pharm.* 441 (2013) 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.040>.
- [63] World Health Organization (WHO), Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for the WHO model list of essential medicines immediate release, solid oral dosage forms, Geneva, Switzerland, 2005. [http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QA\\_S04%0A109Rev1\\_Waive\\_invivo\\_bioequiv.pdf](http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QA_S04%0A109Rev1_Waive_invivo_bioequiv.pdf).
- [64] Z. Rukavina, Š.K. Maja, J. Filipovic - Grcic, J. Lovric, Ž. Vanic, Azithromycin-loaded liposomes for enhanced topical treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections, *Int. J. Pharm.* 553 (2018) 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.024>.
- [65] M.W. Ruble, D.H. Gilbert, S.H.Z. J, In-vitro interaction of azithromycin and fluoroquinolones against gram-positive and gram-negative bacteria, *Clin. Microbiol. Infect.* 1 (1995) 183–189. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1996.tb00551.x>.
- [66] E.B. Wilms, D.J. Touw, H.G.M. Heijerman, Pharmacokinetics of azithromycin in plasma, blood, polymorphonuclear neutrophils and sputum during long-term therapy in patients with cystic fibrosis, *Ther. Drug Monit.* 28 (2006) 219–225. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000195617.69721.a5>.
- [67] K. Ikemoto, S. Kobayashi, Y. Haranosono, S. Kozai, T. Wada, H. Tokushige, Contribution of anti-inflammatory and anti-virulence effects of azithromycin in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* keratitis, *BMC Ophthalmol.* 20 (2020) 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12886-020-01358-4>.
- [68] Q. Wang, G. Mi, D. Hickey, Y. Li, J. Tu, T.J. Webster, Y. Shen, Azithromycin-loaded respirable microparticles for targeted pulmonary delivery for the treatment of pneumonia, *Biomaterials.* 160 (2018) 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.022>.
- [69] H. Li, D.H. Liu, L.L. Chen, Q. Zhao, Y.Z. Yu, J.J. Ding, L.Y. Miao, Y.L. Xiao, H.R.

- Cai, D.P. Zhang, Y.B. Guo, C.M. Xie, Meta-analysis of the adverse effects of long-term azithromycin use in patients with chronic lung diseases, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 511-517. <https://doi.org/10.1128/AAC.02067-13>.
- [70] P. Gautret, J.-C. Lagier, P. Parola, V.T. Hoang, L. Meddeb, J. Sevestre, M. Mailhe, B. Doudier, C. Aubry, S. Amrane, et al., Clinical and microbiological effect of a combination of hydroxychloroquine and azithromycin in 80 COVID-19 patients with at least a six-day follow up: A pilot observational study, *Travel Med. Infect. Dis.* 34 (2020) 101663. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101663>.
- [71] P. Gautret, J.-C. Lagier, P. Parola, V.T. Hoang, L. Meddeb, M. Mailhe, B. Doudier, J. Courjon, V. Giordanengo, et al., Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 56 (2020) 105949. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105949>.
- [72] D. Echeverría-Esnal, C. Martin-ontiyuelo, M.E. Navarrete, M.D.A. Cuscó, O. Ferrández, J.P. Horcajada, Azithromycin in the treatment of COVID-19: a review, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 19 (2021) 147-163. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813024>.
- [73] M. Alkotaji, Azithromycin and ambroxol as potential pharmacotherapy for SARS-CoV-2, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 56 (2020) 106192. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106192>.
- [74] D. Tyteca, P.V.D. Smissen, M. Mettlen, P.M. Tulkens, P.J. Courtoy, Azithromycin, a lysosomotropic antibiotic, has distinct effects on fluid-phase and receptor-mediated endocytosis, but does not impair phagocytosis in J774 macrophages, *Exp. Cell Res.* 281 (2002) 86-100. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5613>.
- [75] V. Erakovic, M. Banjanac, V. Munic, D. Polanc, Impairment of lysosomal functions by azithromycin and chloroquine contributes to anti-inflammatory phenotype, *Cell. Immunol.* 279 (2012) 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.09.007>.
- [76] Q.T. Zhou, S.S.Y. Leung, P. Tang, T. Parumasivam, Z.H. Loh, H.K. Chan, Inhaled formulations and pulmonary drug delivery systems for respiratory infections, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 85 (2015) 83-99. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.022>.
- [77] M.Z.R. Sabuj, N. Islam, Inhaled antibiotic-loaded polymeric nanoparticles for the management of lower respiratory tract infections, *Nanoscale Adv.* 3 (2021) 4005-4018. <https://doi.org/10.1039/d1na00205h>.

- [78] Y.H. Lim, K.M. Tiemann, D.A. Hunstad, M. Elsbahy, K.L. Wooley, Polymeric nanoparticles in development for treatment of pulmonary infectious diseases, *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology*. 8 (2016) 842–871. <https://doi.org/10.1002/wnan.1401>.
- [79] W.-H. Lee, C.-Y. Loo, D. Traini, P.M. Young, Nano- and micro-based inhaled drug delivery systems for targeting alveolar macrophages, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2015). <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1039509>.
- [80] T. Praphawatvet, J.I. Peters, R.O. Williams, Inhaled nanoparticles - An updated review, *Int. J. Pharm.* 587 (2020) 119671. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119671>.
- [81] M.A.M. Momin, I.G. Tucker, S.C. Das, High dose dry powder inhalers to overcome the challenges of tuberculosis treatment, *Int. J. Pharm.* 550 (2018) 398–417. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.061>.
- [82] T. Lepistö, H. Kuuluvainen, P. Juuti, A. Järvinen, A. Arffman, T. Rönkkö, Measurement of the human respiratory tract deposited surface area of particles with an electrical low pressure impactor, *Aerosol Sci. Technol.* 54 (2020) 958–971. <https://doi.org/10.1080/02786826.2020.1745141>.
- [83] A. Kumar, F. Chen, A. Mozhi, X. Zhang, Y. Zhao, X. Xue, X. Zhang, P.C. Wang, X.J. Liang, Innovative pharmaceutical development based on unique properties of nanoscale delivery formulation, *Nanoscale*. 5 (2014) 8307–8325. <https://doi.org/10.1039/c3nr01525d>.Innovative.
- [84] A.F. Tena, P.C. Clará, Deposition of inhaled particles in human lungs, *Arch. Bronconeumol.* 48 (2012) 240–246. <https://doi.org/10.1038/214908a0>.
- [85] K. Nahar, V. Gupta, R. Gauvin, S. Absar, B. Patel, V. Gupta, A. Khademhosseini, F. Ahsan, In vitro, in vivo and ex vivo models for studying particles deposition and drug absorption of inhaled pharmaceuticals, *Eur. J. Pharm. Sci.* 49 (2013) 805–818.
- [86] ICRP, Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection, *ICRP Publ.* 66. 24 (1994).
- [87] W.C. Hinds, *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles*, 2nd Editio, John Wiley & Sons Inc., New York, NY, 1999.
- [88] S.W. Stein, Estimating the number of droplets and drug particles emitted from MDIs, *AAPS PharmSciTech.* 9 (2008). <https://doi.org/10.1208/s12249-007-9006-8>.

- [89] Y.M. Kuo, S.H. Huang, T.S. Shih, C.C. Chen, Y.M. Weng, W.Y. Lin, Development of a size-selective inlet-simulating ICRP lung deposition fraction, *Aerosol Sci. Technol.* 39 (2005) 437–443. <https://doi.org/10.1080/027868290956602>.
- [90] T.M. Crowder, J.A. Rosati, J.D. Schroeter, A.J. Hickey, T.B. Martonen, Fundamental effects of particle morphology on lung delivery: Predictions of Stokes' Law and the particular relevance to dry powder inhaler formulation and development, *Pharm. Res.* 19 (2002). <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1014426530935>.
- [91] M.S. Miranda, M.T. Rodrigues, R.M.A. Domingues, E. Torrado, R.L. Reis, J. Pedrosa, M.E. Gomes, Exploring inhalable polymeric dry powders for anti-tuberculosis drug delivery, *Mater. Sci. Eng. C.* 93 (2018) 1090–1103. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.004>.
- [92] C. Loira-Pastoriza, J. Todoroff, R. Vanbever, Delivery strategies for sustained drug release in the lungs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75 (2014) 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.05.017>.
- [93] S. Adi, H. Adi, P. Tang, D. Traini, H.K. Chan, P.M. Young, Micro-particle corrugation, adhesion and inhalation aerosol efficiency, *Eur. J. Pharm. Sci.* 35 (2008) 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.05.009>.
- [94] Q. Liu, J. Guan, R. Song, X. Zhang, S. Mao, Physicochemical properties of nanoparticles affecting their fate and the physiological function of pulmonary surfactants, *Acta Biomater.* 140 (2022) 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.11.034>.
- [95] P. Kumbhar, A. Manjappa, R. Shah, N.K. Jha, S.K. Singh, K. Dua, J. Disouza, V. Patravale, Inhalation delivery of repurposed drugs for lung cancer: Approaches, benefits and challenges, *J. Control. Release.* 341 (2022) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.11.015>.
- [96] A. Kuzmov, T. Minko, Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases, *J. Control. Release.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.07.024>.
- [97] M.A. Selo, J.A. Sake, K.J. Kim, C. Ehrhardt, In vitro and ex vivo models in inhalation biopharmaceutical research — advances, challenges and future perspectives, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 177 (2021) 113862. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113862>.
- [98] S. He, J. Gui, K. Xiong, M. Chen, H. Gao, Y. Fu, A roadmap to pulmonary delivery strategies for the treatment of infectious lung diseases, *J. Nanobiotechnology.* 20 (2022).

- [99] W. Dong, J. Ye, J. Zhou, W. Wang, Comparative study of mucoadhesive and mucus- penetrative nanoparticles based on phospholipid complex to overcome the mucus barrier for inhaled delivery of baicalein, *Acta Pharm. Sin. B.* 10 (2020) 1576-1585. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.10.002>.
- [100] P. Kurbatova, N. Bessonov, V. Volpert, H.A.W.M. Tiddens, C. Cornu, P. Nony, Model of mucociliary clearance in cystic fibrosis lungs, *J. Theor. Biol.* 372 (2015) 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.02.023>.
- [101] Q. Liu, J. Guan, L. Qin, X. Zhang, S. Mao, Physicochemical properties affecting the fate of nanoparticles in pulmonary drug delivery, *Drug Discov. Today.* 25 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.023>.
- [102] R.R. Mercer, M.L. Russell, V.L. Roggli, J.D. Crapo, Cell number and distribution in human and rat airways, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10 (1994) 613-624. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.10.6.8003339>.
- [103] E. Lopez-Rodriguez, J. Pérez-Gil, Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: From biophysics to therapy, *Biochim. Biophys. Acta.* 1838 (2014) 1568-1585. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.028>.
- [104] M. García-díaz, D. Birch, F. Wan, H. Mørck, The role of mucus as an invisible cloak to transepithelial drug delivery by nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 124 (2018) 107-124. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.11.002>.
- [105] M. Geiser, Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles, *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 23 (2010) 207-217. <https://doi.org/10.1089/jamp.2009.0797>.
- [106] H.M. Abdelaziz, M. Gaber, M.M. Abd-Elwakil, M.T. Mabrouk, M.M. Elgohary, N.M. Kamel, D.M. Kabary, M.S. Freag, M.W. Samaha, S.M. Mortada, K.A. Elkhodairy, J.Y. Fang, A.O. Elzoghby, Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: Nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates, *J. Control. Release.* 269 (2018) 374-392. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.036>.
- [107] B. Olsson, E. Bondesson, L. Borgström, S. Edsbäcker, K. Ekelund, L. Gustavsson, T. Hegelund-Myrbäck, Pulmonary drug metabolism, clearance, and absorption, in: Springer (Ed.), *Control. Pulm. Drug Deliv. Adv. Deliv. Sci. Technol.*, New York, NY, 2011. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_2).
- [108] F. Ratjen, F. Brockhaus, G. Angyalosi, Aminoglycoside therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: A review, *J. Cyst. Fibros.* 8 (2009) 361-369. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2009.08.004>.

- [109] N.M. Maurice, B. Bedi, R.T. Sadikot, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Host response and clinical implications in lung infections, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 58 (2018). <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0321TR>.
- [110] O. Ciofu, T. Tolker-Nielsen, P.Ø. Jensen, H. Wang, N. Høiby, Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 85 (2015) 7-23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.017>.
- [111] N. Hoffmann, T.B. Rasmussen, P.Ø. Jensen, C. Stub, M. Hentzer, S. Molin, O. Ciofu, M. Givskov, H.K. Johansen, N. Høiby, Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis, *Infect. Immun.* 73 (2005) 2504-2514. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2504-2514.2005>.
- [112] J. Yadav, R.M. Kumari, V. Verma, S. Nimesh, Recent development in therapeutic strategies targeting *Pseudomonas aeruginosa* biofilms - A review, *Mater. Today Proc.* 46 (2021) 2359-2373. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.245>.
- [113] M. Tam, T. Thi, D. Wibowo, B.H.A. Rehm, *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 8671. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms21228671>.
- [114] M. Molimard, I. Kottakis, J. Jauernig, S. Lederhilger, I. Nikolaev, Performance Characteristics of Breezhaler® and Aerolizer® in the Real-World Setting, *Clin. Drug Investig.* 41 (2021) 415-424. <https://doi.org/10.1007/s40261-021-01021-w>.
- [115] G. Lambert, A. Bergman, Q. Zhang, D. Bortz, Physics of biofilms: the initial stages of biofilm formation and dynamics, *New Journal Phys.* 16 (2014) 045005. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/16/4/045005>.
- [116] K.K. Patel, M. Tripathi, N. Pandey, A.K. Agrawal, S. Gade, M.M. Anjum, R. Tilak, S. Singh, Alginate lyase immobilized chitosan nanoparticles of ciprofloxacin for the improved antimicrobial activity against the biofilm associated mucoid *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis, *Int. J. Pharm.* 563 (2019) 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.051>.
- [117] N. Osman, K. Kaneko, V. Carini, I. Saleem, Carriers for the targeted delivery of aerosolized macromolecules for pulmonary pathologies, *Expert Opin. Drug Deliv.* 15 (2018) 821-834. <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1502267>.
- [118] I.M. El-Sherbiny, N.M. El-Baz, M.H. Yacoub, Inhaled nano- and microparticles for drug delivery, *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2 (2015).

- <https://doi.org/10.5339/gcsp.2015.2>.
- [119] A. Bianchera, F. Buttini, R. Bettini, Micro/nanosystems and biomaterials for controlled delivery of antimicrobial and anti-biofilm agents, *Expert Opin. Ther. Pat.* 30 (2020) 983-1000. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1839415>.
- [120] F. Emami, S.J.M. Yazdi, D.H. Na, Poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) particulate carriers for pulmonary drug delivery, *J. Pharm. Investig.* 49 (2019) 427-442. <https://doi.org/10.1007/s40005-019-00443-1>.
- [121] F. Ungaro, I. D'Angelo, C. Coletta, R. D'Emmanuele Di Villa Bianca, R. Sorrentino, B. Perfetto, M.A. Tufano, A. Miro, M.I. La Rotonda, F. Quaglia, Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: Modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers, *J. Control. Release.* 157 (2012) 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.010>.
- [122] M.D. Buhecha, A.B. Lansley, S. Somavarapu, A.S. Pannala, Development and characterization of PLA nanoparticles for pulmonary drug delivery: Co-encapsulation of theophylline and budesonide, a hydrophilic and lipophilic drug, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 53 (2019) 101128. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101128>.
- [123] M. Beck-Broichsitter, J. Gauss, T. Gessler, W. Seeger, T. Kissel, T. Schmehl, Pulmonary targeting with biodegradable salbutamol-loaded nanoparticles, *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 23 (2010) 47-57. <https://doi.org/10.1089/jamp.2009.0759>.
- [124] E. Rytting, J. Nguyen, X. Wang, T. Kissel, Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 5 (2008) 1-11. <https://doi.org/10.1517/17425247.5.6.629>.
- [125] M. Alipour, Z.E. Suntres, Liposomal antibiotic formulations for targeting the lungs in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa*, *Ther. Deliv.* 5 (2014) 409-427. <https://doi.org/10.4155/tde.14.13>.
- [126] L. Willis, D. Hayes, J. Heidi, Therapeutic liposomal dry powder inhalation aerosols for targeted lung delivery, *Lung.* 190 (2012) 251-262. <https://doi.org/10.1007/s00408-011-9360-x>.
- [127] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.

- [128] M. Bassetti, A. Vena, A. Russo, M. Peghin, Inhaled liposomal antimicrobial delivery in lung infections, *Drugs*. 80 (2020) 1309-1318. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01359-z>.
- [129] W. Su, Y. Liang, Z. Meng, X. Chen, M. Lu, X. Han, X. Deng, Q. Zhang, H. Zhu, T. Fu, Inhalation of tetrandrine-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes for pulmonary fibrosis treatment, *Mol. Pharm.* 17 (2020) 1596-1607. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00026>.
- [130] G. Kaur, R.K. Narang, G. Rath, A.K. Goyal, Advances in pulmonary delivery of nanoparticles, *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* 40 (2012) 75-96. <https://doi.org/10.3109/10731199.2011.592494>.
- [131] G. Dufour, W. Bigazzi, N. Wong, F. Boschini, P. Tullio, G. Piel, D. Cataldo, B. Evrard, Interest of cyclodextrins in spray-dried microparticles formulation for sustained pulmonary delivery of budesonide, *Int. J. Pharm.* 495 (2015) 869-878. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.052>.
- [132] W. Yang, K. Theng, B. Lang, N.P. Wiederhold, K.P. Johnston, R.O. Williams, In vitro characterization and pharmacokinetics in mice following pulmonary delivery of itraconazole as cyclodextrin solubilized solution, *Eur. J. Pharm. Sci.* 39 (2010) 336-347. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.01.001>.
- [133] A.J. Almeida, E. Souto, Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 478-490. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.007>.
- [134] S. Martins, B. Sarmento, D.C. Ferreira, E.B. Souto, Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery - liposomes versus lipid nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine.* 2 (2007) 595-607.
- [135] J. Weers, T. Tarara, The PulmoSphere™ platform for pulmonary drug delivery, *Ther. Deliv.* 5 (2014) 277-295. <https://doi.org/10.4155/tde.14.3>.
- [136] D.E. Geller, J. Weers, S. Heuerding, Development of an inhaled dry-powder formulation of tobramycin using PulmoSphere™ technology, *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 24 (2011) 175-182. <https://doi.org/10.1089/jamp.2010.0855>.
- [137] M. Smola, T. Vandamme, A. Sokolowski, Nanocarriers as pulmonary drug delivery systems to treat and to diagnose respiratory and non respiratory diseases, *Int. J. Nano.* 3 (2008) 1-19.
- [138] L.A. Ibarra-Sánchez, A. Gámez-Méndez, M. Martínez-Ruiz, E.F. Nájera-

- Martínez, B.A. Morales-Flores, E.M. Melchor-Martínez, J.E. Sosa-Hernández, R. Parra-Saldívar, H.M.N. Iqbal, Nanostructures for drug delivery in respiratory diseases therapeutics: Revision of current trends and its comparative analysis, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 70 (2022) 103219. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103219>.
- [139] C.P. Reis, A.J. Ribeiro, R.J. Neufeld, F. Veiga, Alginate microparticles as novel carrier for oral insulin delivery, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007). <https://doi.org/10.1002/bit>.
- [140] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1650-1662. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.001>.
- [141] J.W. Lee, J.H. Park, J.R. Robinson, Bioadhesive-based dosage forms: The next generation, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000). [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200007\)89:7<850::AID-JPS2>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200007)89:7<850::AID-JPS2>3.0.CO;2-G).
- [142] G. Ponchel, J.M. Irache, Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 34 (1998) 191-219. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00040-4).
- [143] I. Rossi, F. Buttini, F. Sonvico, F. Affaticati, F. Martinelli, G. Annunziato, D. Machado, M. Viveiros, M. Pieroni, R. Bettini, Sodium hyaluronate nanocomposite respirable microparticles to tackle antibiotic resistance with potential application in treatment of mycobacterial pulmonary infections, *Pharmaceutics*. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050203>.
- [144] D. Nikjoo, I. van der Zwaan, M. Brülls, U. Tehler, G. Frenning, Hyaluronic acid hydrogels for controlled pulmonary drug delivery—a particle engineering approach, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 1878. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111878>.
- [145] C.I. Camara, L. Bertocchi, C. Ricci, R. Bassi, A. Bianchera, L. Cantu', R. Bettini, E. Del Favero, Hyaluronic Acid-Dexamethasone nanoparticles for local adjunct therapy of lung inflammation, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 10480. <https://doi.org/10.3390/ijms221910480>.
- [146] C. Hu, H. Feng, C. Zhu, Preparation and characterization of rifampicin-PLGA microspheres/sodium alginate in situ gel combination delivery system, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 95 (2012) 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.030>.
- [147] A.A. Mahmoud, N.A. Elkasabgy, A.A. Abdelkhalek, Design and characterization of emulsified spray dried alginate microparticles as a carrier

- for the dually acting drug roflumilast, *Eur. J. Pharm. Sci.* 122 (2018) 64-76. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.06.015>.
- [148] S. Alipour, H. Montaseri, M. Tafaghodi, Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded alginate microparticles for pulmonary delivery, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 81 (2010) 521-529. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.050>.
- [149] S.A. Meenach, Y.J. Kim, K.J. Kauffman, N. Kanthamneni, E.M. Bachelder, K.M. Ainslie, Synthesis, optimization, and characterization of camptothecin-loaded acetalated dextran porous microparticles for pulmonary delivery, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 290-298.
- [150] R.C. Waters, G. Hochhaus, Characterization of a dextran-budesonide prodrug for inhalation therapy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 129 (2019) 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.11.038>.
- [151] P.J. Kuehl, A. Cherrington, D.E. Dobry, D. Edgerton, D.T. Friesen, C. Hobbs, C.L. Leach, B. Murri, D. Neal, D.K. Lyon, D.T. Vodak, M.D. Reed, Biologic comparison of inhaled insulin formulations: Exubera™ and novel spray-dried engineered particles of dextran-10, *APPS Pharm. Sci. Technol.* 15 (2014). <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0181-0>.
- [152] N. Changsan, C. Sinsuebpol, Dry powder inhalation formulation of chitosan nanoparticles for co-administration of isoniazid and pyrazinamide, *Pharm. Dev. Technol.* 26 (2021) 181-192. <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1852570>.
- [153] D.J. Singh, A.A. Lohade, J.J. Parmar, D.D. Hegde, P. Soni, A. Samad, M.D. Menon, Development of chitosan - based dry powder inhalation system of cisplatin for lung cancer, *Indian J. Pharm. Sci.* (2012).
- [154] D.O. Corrigan, A.M. Healy, O.I. Corrigan, Preparation and release of salbutamol from chitosan and chitosan co-spray dried compacts and multiparticulates, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 62 (2006) 295-305. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.09.008>.
- [155] K.Y. Lee, D.J. Mooney, Alginate: Properties and biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 106-126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
- [156] I.M. El-Sherbiny, H.D.C. Smyth, Biodegradable nano-micro carrier systems for sustained pulmonary drug delivery: ( I ) Self-assembled nanoparticles encapsulated in respirable / swellable semi-IPN microspheres, *Int. J. Pharm.* 395 (2010) 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.05.032>.

- [157] M. Sharma, K.K. Dash, L.S. Badwaik, Physicochemical and release behaviour of phytochemical compounds based on black jamun pulp extracts-filled alginate hydrogel beads through vibration dripping extrusion, *Int. J. Biol. Macromol.* 194 (2022) 715-725. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.116>.
- [158] C. Vauthier, G. Couarraze, Development of a new drug carrier made from alginate, *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 2-7. <https://doi.org/10.1002/jps.2600820909>.
- [159] S.B. Patil, A. Kaul, A. Babbar, R. Mathur, A. Mishra, K.K. Sawant, In vivo evaluation of alginate microspheres of carvedilol for nasal delivery, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B.* 100B (2012) 249-255. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31947>.
- [160] I.P.S. Fernando, W.W. Lee, E.J. Han, G. Ahn, Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications, *Chem. Eng. J.* 391 (2020) 123823. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123823>.
- [161] A. Banerjee, R. Bandopadhyay, Use of dextran nanoparticle: A paradigm shift in bacterial exopolysaccharide based biomedical applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 87 (2016) 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.059>.
- [162] R. Mehvar, Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents, *J. Control. Release.* 69 (2000) 1-25. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00302-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00302-3).
- [163] F. Wang, J. Li, X. Tang, K. Huang, L. Chen, Polyelectrolyte three layer nanoparticles of chitosan/dextran sulfate/chitosan for dual drug delivery, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 190 (2020) 110925. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110925>.
- [164] T.G. Barclay, C.M. Day, N. Petrovsky, S. Garg, Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery, *Carbohydr. Polym.* 221 (2019) 94-112. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.067>.
- [165] R. Guo, P. Chen, Y. Mo, Y. Lan, W. Xue, Y. Zhang, Synthesis, characterization of dextran hydrogels and their in vitro release of gentamycin sulphate, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 13 (2015) e228-e233. <https://doi.org/10.5301/jabfm.5000233>.
- [166] M. Bodnar, J.F. Hartmann, J. Borbely, Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles, *Biomacromolecules.* 6 (2005) 2521-2527. <https://doi.org/10.1021/bm0502258>.

- [167] J.J. Wang, Z.W. Zeng, R.Z. Xiao, T. Xie, G.L. Zhou, X.R. Zhan, S.L. Wang, Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers, *Int. J. Nanomedicine*. 6 (2011) 765–774. <https://doi.org/10.2147/ijn.s17296>.
- [168] F. Li, J. Li, X. Wen, S. Zhou, X. Tong, P. Su, H. Li, D. Shi, Anti-tumor activity of paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles: An in vitro study, *Mater. Sci. Eng. C*. 29 (2009) 2392–2397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.07.001>.
- [169] Z. Sobhani, S.M. Samani, H. Montaseri, E. Khezri, Nanoparticles of chitosan loaded ciprofloxacin: Fabrication and antimicrobial activity, *Adv. Pharm. Bull.* 7 (2017) 427–432. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.051>.
- [170] C. Chavan, P. Bala, K. Pal, S.N. Kale, Cross-linked chitosan-dextran sulphate vehicle system for controlled release of ciprofloxacin drug: An ophthalmic application, *OpenNano*. (2017) 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2017.04.002>.
- [171] P. Mukhopadhyay, R. Mishra, D. Rana, P.P. Kundu, Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 1457–1475. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.04.004>.
- [172] F.Y. Alqahtani, F.S. Aleanizy, E.E. Tahir, B.T. Alquadeib, I.A. Alsarra, J.S. Alanazi, H.G. Abdelhady, Preparation, characterization, and antibacterial activity of diclofenac-loaded chitosan nanoparticles, *Saudi Pharm. J.* 27 (2019) 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.08.001>.
- [173] R. Ni, J. Zhao, Q. Liu, Z. Liang, U. Muenster, S. Mao, Nanocrystals embedded in chitosan-based respirable swellable microparticles as dry powder for sustained pulmonary drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 99 (2017) 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.12.013>.
- [174] S.A. Valente, L.M. Silva, G.R. Lopes, B. Sarmiento, M.A. Coimbra, C.P. Passos, Polysaccharide-based formulations as potential carriers for pulmonary delivery - A review of their properties and fates, *Carbohydr. Polym.* (2022) 118784. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118784>.
- [175] C. Kleinstreuer, Z. Zhang, J.F. Donohue, Targeted drug-aerosol delivery in the human respiratory system, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 10 (2008) 195–220. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160544>.
- [176] I. D'angelo, C. Conte, M.I. La Rotonda, A. Miro, F. Quaglia, F. Ungaro, Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis: Challenges and emerging drug delivery strategies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75 (2014) 92–111.

- [177] L. Ding, J. Wang, S. Cai, H. Smyth, Z. Cui, Pulmonary biofilm-based chronic infections and inhaled treatment strategies, *Int. J. Pharm.* 604 (2021) 120768. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120768>.
- [178] M. Sakagami, In vitro , ex vivo and in vivo methods of lung absorption for inhaled drugs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 161-162 (2020) 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.025>.
- [179] G. Anderson, N. Johnson, A. Mulgirigama, B. Aggarwal, Use of spacers for patients treated with pressurized metered dose inhalers: focus on the VENTOLIN<sup>™</sup> Mini Spacer, *Expert Opin. Drug Deliv.* (2018). <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1437414>.
- [180] D. Traini, P.M. Young, Delivery of antibiotics to the respiratory tract: An update, *Expert Opin. Drug Deliv.* 6 (2009) 897-905. <https://doi.org/10.1517/17425240903110710>.
- [181] M. Mashat, B.J. Clark, K.H. Assi, H. Chrystyn, Assessment of recent nebulizer delivery systems using urinary pharmacokinetics method and aerodynamic characteristics of TOBI<sup>®</sup> nebulized dose following inhalation, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 39 (2017) 428-434. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.04.007>.
- [182] F. Lavorini, M. Pistolesi, O.S. Usmani, Recent advances in capsule-based dry powder inhaler technology, *Multidiscip. Respir. Med.* 12 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40248-017-0092-5>.
- [183] B. Zhu, M. Padroni, G. Colombo, G. Phillips, J. Crapper, P.M. Young, D. Traini, The development of a single-use, capsule-free multi-breath tobramycin dry powder inhaler for the treatment of cystic fibrosis, *Int. J. Pharm.* 514 (2016) 392-398. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.009>.
- [184] A. Hassan, D. Farkas, W. Longest, M. Hindle, Characterization of excipient enhanced growth (EEG) tobramycin dry powder aerosol formulations, *Int. J. Pharm.* 591 (2020) 120027. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120027>.
- [185] J. Shur, B. Saluja, S. Lee, J. Tibbatts, R. Price, Effect of device design and formulation on the in vitro comparability for multi-unit dose Dry Powder Inhalers, *AAPS J.* 17 (2015). <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9775-z>.
- [186] H.W. Frijlink, A.H. De Boer, Dry powder inhalers for pulmonary drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 1 (2004). <https://doi.org/10.1517/17425247.1.1.67>.
- [187] A.D. Brunaugh, H.D.C. Smyth, Formulation techniques for high dose dry powders, *Int. J. Pharm.* 547 (2018) 489-498.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.036>.
- [188] A.M. Healy, M.I. Amaro, K.J. Paluch, L. Tajber, Dry powders for oral inhalation free of lactose carrier particles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75 (2014) 32–52. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.04.005>.
- [189] G. Pilcer, V. De Bueger, K. Traina, H. Traore, T. Sebti, F. Vanderbist, K. Amighi, Carrier-free combination for dry powder inhalation of antibiotics in the treatment of lung infections in cystic fibrosis, *Int. J. Pharm.* 451 (2013) 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.069>.
- [190] S.C. Das, P.J. Stewart, Understanding the respiratory delivery of high dose anti-tubercular drugs, in: A.J. Misra, A. Fourie (Eds.), *Drug Deliv. Syst. Tuberc. Prev. Treat.*, John Wiley & Sons Ltd, Chinchester, UK, 2016: pp. 258–274. <https://doi.org/10.1002/9781118943182.ch13>.
- [191] K. Karimi, G. Katona, I. Csóka, R. Ambrus, Physicochemical stability and aerosolization performance of dry powder inhalation system containing ciprofloxacin hydrochloride, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 148 (2018) 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.019>.
- [192] Y. Ye, Y. Ma, J. Zhu, The future of dry powder inhaled therapy: Promising or discouraging for systemic disorders?, *Int. J. Pharm.* 614 (2022) 121457. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121457>.
- [193] W. Azouz, H. Chrystyn, Clarifying the dilemmas about inhalation techniques for dry powder inhalers: Integrating science with clinical practice, *Prim. Care Respir. J.* 21 (2012) 208–213. <https://doi.org/10.4104/pcrj.2012.00010>.
- [194] R.W. Dal Negro, Dry powder inhalers and the right things to remember: A concept review, *Multidiscip. Respir. Med.* 10 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40248-015-0012-5>.
- [195] P. Muralidharan, D. Hayes, H.M. Mansour, Dry powder inhalers in COPD, lung inflammation and pulmonary infections, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2014) 947–962. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.977783>.
- [196] M. Cohen-Cymberknoh, D. Shoseyov, E. Kerem, Managing Cystic Fibrosis, *Concise Clin. Rev.* 183 (2011). <https://doi.org/10.1164/rccm.201009-1478CI>.
- [197] R. Scherließ, C. Etschmann, DPI formulations for high dose applications – Challenges and opportunities, *Int. J. Pharm.* 548 (2018) 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.038>.

- [198] L.M. Rose, R. Neale, Development of the first inhaled antibiotic for the treatment of cystic fibrosis, *Sci. Transl. Med.* 2 (2010) 63mr4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001634>.Development.
- [199] S. Claus, C. Weiler, J. Schiewe, W. Friess, How can we bring high drug doses to the lung?, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86 (2014) 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.11.005>.
- [200] F. Blasi, V. Carnovale, G. Cimino, V. Lucidi, D. Salvatore, B. Messori, M. Bartezaghi, E. Muscianisi, P.A. Porpiglia, Treatment compliance in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection treated with tobramycin inhalation powder: The FREE study, *Respir. Med.* 138 (2018) 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.03.034>.
- [201] F. Buttini, A. Giulia, G. Colombo, F. Sonvico, S. Montanari, G. Pisi, A. Rossi, P. Colombo, R. Bettini, Dose administration maneuvers and patient care in tobramycin dry powder inhalation therapy, *Int. J. Pharma.* 548 (2018) 182-191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.006>.
- [202] Y. Wang, R.Y.K. Chang, W.J. Britton, H.K. Chan, Advances in the development of antimicrobial peptides and proteins for inhaled therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 180 (2022) 114066. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114066>.
- [203] A. Schuster, C. Haliburn, G. Döring, M.H. Goldman, Safety, efficacy and convenience of colistimethate sodium dry powder for inhalation (Colobreathe DPI) in patients with cystic fibrosis: A randomised study, *Thorax.* 68 (2013) 344-350. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202059>.
- [204] P.J. McShane, J.G. Weers, T.E. Tarara, A. Haynes, P. Durbha, D.P. Miller, T. Mundry, E. Operschall, J.S. Elborn, Ciprofloxacin Dry Powder for Inhalation (ciprofloxacin DPI): Technical design and features of an efficient drug-device combination, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 50 (2018) 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2018.03.005>.
- [205] A. De Soyza, T. Aksamit, Ciprofloxacin dry powder for inhalation in non-cystic fibrosis bronchiectasis, *Expert Opin. Orphan Drugs.* 4 (2016) 875-884. <https://doi.org/10.1080/21678707.2016.1196129>.
- [206] D.J. Maselli, H. Keyt, M.I. Restrepo, Inhaled antibiotic therapy in chronic respiratory diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017). <https://doi.org/10.3390/ijms18051062>.
- [207] N.S. Britt, D.S. Hazlett, R.T. Horvat, R.M. Liesman, M.E. Steed, Activity of pulmonary vancomycin exposures versus planktonic and biofilm isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cystic fibrosis sputum, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 55 (2020) 105898.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105898>.
- [208] D.R. Sikwal, R.S. Kalhapure, S. Rambharose, S. Vepuri, M. Soliman, C. Mocktar, T. Govender, Polyelectrolyte complex of vancomycin as a nanoantibiotic: Preparation, in vitro and in silico studies, *Mater. Sci. Eng. C.* 63 (2016) 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.019>.
- [209] S. Bahrainian, M. Rouini, K. Gilani, Preparation and evaluation of vancomycin spray-dried powders for pulmonary delivery, *Pharm. Dev. Technol.* 26 (2021) 647–660. <https://doi.org/10.1080/10837450.2021.1915331>.
- [210] D. Hayes, B.S. Murphy, T.W. Mullett, D.J. Feola, Aerosolized vancomycin for the treatment of MRSA after lung transplantation, *Respirology.* 15 (2010) 184–186. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2009.01647.x>.
- [211] D.K. Ho, B.L.B. Nichols, K.J. Edgar, X. Murgia, B. Loretz, C.M. Lehr, Challenges and strategies in drug delivery systems for treatment of pulmonary infections, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 144 (2019) 110–124. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.09.002>.
- [212] M. Hoppentocht, P. Hagedoorn, H.W. Frijlink, A.H. Boer, Developments and strategies for inhaled antibiotic drugs in tuberculosis therapy: A critical evaluation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86 (2014) 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.10.019>.
- [213] R. Scherließ, S. Bock, N. Bungert, A. Neustock, L. Valentin, Particle engineering in dry powders for inhalation, *Eur. J. Pharm. Sci.* 172 (2022) 106158. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106158>.
- [214] T. Velkov, N. Abdul Rahim, Q.T. Zhou, H.K. Chan, J. Li, Inhaled anti-infective chemotherapy for respiratory tract infections: Successes, challenges and the road ahead, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 85 (2015) 65–82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.004>.
- [215] H.G. Lee, D.W. Kim, C.W. Park, Dry powder inhaler for pulmonary drug delivery: human respiratory system, approved products and therapeutic equivalence guideline, *J. Pharm. Investig.* 48 (2018) 603–616. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0359-z>.
- [216] A.H. de Boer, P. Hagedoorn, M. Hoppentocht, F. Buttini, F. Grasmeijer, H.W. Frijlink, Dry powder inhalation: past, present and future, *Expert Opin. Drug Deliv.* 14 (2017) 499–512. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1224846>.
- [217] S. Mangal, H. Park, R. Nour, N. Shetty, A. Cavallaro, D. Zemlyanov, K. Thalberg, V. Puri, M. Nicholas, A.S. Narang, Q.T. Zhou, Correlations between surface

- composition and aerosolization of jet-milled dry powder inhaler formulations with pharmaceutical lubricants, *Int. J. Pharm.* 568 (2019) 118504. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118504>.
- [218] S. Kim, E. Bilgili, R.N. Davé, Impact of altered hydrophobicity and reduced agglomeration on dissolution of micronized poorly water-soluble drug powders after dry coating, *Int. J. Pharm.* 606 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120853>.
- [219] W.S. Choi, H.I. Kim, S.S. Kwak, H.Y. Chung, H.Y. Chung, K. Yamamoto, T. Oguchi, Y. Tozuka, E. Yonemochi, K. Terada, Amorphous ultrafine particle preparation for improvement of bioavailability of insoluble drugs: Grinding characteristics of fine grinding mills, *Int. J. Miner. Process.* 74 (2004) 165-172. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2004.07.025>.
- [220] S. Watano, M. Matsuo, H. Nakamura, T. Miyazaki, Improvement of dissolution rate of poorly water-soluble drug by wet grinding with bio-compatible phospholipid polymer, *Chem. Eng. Sci.* 125 (2015) 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.09.010>.
- [221] M. Hoppentocht, P. Hagedoorn, H.W. Frijlink, A.H. de Boer, Technological and practical challenges of dry powder inhalers and formulations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75 (2014) 18-31. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.04.004>.
- [222] H. Adi, P.M. Young, H.K. Chan, H. Agus, D. Traini, Co-spray-dried mannitol-ciprofloxacin dry powder inhaler formulation for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease, *Eur. J. Pharm. Sci.* 40 (2010) 239-247. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.03.020>.
- [223] A. Veronovski, Ž. Knez, Z. Novak, Preparation of multi-membrane alginate aerogels used for drug delivery, *J. Supercrit. Fluids.* 79 (2013) 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.01.025>.
- [224] M. Sapra, Y.S. Mayya, C. Venkataraman, Air-jet atomization for preparation of lipid nanoparticles: Dependence of size on solute concentration, *J. Aerosol Sci.* 100 (2016) 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2016.05.007>.
- [225] M. Nikolaou, T. Krasia-Christoforou, Electrohydrodynamic methods for the development of pulmonary drug delivery systems, *Eur. J. Pharm. Sci.* 113 (2018) 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.08.032>.
- [226] M. Eltayeb, E. Stride, M. Edirisinghe, A. Harker, Electrospayed nanoparticle delivery system for controlled release, *Mater. Sci. Eng. C.* 66 (2016) 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.001>.

- [227] A. Pawar, S. Thakkar, M. Misra, A bird's eye view of nanoparticles prepared by electrospraying: advancements in drug delivery field, *J. Control. Release.* 286 (2018) 179–200. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.07.036>.
- [228] A. Jaworek, A.T. Sobczyk, A. Krupa, Electrospray application to powder production and surface coating, *J. Aerosol Sci.* 125 (2018) 57–92. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2018.04.006>.
- [229] C.M. Librán, S. Castro, J.M. Lagaron, Encapsulation by electrospray coating atomization of probiotic strains, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 39 (2017) 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.12.013>.
- [230] S. Yaqoubi, K. Adibkia, A. Nokhodchi, S. Emami, A.A. Alizadeh, H. Hamishehkar, M. Barzegar-Jalali, Co-electrospraying technology as a novel approach for dry powder inhalation formulation of montelukast and budesonide for pulmonary co-delivery, *Int. J. Pharm.* 591 (2020) 119970. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119970>.
- [231] M.P. Prabhakaran, M. Zamani, B. Felice, S. Ramakrishna, Electrospraying technique for the fabrication of metronidazole contained PLGA particles and their release profile, *Mater. Sci. Eng. C.* 56 (2015) 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.018>.
- [232] S. Kavadiya, P. Biswas, Electrospray deposition of biomolecules: Applications, challenges, and recommendations, *J. Aerosol Sci.* 125 (2018) 182–207. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2018.04.009>.
- [233] S. Torres-Giner, M.J. Ocio, J.M. Lagaron, Development of active antimicrobial fiber based chitosan polysaccharide nanostructures using electrospinning, *Eng. Life Sci.* 8 (2008) 303–314. <https://doi.org/10.1002/elsc.200700066>.
- [234] A.Í.S. Morais, E.G. Vieira, S. Afewerki, R.B. Sousa, L.M.C. Honorio, A.N.C.O. Cambrussi, J.A. Santos, R.D.S. Bezerra, J.A.O. Furtini, E.C. Silva-Filho, T.J. Webster, A.O. Lobo, Fabrication of polymeric microparticles by electrospray: The impact of experimental parameters, *J. Funct. Biomater.* 11 (2020). <https://doi.org/10.3390/jfb11010004>.
- [235] A. Ali, A. Zaman, E. Sayed, D. Evans, S. Morgan, C. Samwell, J. Hall, M. Sohail, N. Singh, O. Qutachi, M. Chang, Z. Ahmad, Electrohydrodynamic atomisation driven design and engineering of opportunistic particulate systems for applications in drug delivery , therapeutics and pharmaceuticals, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 176 (2021) 113788. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.026>.
- [236] H. Wang, Q. Liu, Q. Yang, Y. Li, W. Wang, L. Sun, C. Zhang, Y. Li, Electrospun poly(methyl methacrylate) nanofibers and microparticles, *J. Mater. Sci.* 45 (2010) 1032–1038. <https://doi.org/10.1007/s10853-009-4035-1>.

- [237] M. Kurakula, N.R. Naveen, Electrospraying: A facile technology unfolding the chitosan based drug delivery and biomedical applications, *Eur. Polym. J.* 147 (2021) 110326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02931982>.
- [238] R. Sverdlov Arzi, A. Sosnik, Electrohydrodynamic atomization and spray-drying for the production of pure drug nanocrystals and co-crystals, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 131 (2018) 79–100. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.012>.
- [239] E.P. Herrero, E.M.M. Del Valle, M.A. Galán, Modelling prediction of the microcapsule size of polyelectrolyte complexes produced by atomization, *Chem. Eng. J.* 121 (2006) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.04.003>.
- [240] S.H. Ching, N. Bansal, B. Bhandari, Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57 (2017) 1133–1152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>.
- [241] B. Strasdat, H. Bunjes, Incorporation of lipid nanoparticles into calcium alginate beads and characterization of the encapsulated particles by differential scanning calorimetry, *Food Hydrocoll.* 30 (2013) 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.07.013>.
- [242] Y. Yoon, B. Namjin, P. Kinam, Microencapsulation Methods for Delivery of Protein Drugs, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6 (2001) 213–230. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02931982>.
- [243] J. V. Román, M.A. Galán, E.M.M. Del Valle, Preparation and preliminary evaluation of alginate crosslinked microcapsules as potential drug delivery system (DDS) for Human lung cancer therapy, *Biomed. Phys. Eng. Express.* 2 (2016) 1–13. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/2/3/035015>.
- [244] J. Cui, Q.-R. Cao, B.-J. Lee, Enhanced delivery of bifidobacteria and fecal changes after multiple oral administrations of bifidobacteria-loaded alginate poly-l-lysine microparticles in human volunteers, *Drug Deliv.* 14 (2007) 265–271. <https://doi.org/10.1080/10717540601067844>.
- [245] P. Burey, B.R. Bhandari, T. Howes, M.J. Gidley, Hydrocolloid gel particles: Formation, characterization, and application, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48 (2008) 361–377. <https://doi.org/10.1080/10408390701347801>.
- [246] J.M. Cerveró, J. Nogareda, E.M.M. Del Valle, M.A. Galán, Development of a technology to produce monodispersed microparticles based on the formation of drops from viscous non-Newtonian liquids sprayed through a fan jet nozzle, *Chem. Eng. J.* 174 (2011) 699–708. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.063>.

- [247] R.J.H. Stenekes, H. Talsma, W.E. Hennink, Formation of dextran hydrogels by crystallization, *Biomaterials*. 22 (2001) 1891-1898. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00375-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00375-6).
- [248] W.E. Hennink, C.F. Van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 223-236. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.009>.
- [249] N.K. Shah, S.K. Gupta, Z. Wang, S.A. Meenach, Enhancement of macrophage uptake via phosphatidylserine-coated acetalated dextran nanoparticles, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 50 (2019) 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.013>.
- [250] E. Westhaus, P.B. Messersmith, Triggered release of calcium from lipid vesicles: a bioinspired strategy for rapid gelation of polysaccharide and protein hydrogels, *Biomaterials*. 22 (2001) 453-462. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00200-3](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00200-3).
- [251] L. Licata, C.E. Smith, R.M. Goldschmidt, J.F. Barrett, M. Froscio, Comparison of the postantibiotic and postantibiotic sub-MIC effects of levofloxacin and ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 950-955. <https://doi.org/10.1128/aac.41.5.950>.
- [252] H.X. Ong, D. Traini, D. Cipolla, I. Gonda, M. Bebawy, H. Agus, P.M. Young, Liposomal nanoparticles control the uptake of ciprofloxacin across respiratory epithelia, *Pharm. Res.* 29 (2012) 3335-3346. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0827-0>.
- [253] F. Fuentes, J. Izquierdo, M.M. Martín, M.L. Gomez-Lus, J. Prieto, Postantibiotic and sub-MIC effects of azithromycin and isepamicin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 (1998) 414-418. <https://doi.org/10.1128/aac.42.2.414>.
- [254] F. Imperi, L. Leoni, P. Visca, Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 1-7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00178>.
- [255] E. Carretto, F. Brovarone, G. Russello, P. Nardini, M.M. El-Bouseary, A.F. Aboklaish, T.R. Walsh, J.M. Tyrrell, Clinical validation of SensiTest colistin, a broth microdilution-based method to evaluate colistin MICs, *J. Clin. Microbiol.* 56 (2018). <https://doi.org/10.1128/JCM.01523-17>.
- [256] J.B. Patel, F.R. Cockerill, P.A. Bradford, G.M. Eliopoulos, J.A. Hindler, S.G. Jenkins, J.S. Lewis, B. Limbago, L.A. Miller, D.P. Nicolau, M. Powell, J.M. Swenson, M.M. Traczewski, J.D. Turnidge, M.P. Weinstein, B.L. Zimmer, M07 -

- A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Tenth Edition., in: CLSI (Clinical Lab. Standards Institute), 2015. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00259-009-1334-3>.
- [257] M. Díez-Aguilar, M. Ekkelenkamp, M.I. Morosini, N. Huertas, R. Del Campo, J. Zamora, A.C. Fluit, M.M. Tunney, D. Obrecht, F. Bernardini, R. Cantón, Antibiofilm activity of murepavadin against cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates, *J. Antimicrob. Chemother.* 76 (2021) 2578–2585. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab222>.
- [258] V.A. Marple, D.L. Roberts, F.J. Romay, N.C. Miller, K.G. Truman, M. Van Oort, B. Olsson, M.J. Holroyd, J.P. Mitchell, D. Hochrainer, Next Generation Pharmaceutical Impactor (a new impactor for pharmaceutical inhaler testing). Part II: Archival calibration, *J. Aerosol Med.* 16 (2003) 283–299. <https://doi.org/10.1089/089426803769017668>.
- [259] V.A. Marple, D.L. Roberts, F.J. Romay, N.C. Miller, K.G. Truman, M. Van Oort, B. Olsson, M.J. Holroyd, J.P. Mitchell, D.H. Hochrainer, Next Generation Pharmaceutical Impactor (A New impactor for pharmaceutical inhaler testing). Part I: Design, *J. Aerosol Med.* 16 (2003) 283–299. <https://doi.org/10.1089/089426803769017659>.
- [260] Council of Europe, Ph. Eur. 2.9.18 Preparations for Inhalation: Assessment of fine particles, in: *Pharm. Eur. Suppl.* 5.1, Strasbourg, France, 2005.
- [261] K.R. Chapman, C.M. Fogarty, C. Peckitt, C. Lassen, D. Jadayel, J. Dederichs, M. Dalvi, B. Kramer, Delivery characteristics and patients' handling of two single-dose dry-powder inhalers used in COPD, *Int. J. COPD.* 6 (2011) 353–363. <https://doi.org/10.2147/COPD.S18529>.
- [262] R.R. Delvadia, X. Wei, P.W. Longest, J. Venitz, P.R. Byron, In Vitro Tests for Aerosol Deposition. IV: Simulating Variations in Human Breath Profiles for Realistic DPI Testing, *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 29 (2016) 196–206. <https://doi.org/10.1089/jamp.2015.1215>.
- [263] R.O. Williams, T.C. Carvalho, J.I. Peters, Influence of particle size on regional lung deposition - What evidence is there?, *Int. J. Pharm.* 406 (2011) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.040>.
- [264] A.H. De Boer, D. Gjaltema, P. Hagedoorn, H.W. Frijlink, Can 'extrafine' dry powder aerosols improve lung deposition?, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96 (2015) 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.07.016>.
- [265] P. Rogliani, L. Calzetta, A. Coppola, F. Cavalli, J. Ora, E. Puxeddu, M. Gabriella, M. Cazzola, Optimizing drug delivery in COPD: The role of inhaler devices,

- Respir. Med. 124 (2017) 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.01.006>.
- [266] J. Santamaría, F. Balas, M.P. Lobera, A. Clemente, Generador de aerosoles nanoparticulados y procedimiento de generación de aerosoles en continuo asociado a dicho generador, 2 679 721, 2019.
- [267] A. Clemente, M.P. Lobera, F. Balas, J. Santamaria, A versatile generator of nanoparticle aerosols. A novel tool in environmental and occupational exposure assessment, *Sci. Total Environ.* 625 (2018) 978–986. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.125>.
- [268] T.R. Myers, The science guiding selection of an aerosol delivery device, *Respir. Care.* 58 (2013). <https://doi.org/10.4187/respcare.02812>.
- [269] P. Colthorpe, T. Voshaar, T. Kieckbusch, E. Cuoghi, Delivery characteristics of a low-resistance dry-powder inhaler used to deliver the long-acting muscarinic antagonist glycopyrronium, *J. Drug Assess.* 2 (2013) 11–16. <https://doi.org/10.3109/21556660.2013.766197>.
- [270] J. Shur, R. Price, D. Lewis, P.M. Young, G. Woollam, D. Singh, S. Edge, From single excipients to dual excipient platforms in dry powder inhaler products, *Int. J. Pharm.* 514 (2016) 374–383. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.057>.
- [271] N. Hertel, G. Birk, R. Scherließ, Particle engineered mannitol for carrier-based inhalation – A serious alternative?, *Int. J. Pharm.* 577 (2020) 118901. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118901>.
- [272] K. Berkenfeld, A. Lamprecht, J.T. McConville, Devices for dry powder drug delivery to the lung, *AAPS PharmSciTech.* 16 (2015). <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0317-x>.
- [273] A. Horváth, I. Balásházy, G. Tomisa, Á. Farkas, Significance of breath-hold time in dry powder aerosol drug therapy of COPD patients, *Eur. J. Pharm. Sci.* 104 (2017) 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.03.047>.
- [274] L.M. Fabbri, G. Nicolini, D. Olivieri, A. Papi, Inhaled beclometasone dipropionate/formoterol extra-fine fixed combination in the treatment of asthma: Evidence and future perspectives, *Expert Opin. Pharmacother.* 9 (2008). <https://doi.org/10.1517/14656566.9.3.479>.
- [275] F. Buttini, G. Brambilla, D. Copelli, I. Pasquali, Effect of flow rate on in vitro aerodynamic performance, *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 29 (2016) 167–178. <https://doi.org/10.1089/jamp.2015.1220>.

- [276] A. Chetta, A. Yorgancioglu, M. Scuri, S. Barile, D. Guastalla, P.N.R. Dekhuijzen, Inspiratory flow profile and usability of the NEXThaler, a multidose dry powder inhaler, in asthma and COPD, *BMC Pulm. Med.* 21 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12890-021-01430-9>.
- [277] Á. Farkas, D. Lewis, T. Church, A. Tweedie, F. Mason, A.E. Haddrell, J.P. Reid, A. Horváth, I. Balásházy, Experimental and computational study of the effect of breath-actuated mechanism built in the NEXThaler® dry powder inhaler, *Int. J. Pharm.* 533 (2017) 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.057>.
- [278] F. Kannies, M. Scuri, S. Vezzoli, C. Francisco, S. Petruzzelli, Extrafine beclomethasone/formoterol combination via a dry powder inhaler (NEXThaler®) or pMDI and beclomethasone monotherapy for maintenance of asthma control in adult patients: A randomised, double-blind trial, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 30 (2015) 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2014.07.006>.
- [279] A. Shakshuki, R.U. Agu, Improving the efficiency of respiratory drug delivery: A review of current treatment trends and future strategies for asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Pulm. Ther.* 3 (2017) 267–281. <https://doi.org/10.1007/s41030-017-0046-2>.
- [280] P. Bakakos, P. Chatziapostolou, P. Katerelos, P. Efstathopoulos, A. Korkontzelou, P. Katsaounou, Extrafine beclometasone dipropionate/formoterol NEXThaler on device usability, adherence, asthma control and quality of life. A panhellenic prospective, non-interventional observational study in patients with asthma—The NEXT-step study, *J. Pers. Med.* 12 (2022) 146. <https://doi.org/10.3390/jpm12020146>.
- [281] G. Pilcer, F. Vanderbist, K. Amighi, Correlations between cascade impactor analysis and laser diffraction techniques for the determination of the particle size of aerosolised powder formulations, *Int. J. Pharm.* 358 (2008) 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.02.014>.
- [282] E. Wenzler, D.R. Fraidenburg, T. Scardina, L.H. Danziger, Inhaled antibiotics for Gram-negative respiratory infections, *Clin. Microbiol. Rev.* 29 (2016) 581–632. <https://doi.org/10.1128/CMR.00101-15>.
- [283] S. Timoumi, D. Mangin, R. Peczalski, F. Zagrouba, J. Andrieu, Stability and thermophysical properties of azithromycin dihydrate, *Arab. J. Chem.* 7 (2014) 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.10.024>.
- [284] Y. Zhang, X. Wang, X. Lin, X. Liu, B. Tian, X. Tang, High azithromycin loading powders for inhalation and their in vivo evaluation in rats, *Int. J. Pharm.* 395 (2010) 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.05.043>.

- [285] M. Malerba, V. Foci, F. Patrucco, P. Pochetti, M. Nardin, C. Pelaia, A. Radaeli, Single inhaler LABA/LAMA for COPD, *Front. Pharmacol.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00390>.
- [286] O.I. Parisi, L. Scrivano, M.S. Sinicropi, F. Puoci, Polymeric nanoparticle constructs as devices for antibacterial therapy, *Curr. Opin. Pharmacol.* 36 (2017) 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.08.004>.
- [287] J. Ling, S. Mangal, H. Park, S. Wang, A. Cavallaro, Q.T. Zhou, Simultaneous Particle Size Reduction and Homogeneous Mixing to Produce Combinational Powder Formulations for Inhalation by the Single - Step Co - Jet Milling, *J. Pharm. Sci.* 108 (2019) 3146–3151. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.011>.
- [288] K. Jabłczyńska, M. Janczewska, A. Kulikowska, T.R. Sosnowski, Preparation and characterization of biocompatible polymer particles as potential nanocarriers for inhalation therapy, *Int. J. Polym. Sci.* (2015) 8. <https://doi.org/10.1155/2015/763020>.
- [289] K.A. Janes, P. Calvo, M.J. Alonso, Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 83–97. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00123-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00123-X).
- [290] M.H. El-Shabouri, Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 101–108. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00461-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00461-1).
- [291] A.J. Thorley, T.D. Tetley, New perspectives in nanomedicine, *Pharmacol. Ther.* 140 (2013) 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.008>.
- [292] S.H. Van Rijt, T. Bein, S. Meiners, Medical nanoparticles for next generation drug delivery to the lungs, *Eur. Respir. J.* 44 (2014) 765–774. <https://doi.org/10.1183/09031936.00212813>.
- [293] Y.I. Jeong, H.S. Na, D.H. Seo, D.G. Kim, H.C. Lee, M.K. Jang, S.K. Na, S.H. Roh, S.I. Kim, J.W. Nah, Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity, *Int. J. Pharm.* 352 (2008) 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.001>.
- [294] R. Osman, P.L. Kan, G. Awad, N. Mortada, A.E. El-Shamy, O. Alpar, Spray dried inhalable ciprofloxacin powder with improved aerosolisation and antimicrobial activity, *Int. J. Pharm.* 449 (2013) 44–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.009>.
- [295] Food Drug Administration (FDA), CIPRO® (ciprofloxacin hydrochloride)

- tablet, for oral use. CIPRO® (ciprofloxacin), for oral suspension, 2021. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2021/019537s093,020780s049lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/019537s093,020780s049lbl.pdf).
- [296] R. Jatal, R. Osman, W. Mamdouh, G.A.S. Awad, Lung targeted electrosprayed chitosan nanocomposite microparticles boost the cytotoxic activity of magnolol, *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 2 (2021) 100169. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100169>.
- [297] L.G. Gómez-Mascaraque, G. Sanchez, A. López-Rubio, Impact of molecular weight on the formation of electrosprayed chitosan microcapsules as delivery vehicles for bioactive compounds, *Carbohydr. Polym.* 150 (2016) 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.012>.
- [298] M.A. Moreno, L.G. Gómez-Mascaraque, M. Arias, I.C. Zampini, J.E. Sayago, L.L.P. Ramos, G. Schmeda-Hirschmann, A. López-Rubio, M.I. Isla, Electrosprayed chitosan microcapsules as delivery vehicles for vaginal phytoformulations, *Carbohydr. Polym.* 201 (2018) 425-437. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.084>.
- [299] S. Zhang, K. Kawakami, One-step preparation of chitosan solid nanoparticles by electrospray deposition, *Int. J. Pharm.* 397 (2010) 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.007>.
- [300] X. Geng, O.H. Kwon, J. Jang, Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution, *Biomaterials.* 26 (2005) 5427-5432. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.066>.
- [301] L.Y. Zheng, J.F. Zhu, Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydr. Polym.* 54 (2003) 527-530. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.07.009>.
- [302] V. Guarino, W.K.W.A. Khodir, L. Ambrosio, Biodegradable microparticles and nanoparticles by electrospraying techniques, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* 10 (2012) 191-196. <https://doi.org/10.5301/JABFM.2012.10369>.
- [303] N. Ardila, Z. Ajji, M.C. Heuzey, A. Ajji, Chitosan electrospraying: Mapping of process stability and micro and nanoparticle formation, *J. Aerosol Sci.* 126 (2018) 85-98. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2018.08.010>.
- [304] R. Jayakumar, M. Prabakaran, S. V. Nair, H. Tamura, Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.11.001>.
- [305] M. Hasegawa, M., Isogai, A., Onabe, F., Usuda, Dissolving States of Cellulose

- and Chitosan in Trifluoroacetic Acid, *J. Appl. Polym. Sci.* 45 (1992) 1857-1863. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.1992.070451020>.
- [306] A.C. Areias, J.A. Gómez-Tejedor, V. Sencadas, J. Alió, J.L.G. Ribelles, S. Lanceros - Mendez, Assessment of parameters influencing fiber characteristics of chitosan nanofiber membrane to optimize fiber mat production, *Polym. Eng. Sci.* (2012). <https://doi.org/10.1002/pen>.
- [307] M. Tahsin, A. Yilmaz, P. Kubra, F. Bozkurt, E. Dertli, A. Basahel, B. Al-sasi, O. Taylan, O. Sagdic, Electrospraying method for fabrication of essential oil loaded-chitosan nanoparticle delivery systems characterized by molecular, thermal, morphological and antifungal properties, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 52 (2019) 166-178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.12.005>.
- [308] N. Angel, S. Li, F. Yan, L. Kong, Recent advances in electrospinning of nanofibers from bio-based carbohydrate polymers and their applications, *Trends Food Sci. Technol.* 120 (2022) 308-324. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.003>.
- [309] M. Klinger-Strobel, C. Lautenschläger, D. Fischer, J.G. Mainz, T. Bruns, L. Tuchscher, M.W. Pletz, O. Makarewicz, Aspects of pulmonary drug delivery strategies for infections in cystic fibrosis-where do we stand?, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2015) 1351-1374. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1007949>.
- [310] United States Pharmacopeia-USP, USP 467 Disolventes residuales, (2019) 1-23.
- [311] A. Kyzioł, A. Mazgała, J. Michna, A. Regiel-Futyra, V. Sebastian, Preparation and characterization of alginate/chitosan formulations for ciprofloxacin-controlled delivery, *J. Biomater. Appl.* 32 (2017) 162-174. <https://doi.org/10.1177/0885328217714352>.
- [312] S.F. Hosseini, M. Zandi, M. Rezaei, F. Farahmandghavi, Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study, *Carbohydr. Polym.* 95 (2013) 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.031>.
- [313] M. George, T.E. Abraham, Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review, *J. Control. Release.* 114 (2006) 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.017>.
- [314] Z. Ma, A. Garrido-Maestu, K.C. Jeong, Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review, *Carbohydr. Polym.* 176 (2017) 257-265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.082>.

- [315] A. Grenha, B. Seijo, C. Remuñán-López, Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 25 (2005) 427-437. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.04.009>.
- [316] J. Meng, T.F. Sturgis, B.B.C. Youan, Engineering tenofovir loaded chitosan nanoparticles to maximize microbicide mucoadhesion, *Eur. J. Pharm. Sci.* 44 (2011) 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.06.007>.
- [317] N. Arya, S. Chakraborty, N. Dube, D.S. Katti, Electrospraying: A facile technique for synthesis of chitosan-based micro/nanospheres for drug delivery applications, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 88 (2009) 17-31. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31085>.
- [318] W.D. Linder, B.C. Lippold, Drug release from hydrocolloid embeddings with high or low susceptibility to hydrodynamic stress, *Pharm. Res.* 12 (1995). <https://doi.org/10.1023/a:1016238427313>.
- [319] R.W. Kormsmeier, E. Von Meerwall, N.A. Peppas, Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. II. Verification of theoretical models, *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* 24 (1986) 409-434. <https://doi.org/10.1002/polb.1986.090240215>.
- [320] N.A. Peppas, J.J. Sahlin, A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation, *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 169-172. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2).
- [321] P. Sangsanoh, P. Supaphol, Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions, *Biomacromolecules.* 7 (2006) 2710-2714. <https://doi.org/10.1021/bm060286l>.
- [322] J. Zhang, X.G. Chen, W.B. Peng, C.S. Liu, Uptake of oleoyl-chitosan nanoparticles by A549 cells, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 4 (2008) 208-214. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.03.006>.
- [323] T. Kloskowski, N. Gurtowska, J. Olkowska, J.M. Nowak, J. Adamowicz, J. Tworkiewicz, R. Dębski, A. Grzanka, T. Drewa, Ciprofloxacin is a potential topoisomerase II inhibitor for the treatment of NSCLC, *Int. J. Oncol.* 41 (2012) 1943-1949. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1653>.
- [324] P. Sahariah, M. Måsson, Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship, *Biomacromolecules.* 18 (2017) 3846-3868. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01058>.
- [325] J.A.S. Moreno, A.C. Mendes, K. Stephansen, C. Engwer, F.M. Goycoolea, A.

- Boisen, L.H. Nielsen, I.S. Chronakis, Development of electrosprayed mucoadhesive chitosan microparticles, *Carbohydr. Polym.* 190 (2018) 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.062>.
- [326] A. Verlee, S. Mincke, C. V. Stevens, Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives, *Carbohydr. Polym.* 164 (2017) 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>.
- [327] M. Berlanga, M.T. Montero, J. Hernández-Borrell, M. Viñas, Influence of the cell wall on ciprofloxacin susceptibility in selected wild-type Gram-negative and Gram-positive bacteria, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 23 (2004) 627–630. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2003.12.015>.
- [328] J. Haaber, M.T. Cohn, D. Frees, T.J. Andersen, H. Ingmer, Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics, *PLoS One.* 7 (2012) 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041075>.
- [329] A. Torge, S. Wagner, P.S. Chaves, E.G. Oliveira, S.S. Guterres, A.R. Pohlmann, A. Titz, M. Schneider, R.C.R. Beck, Ciprofloxacin-loaded lipid-core nanocapsules as mucus penetrating drug delivery system intended for the treatment of bacterial infections in cystic fibrosis, *Int. J. Pharm.* 527 (2017) 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.013>.
- [330] P.A. Lambert, Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. R. Soc. Med.* 95 (2002).
- [331] N. Lababidi, C. V. Montefusco-Pereira, C. de Souza Carvalho-Wodarz, C.M. Lehr, M. Schneider, Spray-dried multidrug particles for pulmonary co-delivery of antibiotics with N-acetylcysteine and curcumin-loaded PLGA-nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 157 (2020) 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.10.010>.
- [332] W. Feng, H. Garrett, D.P. Speert, M. King, Improved clearability of cystic fibrosis sputum with dextran treatment in vitro, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157 (1998) 710–714. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.3.9703059>.
- [333] S. Barghouthi, L.M. Guerdoud, D.P. Speert, Inhibition by dextran of *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154 (1996) 1788–1793. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.6.8970372>.
- [334] C.H. Chiu, S. Wong, R.E.W. Hancock, D.P. Speert, Adherence of *Burkholderia cepacia* to respiratory tract epithelial cells and inhibition with dextrans, *Microbiology.* 147 (2001) 2651–2658. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2651>.

- [335] R. Bryan, M. Feldman, S.C. Jawetz, S. Rajan, E. DiMango, H.B. Tang, L. Scheffler, D.P. Speert, A. Prince, The effects of aerosolized dextran in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection, *J. Infect. Dis.* 179 (1999) 1449-1458. <https://doi.org/10.1086/314755>.
- [336] E. Sudo, W.A. Boyd, M. King, Effects of Dextran Sulfate on Tracheal Mucociliary Velocity in Dogs, *J. Aerosol Med.* 13 (2000) 87-96. <https://doi.org/10.1089/089426800418613>.
- [337] W. Feng, S. Nakamura, E. Sudo, M.M. Lee, A. Shao, M. King, Effects of Dextran on Tracheal Mucociliary Velocity in Dogs In Vivo, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 12 (1999) 35-41. <https://doi.org/10.1006/pupt.1999.0166>.
- [338] M. Odziomek, T.R. Sosnowski, L. Gradoń, Conception, preparation and properties of functional carrier particles for pulmonary drug delivery, *Int. J. Pharm.* 433 (2012) 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.067>.
- [339] R. Lord, A.M. Jones, A. Horsley, Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation, *Cochrane Database Syst. Rev.* (2020). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009529.pub4>.
- [340] S. Chono, T. Tanino, T. Seki, K. Morimoto, Pharmacokinetic and pharmacodynamic efficacy of intrapulmonary administration of ciprofloxacin for the treatment of respiratory infections, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 22 (2007) 88-95. <https://doi.org/10.2133/dmpk.22.88>.
- [341] S.R. Van Tomme, W.E. Hennink, Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications, *Expert Rev. Med. Devices.* 4 (2007) 147-164. <https://doi.org/10.1586/17434440.4.2.147>.
- [342] S. Netsopa, S. Niamsanit, D. Sakloetsakun, N. Milintawisamai, Characterization and rheological behavior of dextran from *Weissella confusa* R003, *Int. J. Polym. Sci.* (2018). <https://doi.org/10.1155/2018/5790526>.
- [343] M. Kooti, A.N. Sedeh, H. Motamedi, S.E. Rezatofighi, Magnetic graphene oxide inlaid with silver nanoparticles as antibacterial and drug delivery composite, *Biotechnol. Prod. Process Eng.* 102 (2018) 3607-3621.
- [344] R. Shukla, S. Shukla, V. Bivolarski, I. Iliev, I. Ivanova, A. Goyal, Structural Characterization of Insoluble Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 in the Presence of Maltose, *Food Technol. Biotechnol.* 49 (2011) 291-296. <https://doi.org/10.13140/2.1.2567.7442>.
- [345] S. Demirci, A. Celebioglu, Z. Aytac, T. Uyar, pH-responsive nanofibers with

- controlled drug release properties, *Polym. Chem.* 5 (2014) 2050. <https://doi.org/10.1039/c3py01276j>.
- [346] X.L. Cao, Q.H. Zhang, X.H. Pan, Z. Chen, J. Lü, Mechanochemical synthesis of nano-ciprofloxacin with enhanced antibacterial activity, *Inorg. Chem. Commun.* 102 (2019) 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.02.015>.
- [347] S. Yang, X. Zhang, D. Zhang, Electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol)/graphene oxide nanofibrous membrane with ciprofloxacin antibiotic drug for potential wound dressing application, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 4395. <https://doi.org/10.3390/ijms20184395>.
- [348] M. Jannesari, J. Varshosaz, M. Morshed, M. Zamani, Composite poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl acetate) electrospun nanofibrous mats as a novel wound dressing matrix for controlled release of drugs, *Int. J. Nanomedicine.* 6 (2011) 993–1003. <https://doi.org/10.2147/ijn.s17595>.
- [349] Higuchi T., Mechanism of Sustained- Action Medication, *J. Pharm. Sci.* 52 (1963) 1145–1149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.2600521210>.
- [350] C.A. García-González, M. Jin, J. Gerth, C. Alvarez-Lorenzo, I. Smirnova, Polysaccharide-based aerogel microspheres for oral drug delivery, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 797–806. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.045>.
- [351] A.D. Bella, M. Müller, A. Danani, L. Soldati, R. Bettini, Effect of lactose pseudopolymorphic transition on the aerosolization performance of drug/carrier mixtures, *Pharmaceutics.* 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110576>.
- [352] I. Sibum, P. Hagedoorn, H.W. Frijlink, F. Grasmeijer, Characterization and formulation of isoniazid for high-dose dry powder inhalation, *Pharmaceutics.* 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050233>.
- [353] I. Sibum, P. Hagedoorn, M.P.G. Kluitman, M. Kloezen, H.W. Frijlink, F. Grasmeijer, Dispersibility and storage stability optimization of high dose isoniazid dry powder inhalation formulations with L-leucine or trileucine, *Pharmaceutics.* 12 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010024>.
- [354] D. Zillen, M. Beugeling, W.L.J. Hinrichs, H.W. Frijlink, F. Grasmeijer, Natural and bioinspired excipients for dry powder inhalation formulations, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 56 (2021) 101497. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101497>.

- [355] U. Sajjan, J. Moreira, M. Liu, A. Humar, C. Chaparro, J. Forstener, S. Keshavjee, A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: Inhibition of *Burkholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xylitol, *J. Hear. Lung Transplant.* 23 (2004) 1382-1391. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2003.09.023>.
- [356] B.S.M. Zadeh, Esfahani G., A. Salimi, Permeability of ciprofloxacin-loaded polymeric micelles including ginsenoside as P-glycoprotein inhibitor through a Caco-2 Cells monolayer as an intestinal absorption model, *Molecules.* 23 (2018) 1904. <https://doi.org/10.3390/molecules23081904>.
- [357] J.J. Salomon, V.E. Muchitsch, J.C. Gausterer, E. Schwagerus, H. Huwer, N. Daum, C.M. Lehr, C. Ehrhardt, The cell line NCl-H441 is a useful in vitro model for transport studies of human distal lung epithelial barrier, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 995-1006. <https://doi.org/10.1021/mp4006535>.
- [358] C. Seral, S. Carryn, P.M. Tulkens, F. Van Bambeke, Influence of P-glycoprotein and MRP efflux pump inhibitors on the intracellular activity of azithromycin and ciprofloxacin in macrophages infected by *Listeria monocytogenes* or *Staphylococcus aureus*, *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (2003) 1167-1173. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg223>.
- [359] M.E. Cavet, M. West, N.L. Simmons, Fluoroquinolone (ciprofloxacin) secretion by human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Br. J. Pharmacol.* 121 (1997) 1567-1578. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701302>.
- [360] M.S. Park, H. Okochi, L.Z. Benet, Is Ciprofloxacin a substrate of P-glycoprotein?, *Arch. Drug Inf.* (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1753-5174.2010.00032.x>.
- [361] Y. Tabata, T. Kawai, Y. Murakami, Y. Ikada, Electric charge influence of dextran derivatives on their tumor accumulation after intravenous injection, *Drug Deliv.* 4 (1997) 213-221. <https://doi.org/10.3109/10717549709051895>.
- [362] D. Sharma, L. Misba, A.U. Khan, Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities, *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 8 (2019) 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>.
- [363] C.R. Hansen, T. Pressler, N. Høiby, Early aggressive eradication therapy for intermittent *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients: 15 years experience, *J. Cyst. Fibros.* 7 (2008) 523-530. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.06.009>.
- [364] N. Høiby, Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis, *BMC Med.* 9 (2011).

- <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-32>.
- [365] M.N. Ahmed, A. Porse, M.O.A. Sommer, N. Høiby, O. Ciofu, Evolution of antibiotic resistance in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa* populations exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (2018) e00320-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00320-18>.
- [366] C. Bavington, C. Page, Stopping bacterial adhesion: a novel approach to treating infections, *Themat. Rev. Ser.* 72 (2005) 335-344. <https://doi.org/10.1159/000086243>.
- [367] E.C. on A.S.T. EUCAST, Clinical breakpoints and dosing of antibiotics, (2022) Clinical breakpoints-bacteria (version 12.0). [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_12.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf) (accessed April 7, 2022).
- [368] H.G. Ahlgren, A. Benedetti, J.S. Landry, J. Bernier, E. Matouk, D. Radzioch, L.C. Lands, S. Rousseau, D. Nguyen, Clinical outcomes associated with *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* airway infections in adult cystic fibrosis patients, *BMC Pulm. Med.* 15 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12890-015-0062-7>.
- [369] P. V. Joshi, A. Singanayagam, P.L. Molyneaux, S.L. Johnston, P. Mallia, Lung microbiology and exacerbations in COPD, *Int. J. COPD.* 7 (2012) 555-569. <https://doi.org/10.2147/COPD.S28286>.
- [370] B.Y. Shekunov, P. Chattopadhyay, H.H.Y. Tong, A.H.L. Chow, Particle Size Analysis in Pharmaceuticals: Principles, Methods and Applications, *Pharm. Res.* 24 (2007). <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9146-7>.
- [371] C.W. Park, X. Li, F.G. Vogt, D. Hayes, J.B. Zwischenberger, E.S. Park, H.M. Mansour, Advanced spray-dried design, physicochemical characterization, and aerosol dispersion performance of vancomycin and clarithromycin multifunctional controlled release particles for targeted respiratory delivery as dry powder inhalation aerosols, *Int. J. Pharm.* 455 (2013) 374-392. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.047>.
- [372] J.A. Rosati, D. Leith, C.S. Kim, Monodisperse and polydisperse aerosol deposition in a packed bed, *Aerosol Sci. Technol.* 37 (2003) 528-535. <https://doi.org/10.1080/02786820300974>.
- [373] Z. Wang, S.K. Gupta, S.A. Meenach, Development and physicochemical characterization of acetalated dextran aerosol particle systems for deep lung delivery, *Int. J. Pharm.* 525 (2017) 264-274. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.052>.

- [374] T.B. Tran, T. Velkov, R.L. Nation, A. Forrest, B.T. Tsuji, P.J. Bergen, J. Li, Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and polymyxin B: are we there yet?, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 48 (2016) 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.010>. Pharmacokinetics/pharmacodynamics.
- [375] C.S. Haworth, J.E. Foweraker, P. Wilkinson, R.F. Kenyon, D. Bilton, Inhaled colistin in patients with bronchiectasis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189 (2014) 975–982. <https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2208OC>.
- [376] Y.-W. Lin, Q.T. Zhou, S.-E. Cheah, J. Zhao, K. Chen, J. Wang, H.-K. Chan, J. Li, Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of pulmonary delivery of colistin against *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse lung infection model, *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.02025-16>.
- [377] T. Athamneh, A. Amin, E. Benke, R. Ambrus, C.S. Leopold, P. Gurikov, I. Smirnova, Alginate and hybrid alginate-hyaluronic acid aerogel microspheres as potential carrier for pulmonary drug delivery, *J. Supercrit. Fluids.* 150 (2019) 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.04.013>.
- [378] Y. Baimark, Y. Srisuwan, Preparation of alginate microspheres by water-in-oil emulsion method for drug delivery: Effect of Ca<sup>2+</sup> post-cross-linking, *Adv. Powder Technol.* 25 (2014) 1541–1546. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2014.05.001>.
- [379] S. Marzieh, H. Hosseini, M. Amin, S.M. Hosseini, H. Hosseini, M.A. Mohammadifar, A.M. Mortazavian, A. Mohammadi, K. Khosravi-Darani, S. Shojaee-Aliabadi, S. Dehghan, R. Khaksar, Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion / ionic gelation process, *Int. J. Biol. Macromol.* 62 (2013) 582–588. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.054>.
- [380] J.P. Paques, E. Van der Linden, C.J.M. Van Rijn, L.M.C. Sagis, Alginate submicron beads prepared through w/o emulsification and gelation with CaCl<sub>2</sub> nanoparticles, *Food Hydrocoll.* 31 (2013) 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.012>.
- [381] M. Santa - Maria, H. Scher, T. Jeoh, Microencapsulation of bioactives in cross-linked alginate matrices by spray drying, *J. Microencapsul.* 29 (2012) 286–295. <https://doi.org/10.3109/02652048.2011.651494>.
- [382] Y. Senuma, C. Lowe, Y. Zweifel, J.G. Hilborn, I. Marison, Alginate hydrogel microspheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization, *Biotechnol. Bioeng.* (2000). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000305\)67:5<616::AID-BIT12>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000305)67:5<616::AID-BIT12>3.0.CO;2-Z).

- [383] J.H. Cui, J.S. Goh, S.Y. Park, P.H. Kim, B.J. Lee, Preparation and physical characterization of alginate microparticles using air atomization method, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27 (2001) 309–319. <https://doi.org/10.1081/DDC-100103730>.
- [384] C. Rodríguez-Rivero, L. Hilliou, E.M.M. Del Valle, M.A. Galán, Rheological characterization of commercial highly viscous alginate solutions in shear and extensional flows, *Rheol. Acta.* 53 (2014) 559–570. <https://doi.org/10.1007/s00397-014-0780-4>.
- [385] K. King, Changes in the functional properties and molecular weight of sodium alginate following  $\gamma$  irradiation, *Food Hydrocoll.* 8 (1994) 83–96. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80035-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80035-0).
- [386] D. Gómez-Díaz, J.M. Navaza, Rheological characterization of water-sodium alginate dispersions with applications in the food industry, *Cienc. y Tecnol. Aliment.* 3 (2002) 302–306. <https://doi.org/10.1080/11358120209487743>.
- [387] K.W. Song, Y.S. Kim, G.S. Chang, Rheology of concentrated Xanthan gum solutions: Steady shear flow behavior, *Fibers Polym.* 7 (2006) 129–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02908257>.
- [388] G.T. Grant, E.R. Morris, D.A. Rees, P.J.C. Smith, D. Thom, Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model, *FEBS Lett.* 32 (1973) 195–198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7).
- [389] A.J. Vegas, O. Veiseh, J.C. Doloff, M. Ma, H.H. Tam, K. Bratlie, J. Li, A.R. Bader, E. Langan, K. Olejnik, et al., Combinatorial hydrogel library enables identification of materials that mitigate the foreign body response in primates, *Nat. Biotechnol.* 34 (2016) 345–352. <https://doi.org/10.1038/nbt.3462>.
- [390] E.M.M. Del Valle, E.P. Herrero, D.A.O. Martins, M.A. Galan, Immobilisation of cells in biocompatible films to cell therapy, *Open Tissue Eng. Regen. Med. J.* 2 (2009) 14–19. <https://doi.org/10.2174/1875043500902010014>.
- [391] M.A. Bochenek, O. Veiseh, A.J. Vegas, J.J. McGarrigle, M. Qi, E. Marchese, M. Omami, J. vC. Doloff, J. Mendoza-Elias, M. Nourmohammadzadeh, A. Khan, et al., Alginate encapsulation as long-term immune protection of allogeneic pancreatic islet cells transplanted into the omental bursa of macaques, *Nat. Biomed. Eng.* 2 (2018) 810–821. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0275-1>.
- [392] Y.A. Mørch, M. Qi, P.O.M. Gundersen, K. Formo, I. Lacik, G. Skjåk-Bræk, J. Oberholzer, B.L. Strand, Binding and leakage of barium in alginate

- microbeads, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 100 A (2012) 2939-2947. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34237>.
- [393] A. Davanlou, J.D. Lee, S. Basu, R. Kumar, Effect of viscosity and surface tension on breakup and coalescence of bicomponent sprays, *Chem. Eng. Sci.* 131 (2015) 243-255. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.03.057>.
- [394] M.C. Butler Ellis, C.R. Tuck, P.C.H. Miller, How surface tension of surfactant solutions influences the characteristics of sprays produced by hydraulic nozzles used for pesticide application, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 180 (2000) 267-276. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(00\)00776-7](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(00)00776-7).
- [395] S. Mazzitelli, G. Luca, F. Mancuso, M. Calvitti, R. Calafiore, C. Nastruzzi, S. Johnson, S.F. Badylak, Production and characterization of engineered alginate-based microparticles containing ECM powder for cell/tissue engineering applications, *Acta Biomater.* 7 (2011) 1050-1062. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.10.005>.
- [396] D. Tahtat, M. Mahlous, S. Benamer, A.N. Khodja, H. Oussedik-Oumehdi, F. Laraba-Djebari, Oral delivery of insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde, *Int. J. Biol. Macromol.* 58 (2013) 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.064>.
- [397] P. Li, Y.N. Dai, J.P. Zhang, A.Q. Wang, Q. Wei, Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine, *Int. J. Biomed. Sci.* 4 (2008) 221-228.
- [398] F.A. Simsek-Ege, G.M. Bond, J. Stringer, Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH, *J. Appl. Polym. Sci.* 88 (2003) 346-351. <https://doi.org/10.1002/app.11989>.
- [399] S.L. Raghavan, A. Trividic, A.F. Davis, J. Hadgraft, Crystallization of hydrocortisone acetate: Influence of polymers, *Int. J. Pharm.* 212 (2001) 213-221. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00610-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00610-4).
- [400] D. Douroumis, A. Fahr, Stable carbamazepine colloidal systems using the cosolvent technique, *Eur. J. Pharm. Sci.* 30 (2007) 367-374. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.12.003>.
- [401] H.A. Garekani, F. Sadeghi, A. Badiee, S.A. Mostafa, A.R. Rajabi - Siahboomi, Crystal habit modifications of ibuprofen and their physicochemical characteristics, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27 (2001) 803-809. <https://doi.org/10.1081/DDC-100107243>.

- [402] S. Strydom, W. Liebenberg, L. Yu, M. de Villiers, The effect of temperature and moisture on the amorphous-to-crystalline transformation of stavudine, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.06.012>.
- [403] K. Aboufotouh, Y. Zhang, M. Maniruzzaman, R.O. Williams, Amorphous solid dispersion dry powder for pulmonary drug delivery: Advantages and challenges, *Int. J. Pharm.* 587 (2020) 119711. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119711>.
- [404] N. Shetty, L. Zeng, S. Mangal, H. Nie, M.R. Rowles, R. Guo, Y. Han, J.H. Park, Q.T. Zhou, Effects of moisture - induced crystallization on the aerosol performance of spray dried amorphous ciprofloxacin powder formulations, *Pharm. Res.* 35 (2019) 139–148. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2281-5>.Effects.
- [405] Y. Hattori, Y. Haruna, M. Otsuka, Dissolution process analysis using model-free Noyes-Whitney integral equation, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 102 (2013) 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.017>.
- [406] M. Skinner, I. Kanfer, Intrinsic dissolution rate and solubility studies on josamycin, a macrolide antibiotic, *Int. J. Pharm.* 88 (1992) 151–158. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90311-O](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90311-O).
- [407] E. Carretto, F. Brovarone, G. Russello, P. Nardini, M.M. El-Bouseary, A.F. Aboklaish, T.R. Walsh, J.M. Tyrrell, Clinical Validation of SensiTest Colistin , a broth microdilution based method to evaluate colistin MICs, *J. Clin. Med.* 56 (2018). <https://doi.org/10.1128/JCM.01523-17>.
- [408] E.C. on A.S.T. EUCAST, Clinical breakpoints and dosing of antibiotics, *Clin. Break. - Break. Guid.* (2022) Clinical breakpoints-bacteria (version 12.0)-f. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_12.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf) (accessed April 26, 2022).
- [409] J. Li, R.L. Nation, R.W. Milne, J.D. Turnidge, K. Coulthard, Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 25 (2005) 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.10.001>.
- [410] Z. Rukavina, M. Šegvić Klarić, J. Filipović-Grčić, J. Lovrić, Ž. Vanić, Azithromycin-loaded liposomes for enhanced topical treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections, *Int. J. Pharm.* 553 (2018) 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.024>.
- [411] G. Kasten, L.F. Costa Silva, E. Lemos-Senna, Development of low density azithromycin-loaded polycaprolactone microparticles for pulmonary delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 42 (2015) 776–787.

- <https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1075032>.
- [412] World Health Organization (WHO), World Health Organization Model List of Essential Medicines, in: 2019: pp. 119–134.
- [413] S. Zheng, P. Matzneller, M. Zeitlinger, S. Schmidt, Development of a population pharmacokinetic model characterizing the tissue distribution of azithromycin in healthy subjects, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 6675–6684. <https://doi.org/10.1128/AAC.02904-14>.
- [414] P. Zimmermann, V.C. Ziesenitz, N. Curtis, N. Ritz, The immunomodulatory effects of macrolides-A systematic review of the underlying mechanisms, *Front. Immunol.* 9 (2018). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00302>.
- [415] M. Zhao, Y. You, Y. Ren, Y. Zhang, X. Tang, Formulation , characteristics and aerosolization performance of azithromycin DPI prepared by spray-drying, *Powder Technol.* 187 (2008) 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2008.02.014>.
- [416] N. Bleyzac, S. Goutelle, L. Bourguignon, M. Tod, Azithromycin for COVID-19: More than just an antimicrobial?, *Clin. Drug Investig.* 40 (2020) 683–686. <https://doi.org/10.1007/s40261-020-00933-3>.
- [417] C. Evora, I. Soriano, R.A. Rogers, K.M. Shakesheff, J. Hanes, R. Langer, Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: The effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine, *J. Control. Release.* 51 (1998) 143–152. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00149-1).
- [418] M.M. Diez, A. Buckley, T.D. Tetley, R. Smith, The method of depositing CeO<sub>2</sub> nanoparticles onto a DPPC monolayer affects surface tension behaviour, *NanoImpact.* 16 (2019) 100186. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100186>.
- [419] J. Duan, F.G. Vogt, X. Li, D. Hayes, H.M. Mansour, Design, characterization, and aerosolization of organic solution advanced spray-dried moxifloxacin and ofloxacin dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) microparticulate/nanoparticulate powders for pulmonary inhalation aerosol delivery, *Int. J. Nanomedicine.* 8 (2013) 3489–3505. <https://doi.org/10.2147/IJN.S48631>.
- [420] S. Bahrainian, M.S. Mirmoeini, Z. Gilani, K. Gilani, Engineering of levodopa inhalable microparticles in combination with leucine and dipalmitoylphosphatidylcholine by spray drying technique, *Eur. J. Pharm. Sci.* 167 (2021) 106008. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106008>.

- [421] X. Mulet, M. D. Maciá, A. Mena, C. Juan, L.J. Pérez, A. Oliver, Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Bactericidal activity and selection of nfxB mutants, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 1552–1560. <https://doi.org/10.1128/AAC.01264-08>.
- [422] M. Abyadeh, A.A. Karimi Zarchi, M.A. Faramarzi, A. Amani, Evaluation of factors affecting size and size distribution of chitosan-electrosprayed nanoparticles, *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 9 (2017) 126–132.
- [423] J.C. Ijsebaert, K.B. Geerse, J.C.M. Marijnissen, J.W.J. Lammers, P. Zanen, Electro-hydrodynamic atomization of drug solutions for inhalation purposes, *J. Appl. Physiol.* 91 (2001) 2735–2741. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.6.2735>.
- [424] A.D. Duong, S. Sharma, K.J. Peine, G. Gupta, A.R. Satoskar, E.M. Bachelder, B.E. Wyslouzil, K.M. Ainslie, Electro spray encapsulation of toll-like receptor agonist resiquimod in polymer microparticles for the treatment of visceral Leishmaniasis, *Mol. Pharm.* 10 (2013) 1045–1055.
- [425] J. Xie, L. Kuang, Y. Phua, J. Hua, C.-H. Wang, Electrohydrodynamic atomization for biodegradable polymeric particle production, *J. Colloid Interface Sci.* 302 (2006) 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.06.037>.
- [426] X. Wu, W. Zhang, D. Hayes, H.M. Mansour, Physicochemical characterization and aerosol dispersion performance of organic solution advanced spray-dried cyclosporine A multifunctional particles for dry powder inhalation aerosol delivery, *Int. J. Nanomedicine.* 8 (2013) 1269–1283. <https://doi.org/10.2147/IJN.S40904>.
- [427] G.P. Alves, A.M.H. Santana, Phospholipid dry powder produced by spray drying processing: structural, thermodynamic and physical properties, *Powder Technol.* 145 (2004) 139–148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.powtec.2004.06.008>.
- [428] E. Adeli, The use of spray freeze drying for dissolution and oral bioavailability improvement of Azithromycin, *Powder Technol.* 319 (2017) 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.06.043>.
- [429] M.M. Mady, M.W. Shafaa, E.R. Abbase, A.H. Fahium, Interaction of doxorubicin and dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes, *Cell Biochem. Biophys.* 62 (2012) 481–486. <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9334-x>.
- [430] S. Mangal, H. Nie, R. Xu, R. Guo, A. Cavallaro, D. Zemlyanov, Q. (Tony) Zhou, Physico-chemical properties, aerosolization and dissolution of co-spray dried azithromycin particles with L-leucine for inhalation, *Pharm. Res.* 35

- (2018). <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2334-9>.
- [431] L. Chen, T. Okuda, X.Y. Lu, H.K. Chan, Amorphous powders for inhalation drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 100 (2016) 102–115. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.002>.
- [432] I.M. Torres, S. Demirdjan, J. Vargas, B.C. Goodale, B. Berwin, Acidosis increases the susceptibility of respiratory epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa* - induced cytotoxicity, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 313 (2017) L126–L127. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00524.2016>.
- [433] A.A. Pezzulo, X.X. Tang, M.J. Hoegger, M.H.A. Alaiwa, S. Ramachandran, T.O. Moninger, P.H. Karp, C. Wohlford-Lenane, H.P. Haagsman, M. Van Eijk, et al., Reduced airway surface pH impairs Bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung, *Nature.* 487 (2013) 109–113. <https://doi.org/10.1038/nature11130.Reduced>.
- [434] L. Wang, K. Kitaichi, C.S. Hui, K. Takagi, K. Takagi, M. Sakai, K. Yokogawa, K.I. Miyamoto, T. Hasegawa, Reversal of anticancer drug resistance by macrolide antibiotics in vitro and in vivo, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27 (2000) 587–593. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2000.03308.x>.
- [435] V. Munić, Ž. Kelnerić, L. Mikac, V. Eraković Haber, Differences in assessment of macrolide interaction with human MDR1 (ABCB1, P-gp) using rhodamine-123 efflux, ATPase activity and cellular accumulation assays, *Eur. J. Pharm. Sci.* 41 (2010) 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.05.016>.
- [436] A. Pompilio, C. Geminiani, P. Mantini, T.N. Siriwardena, I. Di Bonaventura, J.L. Reymond, G. Di Bonaventura, Peptide dendrimers as “lead compounds” for the treatment of chronic lung infections by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients: In vitro and in vivo studies, *Infect. Drug Resist.* 11 (2018) 1767–1782. <https://doi.org/10.2147/IDR.S168868>.
- [437] N. Hoffmann, B. Lee, M. Hentzer, T.B. Rasmussen, Z. Song, H.K. Johansen, M. Givskov, N. Høiby, Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in *Cftr*<sup>-/-</sup> mice, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 3677–3687. <https://doi.org/10.1128/AAC.01011-06>.
- [438] G.B. Pier, F. Coleman, M. Grout, M. Franklin, D.E. Ohman, Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis, *Infect. Immun.* 69 (2001) 1895–1901. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1895-1901.2001>.
- [439] R. Cantón, L. Máiz, A. Escribano, C. Olveira, A. Oliver, O. Asensio, S. Gartner,

- E. Roma, E. Quintana-Gallego, A. Salcedo, et al., Spanish consensus on the prevention and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* bronchial infections in cystic fibrosis patients, *Arch. Bronconeumol.* 51 (2015) 140-150. <https://doi.org/10.1016/j.arbr.2014.09.018>.
- [440] L. Saiman, B.C. Marshall, N. Mayer-hamblett, J.L. Burns, A.L. Quittner, D.A. Cibene, et al., Azithromycin in patients with Cystic Fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*. A randomized controlled trial, *J. Am. Med. Assoc.* 290 (2003) 1749-1756. <https://doi.org/doi:10.1001/jama.290.13.1749>.
- [441] R.J. Gillis, B.H. Iglewski, Azithromycin retards *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 5842-5845. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5842-5845.2004>.
- [442] T. Ichimiya, K. Takeoka, K. Hiramatsu, K. Hirai, T. Yamasaki, M. Nasu, The influence of Azithromycin on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro, *Chemotherapy.* 42 (1996) 186-191. <https://doi.org/10.1159/000239440>.
- [443] D.M. Bamberger, B.L. Herndon, M. Dew, R.P. Chern, H. Mitchell, L.E. Summers, R.F. Marcus, S.C. Kim, Efficacies of Ofloxacin, Rifampin, and Clindamycin in treatment of *Staphylococcus aureus* abscesses and correlation with results of an in vitro assay of intracellular bacterial killing, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 1178-1181. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.5.1178>.
- [444] F.H. Proma, M.K. Shourav, J. Choi, Post-Antibiotic effect of Ampicillin and Levofloxacin to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Based on microscopic imaging analysis, *Antibiotics.* 9 (2020) 458. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics9080458>.
- [445] W. Ding, Y. Zhou, Q. Qu, W. Cui, B.O. God'spower, Y. Liu, X. Chen, M. Chen, Y. Yang, Y. Li, Azithromycin inhibits biofilm formation by *Staphylococcus xylosus* and affects histidine biosynthesis pathway, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1-11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00740>.
- [446] Y. Imamura, Y. Higashiyama, K. Tomono, K. Izumikawa, K. Yanagihara, H. Ohno, Y. Miyazaki, Y. Hirakata, Y. Mizuta, J.I. Kadota, B.H. Iglewski, S. Kohno, Azithromycin exhibits bactericidal effects on *Pseudomonas aeruginosa* through interaction with the outer membrane, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 1377-1380. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1377-1380.2005>.
- [447] B. Gottenbos, D.W. Grijpma, H.C. Van Der Mei, J. Feijen, H.J. Busscher, Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria, *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (2001) 7-13. <https://doi.org/10.1093/jac/48.1.7>.

- [448] M. Bogataj, T. Vovk, M. Kerec, A. Dimnik, I. Grabnar, A. Mrhar, The correlation between zeta potential and mucoadhesion strength on pig vesical mucosa, *Biol. Pharm. Bull.* 26 (2003) 743–746. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.743>.
- [449] J.W. Goodwin, R.W. Hughes, *Rheology for Chemists An introduction*, 2th editio, RSC Publishing, Cambridge, UK, 2008.
- [450] A. Clemente, F. Balas, M.P. Lobera, S. Irusta, J. Santamaria, Fluidized bed generation of stable silica nanoparticle aerosols, *Aerosol Sci. Technol.* 47 (2013) 867–874. <https://doi.org/10.1080/02786826.2013.797952>.
- [451] B. Magnusson, U. Örnemark, *Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods - A laboratory guide to method validation and related topics.*, 2nd ed., Middlesex, UK, 2014. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- [452] National Formulary, United States Pharmacopeia. *Validation of compendial methods. Twenty-Sixth Revision, 21st ed.*, The United States Pharmacopeial Convention Inc, 2003.
- [453] H.B. Aaron, G.R. Kotler, The effects of curvature on the dissolution kinetics of spherical precipitates, *Met. Sci. J.* 4 (1970) 222–225. <https://doi.org/10.1179/msc.1970.4.1.222>.
- [454] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basic for a Biopharmaceutic Drug Classification: The correlation of in vivo drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharm. Res.* 12 (1995). <https://doi.org/10.1023/A>.
- [455] A.L. Tian, Q. Wu, P. Liu, L. Zhao, I. Martins, O. Kepp, M. Leduc, G. Kroemer, Lysosomotropic agents including azithromycin, chloroquine and hydroxychloroquine activate the integrated stress response, *Cell Death Dis.* 12 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03324-w>.
- [456] H. Sharif, D. O’Leary, D. Ditor, Comparison of QT-interval and variability index methodologies in individuals with spinal cord injury, *Spinal Cord.* 55 (2017) 274–278. <https://doi.org/10.1038/sc.2016.118>.

