

PLANES PIIF 2023				
	DIRECTOR/CODIRECTOR	SUPERVISOR	TÍTULO	HORAS
P1	Alza Natalia <a href="mailto:natalia.alza@uns.edu.ar">natalia.alza@uns.edu.ar</a> Salvador Gabriela <a href="mailto:salvador@criba.edu.ar">salvador@criba.edu.ar</a>	-	Caracterización de las propiedades multi-targeting de potenciales agentes terapéuticos en procesos neurodegenerativos.	150
P2	Arnaboldi, Cecilia Andrea <a href="mailto:carnaboldi@uns.edu.ar">carnaboldi@uns.edu.ar</a>	Cabrera Fernanda <a href="mailto:fcabrera@plapiqui.edu.ar">fcabrera@plapiqui.edu.ar</a>	Implementación de Gestión de Riesgo en el proceso de Diseño y Desarrollo de un medicamento innovador, útil para el tratamiento de infecciones crónicas asociadas a Fibrosis Quística.	120
P3	Biscussi Brunella <a href="mailto:Brunella.biscussi@uns.edu.ar">Brunella.biscussi@uns.edu.ar</a>	-	Síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de cafeína con potencial aplicación en la terapia de Alzheimer.	120
P4	Brigante Maximiliano <a href="mailto:brigante@uns.edu.ar">brigante@uns.edu.ar</a> Luengo Carina <a href="mailto:cluengo@uns.edu.ar">cluengo@uns.edu.ar</a>		Diseño de sistemas SiO <sub>2</sub> -HDL con capacidad de liberación prolongada de fármacos.	240
P5	Ramirez Rigo María Verónica <a href="mailto:vrrigo@plapiqui.edu.ar">vrrigo@plapiqui.edu.ar</a>	Caldarola María Paula <a href="mailto:mpcaldarola@plapiqui.edu.ar">mpcaldarola@plapiqui.edu.ar</a>	De la cápsula al pulmón: estudio de la resistencia al flujo de aire de inhaladores de polvo seco.	150
P6	Cavallaro Valeria <a href="mailto:cavallaro@uns.edu.ar">cavallaro@uns.edu.ar</a>	-	Búsqueda de potenciales fármacos de origen natural para la enfermedad de Alzheimer.	120
P7	Ceschan Nazareth <a href="mailto:nceschan@plapiqui.edu.ar">nceschan@plapiqui.edu.ar</a>	-	Desarrollo de micropartículas co-procesadas de principios activos para la formulación de inhaladores presurizados estables.	120
P8	González Natalia <a href="mailto:Gonzalez.natalia@uns.edu.ar">Gonzalez.natalia@uns.edu.ar</a> Olivia López <a href="mailto:olivialopez@plapiqui.edu.ar">olivialopez@plapiqui.edu.ar</a>	-	Cápsulas veganas para polvos alimenticios ricos en antioxidantes.	240
P9	González Pardo María Verónica <a href="mailto:vgpardo@criba.edu.ar">vgpardo@criba.edu.ar</a>	Príncipe Gabriel <a href="mailto:gprincipe@inbiosur-conicet.gob.ar">gprincipe@inbiosur-conicet.gob.ar</a>	Estudio de la actividad biológica de nuevos nanosistemas como agentes antineoplásicos.	120
P10	González Vidal Noelia Luján	Juan Candela Dana	Desarrollo de comprimidos orodesintegrables para	120

	<a href="mailto:nlgvidal@uns.edu.ar">nlgvidal@uns.edu.ar</a>	<a href="mailto:candela.juan@uns.edu.ar">candela.juan@uns.edu.ar</a>	patologías cardiovasculares pediátricas.	
P11	Lezcano Virginia Alicia <a href="mailto:vlezcano@criba.edu.ar">vlezcano@criba.edu.ar</a> Montiel Schneider Gabriela <a href="mailto:gabriela.montielsc@gmail.com">gabriela.montielsc@gmail.com</a>	Tiburzi Silvia Mabel <a href="mailto:bioqsilvi@gmail.com">bioqsilvi@gmail.com</a>	Efecto antitumoral de nanopartículas cargadas con quercetina en células de cáncer de mama.	120
P12	Luengo Carina <a href="mailto:cluengo@uns.edu.ar">cluengo@uns.edu.ar</a> Crescitelli Carla <a href="mailto:carla.crescitelli@uns.edu.ar">carla.crescitelli@uns.edu.ar</a>	-	Síntesis y caracterización de materiales biocompatibles para ser usados como carriers de fármacos.	240
P13	Luquez Jessica Mariela <a href="mailto:jluquez@criba.edu.ar">jluquez@criba.edu.ar</a>	-	Efecto de la suplementación con ácido retinoico y 22:6 n-3 sobre el desarrollo de la espermatogénesis ex vivo.	240
P14	Martín María Julia <a href="mailto:Ma.julia.martin@gmail.com">Ma.julia.martin@gmail.com</a> Spitzmaul Guillermo <a href="mailto:gspitz@criba.edu.ar">gspitz@criba.edu.ar</a>	Paolillo Giuliana <a href="mailto:p.giuli@hotmail.com">p.giuli@hotmail.com</a>	Nanotecnología magnética para tratamiento de la pérdida auditiva: Estudios de toxicidad in vitro y de direccionamiento.	120
P15	Montiel Schneider Gabriela <a href="mailto:gabriela.montiel@uns.edu.ar">gabriela.montiel@uns.edu.ar</a>	-	Nanosistemas de novedoso diseño como agentes teranósticos.	240
P16	Pereyra Romina Belén <a href="mailto:Romina.pereyra@uns.edu.ar">Romina.pereyra@uns.edu.ar</a>	Lopez Nicolas Alfredo <a href="mailto:nicolas.lopez@uns.edu.ar">nicolas.lopez@uns.edu.ar</a>	Desarrollo de gomas masticables destinadas a pacientes pediátricos.	120
P17	Springer Valeria <a href="mailto:Valeria.springer@uns.edu.ar">Valeria.springer@uns.edu.ar</a>	-	Compuestos naturales bioactivos para la síntesis de nanopartículas biocompatibles.	150
P18	Veuthey Tania Vanesa <a href="mailto:tveuthey@uns.edu.ar">tveuthey@uns.edu.ar</a>	-	Screening farmacológico de nuevos derivados de 4-tiazolidinonas: búsqueda de moléculas con actividad biológica antihelmíntica.	120

## **P1. Caracterización de las propiedades multi-targeting de potenciales agentes terapéuticos en procesos neurodegenerativos.**

**OBJETIVO GENERAL:** Con el aumento de la esperanza de vida en las últimas décadas, se ha incrementado la incidencia de enfermedades neurodegenerativas (NDD, del inglés neurodegenerative diseases), las cuales afectan funciones fundamentales del individuo como moverse, hablar, respirar y pensar. Estos desórdenes, aunque presentan síntomas clínicos diversos, comparten una neurodegeneración progresiva desencadenada por complejos mecanismos patológicos aun no completamente elucidados que llevan al daño y la muerte de neuronas en regiones específicas del cerebro. La etiología de las NDD es multifactorial e involucra causas genéticas y ambientales. Se ha demostrado que la muerte neuronal es secundaria a la coexistencia de múltiples eventos como la agregación proteica que lleva a la acumulación intra- o extracelular de proteínas específicas, disfunción mitocondrial e incrementados niveles de estrés oxidativo, disfunción lisosomal y neuroinflamación (Hou et al., 2019; Jellinger, 2010). La búsqueda de intervenciones terapéuticas para enfermedades en cuya patogenia se involucran múltiples mecanismos celulares, como muchas NDD, ha tenido un cambio de paradigma desde el enfoque “una molécula, un blanco” a una alternativa más prometedora donde se piensa en una molécula que interactúe y module múltiples blancos, conocida como enfoque multi-target.

En consonancia con lo mencionado, esta propuesta tiene como objetivo general buscar nuevos agentes multi-targeting a partir de una biblioteca de productos naturales que puedan ser potenciales líderes para el tratamiento de patologías neurodegenerativas.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.** La hipótesis de trabajo se centra en que los agentes multi-targeting ante eventos relacionados a las NDD, tales como el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la ferroptosis, pueden ser potenciales líderes de fármacos para el tratamiento de estas patologías. Para ello, se empleará una pequeña biblioteca “in house” de productos naturales derivadas de plantas, entre los que se incluirán lactonas sesquiterpénicas y cumarinas. Estos compuestos se evaluarán en modelos experimentales in vitro que mimetizan diversos aspectos de la neurodegeneración para investigar su capacidad de revertir los fenotipos propuestos.

Para desafiar la hipótesis planteada, se proponen los siguientes objetivos específicos (OE):

OE-1. Evaluar in vitro el efecto protector de los compuestos contra el estrés oxidativo.

OE-2. Evaluar el efecto antiinflamatorio de los compuestos en células de microglía BV2.

OE-3. Evaluar la capacidad de los compuestos de inhibir la ferroptosis.

**METODOLOGIA:** Nos enfocaremos en esta propuesta en dos modelos de neurodegeneración: la exposición a hierro y al neurotóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Ambos modelos buscan emular procesos comunes a las NDD como el estrés oxidativo, pérdida de la proteostasis con agregación proteica, disfunción del sistema lisosomal, neuroinflamación y ferroptosis.

OE-1. Evaluar el efecto protector de los compuestos contra el estrés oxidativo.

La capacidad de los compuestos de proteger contra el estrés oxidativo se evaluará midiendo generación de EROS mediante el ensayo con la sonda fluorescente DCFH-DA luego de exponer las células de neuroblastoma IMR-32 a dos insultos oxidativos, citrato de amonio férrico (FAC) y 6-OHDA, junto con la determinación de la viabilidad celular (ensayo de MTT)(Alza et al., 2017). En el laboratorio hemos trabajado con un modelo de estrés oxidativo inducido por FAC que dispara la activación de vías de señalización sensibles al estado redox celular, como el aumento de la actividad transcripcional de NF $\kappa$ B (Salvador and Oteiza, 2011). Estos modelos celulares son ideales para evaluar el efecto protector de los compuestos a fin de conocer su propiedad antioxidante. En estos ensayos usaremos el antioxidante ácido ascórbico como control positivo.

Un aumento de la viabilidad celular en presencia del compuesto y/o una reducción en la producción de EROS o la peroxidación lipídica cuando se compara con la condición injuriente implicaría que la protección celular es mediada por su actividad antioxidante.

OE-2. Evaluar el efecto antiinflamatorio de los compuestos en células de microglía BV2.

En nuestro laboratorio, hemos demostrado en distintos modelos que la sobrecarga de Fe y la exposición a la 6-OHDA disparan la presencia de marcadores de inflamación como son NF $\kappa$ B y COX-2 (Alza et al., 2020; Iglesias González et al., 2019; Rodríguez Diez et al., 2013). La propuesta de este plan es utilizar estos insultos como inductores de inflamación en células murinas de microglía BV2. En estos ensayos realizaremos en paralelo la exposición a lipopolisacárido bacteriano como control positivo de

neuroinflamación. Luego de determinar la citotoxicidad de los compuestos mediante el ensayo de MTT, su capacidad de contrarrestar la neuroinflamación inducida por FAC o 6-OHDA en células BV2 se evaluará mediante la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B por inmunocitoquímica y la medición de la expresión de COX-2 por RT-PCR. La inhibición de la translocación de NF- $\kappa$ B promovida por FAC o 6-OHDA y de la expresión de COX-2 en células BV2 expuestas a los compuestos indicará que este posee acción antiinflamatoria en este modelo.

OE-3. Evaluar la capacidad de los compuestos de inhibir la ferroptosis.

Además, evaluaremos la capacidad de los compuestos de inhibir la ferroptosis en el modelo celular de estrés oxidativo inducido por FAC, siendo este mecanismo uno de los que media la muerte celular disparada por la peroxidación lipídica dependiente de Fe (Stockwell, 2022). Usaremos dos conocidos inductores de ferroptosis, RSL3 y erastina-1, a concentraciones capaces de inducir muerte celular en neuronas dopaminérgicas de rata N27. Mediante el ensayo de MTT, evaluaremos la capacidad de los compuestos de revertir el efecto de estos inductores sobre la viabilidad celular (Conde et al., 2023).

Los compuestos que revertan la muerte celular inducida por RSL3 y erastina-1 serán considerados inhibidores de la ferroptosis.

Con la ejecución de los OE1-3 esperamos obtener datos acerca de la capacidad de los compuestos de modular dos o más blancos relacionados a los eventos anteriormente mencionados, los cuales en conjunto se vinculan estrechamente con la patogenia de las NDD. En base a estos datos seleccionaremos un candidato que reúna las mejores características en cuanto a su potencial multi-targeting y su drogabilidad para continuar con futuros estudios orientados a la modulación de la agregación de proteínas estrechamente vinculadas a las NDD, como la  $\alpha$ -sinucleína.

**Requisitos especiales del alumno:** El alumno/a deberá tener aprobada la materia Química Medicinal y cursada la materia Farmacología II.

## **P2. Implementación de Gestión de Riesgo en el proceso de Diseño y Desarrollo de un medicamento innovador, útil para el tratamiento de infecciones crónicas asociadas a Fibrosis Quística.**

El instituto PLAPIQUI se encuentra implementando un Sistema de Gestión de Calidad (SGC) institucional. En este contexto, el grupo de Tecnología de Partículas se ha abocado a estandarizar procedimientos relacionados con los procesos de producción y control de calidad de nuevos medicamentos y dispositivos utilizados en la administración de fármacos por vía inhalatoria.

En una primera etapa, se elaboraron un instructivo y los registros asociados al uso del impactador en cascada de múltiples etapas para la evaluación del tamaño aerodinámico de diferentes sistemas dispositivo-formulación [1] y un instructivo de armado, funcionamiento y limpieza de la DUSA (de Dosage Unit Sampling Apparatus, aparato de muestreo de uniformidad de contenido de la dosis emitida), para inhaladores de polvo seco (IPS)[2].

Con el objetivo de dar continuidad a la implementación del SGC vemos la necesidad de confeccionar e implementar un procedimiento aplicable a otro aspecto fundamental, el Diseño y Desarrollo de Medicamentos. Parte fundamental del mismo es la Gestión de Riesgo del producto.

El proceso de Gestión de Riesgos requiere para su ejecución un instructivo específico donde se establece la metodología a aplicar, los criterios para aceptabilidad de riesgos, el tratamiento de riesgos residuales, revisión del proceso de mitigación, responsables, etc.

Metodología del trabajo:

Proponemos que el alumno se involucre en la redacción de este instructivo y participe en su implementación aplicándolo a un medicamento innovador, útil para el tratamiento de infecciones crónicas asociadas a FQ, utilizando la tecnología de IPSs.

El abordaje metodológico de este trabajo consistirá en una primera etapa donde el alumno realizará una búsqueda bibliográfica asociada al tema de Gestión de Riesgo y a las metodologías aplicables tales como FMEA (Análisis Modal de Fallos y Efectos), Análisis Preliminar de peligros (PHA), Estudios de peligros y de operabilidad (HAZOP), entre otros.

Luego, una vez seleccionada la metodología apropiada, el alumno colaborará con la redacción del Instructivo de aplicación de la Gestión de Riesgo en un formato coincidente con el resto de los documentos de Calidad del Instituto.

Una vez disponible e implementado el documento y luego de interiorizarse del producto sobre el cuál aplicarlo, se desarrollará la evaluación de la Gestión de Riesgo mediante la conformación de un equipo multidisciplinario donde el alumno adquirirá la experiencia en la aplicación del Instructivo.

La directora y la supervisora enseñarán al alumno distintos mecanismos de búsqueda bibliográfica y lo guiarán en la misma. De igual manera asesorarán al alumno en la redacción del Instructivo y su aplicación para un caso concreto de investigación farmacéutica.

**Requisitos especiales del alumno:** Capacidad y buena predisposición para el trabajo en equipo. Aptitud en lecto-comprensión del idioma inglés y manejo básico de herramientas informáticas.

### **P3. Síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de cafeína con potencial aplicación en la terapia de Alzheimer**

El objetivo de este plan de trabajo es contribuir al hallazgo de nuevas moléculas bioactivas a través de un diseño racional y de estrategias sintéticas eficaces y sencillas que signifiquen un aporte en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos más efectivos para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer (EA)

Objetivos específicos:

1. Sintetizar nuevos derivados de cafeína. A partir de un diseño racional se llevará a cabo la síntesis asistida por microondas de nuevos compuestos conectando la estructura de cafeína con distintas aminas secundarias y ácidos fenólicos.
2. Purificar y caracterizar los nuevos derivados de cafeína. Se realizará la purificación de los intermediarios y productos finales y la correspondiente caracterización de los mismos.
3. Evaluar la actividad inhibitoria de AChE in vitro de los compuestos sintetizados. Cuantificar la actividad inhibitoria enzimática de los compuestos determinando su IC50.
4. Determinar el tipo de inhibición enzimática. Se seleccionará el inhibidor más activo para determinar su tipo de inhibición y correspondiente Ki.

Hipótesis de trabajo

La síntesis de nuevos derivados de cafeína con estructuras químicas inspiradas en híbridos de cafeína-pirrolidina, resultará en compuestos multitarget capaces de actuar como potentes inhibidores de la acetilcolinesterasa con el potencial de mejorar la señalización colinérgica en el cerebro, contribuyendo significativamente al desarrollo de terapias efectivas para la enfermedad de Alzheimer.

Metodología

#### 1. Síntesis de nuevos derivados de cafeína

Teniendo en cuenta el perfil de actividades biológicas de la cafeína, y los resultados obtenidos por el grupo en trabajos recientes, se propone sintetizar nuevos híbridos de cafeína utilizando distintas aminas secundarias y una variedad de ácidos polifenólicos de conocida actividad antioxidante con el fin de impartirles esta propiedad a los nuevos compuestos propuestos. Para ello se llevará a cabo en un primer paso la reacción asistida por microondas entre teofilina y un dibromoalcano de longitud variable (linker). En una segunda etapa, el intermediario alquilbromado se hará reaccionar con una amina secundaria (bencilaminas y bencilpiperidinas) o con el ácido polifenólico (ácido cinámico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido gálico) correspondiente.

#### 2. Purificación y caracterización de los nuevos derivados de cafeína

Los intermediarios alquilbromados y los productos finales serán purificados mediante cromatografía en columna de gel de sílice empleando una mezcla de diclorometano y metanol como fase móvil. Luego, los productos finales serán caracterizados por Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C utilizando un espectrómetro de RMN multinuclear Bruker de 300 MHz. Además se realizará el análisis elemental y la determinación del punto de fusión cuando corresponda.

#### 3. Evaluación de la actividad inhibitoria de AChE in vitro de los compuestos sintetizados

Los derivados sintetizados serán evaluados como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) mediante el método espectrofotométrico de Ellman. Se compararán los porcentajes de inhibición a determinadas concentraciones para cada muestra para calcular el valor de IC50 (concentración que inhibe la actividad enzimática en un 50%) de cada compuesto activo. El cálculo de IC50 se realizará utilizando el programa GraphPad 5. Todas las determinaciones se realizarán por triplicado. Los valores de Km y Vmax se determinarán midiendo la velocidad inicial a diferentes concentraciones del sustrato respectivo, en ausencia de inhibidor.

#### 4. Determinación del tipo de inhibición enzimática del compuesto más activo

Para el estudio de la cinética enzimática en presencia de un inhibidor se determinará la velocidad de la reacción enzimática a distintas concentraciones del sustrato para 5 concentraciones fijas del inhibidor (todas las determinaciones por triplicado). Con estos datos se construirá la gráfica de Lineweaver-Burk que permitirá, a partir del patrón de líneas que se obtiene para las dobles recíprocas  $1/v$  vs  $1/[S]$ , determinar si se está ante un inhibidor competitivo, acompetitivo o no competitivo. El análisis de estos datos con el programa GraphPad 5 también permitirá determinar los valores de  $K_i$  en cada caso.

Este plan de trabajo se enmarca en el proyecto de Ciencia y Tecnología titulado "Productos naturales y análogos sintéticos biológicamente activos" (PGI 24/Q105) del Laboratorio de productos naturales y análogos sintéticos bioactivos (<http://www.pronabio.net.ar/>) del Instituto de Química del Sur (INQUISUR) y del Departamento de Química de la UNS.

**Requisitos especiales del alumno:** Conocimiento e interés sobre la química orgánica y la farmacología. Motivación y curiosidad.

#### **P4. Implementación de metodologías de control de calidad para inhaladores de polvo seco.**

##### Objetivos Generales

- Obtener nuevas nanoestructuras aptas para la liberación prolongada de moléculas de interés farmacológico.
- Generar conocimiento sobre el modo de unión de los fármacos a la matriz del nanotransportador y su mecanismo de liberación en medios acuosos.

##### Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de SiO<sub>2</sub>-HDL a fin de mejorar las carencias de cada material individual.
- Caracterizar la estructura de los sólidos sintetizados por técnicas difractométricas, microscópicas, espectroscópicas, potenciométricas, termogravimétricas, electroforéticas y porosimétricas.
- Evaluar la performance de los materiales sintetizados como transportadores de doxicilina y ciprofloxacina en estudios de liberación controlada in vitro.

##### ANTECEDENTES

Un sistema de liberación prolongada es un dispositivo nanométrico diseñado para la liberación sostenida de agentes farmacéuticamente activos en un lugar específico o a una velocidad específica y, en muchos casos, para ambos fines. Estos sistemas han surgido en paralelo a la necesidad de nuevas drogas farmacéuticas, teniendo en cuenta que contribuyen a superar sus propias limitaciones, tales como pobre hidrosolubilidad, corta vida media y potencial inmunogenicidad.<sup>1</sup>

Muchas drogas tienen baja solubilidad en agua, lo que lleva a dificultades en el suministro de la dosis adecuada y a efectos secundarios no deseados. Por lo tanto, la investigación en este tema se está dirigiendo hacia la liberación prolongada de fármacos, la cual ofrece numerosos beneficios tales como la retención de la bioactividad de las drogas, la reducción de los efectos secundarios y la prolongación del tiempo de actividad farmacológica. Esto permite balancear las concentraciones del fármaco dentro de un rango deseado, beneficiando así al paciente.<sup>2</sup> El uso de matrices inorgánicas ha recibido recientemente una atención cada vez mayor como vehiculizadores de drogas ya que presentan una buena estabilidad, son biocompatibles y son fáciles de modificar.<sup>3</sup> Entre las más relevantes se encuentran los hidróxidos dobles laminares (HDL) y las sílices mesoporosas (SiO<sub>2</sub>).

Los HDL son materiales actualmente empleados en la industria farmacéutica como excipientes y antiácidos,<sup>4</sup> y muestran la capacidad de incorporar, como ion intercambiable, diferentes fármacos, proteínas, aminoácidos, péptidos y ADN.<sup>5</sup> Su estructura se basa en una red bidimensional plana compuesta de láminas de hidróxidos de iones metálicos di (M<sup>2+</sup>) y trivalentes (M<sup>3+</sup>). La sustitución isomórfica de algunos iones metálicos divalentes por iones trivalentes da lugar a una carga positiva residual

en la red, la cual es balanceada con aniones intercambiables y moléculas de agua colocadas en el espacio interlaminar.<sup>6</sup> Sumado a su gran biocompatibilidad, los HDL tienen baja citotoxicidad, ejercen efecto protector de la droga frente a la luz y humedad y aumentan la solubilidad del fármaco, entre otros.<sup>7</sup> Sin embargo, dos de las carencias a destacar son su baja afinidad a especies catiónicas (por presentar cargas estructurales positivas) y alta sensibilidad en condiciones ácidas. Esto último fue confirmado en estudios realizados por nuestro grupo con HDL intercalados con diferentes fármacos en presencia de buffer pH 1,2 donde la liberación del fármaco es instantánea debido a la disolución de la estructura del carrier.<sup>8,9</sup>

Por lo tanto, las investigaciones actuales se han enfocado en la protección de los HDL intercalados con drogas orales que necesiten la absorción en el intestino. Una posible solución sería recubrir el sistema con nanopartículas de SiO<sub>2</sub>. El uso de este material resulta muy atractivo como plataformas de liberación de fármacos, ya que presenta un arreglo de poros ordenados cuyo tamaño promedio puede ser desde 2 a 50 nm, elevada área superficial, excelente biocompatibilidad y muy buena estabilidad química e hidrotérmica. La principal desventaja del SiO<sub>2</sub> es que su unión con el fármaco (la mayoría de estos son polares o aniónicos) puede ser algo débil, por lo que en contacto con el fluido acuoso o fisiológico podría provocar, no por efectos de disolución como sucede en los HDL, la liberación rápida de la droga.<sup>10</sup> Por lo tanto, la síntesis de un sistema HDL-SiO<sub>2</sub> generaría un carrier novedoso que disminuiría la carencia individual de cada sólido, ya sea inhibiendo la disolución del primero o reforzando las fuerzas de interacción del segundo frente al fármaco. Además, el SiO<sub>2</sub> presenta cargas negativas en agua, lo cual generaría con el HDL un híbrido atractivo tanto a fármacos aniónicos, polares como catiónicos, ampliando así el rango de aplicación.

En este plan de trabajo se seleccionarán fármacos que sean fácilmente intercalados entre las láminas del HDL o con buena afinidad hacia el SiO<sub>2</sub>. Se utilizarán en principio los fármacos ciprofloxacina (CPX) y doxiciclina (DXC). La CPX es un antibiótico que se utiliza ampliamente en aplicaciones clínicas y veterinarias. Sin embargo, la mayor parte de este no se metaboliza completamente en el cuerpo, y se excreta a tasas de hasta el 70%. La DXC es otro de los fármacos de uso masivo, no sólo por ser de amplio espectro sino por su reciente aplicación en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y en la reducción de síntomas causados por el COVID-19.

#### ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA

Se detalla a continuación las siguientes actividades y metodologías a realizar en este plan de trabajo:

##### 1. Síntesis de SiO<sub>2</sub> y HDL-SiO<sub>2</sub>

La síntesis de SiO<sub>2</sub> se llevará a cabo en un frasco de autoclave donde se disolverán una cantidad conocida del surfactante bromuro de cetiltrimetilamonio o CTAB en agua bidestilada por sonicado. Esta solución actuará luego como plantilla de la estructura porosa del material. Luego se agregará a ésta un volumen conocido de solución de NH<sub>3</sub> 28-30%, el cual actuará como catalizador en la hidrólisis del precursor de sílice, tetraetilortosilicato (TEOS). A continuación, un volumen conocido de TEOS será adicionado gota a gota al frasco de reacción, a temperatura ambiente y en constante agitación magnética. El sólido formado se lavará, se secará en horno convencional a 100°C por 12 h y finalmente, se calcinará en mufla con flujo de aire a 540°C durante 7 h (rampa 5°C/min).

El HDL-SiO<sub>2</sub> será sintetizado por coprecipitación de sales de Mg(II) y Al(III) en medio alcalino en presencia de una cantidad fija de SiO<sub>2</sub>. Para ello, se pondrá en contacto el mesoporoso con 100 mL de una solución de MgCl<sub>2</sub> y AlCl<sub>3</sub> con una relación [Mg<sup>2+</sup>]/[Al<sup>3+</sup>] de 2:1 y [Mg<sup>2+</sup>] + [Al<sup>3+</sup>] = 1 M. Se agitará la suspensión vigorosamente y si llevará el pH a 9,5 mediante el agregado de una solución de NaOH 2 M. El sólido formado se lavará y se secará en estufa a 30°C toda la noche. De hecho, la Dra. Carina Luengo (Inv. Asistente CONICET, y codirectora propuesta del plan de trabajo) tiene experiencia en la síntesis de HDL y su posterior uso como carrier de fármacos en sistemas de liberación controlada.<sup>8,9</sup>

##### 2. Caracterización de los materiales híbridos sintetizados

Los materiales híbridos obtenidos se caracterizarán por espectroscopia FTIR, difracción de rayos X, microscopía SEM y TEM, TGA-DSC y por determinaciones de área superficial, porosidad y tamaño de partícula. Además, se caracterizará la generación de cargas eléctricas superficiales a través de movi­lidades electroforéticas.

##### 3. Estudio de liberación del fármaco in vitro

Previamente se llevará a cabo la incorporación de CPX y DXC a los carriers más prometedores. Esto puede hacerse mediante dos vías: impregnación de una solución de concentración fija de la droga, o a través de la intercalación del fármaco durante la formación del HDL. Dependiendo de la droga a estudiar, se elegirá el mejor procedimiento.

Los estudios de liberación in vitro se realizarán en condiciones experimentales similares a las del fluido gastrointestinal en término de pH y composición: soluciones buffer a pH 1,2 (HCl/KCl) para fluido gástrico, y pH 4,5 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/HCl) y 6,8 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) para fluido intestinal. Para ello, una cantidad conocida del sistema fármaco-carrier se pondrá en contacto con la solución buffer. A diferentes tiempos, una alícuota de suspensión será extraída, se separarán las fases por centrifugación y el fármaco será cuantificado en el sobrenadante a fin de estimar el porcentaje de liberación. La temperatura se controlará a 37°C para simular las condiciones en el organismo y la velocidad de agitación será de 100 rpm para simular el movimiento peristáltico.

#### FACTIBILIDAD Y VINCULACIÓN CON PROYECTOS EN EJECUCIÓN:

El grupo cuenta con el equipamiento y el financiamiento necesarios para el normal desarrollo del plan de trabajo. El trabajo a desarrollar se relaciona estrechamente con el proyecto dirigido por los doctores Marcelo Avena y Maximiliano Brigante en el Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur, Código PGI UNS 24-Q120, "Reacciones superficiales de óxidos metálicos y minerales del suelo en medios acuosos", en el que se estudia la reactividad de la interfaz sólido/ solución acuosa, donde se estudian fenómenos de adsorción de nutrientes, fenómenos de disolución, catálisis por superficies y sistemas de liberación de fármacos. De hecho, los integrantes de este grupo de trabajo son participantes activos en este proyecto.

**Requisitos especiales del alumno:** Estudiante de 4to ó 5to año de la carrera de Farmacia.

#### **P5. De la cápsula al pulmón: estudio de la resistencia al flujo de aire de inhaladores de polvo seco.**

Los inhaladores de polvo seco (IPSS) consisten en formulaciones en polvo, que se aerosolizan por inspiración del paciente utilizando un dispositivo inhalador. Actualmente, constituyen la tecnología preferida por prescriptores y pacientes para la administración de fármacos por vía inhalatoria. Esto se debe a sus ventajas competitivas en términos de estabilidad (física, química y microbiológica), facilidad de uso y portabilidad, respecto a otros sistemas de administración de fármacos al pulmón, como los nebulizadores. Sin embargo, en enfermedades obstructivas, como la fibrosis quística, el diseño de los IPS aún representa un desafío, relacionado con: (a) tratamientos de dosis altas: el elevado número de cápsulas requeridas para alcanzar dosis terapéuticas de mucolíticos y antibióticos; y (b) baja capacidad inspiratoria: los pacientes con daño pulmonar suelen presentar dificultades para alcanzar los flujos máximos de inhalación, necesarios para una dosis emitida adecuada. Por lo tanto, en los últimos años crece el interés por el desarrollo de IPS que combinen alta capacidad de carga de dosis, con dispositivos de menor resistencia al flujo de aire. Entre ellos, los de uso más extendido son los dispositivos monodosis, donde el polvo se vehiculiza en cápsulas.

La hipótesis de este plan de trabajo es que los patrones de flujo de aire a través del dispositivo inhalador se ven afectados por la presencia y cargado de la cápsula, y esto condiciona la comparación del desempeño aerodinámico de dispositivos y sistemas particulados trasladable a la aplicación clínica.

El objetivo general de esta propuesta consiste en estudiar el impacto de la presencia, tamaño y cargado de la cápsula en el caudal requerido para evaluar el comportamiento aerodinámico de dispositivos IPS con diferentes resistencias al flujo de aire. Para alcanzar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto del ensayo de medición de caudal y resistencia al flujo de aire de los inhaladores, empleando un equipo de control de flujo crítico.
- Incorporación de un polvo seco modelo y comparación del desempeño aerodinámico de sistemas que involucren diferentes tamaños de cápsula y cargado de las mismas.
- Selección del sistema (dispositivo inhalador, tamaño y cargado de cápsula) más adecuado y caracterización del mismo.

A continuación, se listan las actividades proyectadas para la pasantía y se resume la metodología de trabajo (ver Esquema 1).

##### 1. Selección de materiales y búsqueda bibliográfica



Se realizará una búsqueda bibliográfica en bases de datos de artículos científicos y patentes, orientada hacia: antibióticos y formulaciones aprobadas para la vía inhalatoria, tendencias de diseño de dispositivos IPS e impacto en la adherencia terapéutica de los pacientes; y metodologías de caracterización y cuantificación de los principios activos. En base a esta búsqueda, se seleccionará el material a cargar en las cápsulas, que consistirá en un polvo inhalable conteniendo un antibiótico de alta dosis (ej: tobramicina, aztreonam).

## 2. Evaluación de flujo de aire a través de los inhaladores

Se evaluarán siete modelos de inhaladores RS01 monodosis basados en cápsulas (Plastiapae, Italia). Cuatro de ellos serán dispositivos para cápsulas #3, con resistencias al flujo de aire: baja, media, alta y ultra-alta. Los tres modelos restantes corresponderán a inhaladores para cápsulas de mayor tamaño (#2), de baja, media y alta resistencia. De acuerdo a la farmacopea de los Estados Unidos (USP <601>), se establecerá en el ensayo una caída de presión ( $\Delta P$ ) de 4 kPa a través del inhalador. El caudal (Q) y la resistencia del dispositivo (R) requeridos para alcanzar dicha  $\Delta P$  se determinarán in vitro empleando un controlador de flujo crítico TPK 100i (Copley Scientific, Reino Unido). El mismo será conectado en línea a un aparato de muestreo de unidades de dosificación (dosage unit sampling apparatus, DUSA) para IPS y a una bomba de vacío de alta capacidad (HCP6, Copley Scientific, Reino Unido). Dicha bomba permitirá generar el flujo de aire necesario para el ensayo. Se medirán cinco unidades de cada IPS con y sin cápsulas vacías de gelatina #2 o #3 (Parafarm, Argentina), y se realizará una comparación entre el dispositivo vacío versus el dispositivo cargado con una cápsula. Se utilizará la ecuación de Clark and Hollingsworth para los cálculos de R. En esta etapa la Dra. Nazareth Ceschan (PLAPIQUI) colaborará en la implementación de la técnica.

## 3. Incorporación de polvo seco a las mediciones

Empleando las mismas condiciones operativas que en la sección 2, se evaluarán diferentes cargados de polvo en las cápsulas. Se realizará una comparación entre el número de cápsulas de cada volumen requeridas para alcanzar la dosis terapéutica identificada en la búsqueda bibliográfica inicial.

## 4. Análisis e interpretación de resultados

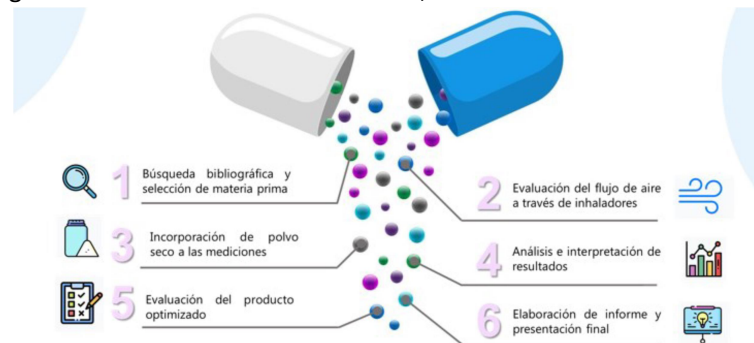
Se analizarán e interpretarán los resultados haciendo uso del software estadístico StatGraphics. Se determinará si existen tendencias en la caída de presión al modificar el tamaño de la cápsula o la resistencia del inhalador, y si las diferencias encontradas son estadísticamente significativas.

## 5. Evaluación del producto optimizado

Se seleccionará la formulación en polvo seco y la combinación de inhalador y tamaño de cápsula óptima, en términos de desempeño aerodinámico y dosis emitida. Se pondrá a punto y aplicará una técnica analítica de cuantificación del principio activo por espectrofotometría UV-Visible o HPLC, según corresponda.

## 6. Redacción del informe y preparación de una presentación final de la pasantía

Se redactará el informe técnico final correspondiente, así como también se confeccionará una presentación en formato Powerpoint o similar con asistencia del docente supervisor. Esta instancia permitirá favorecer la integración de los contenidos abordados, así como también las habilidades de comunicación escrita y oral del alumno.



**Requisitos especiales del alumno:** Lecto-comprensión del idioma inglés.

## **P6. Búsqueda de potenciales fármacos de origen natural para la Enfermedad de Alzheimer.**

### Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo que afecta la memoria, el pensamiento, el razonamiento y el lenguaje, terminando por desarrollar cambios en la personalidad del paciente haciéndolo incapaz de cuidarse por sí mismo. Se sabe que esta enfermedad es la causa más común de demencia, representando aproximadamente entre el 60 % y el 80 % de los casos. Mientras que la etiología de la enfermedad no se ha comprendido en su totalidad se sabe que se relaciona con la formación y deposición de péptidos  $\beta$ -amiloide y a la hiperfosforilación y agregación de un estabilizador de microtúbulos llamado proteína tau. Estas estructuras causan disfunción mitocondrial y sináptica, lo que conduce al estrés oxidativo, la neuroinflamación, y llevan a la neurodegeneración. En un intento por explicar estos múltiples y variados factores han surgido varias teorías. Entre ellas, la hipótesis colinérgica y la hipótesis amiloide son las más aceptadas y difundidas, llevando a que el diseño de fármacos basado en estas hipótesis siga siendo una de las principales estrategias terapéuticas. En la actualidad, la mayoría de los fármacos aprobados para el tratamiento de la EA son inhibidores de las enzimas acetilcolinesterasa (ACE) y/o butirilcolinesterasa (BuCE), cuya eficacia se limita a las primeras etapas de la enfermedad, además de presentar varios efectos secundarios. A pesar de la enorme cantidad de investigaciones llevadas adelante sobre el tema, hasta el momento no se han podido explicar de forma completa las causas de la enfermedad ni se ha logrado un efecto modificador de la misma al aplicar las teorías en forma aislada. Debido a esto, se continúa en la búsqueda y desarrollo de compuestos para el tratamiento de la EA, intentando que puedan interactuar simultáneamente con varios blancos terapéuticos y presenten un perfil farmacológico expandido.

Los productos naturales han sido utilizados tradicionalmente como fuente de medicina, e incluso hoy son considerados como la fuente más exitosa de potenciales fármacos líderes. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población mundial todavía utiliza plantas o medicinas relacionadas como atención primaria de salud. La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo que afecta la memoria, el pensamiento, el razonamiento y el lenguaje, terminando por desarrollar cambios en la personalidad del paciente haciéndolo incapaz de cuidarse por sí mismo. Se sabe que esta enfermedad es la causa más común de demencia, representando aproximadamente entre el 60 % y el 80 % de los casos. Mientras que la etiología de la enfermedad no se ha comprendido en su totalidad se sabe que se relaciona con la formación y deposición de péptidos  $\beta$ -amiloide y a la hiperfosforilación y agregación de un estabilizador de microtúbulos llamado proteína tau. Estas estructuras causan disfunción mitocondrial y sináptica, lo que conduce al estrés oxidativo, la neuroinflamación, y llevan a la neurodegeneración. En un intento por explicar estos múltiples y variados factores han surgido varias teorías. Entre ellas, la hipótesis colinérgica y la hipótesis amiloide son las más aceptadas y difundidas, llevando a que el diseño de fármacos basado en estas hipótesis siga siendo una de las principales estrategias terapéuticas. En la actualidad, la mayoría de los fármacos aprobados para el tratamiento de la EA son inhibidores de las enzimas acetilcolinesterasa (ACE) y/o butirilcolinesterasa (BuCE), cuya eficacia se limita a las primeras etapas de la enfermedad, además de presentar varios efectos secundarios. A pesar de la enorme cantidad de investigaciones llevadas adelante sobre el tema, hasta el momento no se han podido explicar de forma completa las causas de la enfermedad ni se ha logrado un efecto modificador de la misma al aplicar las teorías en forma aislada. Debido a esto, se continúa en la búsqueda y desarrollo de compuestos para el tratamiento de la EA, intentando que puedan interactuar simultáneamente con varios blancos terapéuticos y presenten un perfil farmacológico expandido.

Los productos naturales han sido utilizados tradicionalmente como fuente de medicina, e incluso hoy son considerados como la fuente más exitosa de potenciales fármacos líderes. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población mundial todavía utiliza plantas o medicinas relacionadas como atención primaria de salud. La vegetación de la zona de nuestro país debido a su variedad de especies vegetales resulta de interés para la recolección de plantas con gran potencialidad para el descubrimiento de nuevos líderes con bioactividad. En particular las plantas del género *Grindelia*, sus extractos y metabolitos han sido reportados por sus interesantes actividades biológicas, tales como antiinflamatoria, expectorante, antiespasmódica, antimicrobiana, inhibición de varias enzimas como MAO-A y ACE, y efectos insecticidas entre otros.

Objetivos:

- Obtener extractos de distinta polaridad de la especie vegetal *Grindelia chilensis* que ha demostrado bioactividad en ensayos preliminares.
- Realizar el aislamiento bioguiado de los extractos y sub-extractos activos utilizando diversas técnicas cromatográficas.
- Identificar y caracterizar los metabolitos activos mediante diversas técnicas espectroscópicas (RMN, EM, IR, etc).
- Evaluar en forma cuantitativa la actividad inhibitoria de ACE y BuCE in vitro, determinando los porcentajes de inhibición y concentración capaz de inhibir la actividad enzimática al 50% (IC50).
- Estudiar la cinética enzimática en presencia de los inhibidores de origen natural. Determinar el tipo de inhibición (competitiva, acompetitiva, no competitiva) y la  $K_i$  de los inhibidores.

Hipótesis de trabajo:

La especie *Grindelia chilensis* es una fuente de compuestos inhibidores de las enzimas ACE y BuCE, que tienen potencial aplicación en la terapia de la Enfermedad de Alzheimer.

Metodología:

1. Obtención de extractos: La planta a estudiar, *Grindelia chilensis*, ha sido recolectada e identificada por especialistas del Departamento de Biología de la UNS. Se realizarán extractos etanólicos de la planta entera mediante maceración.
2. Estudio de la composición química: Para el estudio de la composición química, en primer lugar, se analizará el extracto utilizando la técnica HPLC-UV/Vis-MS. De esta forma se podrán identificar de forma rápida y sencilla metabolitos secundarios ya conocidos y se evitará el aislamiento de los mismos. En el caso de que en el análisis por HPLC-UV/Vis-MS se detectaran metabolitos no identificados con potencial actividad biológica se procederá al aislamiento de los mismos. Para ello se realizarán extracciones líquido-líquido a partir del extracto etanólico con solventes orgánicos de diversa polaridad (hexano, diclorometano, acetato de etilo y n-butanol). Las fracciones obtenidas se someterán nuevamente a los bioensayos para detectar las que concentren los compuestos activos y proceder a su purificación. Esto se llevará a cabo empleando distintas técnicas cromatográficas, en capa delgada, en columna, flash en columna seca, líquida de alta resolución, etc., y distintas fases estacionarias: silicagel 60, fase reversa C18, Sephadex LH-20, etc. Para la elucidación estructural de los compuestos bioactivos puros se emplearán métodos espectroscópicos: RMN mono y bidimensional, UV-visible, IR, y Espectrometría de Masas. Una vez aislados e identificados los compuestos activos se llevarán a cabo los ensayos biológicos para cuantificar la actividad.
3. Ensayos de actividad biológica in vitro: La inhibición de las enzimas ACE de anguila eléctrica y BuCE de serum de caballo se llevará a cabo utilizando el método espectrofotométrico de Ellman con algunas modificaciones. Como inhibidor de referencia se utilizará tacrina. Para aquellos compuestos que muestren valores de inhibición enzimática comparables al control positivo se procederá a la determinación de los valores de  $K_i$  y del tipo de inhibición ejercida mediante las gráficas de Lineweaver-Burk.

**Requisitos especiales de alumno:** tener cursadas las materias Química Orgánica I y II.

**P7. Desarrollo de micropartículas co-procesadas de principios activos para la formulación de inhaladores presurizados estables.**

La mayor parte de los medicamentos de administración inhalatoria que se encuentran disponibles en terapéutica están dirigidos al tratamiento de enfermedades respiratorias como el asma. Esto permite que el fármaco llegue directamente al sitio de acción reduciendo el tiempo en el que comienza el efecto farmacológico y evitando muchos efectos adversos sistémicos. Los medicamentos más empleados en el mercado mundial y argentino para administrar fármacos al sistema respiratorio son los inhaladores presurizados o de dosis medida (IDMs, conocidos popularmente como “puffs”). Su éxito se basa en que pueden utilizarse en un amplio grupo de poblaciones de pacientes, incluyendo niños menores a cuatro años, pacientes con capacidad inspiratoria reducida y ancianos.

Los IDMs pueden formularse como soluciones o suspensiones del principio activo en uno o más propelentes, o una mezcla de solventes, propelentes y otros excipientes. El propelente es el componente mayoritario de estas formulaciones y se encuentra en dos fases: una fase licuada, en equilibrio con su fase gaseosa. En el área farmacéutica los más utilizados son los hidrofluoroalcanos (HFAs): HFA 134a y 237. Debido a la baja capacidad solvente de estos propelentes, muchas veces la única opción para formular principios activos es a través de suspensiones. Como en todo sistema heterogéneo, la estabilidad física es un desafío. La tendencia de los principios activos a aglomerarse, cremar o precipitar hace que la dosis administrada cada vez que se usa el inhalador no sea reproducible, traduciéndose en potenciales fallas de la terapia. En muchas oportunidades, los IDMs combinan más de una familia de principios activos (por ejemplo, corticoides con broncodilatadores). Cuando dos o más principios activos se co-suspenden en la misma formulación, la estabilidad física de la misma se ve aún más comprometida, haciendo que cada fármaco se comporte de forma independiente.

En este trabajo se desarrollarán microestructuras porosas combinando corticoides y broncodilatadores en una única partícula. La combinación de ambos principios activos en una única entidad evitará que cada uno se comporte de forma individual mientras que la estructura porosa de la partícula proveerá de estabilidad física a la formulación. Los sistemas particulados co-procesados se producirán mediante secado por atomización. Se caracterizará la performance del proceso de obtención (rendimiento y humedad residual del producto) y se estudiarán los atributos críticos de calidad de las partículas como, por ejemplo:

- Forma, mediante microscopía electrónica;
- Tamaño, empleando difracción láser;
- Densidad y porosidad, mediante isotermas de adsorción de nitrógeno;
- Propiedades de flujo, a través del ángulo de reposo, densidad libre y empaquetada;
- Estabilidad, mediante seguimiento en el tiempo de la formación de precipitado o cremado

Se producirán aerosoles presurizados, suspendiendo las partículas en propelentes, dentro de envases de aluminio sellados con una válvula dosificadora. Para ello, se empleará una envasadora manual. A esos aerosoles se les determinará el desempeño aerodinámico, intentando correlacionar el funcionamiento in vitro con la llegada in vivo de las partículas al sistema respiratorio.

Todas las determinaciones se realizarán, en principio con ayuda de la directora. Una vez que el alumno haya sido capacitado en cada una de las técnicas descriptas, podrá desempeñarlas de manera independiente, contando con la colaboración permanente de la directora.

**Requisitos especiales del alumno:** Se requiere aptitud en lecto-comprensión del idioma inglés y manejo de herramientas informáticas.

### **P8 Cápsulas veganas para polvos alimenticios ricos en antioxidantes**

El objetivo general de este plan de trabajo es el desarrollo de cápsulas veganas a partir de almidón con el propósito de mejorar, maximizar, potenciar y mantener las propiedades antioxidantes (AOs) de diferentes polvos de alimentos, provenientes de las pérdidas y desperdicios alimenticios (PDA) de la industria frutihortícola.

Para alcanzar el objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos (O.E):

O.E.1: Obtener distintas formulaciones a base de almidones de maíz nativo y modificados, plastificantes y agentes antimicrobianos mediante la técnica de gelatinización térmica.

O.E.2: Determinar el comportamiento reológico de las suspensiones gelatinizadas.

O.E.3: Obtener películas a partir de las suspensiones gelatinizadas mediante el método de casting para su posterior caracterización mediante el estudio de su microestructura y sus propiedades térmicas, mecánicas y ópticas.

O.E.4: Obtener cápsulas mediante el método de inmersión y secado a partir de las formulaciones que presenten las mejores propiedades para esta aplicación.

O.E.5: Encapsular polvos ricos en AOs obtenidos de la PDA empleando las cápsulas desarrolladas en el marco de este trabajo y cápsulas tradicionales a base de gelatina.

Vehiculización eficiente de polvos alimenticios ricos en AOs.

En la actualidad, los polvos alimenticios ricos en AOS se comercializan en forma tal cual, cuya dosificación debe ser realizada de forma manual por cada consumidor [1]. También puede encontrarse en forma de comprimidos o cápsulas cuyo principal beneficio es que la dosificación ya viene incluida [2]. La encapsulación de compuestos bioactivos como los AOs mejora la biodisponibilidad de los mismos en su ingesta, así como la estabilidad frente al almacenamiento, transporte y distribución, protegiéndolos de factores externos como la luz, el calor y la humedad [3-4]. Se encuentran en el mercado gran cantidad de compuestos utilizados para la realización de cápsulas, siendo uno de los más empleados la gelatina [5]. Sin embargo, la misma presenta ciertas desventajas como su origen animal, susceptibilidad a la reticulación y pobres propiedades mecánicas, entre otras [14]. Es por ello que para superar las desventajas de la gelatina se estudian otros compuestos con propiedades potencialmente atractivas para la obtención de cápsulas. Dentro de este contexto, los almidones podrían ser materiales alternativos para esta aplicación. Para la obtención de las cápsulas a base de almidón se pueden emplear dos metodologías: extrusión [5] o la técnica de moldeado por inmersión y posterior secado [6]. En cuanto a esta última, el procedimiento es muy sencillo y consiste básicamente en sumergir un molde de forma cilíndrica en suspensiones de almidón gelatinizadas, luego el molde se retira, la suspensión se deja secar y se desmolda el material, obteniéndose así el cuerpo y la tapa que conforman la cápsula. Luego, se procede al llenado, se coloca la tapa y se sellan por microspray o bandas de sellado [7].

Hipótesis: Los polvos alimenticios pueden vehiculizarse en cápsulas veganas para obtener nutraceuticos ricos en AOs.

Actividades y metodología: Para alcanzar los objetivos específicos planteados se proponen las siguientes actividades experimentales.

Obtención de las formulaciones (O.E.1): Se prepararán diversas suspensiones acuosas (5-15 % m/m) a base de almidón (nativo, hidrolizado y acetilado) que serán sometidas a un proceso de gelatinización térmica (90

°C, 20 min) con agitación constante. Luego de la gelatinización, se eliminarán las burbujas de aire aplicando vacío (30 min) y se incorporarán los plastificantes (glicerol y sorbitol, en concentraciones entre 25 y 40 % m/m, en base almidón) [8]. Se optimizarán las concentraciones de los almidones y los plastificantes de manera tal de obtener suspensiones con viscosidades que permitan el moldeo para la obtención de las cápsulas y obtener materiales con las propiedades adecuadas. Se incorporarán agentes antimicrobianos como el sorbato de potasio [9] para minimizar el deterioro de las cápsulas.

Determinar el comportamiento reológico de las suspensiones gelatinizadas (O.E.2): Para evaluar el comportamiento reológico de las suspensiones gelatinizadas se empleará un Reómetro Dinámico. Los resultados obtenidos se modelarán matemáticamente con el modelo Newtoniano o el de Ostwald de Waele y se calculará la viscosidad aparente.

Obtención y caracterización de las películas (O.E.3): Las suspensiones gelatinizadas, plastificadas y desgasificadas de almidón se volcarán (20 g) en moldes de acrílico y se dejarán secar a 40 °C en estufa hasta peso constante, luego las mismas se desmoldarán. Las películas se acondicionarán a 25 °C y 50 - 60 % de humedad relativa durante 48 hs para realizar las pruebas de caracterización [10]. Las películas obtenidas se caracterizarán a partir del estudio de sus propiedades estructurales (mediante Microscopía Electrónica de Barrido, Difracción de Rayos X y Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier), propiedades térmicas (Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido) y las propiedades mecánicas (ensayos de tracción). Se determinará la permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua. Las formulaciones que presenten las mejores propiedades se seleccionarán para la obtención de las cápsulas.

Obtención de las cápsulas (O.E.4): Las cápsulas se obtendrán mediante el método de inmersión y secado. Los moldes de las cápsulas, tanto el cuerpo como la tapa, se diseñarán a medida (cilíndricos, 6 mm y 6,20 mm) y se realizarán utilizando tecnologías de impresión 3D. Las suspensiones gelatinizadas se pondrán en contacto con los moldes realizados y se secarán a 40 °C durante 3 hs [11]. Se evaluarán diferentes sistemas de cierre tales como por presión, microspray o bandas de sellado [12].

Encapsulación de los polvos alimenticios (O.E.5): Se encapsularán los polvos obtenidos por liofilización de las PDA en las cápsulas veganas y en cápsulas tradicionales a base de gelatina. Se evaluará la disolución (Prueba 320), la disgregación (Prueba 310), humedad y control microbiológicos (Prueba 90) según lo indicado en la Farmacopea Argentina octava edición, Volumen I [13-14]. Las cápsulas se cerrarán empleando el sistema de cierre (presión, microspray o bandas de sellado) previamente seleccionado.

**Requisitos especiales del alumno:** Contar con al menos el 60% de la carrera aprobada.

### **P9. Estudio de la actividad biológica de nuevos nanosistemas como agentes antineoplásicos.**

La quercetina (QUE) pertenece al grupo de los fitoestrógenos y su acción anti-tumoral es conocida en varios tipos de células malignas. Si bien la QUE presenta toxicidad limitada en las células normales, su alta hidrofobicidad disminuye significativamente su solubilidad en agua limitando su aplicación biomédica. Se plantea como objetivo general evaluar la efectividad de un nuevo nanosistema cargado con QUE como agente antineoplásico en un modelo celular de oncogénesis viral. La finalidad de este estudio es superar las barreras que impiden la aplicación terapéutica de la QUE.

1. Hipótesis de trabajo: El nuevo nanosistema, MAG.Manosa.QUE, tiene actividad antitumoral en un modelo de oncogénesis viral.

2. Objetivos específicos:

Se trabajará con un nanosistema a base de óxido de hierro y manosa al que se le cargará QUE. Estas actividades serán desarrolladas en el grupo de Nanomateriales Híbridos Aplicados (NanoHiAP) del INQUISUR, dirigido por la Dra. Verónica Lassalle.

2.1. Investigar la biocompatibilidad y actividad biológica de los nuevos nanosistemas (NS), cargado (MAG.Manosa.QUE) y sin carga (MAG.Manosa), en células normales (SVEC) y transformadas por el receptor viral que desencadena la oncogénesis viral (SVEC-vGPCR) en el sarcoma de Kaposi. En primer lugar, se determinará el efecto de los NS sobre la proliferación celular a través de estudios dependientes de la concentración y el tiempo de incubación. La proliferación se cuantificará a través de la técnica de cristal violeta. Se complementarán estos estudios analizando la morfología celular. Para evaluar la citotoxicidad se plantea ensayar la viabilidad a través del estudio de la actividad metabólica por rojo neutro.

2.2. Analizar la capacidad de acumulación de los NS. Se observará la acumulación de los NS en las células a través de la tinción con Azul de Prusia que colorea el contenido de hierro y por H&E el contenido celular. Además, se cuantificará el contenido de hierro espectrofotométricamente a partir de la solubilización del colorante azul de Prusia

3. Metodología

3.1. Cultivo de líneas celulares y modelo experimental de oncogénesis viral: Se utilizará la línea celular murina de células endoteliales (SVEC) “simian virus 40-, large T-antigen-immortalized- murine endothelial cells” que expresa en forma estable el receptor viral, vGPCR (SVEC-vGPCR). Las células creciendo en monocapa se cultivarán en medio DMEM 5% de suero fetal bovino (SFB) en presencia de G418 (500 µg/ml) como antibiótico de selección para su mantenimiento. La sobreexpresión estable del vGPCR desencadena la proliferación de las células endoteliales, induce angiogénesis, y reproduce las lesiones angioproliferativas que ocurren en el sarcoma de Kaposi humano, constituyendo un buen modelo experimental in vitro de esta patología.

3.2. Caracterización de los NS: Se utilizará un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100CX-II (JEOL, Akishima, Tokio, Japón) para determinar el tamaño de partícula y la morfología de los nanosistemas cargados con QUE. Las muestras se disolverán en agua, se colocarán en rejillas de Cu de malla 200 y se secarán a temperatura ambiente. Los datos sobre el diámetro hidrodinámico y el potencial Z ( $\zeta$ ) se adquirirán en un Malvern Zetasizer (Nano-Zs90). Las muestras se dispersarán por sonicación en agua bidestilada antes de realizar la adquisición y ensayos biológicos. Se realizarán ensayos de liberación de QUE en medio de cultivo DMEM 2%SFB a pH 5 y pH 7 para determinar la eficiencia en la liberación.

3.4. Tinción con violeta cristal. Brevemente, las células se lavarán con PBS y se fijarán con paraformaldehído 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubarán con el colorante violeta cristal 0,1% durante 30 min y se lavarán con agua bidestilada hasta eliminar el exceso de colorante. Se tomarán fotografías representativas de cada condición bajo microscopio óptico y luego se cuantificará el colorante celular disolviendo el violeta cristal con una solución de tritón 0,2%. La absorbancia se leerá a 590 nm en espectrofotómetro.

3.5. Ensayo de rojo neutro: El número de células viables se estimará cuantitativamente mediante la incorporación de rojo neutro en los lisosomas. Brevemente, las células se incubarán en presencia de diferentes concentraciones de NS en placas de 96 pocillos durante 48 h. Luego, se incorporará la solución de rojo neutro en DMEM durante 3

h. Posteriormente, se capturarán micrografías de cada condición bajo un microscopio de campo de luz invertido (Nikon TE300 Eclipse) equipado con una cámara digital. Finalmente, se cuantificará la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (Bioteck Synergy-HT).

3.6. Detección y cuantificación de hierro mediante ensayo de azul de Prusia: Las células se cultivarán con los NS a diferentes concentraciones y durante diferentes períodos de tiempo (3-48 h). Luego, las células se lavarán con PBS y se fijarán con paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavarán e incubarán con la solución de azul de Prusia (5% K<sub>4</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>; 1% HCl) durante 15 min y se contra teñirán con H&E. Las micrografías de cada concentración se obtendrán por microscopía de campo de luz invertido (Nikon TE300 Eclipse) equipado con una cámara digital. En experimentos en paralelos, el contenido de hierro de los NS se cuantificará mediante la incubación de las células con 250 µl de HCl al 20 % durante la noche a 37 °C. A continuación, se agregará 250 µL de K<sub>4</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> al 10% por pocillo y se medirá la absorbancia a 700 nm en un lector de microplacas (Bioteck Synergy-HT).

**Requisitos especiales del alumno:** Contar con las materias aprobadas: Físicoquímica General, Química Biológica A e inmunología F y manifestar entusiasmo para desarrollar tareas de laboratorio relacionadas con el área de los materiales y la bioquímica.

### **P10 Desarrollo de comprimidos orodesintegrables para patologías cardiovasculares pediátricas**

El desarrollo de medicamentos destinados a población pediátrica ha sido, históricamente, relegado por la industria. Por ello, muchos medicamentos de escaso interés por su bajo precio o por el grupo minoritario de población al que se destinan, quedan al margen de la investigación y producción a gran escala. En consecuencia, a aquellos productos que no se encuentran disponibles en formas farmacéuticas adecuadas para niños, se los conoce como “formulaciones huérfanas”. En este tipo de formulaciones, el fármaco tiene indicación para la enfermedad a tratar y se presenta en formas farmacéuticas para adultos, pero no está disponible comercialmente para tratamiento de pacientes pediátricos. Es por ello, que muchos de los profesionales de la salud acuden a las formulaciones “off-label”, las cuales son prescripciones realizadas en dosis, rango de edad, vía de administración o indicaciones distintas a las reflejadas en la documentación oficial de autorización del fármaco. A modo de ejemplo, los comprimidos pueden ser pulverizados e incluidos en matrices amigables para los niños, como jugos o lácteos. Esto conlleva a potenciales riesgos: inexactitud de dosis, falta de eficacia y posible aparición de mal sabor y/o efectos adversos. Si bien en los últimos años se han discutido estrategias para promover el desarrollo de medicamentos pediátricos, se debe continuar ahondando esfuerzos en torno a la investigación que intente dar respuesta a esta problemática, a través de nuevas formulaciones aptas, seguras y eficaces. Actualmente, se encuentra en auge el desarrollo de comprimidos orodesintegrables (ODT). Estos constituyen una novedosa formulación sólida que se desintegra en la cavidad bucal en menos de 180 segundos, y que es fácilmente deglutible, asegurando la ingestión de la totalidad de la dosis y facilitando la adherencia al tratamiento, en el caso de patologías crónicas. Es por ello que, el objetivo de este trabajo consiste en el desarrollo de ODT de fármacos de interés pediátrico para tratamiento de patologías cardiovasculares, tales como amiodarona (antiarrítmico) y furosemida (diurético de asa). Se evaluará el efecto de diferentes diluyentes, superdesintegrantes y/o lubricantes analizando los parámetros críticos de procesamiento de cada formulación, hasta alcanzar aquellas que sean promisorias para cubrir el vacío farmacoterapéutico existente. Específicamente para el caso de furosemida se prevé estudiar el efecto del fármaco a distintas dosis, con la finalidad de lograr una adecuada flexibilidad de dosis.

Se realizarán las siguientes actividades y metodologías para cumplimentar el objetivo anteriormente propuesto:

1. Búsqueda bibliográfica: la directora y supervisora enseñarán al alumno a acceder a las diferentes bases de datos de literatura científica y se acompañará en el proceso de revisión de las características físicoquímicas, farmacotécnicas y organolépticas de ambos fármacos. Se hará especial hincapié en textos indispensables para el trabajo experimental que han sido o serán vistos en el transcurso de la carrera (Farmacopea Argentina, United States Pharmacopeia, entre otros).
2. Diseño y desarrollo de formulaciones de ODTs: la supervisora será la encargada de las explicaciones pertinentes al proceso de diseño de formulaciones, teniendo en cuenta las posibles variaciones en excipientes (diluyentes, superdesintegrantes y/o lubricantes), tanto en calidad como en cantidad, y mediante aplicación de herramienta de diseño experimental. Las mezclas de polvos propuestas para las diversas formulaciones se evaluarán en términos de propiedades reológicas y curvas de compactabilidad, además de evidenciar la posibilidad de existencia de interacciones químicas indeseables entre el fármaco y los excipientes propuestos. Se explicarán los procesos de mezclado y compresión directa para la obtención de los comprimidos. Se entrenará al alumno de forma tal que pueda utilizar con destreza la comprimidora excéntrica monopunzón a través del conocimiento de los diferentes parámetros de ajuste de la misma.
3. Evaluación de las características críticas de calidad de ODTs: inicialmente los ODTs serán caracterizados en cuanto a tiempo de desintegración, friabilidad y dureza. Se evaluará si las formulaciones cumplen con los criterios de calidad esperados. Luego, se realizará la caracterización completa de aquellas formulaciones más promisorias,

incluyendo: uniformidad de peso, diámetro y espesor, uniformidad de contenido, tiempo de mojado y tasa de captación de agua, disolución in vitro, entre otros. Para llevar a cabo estos ensayos se utilizarán equipos de uso diario (balanzas y calibre digital), acompañado de equipamiento específico (desintegrador, friabilómetro, durómetro, espectrofotómetro UV-Vis, disolutor, medidor de densidad de polvos y prensa hidráulica, entre otros). La supervisora entrenará y guiará al alumno en el uso de este equipamiento. Además, tanto la directora como la supervisora estarán involucradas en la interpretación de los resultados obtenidos en cada etapa del proceso.

**Requisitos especiales del alumno:** no requiere.

### **P11. Efecto antitumoral de nanopartículas cargadas con quercetina en células de cáncer de mama.**

La quercetina (QUE) es un flavonoide perteneciente al grupo de los fitoestrógenos que se encuentra ampliamente distribuido en frutas y verduras. Su actividad anti-oxidante, anti-inflamatoria y anti-tumoral, entre otras actividades biológicas, ha sido muy estudiada en los últimos años. Sin embargo, su alta hidrofobicidad y baja biodisponibilidad al ser administrada oralmente, limita su aplicación biomédica. Se plantea como objetivo general evaluar el efecto anti-tumoral de nanopartículas de óxido de hierro cubiertas con manosa y cargadas con quercetina en un modelo celular de cáncer de mama humano. Además, estos estudios permitirán caracterizar un nuevo nanosistema que sirva como portador bioseguro para la carga de otros compuestos bioactivos.

#### 1. Hipótesis de trabajo:

Las nanopartículas de manosa (Mag@Man) cargadas con quercetina (MAG@Man@QUE) presentan actividad anti-tumoral en células de cáncer de mama humano.

#### 2. Objetivos específicos:

2.1. Incorporar quercetina a Mag@Man y caracterizar el nanosistema obtenido. La incorporación de la droga a las nanopartículas de Mag@Man previamente sintetizadas se realizará en el laboratorio de la Dra. Verónica Lassalle (INQUISUR UNS-CONICET). En este objetivo, se propone la carga de las MAG@Man con quercetina y su caracterización fisicoquímica determinando la capacidad de carga y liberación del fitoestrógeno según el pH del medio. Este objetivo se desarrollará bajo la co-dirección de la Dra. Gabriela Montiel.

2.2. Investigar la citotoxicidad de la partícula con y sin carga de quercetina. En primer lugar, se determinará si la partícula sin cargar (MAG@Man) es un nanoportador bioseguro. Para ello, se evaluará la citotoxicidad celular a través de estudios dependientes de la concentración y el tiempo de incubación en las células tumorales MCF-7. La proliferación celular se cuantificará a través de la técnica de cristal violeta y la viabilidad celular se estudiará midiendo la actividad metabólica por el método de rojo neutro. Se complementarán estos estudios analizando la morfología celular por microscopía óptica. En segundo lugar, se realizarán los mismos estudios con la partícula cargada (MAG@Man@QUE) y se determinarán los efectos anti-tumorales.

2.3. Analizar la incorporación y acumulación de MAG@Man@QUE en células tumorales. Las células MCF-7 se incubarán con MAG@Man@QUE a una concentración y tiempo efectivos, determinado en los ensayos previos, y se evaluará el contenido de hierro de las partículas por medio de la técnica de azul de Prusia. Las células se contrastarán mediante tinción con hematoxilina & eosina.

#### 3. Metodología:

3.1. Cultivo celular. Se utilizará la línea celular derivada de cáncer de mama humano MCF-7. Las células creciendo en monocapa se cultivarán en medio DMEM 10% de suero fetal bovino (SFB).

3.2. Incorporación de quercetina y caracterización de las nanopartículas. Para incorporar quercetina a Mag@Man, se preparará una solución alcohólica de quercetina, la cual se añadirá sobre una suspensión de nanopartículas. La mezcla obtenida se mantendrá en agitación a temperatura ambiente por 24 h. La adsorción se seguirá mediante espectroscopía UV-Vis, tomando alícuotas a determinados intervalos de tiempo. Las nanopartículas cargadas se caracterizarán por: espectroscopía FTIR, para determinar la presencia de quercetina en las nanopartículas; microscopio electrónico de transmisión JEOL 100CX-II (JEOL, Akishima, Tokio, Japón) para determinar el tamaño de partícula y la morfología de los nanosistemas cargados con quercetina. Los datos sobre el diámetro hidrodinámico y el potencial Z ( $\zeta$ ) serán adquiridos en un Malvern Zetasizer (Nano-Zs90).



**3.3. Ensayos de liberación.** Se realizarán ensayos de liberación de quercetina en medio de cultivo DMEM 2% SFB a pH 5 y pH 7 a 37°C. Para determinar la eficiencia en la liberación, en ambos casos se seguirá el proceso mediante espectroscopía UV-Vis, tomando alícuotas a determinados intervalos de tiempo.

**3.4. Ensayo de violeta cristal.** Brevemente, las células se lavarán con PBS y se fijarán con paraformaldehído 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubarán con el colorante violeta cristal 0,1% durante 30 min y se lavarán con agua bidestilada hasta eliminar el exceso de colorante. Se tomarán fotografías representativas de cada condición bajo microscopio óptico y luego se cuantificará el colorante celular disolviéndolo con una solución de tritón 0,2%. La absorbancia se leerá a 590 nm en espectrofotómetro.

**3.5. Ensayo de rojo neutro.** El número de células viables se estimará cuantitativamente mediante la incorporación de rojo neutro en los lisosomas. Brevemente, las células se incubarán en presencia de diferentes concentraciones de nanopartículas durante 48 h. Luego, se incorporará la solución de rojo neutro en DMEM durante 3 h y se capturarán micrografías de cada condición bajo un microscopio de campo de luz invertido (Nikon TE300 Eclipse) equipado con una cámara digital. Finalmente, se cuantificará la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (Bioteck Synergy-HT).

**3.6. Ensayo de azul de Prusia.** Las células se incubarán con MAG@Man@QUE durante diferentes períodos de tiempo (3-48 h). Luego, las células se lavarán con PBS y se fijarán con paraformaldehído al 4% durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavarán e incubarán con la solución de azul de Prusia (5%  $K_4Fe(CN)_6$ ; 1% HCl) durante 15 min y se contrastarán por tinción con hematoxilina & eosina. Las micrografías de cada concentración se obtendrán por microscopía de campo de luz invertido (Nikon TE300 Eclipse) equipado con una cámara digital. En experimentos realizados en paralelo, se cuantificará el contenido de hierro de las nanopartículas mediante incubación de las células con 250  $\mu$ L de HCl al 20 % durante la noche a 37 °C. A continuación, se agregarán 250  $\mu$ L  $K_4Fe(CN)_6$  al 10% por pocillo y se medirá la absorbancia a 700 nm en un lector de microplacas (Bioteck Synergy-HT).

**Requisitos especiales del alumno:** Manifestar interés y entusiasmo para desarrollar tareas de laboratorio relacionadas con el área de los materiales y la bioquímica. Contar con las asignaturas Fisicoquímica general, Química Biológica A e inmunología F aprobadas.

## **P12. Síntesis y caracterización de materiales biocompatibles para ser usados como carriers de fármacos**

Objetivos:

- 1- Sintetizar complejos biocompatibles de arcillas laminares con fármacos.
- 2- Caracterizar la estructura de los sólidos sintetizados por técnicas difractométricas, microscópicas, espectroscópicas, potenciométricas, termogravimétricas, electroforéticas y porosimétricas.
- 3- Estudiar la cinética de disolución de los complejos arcilla-fármaco.
- 4- Estudiar la cinética de liberación del fármaco en condiciones fisiológicas.
- 5- Valorar la biocompatibilidad de las arcillas cargadas con fármacos.

Introducción:

El diseño de estrategias efectivas para la administración de fármacos se ha convertido en un tema importante en la industria farmacéutica moderna, con el objetivo de mejorar la efectividad de los medicamentos y de minimizar sus efectos secundarios, aumentar la biodisponibilidad y la estabilidad del fármaco o incluso lograr una mejor localización de la acción farmacéutica<sup>1-2</sup>.

Existen muchos fármacos que, por sus características químicas, poseen propiedades biofarmacéuticas inadecuadas, como baja solubilidad y permeabilidad. Una estrategia para mejorar estas limitaciones es el uso de nanovehículos o nanotransportadores que mejoren los perfiles farmacocinéticos y biofarmacéuticos. Estos sistemas pueden estar compuestos por diversos tipos de materiales como polímeros, materiales inorgánicos o lipídicos.

Las arcillas son materiales capaces de intercalar moléculas biológicamente activas, una propiedad que generó nuevas aplicaciones en medicina y farmacia. Debido a su alta capacidad de adsorción, se han usado en cosmética para remover exudados inflamatorios, para encapsular moléculas orgánicas o para protección contra el daño solar de la piel.<sup>3</sup> También se los han utilizado como matrices para almacenamiento de principios activos con actividad citotóxica.<sup>4-5</sup>

Estos materiales ofrecen varias ventajas como vehículos de fármacos, tales como bajo costo, fácil síntesis, gran estabilidad, buena biocompatibilidad, baja citotoxicidad, mayor protección de la droga a la luz, la humedad y la radiación ultravioleta y el aumento de la solubilidad de las drogas. También tienen la ventaja de poder ser utilizados para la liberación controlada del fármaco ya que una vez encapsulada la droga, ésta puede ser liberada a una velocidad que depende del pH del medio.<sup>6</sup>

En los últimos años, las aplicaciones biomédicas de las arcillas han sido ampliamente investigadas. Cuando las nanopartículas interactúan con proteínas en entornos biológicos, éstas se rodean por una capa de biomoléculas, principalmente proteínas, que se adsorben en la superficie, formando una "corona proteica" (CP). Las propiedades moleculares y la composición de la corona de proteínas pueden afectar la liberación del fármaco unido a la arcilla.<sup>7</sup> Comprender y analizar la formación de CPs en relación con las propiedades de las arcillas y dilucidar sus implicaciones biológicas en términos de biocompatibilidad juegan un papel importante en los estudios de nanoinvestigación.

En la actualidad, los estudios relacionados a las arcillas como vehículos de drogas se han centrado en la incorporación de diversos fármacos y su caracterización estructural, mientras que sus mecanismos de liberación aún no han sido adecuadamente descritos y entendidos, como tampoco su biocompatibilidad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es sintetizar y caracterizar un complejo biocompatible de arcilla-fármaco para luego estudiar la cinética de disolución del complejo y la liberación del fármaco in vitro con el objetivo de obtener datos sobre el mecanismo de liberación, y por último realizar estudios de biocompatibilidad del material.

Metodología y técnicas de investigación a utilizar:

El presente plan de trabajo se enmarca en la síntesis y caracterización de complejos de arcillas laminares para ser luego utilizados como transporte y liberadores del fármaco metotrexato, droga anticancerígena ampliamente utilizada en la actualidad.

#### 1- Síntesis de complejos arcilla-fármaco (A-F)

Se sintetizará el complejo biocompatible por el método de coprecipitación a pH constante. Se trabajará con sales de Mg(II) y Al(III), ya que son elementos no tóxicos para el organismo. Una solución conteniendo los iones metálicos ( $AlCl_3$  y  $MgCl_2$ ) se añadirá gota a gota a una solución conteniendo el fármaco bajo agitación vigorosa mientras que el pH se mantendrá fijo (pH = 9) por el agregado de NaOH. La dispersión resultante se centrifugará, se lavará y se secará a temperatura ambiente durante 48 hs.

#### 2- Caracterización de los materiales sintetizados

El complejo A-F obtenido se caracterizará por espectroscopia infrarroja, difracción de rayos X, microscopia electrónica de transmisión y de barrido, análisis térmicos, determinación de áreas BET y porosidad. También se caracterizará la generación de cargas eléctricas superficiales a través de movilidades electroforéticas. También se determinará el contenido de Mg y Al por espectrometría de absorción atómica y el contenido del fármaco por espectroscopia UV-visible, luego de la digestión completa del sólido.

#### 3- Estudio de disolución del complejo arcilla-fármaco

Los estudios de cinética de disolución del complejo A-F se realizarán para estudiar la estabilidad del complejo en función del pH. Los estudios se llevarán a cabo a distintos pH en un reactor tipo "batch" con temperatura y agitación controlada. En una celda de reacción se colocará el complejo A-F en contacto con una solución de NaCl 0,1 M a un determinado pH. Este pH se mantendrá constante durante todo el experimento por el agregado de HCl o NaOH. A distintos intervalos de tiempo se extraerá un determinado volumen, se centrifugará y se medirá la concentración de Mg, Al y fármaco en el sobrenadante.

#### 4- Estudio de liberación del fármaco in vitro

Los estudios de liberación del fármaco in vitro se realizarán en condiciones experimentales similares a las del fluido gastrointestinal en término de pH y composición: soluciones buffer a pH 1,2 para fluido gástrico, pH 4,5 y 6,8 para fluido intestinal, y pH 7 para fluido sanguíneo. Estos estudios también se llevarán a cabo en un reactor tipo "batch" con temperatura y agitación controlada. La liberación del fármaco en el medio se realizará mediante la adición de una determinada cantidad del complejo A-F en 100 ml de medio de liberación a 37°C con agitación suave. Un cierto volumen de la suspensión se retirará a intervalos predeterminados y se centrifugará. La cantidad liberada del fármaco en el sobrenadante se medirá en un espectrofotómetro UV-Vis.

#### 5- Estudios de biocompatibilidad del Material:

Se realizarán ensayos in vitro de estas plataformas por interacción de las mismas con sangre entera o suero/plasma, para la evaluación de posibles alteraciones en la morfología celular, parámetros de coagulación y actividad enzimática relacionada con daño tisular.

- Interacción biomaterial – células sanguíneas: Las arcillas se pondrán en contacto con sangre entera y se incubarán a distintos tiempos en un medio isoosmolar y conservado, para posteriormente realizar el extendido sanguíneo. Posterior a la fijación y tinción de éste con Giemsa, se evaluará la morfología y posible crenado celular en microscopio óptico.

- Interacción biomaterial – plasma/suero sanguíneo humano: Los biomateriales se incubarán con plasma/suero obtenido de sangre entera, y mediante la utilización de kits comerciales se determinará hemoglobina libre y la actividad lactato deshidrogenasa como indicadores de daño celular con la consecuente liberación de éstos a la circulación, y se estudiarán alteraciones en el tiempo y factores de coagulación.

Factibilidad y Vinculación del plan de trabajo con otros proyectos en ejecución:

El grupo de trabajo posee subsidios en el marco de la UNS y otras fuentes de financiamiento que permiten el desarrollo adecuado del presente trabajo. El trabajo a desarrollar se relaciona estrechamente con el proyecto dirigido por los doctores M. Avena y M. Brigante en el Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur, Código PGI UNS 24-Q120, "Reacciones superficiales de óxidos metálicos y minerales del suelo en medios acuosos". La directora y co-directora del presente trabajo son integrantes del proyecto.

**Requisitos especiales del alumno:** Estudiante de 5to o 6to año de la carrera de Farmacia.

### **P13. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO RETINOICO Y 22:6n-3 SOBRE EL DESARROLLO DE LA ESPERMATOGÉNESIS EX VIVO.**

#### OBJETIVOS

El objetivo general de este plan de trabajo es estudiar en profundidad el rol del ácido retinoico y del ácido graso poliinsaturado 22:6 n-3 en la dinámica molecular y celular que tiene lugar durante el desarrollo in vitro de la espermatogénesis en un sistema de cultivo de explantos de testículos neonatales que ha probado ser capaz de producir espermatozoides fértiles a partir de las espermatogonias primitivas que contienen. Los estudios a realizar aquí constituyen un paso importante para establecer en el futuro la espermatogénesis in vitro en humanos y grandes mamíferos.

#### ANTECEDENTES

La espermatogénesis es un proceso extremadamente complejo que involucra a las células germinales, que desde espermatogonias se dividen y se diferencian a espermatoцитos y espermátidas, y a las células somáticas de Sertoli, que las sostienen física y metabólicamente a las primeras durante todo el proceso hasta que se liberan como espermatozoides. A nivel mundial la ciencia de la reproducción ha investigado desde hace décadas cómo lograr completar la espermatogénesis in vitro, esto es, a partir de cultivos de células o de un pequeño trozo de tejido testicular. La aplicación potencial de este conocimiento es por una parte terapéutica, esto es, en el tratamiento de determinados tipos de infertilidad masculina, por ejemplo, al obtener gametas viables para fertilización asistida, o preventiva, asegurando la fertilidad a futuro en pacientes jóvenes o en la prepubertad con cáncer, que se prevé van a ser sometidos a tratamientos quimioterapéuticos que afecten adversamente a la línea germinal.

Espermatogénesis in vitro. En 2011, Sato y colaboradores desarrollaron un sistema de cultivo de explantos de testículos de edades postnatales muy tempranas, que es capaz de posibilitar el desarrollo desde espermatogonias primitivas hasta células haploides, llegando a la formación de espermatozoides fértiles (1). Este sistema tiene la ventaja de que mantiene la arquitectura tisular, esto es, las interacciones entre células germinales, y entre éstas y las células de Sertoli, sobre un soporte de agar y un medio de cultivo químicamente definido.

Lípidos y espermatogénesis. Por estudios previos en testículo de rata y ratón, sabemos que, tanto con el avance de la edad postnatal como con el progreso de la diferenciación celular en el adulto, los glicerofosfolípidos (GLP), tales como fosfatidilcolina (PC) o fosfatidiletanolamina (PE), se enriquecen en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de larga cadena (C20-C22). Así, los GPL testiculares, de contener cantidades mínimas de otro PUFA que no sea el ácido linoleico (18:2n-6) y trazas de 18:3n-3 antes de la pubertad, se enriquecen con el avance de la misma primero en araquidonato (20:4n-6) y luego en docosapentaenoato (22:5n-6) y docosahexaenoato (22:6n-3). Del mismo modo, los esfingolípidos (SL), entre ellos esfingomielina (SM) y ceramida (Cer), de ser ricos en 16:0 en la etapa prepubertal, se enriquecen primero en PUFA de muy larga cadena (VLCPUFA) no hidroxilados (n-V) como p. ej., el 28:4, 30:5 o 32:6 (2) y más adelante en sus contrapartes 2-hidroxiladas (h-V).

Un factor importante para el tejido testicular, es el ácido retinoico. Se sabe que además de jugar un papel fundamental en procesos muy diversos como la visión y la crecimiento y diferenciación de numerosos tipos de células, la vitamina A (retinol) y su principal derivado biológicamente activo, el ácido retinoico, está claramente implicado en la regulación de funciones testiculares en roedores. Un exceso de vitamina A provoca lesiones testiculares y trastornos espermato genéticos y una deficiencia induce el cese temprano de la espermatogénesis y afecta negativamente la secreción de testosterona. Los retinoides también parecen ser necesarios para la proliferación y diferenciación de espermatogonia A y para la espermiogénesis (3).

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Explorar el efecto que tiene la suplementación del medio de cultivo con ácido retinoico y del ácido graso poliinsaturado el 22:6 n-3 sobre el desarrollo de espermatogénesis in vitro. Nuestra hipótesis es que la suplementación contribuirá a mejorar la progresión hasta espermátidas y tal vez hasta espermatozoides. Se enfocará en conocer los cambios citológicos e histológicos en explantos cultivados con ácido retinoico y 22:6n-3 como suplementos.

2- Determinar si el desarrollo de espermatogénesis en presencia de ácido retinoico y de 22:6 n-3 se acompaña de incremento en lípidos con PUFA de larga y muy larga cadena.

#### ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA

Se emplearán ratones C57BL6J del Bioterio del INIBIBB siguiendo los lineamientos indicados en la guía de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU, NIH Guide for the care and use of laboratory animals. Los protocolos del presente proyecto se ajustan a la normativa y han sido aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS (Res. CDBByF 328/17 protocolo N°101).

Método de cultivo de explantos de tejido testicular neonatal: Se seguirá el procedimiento descrito por Yokonishi y colaboradores (4) con modificaciones. Los ratones de 6 días posnatales (6dpn), se les extrae mediante disección post-mortem los testículos, retirando la túnica albugínea para que los túbulos seminíferos queden expuestos al medio de cultivo. En placas de cultivo de 6 pocillos se colocan 1-3 bloques de agarosa (previamente incubados 24 horas con el medio de cultivo) y sobre cada bloque se coloca un máximo de 3 explantos de testículo, considerando un explanto a un testículo entero de 6 días de edad. El medio de cultivo basal (MB) estará compuesto por  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium) + 10%KSR (knockout serum replacement), el medio experimental para evaluar el efecto del ácido retinoico estará compuesto por  $\alpha$ -MEM + 10%KSR + 10<sup>-6</sup> M de retinol y para evaluar el efecto del agregado de ácido graso estará compuesto por  $\alpha$ -MEM + 10%KSR+ 2,5  $\mu$ M de 22:6 n-3. Los explantos se incuban a 34°C con suficiente medio de cultivo como para cubrir los bloques de agarosa hasta una altura en torno a 3/4 del total, y el medio de cultivo se renueva cada 5 días. El tiempo de cultivo será de 22 días.

Métodos analíticos para lípidos. Los lípidos se aíslan de tejidos y medios de cultivo por extracción con mezclas de solventes siguiendo el procedimiento clásico de Bligh y Dyer (5). Para el aislamiento preparativo y la cuantificación de clases de fosfolípidos incluyendo a la SM se utiliza TLC mono y bidimensional y se cuantifican por dosaje de fósforo. Para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos de las clases lipídicas, se las somete a metanólisis para obtener los correspondientes metilésteres que serán analizados por cromatografía gaseosa.

Medición de testosterona: Se realizará por el método de ECLIA midiendo la secreción al medio de cultivo y en el tejido testicular.

Observación de motilidad espermática: Este estudio se hará en aquellos tiempos de cultivo donde se prevé la presencia de espermatozoides ( $\geq$  a 6dpp + 44). Se aplicará el protocolo descrito por Dumont et al, 2016 para espermatozoides testiculares (16). Brevemente, una alícuota de la suspensión celular sin fijar es mantenida a 34 °C, en atmosfera 5% CO<sub>2</sub> / 95% aire y se trata durante 5 minutos con 3.5 mM pentoxifilina (PTX) y luego se observa al microscopio para el recuento de espermatozoides testiculares que reaccionan al tratamiento con algún movimiento. Como control positivo se utiliza una suspensión de células germinales totales de ratón de 44 días (que contiene abundantes espermatozoides testiculares).

**Requisitos especiales del alumno:** Se valorará que el alumno tenga conocimientos básicos sobre las técnicas cromatográficas y de cultivo celular. Haber aprobado más del 70 % de las materias del plan de estudio.

#### **P14. Nanotecnología magnética para tratamiento de la pérdida auditiva: Estudios de toxicidad in vitro y de direccionamiento.**

##### Objetivos Generales

La pérdida de la audición (PA) afecta al 5% de la población mundial, generando costos del orden de los mil millones de dólares anuales que impactan en los sistemas de salud [1]. Además, de acuerdo a las proyecciones de la OMS, hasta un 50% de los jóvenes desarrollarán PA a futuro debido a exposición a ruidos en contextos recreativos y uso extendido de auriculares [2]. Por lo expuesto, los trastornos en la audición forman parte de las afecciones crónicas de la población, donde también se asocian al declive cognitivo o al aceleramiento de patologías neurodegenerativas como el Alzheimer o la demencia [3]. Por otro lado, gran parte de esta problemática se origina por las características propias del oído interno, el cual presenta una estructura geoméricamente compleja con un alto grado de hermetismo y compartimentalización, por lo que la llegada de moléculas farmacológicas hasta el sitio donde se han producido injurias es extremadamente baja. En consecuencia, los tratamientos actuales para diversos tipos de hipoacusia, son muy ineficientes e inespecíficos. Cabe destacar que muchas PA son mediadas por procesos inflamatorios por lo que las drogas de primera elección son corticoides, los cuales son administrados en dosis muy altas para lograr un efecto terapéutico [4,5].

El uso de herramientas nanotecnológicas en el área biomédica ha experimentado un amplio crecimiento en las últimas décadas, hecho que se refleja en la comercialización de diferentes tipos de nanosistemas, incluidas las nanopartículas magnéticas (NPMs). Estas últimas son dispositivos capaces de transportar agentes terapéuticos en su superficie y de ser guiadas a un sitio específico mediante un campo magnético externo (CME). A pesar de estas aprovechables ventajas, existen escasos estudios a nivel mundial que utilizan NPMs como agentes de terapia para la PA [6]. Previamente, nuestro grupo de trabajo sintetizó NPMs biocompatibles compuestas de un núcleo magnético y recubiertas con ácido fólico, el cual es un agente otoprotector [7–9]. Posteriormente, se les agregó Diclofenac a la superficie, un antiinflamatorio no esterooidal, como alternativa terapéutica a las drogas esteroidales comúnmente utilizadas en la clínica. Se pretende con esta estrategia aprovechar su efecto inhibitorio sobre las COX y su capacidad de modular canales iónicos responsables de la homeostasis en células cocleares [10,11] (Martín et al, manuscrito en redacción) (Figura 1A). Estas NPMs cargadas forman parte de un esquema de terapia para la PA basada en nanotecnología propuesta en el proyecto que da marco a este plan de trabajo. Como se observa en la Figura 1B, el tratamiento completo consta de la aplicación intratimpánica de las NPMs en el oído medio y posteriormente su direccionamiento hacia el interior de la cóclea mediante un CME. Se propone entonces como objetivo general de este plan de trabajo, realizar estudios in vitro para corroborar la bioseguridad de las NPMs cargadas. La obtención de estos datos es un paso fundamental de validación previo al abordaje de estudios más complejos sobre modelos in vivo. Se emplearán cultivos de líneas celulares disponibles en el laboratorio. Una vez superada esta etapa, se iniciarán estudios de direccionamiento de las NPMs por CME sobre tejido coclear murino disecado previamente obtenido (Protocolo 183/2021), para constatar que los nanosistemas cargados son capaces de permear a través de la membrana de la ventana redonda, y acumularse en el interior de la cóclea.

Este plan de trabajo tiene un enfoque multidisciplinario, donde el/la alumno/a de la carrera de Farmacia adquirirá conocimiento en el área de nanomateriales de uso biomédico, un campo de estudio en auge. Además, tendrá la posibilidad de ganar experiencia en análisis por microscopía óptica y de fluorescencia, técnicas de cultivo celular, ensayos de citotoxicidad y algunas tinciones específicas comúnmente utilizadas para la detección de NPMs en sistemas biológicos. Asimismo, obtendrá experiencia en manejo de tejido coclear murino y procesamiento de tejido para cortes histológicos.

Teniendo en cuenta la instancia del alumno en cuanto a su conocimiento sobre los temas a investigar, se plantea avanzar en las siguientes etapas u Objetivos específicos:

OE1: Realizar un curso introductorio online gratuito sobre NANOMEDICINAS.

OE2: Realizar búsquedas bibliográficas en la web.

OE3: Estudiar in vitro la biocompatibilidad de NPMs cargadas con Diclofenac, analizando parámetros tales como citotoxicidad e internalización celular.

OE4: Realizar ensayos de direccionamiento magnético sobre muestras de tejido coclear murino disecado previamente obtenidas.

Hipótesis de trabajo

Se hipotetiza que las NPMs cargadas son bioseguras, es decir no generan efectos adversos sobre células en cultivo y son capaces de ser incorporadas por las células sin alterar su morfología ni viabilidad. En el tejido coclear murino disecado es posible lograr la entrada de NPMs cargadas a través de la membrana de la ventana redonda mediante la aplicación de un CME y su acumulación en la cóclea.

#### Metodología

OE1: Realizar un curso introductorio online gratuito sobre NANOMEDICINAS, dictado por la Fundación Argentina de Nanotecnología (<https://nanou.org.ar/course/view.php?id=5>). Carga horaria total: 6 horas, con certificado de aprobación. Se adjunta programa.

OE2: Realizar búsquedas bibliográficas en la web: se buscarán trabajos científicos relacionados al tema de trabajo en portales tales como PUBMED, ScienceDirect o GoogleScholar.

OE3: Estudiar in vitro la biocompatibilidad de NPMs cargadas con Diclofenac. Para estos estudios se utilizará la línea celular Hek293, derivada de epitelio renal humano, usualmente empleada como modelo para análisis de toxicidad de compuestos farmacológicos [12,13]. Previamente, se comprobó la bioseguridad de las NPMs sin droga cargada sobre la línea celular normal HMEC-1, derivada de endotelio vascular humano, y sobre la línea tumoral de CCR HTC116 [7]. En estos estudios, emplearemos NPMs cargadas con Diclofenac (denominadas NPMs@DICLO), previamente obtenidas en nuestro laboratorio, las cuales fueron caracterizadas fisicoquímicamente (Martin et al, manuscrito en redacción). Las NPMs que se ensayarán se esterilizan por 1 hora por irradiación UV, para luego ser resuspendidas en solución salina estéril de concentración 1mg partículas/ml en baño ultrasónico.

Para los estudios in vitro, las células serán cultivadas en DMEM con 10% de suero fetal bovino a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> hasta una confluencia del 80% y luego tratadas por 24 a 72 hs con dosis creciente de NPMs@DICLO. Los parámetros asociados a biocompatibilidad que se evaluarán serán:

a) Viabilidad celular: Se estimará el número de células vivas luego del tratamiento empleando:

i) el colorante azul de tripano: es un colorante que permite distinguir las células no viables de las viables expresando en función del porcentaje de estas últimas su viabilidad. Su fundamento consiste en que las células vivas, con membrana citoplasmática íntegra, excluyen el colorante y no se tiñen; en cambio penetra en las muertas con lesión de la membrana celular lo que hace que se vean de color azul.

ii) el ensayo de incorporación de rojo neutro ("NRU"), basado en la incorporación del colorante supravital rojo neutro a los lisosomas de células viables no dañadas.

iii) detección de células apoptóticas: en caso de observarse disminución en la viabilidad celular, las células serán incubadas con el marcador mitocondrial mitotracker) y el colorante nuclear DAPI para estudiar la integridad nuclear y mitocondrial por microscopía de fluorescencia.

b) Internalización de NPMs se estudiará por medio de la tinción Azul de Prusia para evidenciar contenido de Fe intracelular, facilitando de esta manera la detección de las nanopartículas, cuyo núcleo es de óxido de hierro. Luego, las células se contrastarán con hematoxilina-eosina para analizar posibles cambios en su morfología.

OE4: Realizar ensayos de direccionamiento magnético sobre muestras de tejido coclear murino disecado previamente obtenidas: Se contará con muestras de cóclea disecadas congeladas en freezer -80°C. Al momento del tratamiento, las cócleas se descongelarán e incubarán a 37°C por 30 minutos.

Tratamiento de las muestras con nanoformulaciones: Las NPMs@DICLO se depositarán en el nicho de la ventana redonda, sin atravesarla. Se utilizarán tanto cóclea izquierda (control basal del tejido) como la cóclea derecha (tratamiento con NPMs en presencia o ausencia de un CME). El direccionamiento de partículas en las se realizará utilizando un campo magnético generado por imanes de Neodimio de 1,3 Tesla por 1 hora, ubicando el mismo externamente en el lado opuesto a la zona de depósito de las NPMs, generándose un CME de atracción. Posteriormente, se analizará la internalización de las NPMs en forma a) cuantitativa y b) cualitativa, como se describe a continuación:

a) Eficiencia de internalización de NPMs dentro de la cóclea: se cuantificará la cantidad de NPMs internalizadas mediante la determinación de Fe elemental mediante ICP-OES. En paralelo se procesarán las cócleas contralaterales (no-tratadas), para determinar el nivel de hierro endógeno. Todas las muestras serán digeridas usando ácido nítrico doble destilado en un digestor de microondas. Determinaciones serán efectuadas con un Espectrómetro de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES).

b) Ubicación de NPMs en la cóclea: la ubicación de las NPMs una vez que las mismas ingresaron a la cóclea será detectada en cortes histológicos del tejido decalcificado en EDTA (Protocolo 086/2016) y tinción con Azul de Prusia para evidenciar el hierro presente en el carozo de las NPM. El tejido además se contrastará por tinción con H&E para identificar las regiones cocleares por microscopía óptica.

**Requisitos especiales del alumno:** 55% aprobado de la carrera. Preferentemente con conocimiento de idioma inglés, no excluyente.

### **P15. Nanosistemas de novedoso diseño como agentes teranósticos.**

Objetivo General: pesar de los avances en terapias para tratamiento de enfermedades oncológicas, los efectos secundarios y la baja eficiencia asociados a la mayoría de ellos constituye problemas irresueltos. La necesidad real de tratamientos más exitosos, así como la importancia de monitorear el progreso de los mismos han originado el surgimiento de los nanoteranósticos. Este tipo de nanoplataforma combina funciones de diagnóstico y terapéuticas en un mismo nanosistema.

Nuestro proyecto, se avoca a diseñar nanosistemas basados en nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro (NPMs) que puedan funcionar para la generación de contraste dual para la técnica de diagnóstico de Resonancia Magnética por Imágenes (RMI) y que, además, sean adecuadas para transportar drogas hacia tejidos patológicos. Es por esto, que proponemos el estudio del diseño de nanopartículas de estructura yolk-shell como nanoteranósticos pensados para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades de alto impacto social como las oncológicas.

Hipótesis: Se plantea como hipótesis que una estructura del tipo yolk-shell, con un núcleo de óxido de hierro (magnetita/maghemita) y una capa externa de óxido de gadolinio; podría actuar como un nanoteranóstico con capacidad de generar contraste dual por RMI. Además, esta estructura sería adecuada como carrier de drogas naturales.

Antecedentes: Dentro de las distintas técnicas de diagnóstico, la Resonancia Magnética es una valiosa herramienta. En muchos casos, se requiere del uso de agentes de contraste (AC). De acuerdo al contraste que originen, los AC se clasifican en positivos o T1, como los compuestos de gadolinio, que generan imágenes brillantes en el sitio donde se acumulan; o negativos o T2, como las NPMs que generan imágenes oscuras. Los AC convencionales solo son efectivos en un solo modo de imagen (negativo o positivo), lo cual muchas veces no es suficiente para lograr un diagnóstico preciso. Es por esto, que la generación de nanopartículas con dualidad para generar los dos tipos de contraste, podría ser una herramienta para mejorar la precisión del diagnóstico proveyendo dos imágenes complementarias con el mismo instrumento y con una sola administración de AC. El desarrollo de este tipo de AC representa un gran desafío, dados los requerimientos fisicoquímicos que deben cumplir.

En este sentido, las nanopartículas de estructura yolk-shell constituyen una estructura novedosa de nanomateriales que se componen de un carozo y una cavidad hueca rodeada por una cubierta exterior porosa. En los últimos años este tipo de estructura ha sido objeto de gran interés en distintas áreas de la nanotecnología, ya que por sus particulares características morfológicas, presentan gran área superficial y alta capacidad de carga.

Las nanopartículas en general, y las nanoestructuras yolk-shell en particular, pueden actuar como vehículos no solo de drogas utilizadas en tratamientos actuales, sino también de aquellos compuestos (principalmente naturales), que han demostrado diversas actividades biológicas en estudios in vitro pero que ven restringido su posible uso en clínica por problemas de solubilidad o estabilidad. Por ejemplo, flavonoides, curcumina, ácido gálico. Las nanopartículas diseñadas para vehiculizar drogas pueden cambiar la farmacocinética y farmacodinamia de los compuestos en cuestión. Además, ofrece la posibilidad de transportar compuestos poco solubles hasta el sitio de acción. También ofrece una barrera protectora para que los compuestos no se degraden antes de llegar al blanco.

Actividades.

Las actividades serán principalmente de síntesis del nanosistema:

- ☑ Síntesis y modificación del núcleo de óxido de hierro (magnetita/maghemita).
- ☑ Incorporación de la cubierta de óxido de gadolinio (Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y modificaciones para la obtención de la estructura yolk-shell.
- ☑ Caracterización del nanosistema mediante técnicas de difracción de rayos X (XRD), a través de la cual se podrá determinar el patrón cristalino. Microscopía electrónica de barrido y de transmisión (SEM/TEM) para observar su tamaño y morfología. Espectroscopia infrarroja (FTIR,) que permitirá observar los grupos funcionales presentes, y de

esta forma confirmar la presencia de los distintos componentes de los nanosistemas. Espectroscopia UV-Visible, que también servirá para estos fines. Por medio de espectroscopia de absorción atómica y espectrometría de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP) se obtendrá información cuantitativa en relación a la composición de los nanosistemas, que se complementará con datos de análisis termogravimétrico. Mediante medidas de potencial Z se determinará la carga superficial.; y a través de la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) se determinará el diámetro hidrodinámico (DH) de los nanosistemas en los medios de interés

☒ Estudiar la adsorción del flavonoide morina al nanosistema obtenido.

☒ Estudiar la liberación de este mismo compuesto en medios que simulen el fisiológico

**Requisitos especiales del alumno:** Manifiestar interés y entusiasmo para desarrollar tareas de laboratorio relacionadas con el área de los materiales.

#### **P16. Desarrollo de gomas masticables destinadas a pacientes pediátricos.**

Para que un medicamento pueda ejercer un efecto farmacológico deseado se debe tener en cuenta la población a la cual está destinada, ya que los diferentes rangos etarios presentan distintas problemáticas a la hora de satisfacer necesidades farmacoterapéuticas. La población pediátrica, además de las variabilidades fisiológicas naturales relativas al crecimiento, exhibe una clara problemática de inmadurez en el proceso de deglución que torna desafiante, a veces casi imposible, la administración de un comprimido o cápsula convencional. Esto demuestra el desafío existente en el desarrollo de formulaciones aptas para este tipo de población. Las gomas masticables se presentan como formulaciones semisólidas, de textura blanda, conferida generalmente por un gel a base de gelatina. Entre sus ventajas fundamentales se pueden citar la ausencia de preparación previa y manipulación de la formulación para su administración, el bajo costo de producción, la versatilidad de formas, tamaños y colores de presentación, así como una adecuada estabilidad y una logística de almacenamiento y transporte más sencilla, comparadas con las formulaciones líquidas. Una gran ventaja que presentan estas formas farmacéuticas es la posibilidad de una elaboración magistral (además de industrial), en oficinas de farmacia del ámbito hospitalario, por ejemplo, en función de que los procedimientos aplicados son simples y no se requiere de equipamientos sofisticados; lo que las convierte en formulaciones sumamente atractivas.

El objetivo general del presente plan de trabajo radica en diseñar, desarrollar y caracterizar gomas masticables, como mecanismo de dosificación de fármacos destinados al tratamiento de enfermedades cardiovasculares o infecciosas de pacientes pediátricos.

Para el cumplimiento exitoso de los objetivos, se plantean las siguientes actividades y metodologías:

##### 1. Relevamiento bibliográfico

La búsqueda bibliográfica tendrá como objetivo identificar las características fisicoquímicas (solubilidad, estabilidad, entre otros) y organolépticas (fundamentalmente sabor) de ciertos principios activos (pertenecientes a las categorías terapéuticas indicadas), para lograr la adecuada selección del fármaco a vehiculizar en la forma farmacéutica. En esta etapa se pretende que el alumno adquiera criterios de búsqueda y selección bibliográfica, consultando diversas fuentes tales como publicaciones, patentes, tendencias del mercado, regulaciones nacionales e internacionales, etc.

##### 2. Aplicación de tecnología de producción

Se pretende que el estudiante se familiarice y adquiera experiencia en la ejecución de procesos sencillos de producción de gomas masticables, tales como moldeado y secado, con el fin de obtener formas de dosificación amigables para el paciente y el elaborador. Esto es debido principalmente a que la producción involucra el uso de técnicas sumamente sencillas y costo-efectivas, y se pueden lograr formulaciones con una gran versatilidad de tamaños, formas y dosificaciones.

##### 3. Caracterización

Las gomas masticables se caracterizarán en términos de peso, sinéresis, dimensiones, análisis del perfil de textura (TPA), pH, actividad acuosa (aw), tiempo de desintegración, disolución in vitro, uniformidad del contenido del fármaco y control higiénico. Entre los equipos a los cuales tendrá acceso el alumno se incluye: equipo de disolución, desintegrador, espectrofotómetro UV-Vis, texturómetro, estufa de vacío, pHímetro, balanza analítica, entre otros.



La directora y el supervisor enseñarán al alumno distintos mecanismos de búsqueda bibliográfica, lo entrenarán en la aplicación de las técnicas de producción y caracterización de las gomas masticables, así como también en el uso del equipamiento especificado, y lo guiarán en la interpretación de los resultados obtenidos.

**Requisitos especiales del alumno:** no requiere.

#### **P17. Compuestos naturales bioactivos para la síntesis de nanopartículas biocompatibles.**

La nanotecnología se ha convertido en un área importante de la ciencia con aplicación en una gran diversidad de campos, incluidos la industria alimentaria, agricultura, cosméticos y medicina, entre otros. Actualmente, la biosíntesis de nanopartículas es ampliamente preferida entre las diversas rutas disponibles, ya que no requieren el uso de productos químicos tóxicos y resultan respetuosas con el medio ambiente, además de tener menores costos asociados. En estos métodos de síntesis pueden emplearse, por ejemplo, extractos de plantas, algas y hongos, ricos en compuestos bioactivos, que actúen como agentes reductores y de recubrimiento para generar nanomateriales biocompatibles.

Las nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) pueden obtenerse empleando algunos de los métodos mencionados, destacándose la alta estabilidad en medio acuoso. Además, estas partículas presentan propiedades biocidas y antiinflamatorias, pueden aumentar la síntesis de colágeno y contribuir a la revitalización, potenciando así su aplicación para el tratamiento de heridas. Por otro lado, desde hace muchos años la plata metálica y sus compuestos derivados se han utilizado como agente antimicrobiano puesto que son más económicos que los compuestos a base de otros metales, como el oro. Las nanopartículas de plata (AgNPs) han demostrado excelentes propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes, entre otras, posibilitando su aplicación en medicina. No obstante, en la mayoría de los casos, se recomienda la inmovilización de AgNPs sobre compuestos inorgánicos para disminuir la posibilidad de agregación y oxidación de las partículas cuando se exponen a ambientes acuosos. Considerando estas características, se plantea como hipótesis que el desarrollo de métodos de síntesis de Ag-ZnONPs empleando extractos acuosos de polen apícola y té verde permitirá la generación de nanomateriales biocompatibles con propiedades antioxidantes, resultando además una estrategia simple, económicamente y segura para la salud y el ambiente.

La metodología de trabajo se dividirá en las siguientes actividades:

- 1) Búsqueda bibliográfica y selección de las condiciones de síntesis
- 2) Obtención de extractos acuosos a partir de polen apícola y té verde
- 3) Síntesis y caracterización fisicoquímica de Ag-ZnONPs
- 4) Evaluación de las propiedades antioxidantes de las nanopartículas obtenidas

**Requisitos especiales del alumno:** tener aprobada la asignatura Análisis Instrumental (6015)

#### **P18. Screening farmacológico de nuevos derivados de 4-tiazolidinonas: búsqueda de moléculas con actividad biológica antihelmíntica.**

Objetivo general

Este proyecto forma parte de un proyecto más general del laboratorio de Neurobiología de Invertebrados, en el que nos proponemos la búsqueda de nuevos compuestos con potencial actividad biológica. En este caso en particular, el objetivo es identificar compuestos con actividad antihelmíntica, mediante un screening farmacológico. Más a largo plazo se pretende identificar el blanco de acción así como los mecanismos moleculares involucrados.

Para este proyecto utilizaremos una batería de 5 a 10 derivados de 4-Tiazolidinonas recientemente sintetizados por colaboradores del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur-INQUISUR (Dra. Ocampo), cuya síntesis resulta altamente novedosa ya que realiza mediante metodologías sintéticas sustentables, obviando el uso de intermediarios tóxicos para el medio ambiente.

Por otro lado, como modelo experimental utilizaremos al nematodo *C. elegans*. El uso de este invertebrado es sumamente atractivo ya que combina: la complejidad necesaria para realizar estudios a nivel molecular, celular y sistémico, un sistema nervioso simple, y facilidad para realizar técnicas genéticas, evaluar estructuras celulares

(al ser transparente) y ensayos de comportamiento. Además, el alto nivel de homología entre los genes de *C. elegans* y mamíferos (83%) sugiere que la gran mayoría de los procesos estudiados en este organismo son universales<sup>1</sup>.

Además, la factibilidad para realizar ensayos masivos de fármacos y la manipulación de genes transforman a *C. elegans* en una excelente plataforma para realizar screenings farmacológicos de manera rápida, económica y factible, algo crucial en las primeras etapas del desarrollo farmacéutico.

#### Objetivos específicos

1- Identificar derivados de 4-Tiazolidinonas con actividad antihelmíntica. Realizaremos un screening de derivados de 4-Tiazolidinonas con el fin de identificar potenciales nuevos nematocidas para el tratamiento de la helmintiasis. Realizaremos ensayos biológicos para determinar la dosis letal 50 (DL50) de los compuestos y los compararemos con las obtenidas para antihelmínticos comerciales.

2- Determinar la actividad ovicida y larvicida de los derivados de tiazolidinonas de interés. Luego de identificar compuestos que disminuyen la sobrevivencia de los nematodos, evaluaremos si esto se debe a un efecto del fármaco sobre los huevos, sobre estadios larvarios, o sobre ambos.

#### Hipótesis de trabajo

Es ampliamente conocido que nematodos parásitos pueden infectar humanos, animales de compañía y ganado, generando un impacto devastador en la calidad de vida humana y la economía. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima una prevalencia del 25-30% de parasitosis en la población humana. Las consecuencias de las helmintiasis humanas son particularmente graves en niños, perjudicando el crecimiento, la nutrición, la cognición y el rendimiento escolar. Aunque los helmintos son una importante preocupación económica y de salud pública, el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos para tratar la helmintiasis se ha retrasado durante décadas y el repertorio de los antihelmínticos disponibles son limitados<sup>2</sup>. De hecho, en los últimos años solo la tribundimidina ha sido desarrollada e incluida en ensayos clínicos en humanos<sup>3</sup>. Por otro lado, dado que se han informado nematodos parásitos resistentes a los medicamentos para todas las clases de antihelmínticos utilizados actualmente<sup>4,5</sup>, existe una necesidad urgente de avanzar en la farmacología de investigación, para desarrollar nuevos fármacos antiparasitarios.

Para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas, la industria farmacéutica ha centrado su atención en los compuestos heterocíclicos<sup>6</sup>. En este contexto las 4-tiazolidinonas no son la excepción, ya que se ha reportado un amplio espectro de acciones terapéuticas, tales como propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antimicóticas y antiparasitarias<sup>7</sup>. El diseño y síntesis de derivados de la 4-tiazolidinona permite generar una amplia gama de moléculas con diferentes características fisicoquímicas. Estas propiedades son esenciales para conferirles gran diversidad de propiedades farmacocinéticas, lo que refuerza más aún su utilización para el desarrollo de drogas.

Por ello nuestra hipótesis de trabajo es que mediante un screening farmacológico podremos identificar uno o más derivados de 4-tiazolidinonas capaces de ejercer actividad antihelmíntica en un modelo animal. Además, debido a las sustituciones adicionadas a la molécula base, creemos que algunos de los derivados en estudio presentarán una mayor absorción gastrointestinal y biodisponibilidad que el núcleo base

#### Metodología

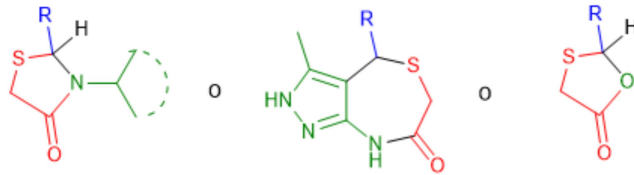
1- Disolución de compuestos a testear: Se prepararán soluciones concentradas (stocks) de los compuestos a probar (5 a 10), disolviéndolos en agua o DMSO según corresponda.

2- Cultivo de *C. elegans*: Los gusanos serán mantenidos a 20°C en placas de NGM (Nematode Growth Medium) sembradas con un cultivo de bacterias *E. coli* OP50 que les servirá como alimento.

3- Screening de derivados de 4-tiazolidinona y determinación de la curva dosis-letalidad: Se utilizará una batería de concentraciones crecientes de cada derivado. Las concentraciones iniciales a testear serán: 0,01  $\mu$ M -0,1  $\mu$ M -0,3  $\mu$ M -0,5  $\mu$ M -0,8  $\mu$ M -1  $\mu$ M y 2  $\mu$ M (se pueden agregar más de ser necesario). Los animales a usar serán sincronizados por edad. Cuando alcancen el estadio de larva 4 se colocarán en placas multi-well con medio líquido conteniendo los compuestos de interés. Trabajando bajo la lupa, se evaluará la sobrevivencia de los gusanos cada 24 hs, por 3 días. Un animal se considera muerto ante la falta de movimiento. Con los datos de muerte animal obtenidos se realizará un gráfico de dosis-letalidad, que nos permitirá obtener la DL50 de cada compuesto.

4- Preparación de controles: Para poder determinar si el efecto observado se debe únicamente a la acción de las drogas en estudio, es fundamental realizar adecuados controles. Para ellos gusanos del mismo estadio larva 4 serán expuestos a agua/DMSO (en la misma concentración que fueron preparados los compuestos) según corresponda. Se evaluará su sobrevivencia según lo descrito anteriormente

5- Determinación de actividad larvicida y ovicida: De una manera muy sencilla y trabajando con una solución de hipoclorito de sodio se obtendrán los huevos de gusanos grávidos, los cuales serán colocados en placas de NGM conteniendo los compuestos en estudio. Los animales nacidos se cuantificarán a las 48 hs. Para determinar la actividad larvicida se expresará el número de animales que nacen como un porcentaje de los huevos totales. Para determinar la actividad ovicida se identificará el número de huevos que no eclosionan.



**Requisitos especiales del alumno:** no requiere