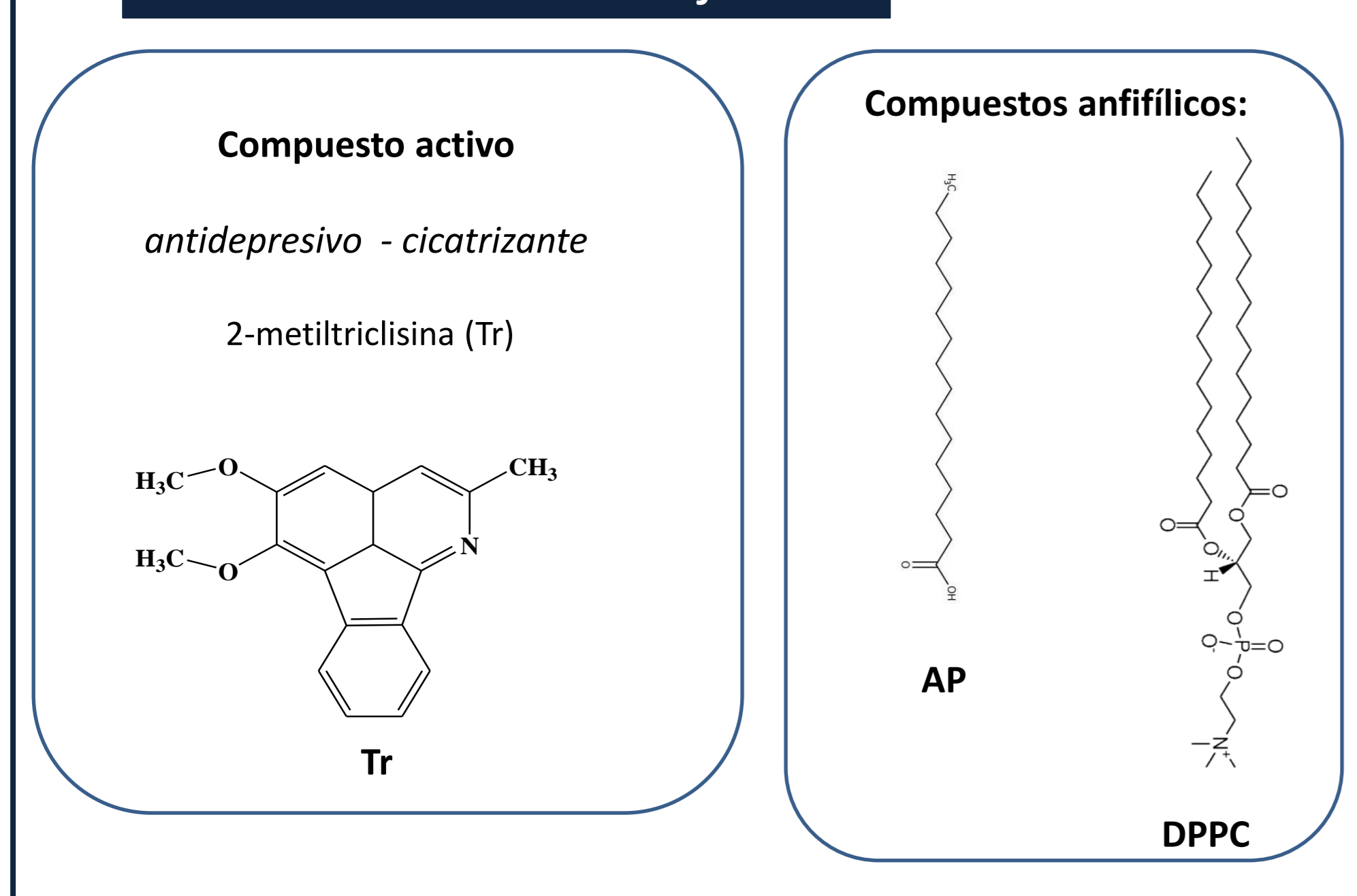


L. Fernández, A. Reviglio, D. Heredia, E. Larghi, A. Bracca, T. Kaufman, G. Morales, F. Alustiza, A. Liaudat, P. Bosch, L. Otero, M. Santo.
ITEMA, CONICET-UNRC y Dpto Física. Dpto. Química. Dpto Biología Molecular. Universidad Nacional de Río Cuarto.
Instituto de Química Rosario. Facultad de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

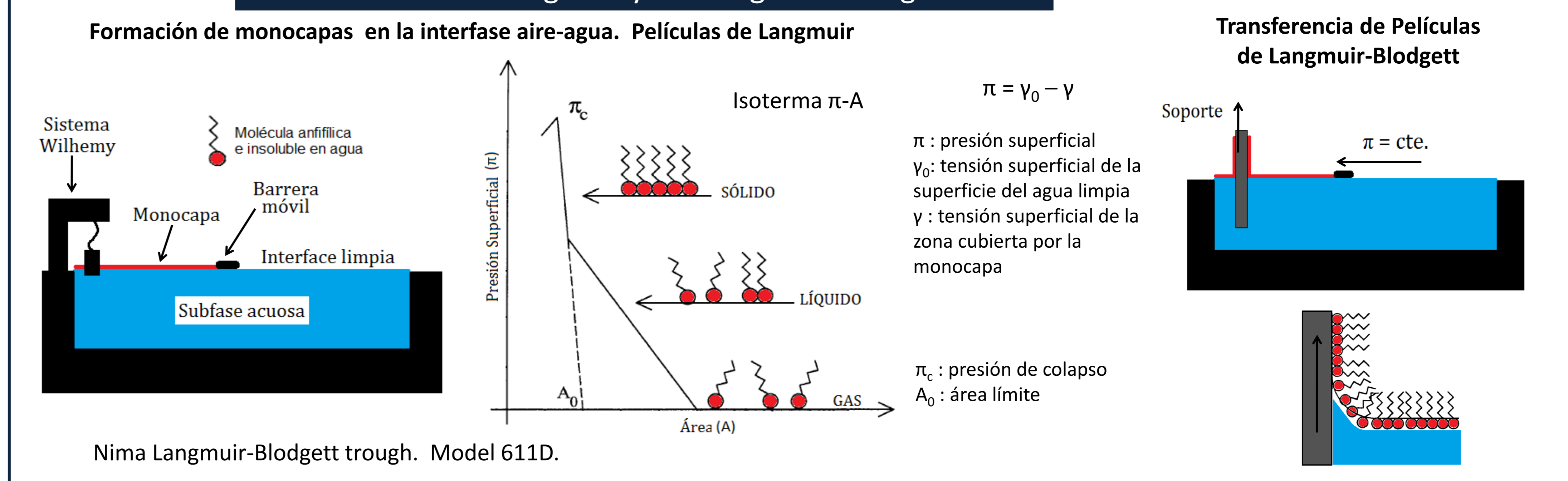
INTRODUCCIÓN

El desarrollo de sistemas de administración de fármacos mediado por superficie consiste en generar películas de material soporte capaces de actuar como reservorio para la carga terapéutica activa y permitir la liberación controlada del fármaco. En este trabajo se presenta el desarrollo y caracterización de películas orgánicas, sobre superficies, que contienen como material de soporte ácidos grasos (AP), fosfolípidos (DPPC) o una mezcla de ambos, como modelo de plataformas de administración de fármacos.

Sistema de trabajo



Técnicas de Langmuir y de Langmuir-Blodgett



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de películas de Langmuir en la interfase aire-agua

Las isotermas representan la presión superficial en función del área disponible por molécula de anfífilo. El desplazamiento de las isotermas indica la presencia del compuesto activo en la interfase intercalado entre las moléculas anfífilas que operan de soporte.

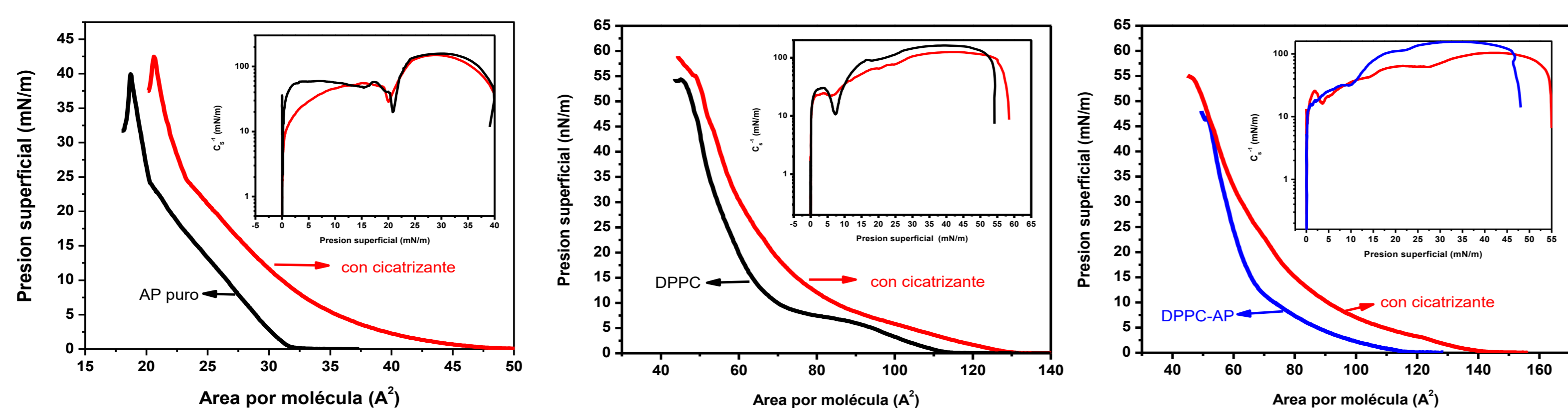


Figura 1. Isoterma presión superficial-área molecular de AP y de AP-Tr (izquierda), DPPC y DPPC-Tr (centro), de DPPC-AP y DPPC-AP-Tr (derecha) y sus correspondientes módulos de compresión (C_s^{-1}).

Estabilidad de las películas en la interfase aire-agua

Se analizó la estabilidad de las monocapas mediante experimentos de expansión-compresión. En general las monocapas muestran un comportamiento reversible.

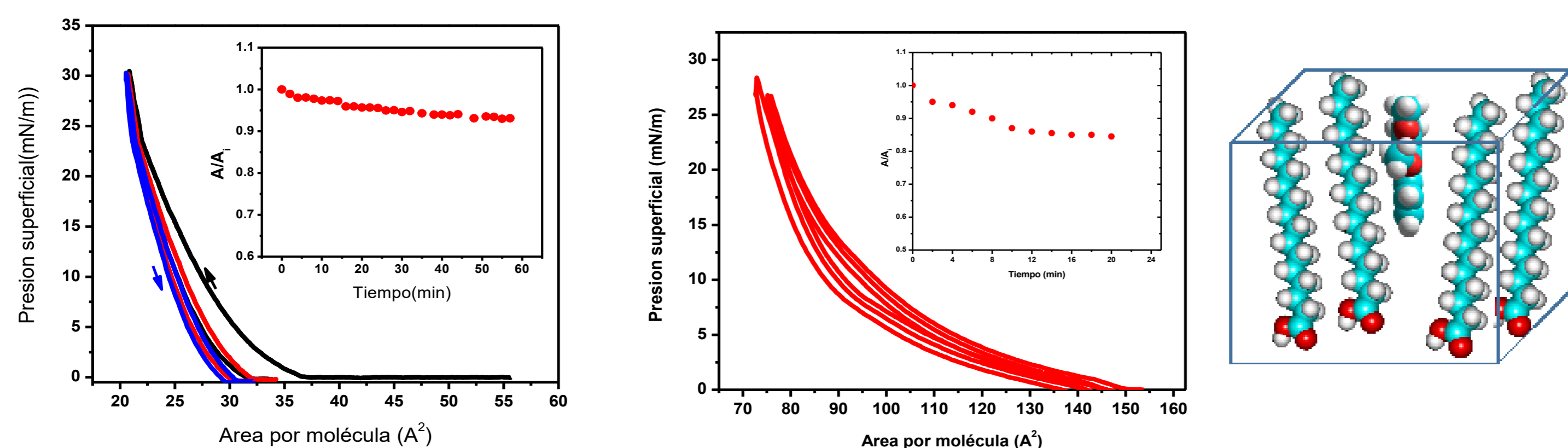


Figura 2. Ciclos de histéresis durante sucesivas compresiones y expansiones de monocapas mixtas Palmítico-Tr (izquierda) y DPPC-PA-Tr (derecha). Inset: Mediciones isobáricas de la deformación resultante con el tiempo (A_t/A_0), obtenidas a 298 K. Representación molecular del arreglo conformacional de las moléculas en la película de Langmuir.

También se realizaron mediciones isobáricas (Inset Figura 2) para completar el estudio de la estabilidad y el ordenamiento de estas moléculas en la interfase aire-agua.

Se observó una ligera pérdida en el área molecular seguida por una relajación lenta hasta alcanzar el equilibrio. Esto indica que el balance hidrofílico/lipofílico permite una disposición estable de la película en la interfase, no se observa ni desestabilización ni colapso de la monocapa de Langmuir con el tiempo.

Análisis computacional de las monocapas de Langmuir

Se llevó a cabo el modelado de los constituyentes de las diferentes monocapas utilizando el método semiempírico AM1, para obtener descriptores que permitan calcular el área molecular ocupada por cada componente de la monocapa. Los valores obtenidos se corresponden con los determinados experimentalmente: 22\AA^2 , 59\AA^2 , 20\AA^2 para AP, DPPC y Tr respectivamente.

Para acceder a los arreglos espaciales y las energías relativas de formación de las películas de Langmuir, se realizó un modelado ab initio de alto nivel, utilizando la Teoría Funcional de Densidad electrónica (DFT). Los resultados indicaron la formación de una solución bidimensional estable con ausencia de islas o dominios originados por segregación molecular en la película.

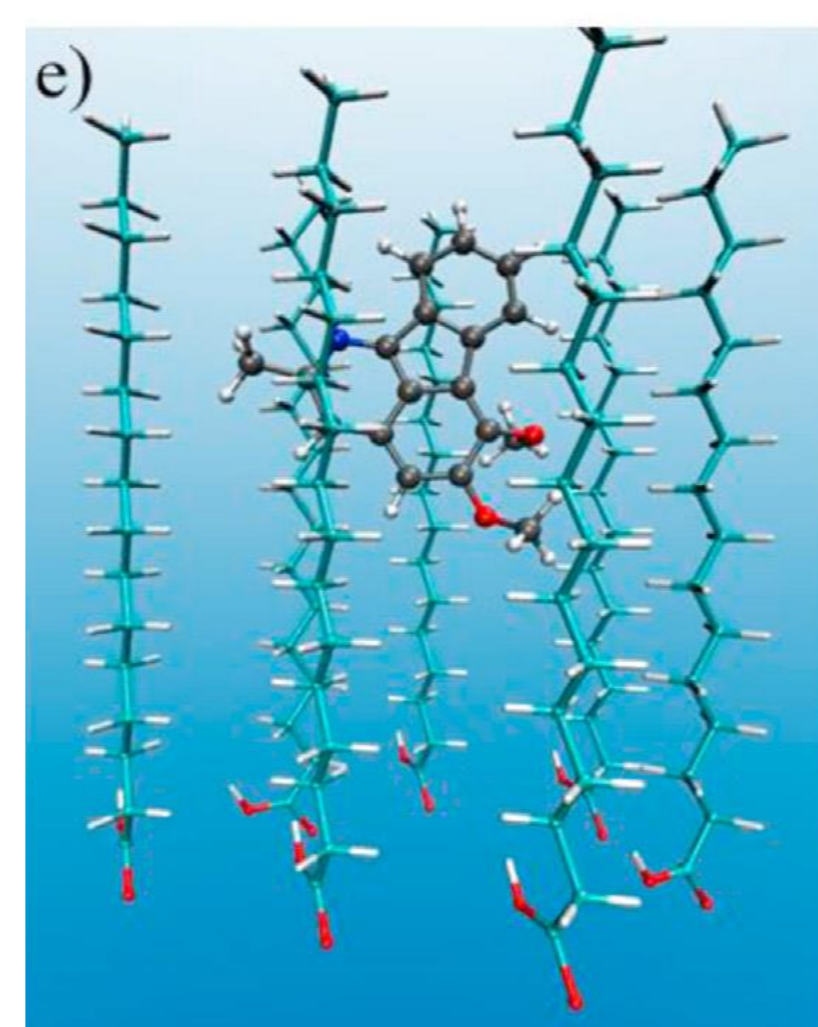


Figura 3. Vista longitudinal de la celda unidad de PA-Tr modelada mediante DFT.

Formación de película de Langmuir-Blodgett sobre mica y caracterización utilizando Microscopía de Fuerza Atómica

La transferencia de las monocapas a un sustrato sólido y su estudio por AFM permite una caracterización detallada de la morfología y la homogeneidad de las películas y una mejor comprensión de la organización de las moléculas en la monocapa de Langmuir.

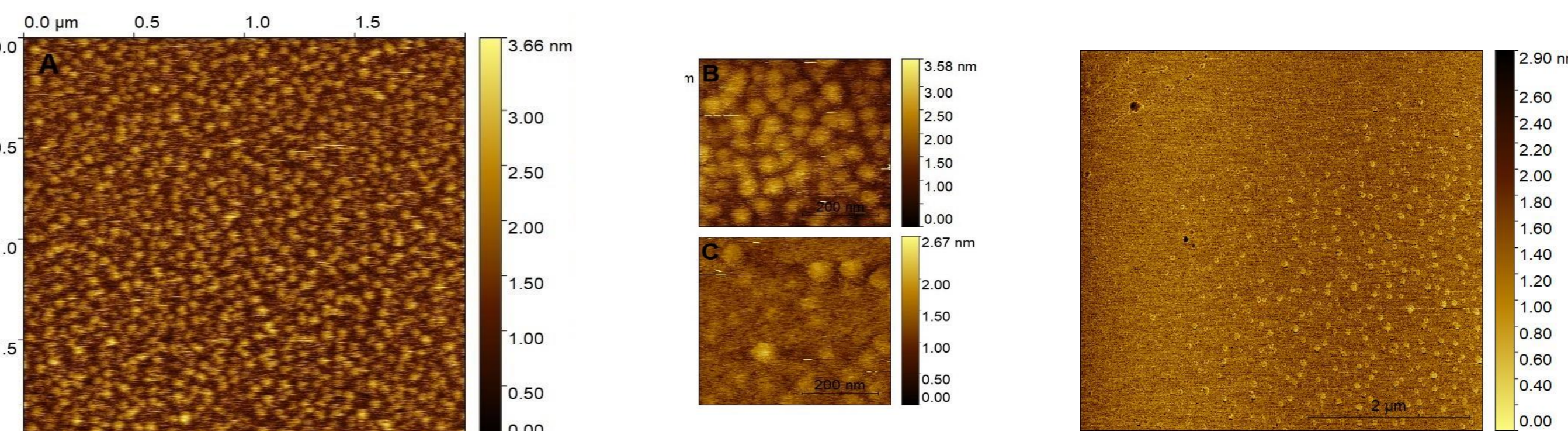


Figure 4. Imágenes AFM de topografía de una monocapa de AP-Tr (izquierda y centro) y de DPPC-AP-Tr (derecha) depositadas sobre mica a 298 K

En las imágenes topográficas obtenidas mediante AFM puede observarse la transferencia de monocapas homogéneas y los valores determinados de espesor y área ocupada se corresponden con los calculados.

Biocompatibilidad y evaluación de actividad cicatrizante

Las superficies generadas fueron ensayadas como soportes para el desarrollo de células. Se trabajó con líneas celulares NIH 3T3 y MRC-5, se estudió la morfología celular, nuclear y la proliferación. La adhesión celular fue ideal sobre las superficies que contienen principios activos, al compararlas con superficies de mica, material soporte y poliestireno. Por otra parte se evaluó la actividad cicatrizante de Tr, mediante el ensayo de la herida basado en generar una ruptura de la monocapa celular preestablecida y se evaluó la capacidad regenerativa de las células. La evaluación se realizó a las 5 horas, midiendo el acortamiento de la longitud de la herida generada, ensayando todas las condiciones por triplicado. Se observó una importante actividad de proliferación celular, con disminución estadísticamente significativa de la longitud de la herida en presencia del cicatrizante, respecto al control.

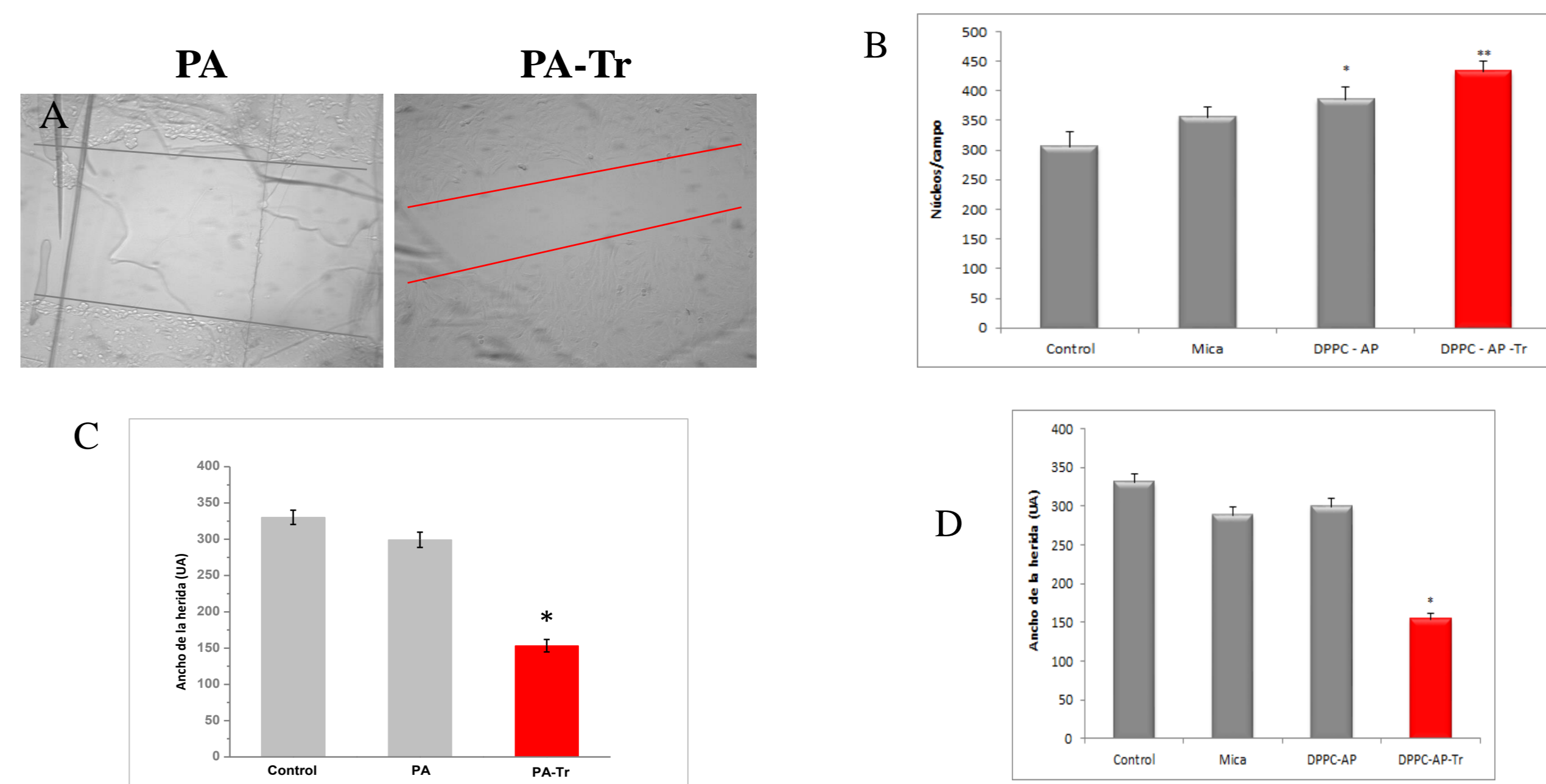


Figura 5. Imágenes 200x de fibroblastos sometidos a una herida y luego de 5 horas de exposición al agente cicatrizante (A); media de la cantidad de núcleos teñidos con Hoesch por campo de células MRC-5 expuesta a los distintos agentes durante 72 hs (B) y ancho de la herida de células MRC-5 expuestas a los distintos agentes durante 5hs. * $p < 0,001$ vs. control, mica y AP o DPPC-AP (C y D).

La comparación de las superficies generadas usando el mismo principio activo y cambiando la naturaleza y proporción del material soporte nos permitió evaluar los beneficios del uso de cada sistema resultando ácido palmítico puro el soporte que brinda mejor balance costo beneficio, siendo fácil de manipular, de bajo costo y eficiente.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que las películas generadas son biocompatibles y mantienen la actividad cicatrizante por lo que pueden proyectarse como sistemas para la administración de drogas mediada por superficie y la ingeniería de tejidos.