

# **Diseño y desarrollo de formulaciones farmacéuticas basadas en un inmunomodulador y un nuevo péptido antimicrobiano: impacto en la terapia antimicrobiana**

---

Año  
2017

Director  
Ravetti, Soledad y Sánchez Bruni, Sergio  
Fernando

Este documento está disponible para su consulta y descarga en el portal on line de la Biblioteca Central "Vicerrector Ricardo Alberto Podestá", en el Repositorio Institucional de la **Universidad Nacional de Villa María**.

#### CITA SUGERIDA

Ravetti, S. y Sánchez Bruni, S. F., [et al.] (2017). *Diseño y desarrollo de formulaciones farmacéuticas basadas en un inmunomodulador y un nuevo péptido antimicrobiano: impacto en la terapia antimicrobiana*. Villa María: Universidad Nacional de Villa María



## Diseño y desarrollo de formulaciones farmacéuticas basadas en un inmunomodulador y un nuevo péptido antimicrobiano: impacto en la terapia antimicrobiana.

**Director:** RAVETTI Soledad

**Co-Director:** SÁNCHEZ BRUNI Sergio Fernando

**Integrantes:** HERGERT Lisandro, BONATERRA Mariana, PALMA Santiago, DELPECH Gastón, SPARO Mónica Delfina, BISTOLETTI Mariana, BRIGNONE Sofía Gisella.

### Informe Académico

#### Etapa I: Extracción química y evaluación de la eficacia de extracto de pared bacteriana (EPB)

En esta etapa se han presentado situaciones que demoraron los procedimientos descritos en el informe anterior para la extracción de EPB (falta de reactivo D-Lactato para valorar concentraciones lo que obligó a revalidar la técnica de extracción) pero las mismas han sido superadas permitiendo avanzar correctamente en las etapas posteriores.

- Técnica de extracción de pared bacteriana: Se obtuvo un cultivo fresco de EFCECT7121 en caldo cerebrocorazón por incubación a 35°C durante 18 h. Luego se centrifugó a 10000 g durante 10 min, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se llevó el sedimento a baño de hielo. Se suspendió en 5 mL de Tris-HCl 25mM, pH 7,4 con 2 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, en baño de hielo y utilizando reactivos pre-enfriados a 4°C. Posteriormente, se sonicó la suspensión bacteriana (150 W durante 5 min) con un baño de hielo a su alrededor. Luego se transfirió a 20 mL de Tris-HCl 25mM, pH: 7,4, pre-enfriado (4°C). Se centrifugó a 5000 g durante 30 min (4°C) para sedimentar las bacterias enteras remanentes.

El sobrenadante conteniendo el extracto de pared PEF7121 se congeló a -20°C hasta su utilización.

- Cuantificación de pared bacteriana: detección de niveles de lactato: Para cuantificar la presencia PEF7121 se realizó la medición de D-lactato (como marcador subrogante), producto final de la hidrólisis del ácido murámico, principal componente de la pared bacteriana.

- Dosaje de D-lactato: Se implementó una técnica que está basada en el tratamiento alcalino de los extractos ácidos de pared para remover el D-lactato de la posición 3 del ácido murámico. Se preparó una solución constituida por 1 mL de Reactivo y 10 µL de solución de concentración conocida de D-lactato (Patrón). Se tomaron 10 µL de cada extracto de pared, se transfirieron a tubo de hemólisis y se agregó 1 mL

de reactivo (Muestras). Los tubos con las soluciones Patrón y Muestras se agitaron e incubaron a 20-25°C durante 5 min. Se realizó la lectura espectrofotométrica de la reacción a 505 nm llevando previamente a cero el aparato con 1 mL de Reactivo (Blanco de reactivo). Luego se realizó la calibración con la solución Patrón y se procedió a la lectura de las soluciones Muestra registrando los valores obtenidos de Densidad Óptica. Se realizaron los cálculos de concentración de D-lactato utilizando la fórmula provista para tal fin. Lactato oxidasa (LOD) > 150 U/l. Se detecta los niveles de lactato, producto final de la hidrólisis del ácido murámico (principal componente de la pared bacteriana), según protocolo descrito en el informe anterior.

#### Etapa II: Diseño y desarrollo de la forma farmacéutica para su administración oral.

A causa de los problemas que surgieron en la etapa anterior, nos encontramos en una etapa de resultados preliminares en la obtención de una forma farmacéutica óptima.

El sistema de Salud del Municipio de Tandil comprende los Hospitales R. Santamarina, de Pediatría D. Blanco Villegas y E. Larreta. Estas instituciones comparten el Laboratorio de Microbiología Clínica integrante de la red WHONET (programa de la OMS de vigilancia de resistencia a los antimicrobianos) coordinada en la Argentina por el ANLIS Malbrán. Uno de sus objetivos es facilitar los estudios de prevalencia de la resistencia en cada unidad hospitalaria. En los últimos años se ha detectado la emergencia en infecciones invasivas de varias de bacterias multirresistentes. Estos antecedentes hacen viable la obtención de una colección de cepas significativa con resistencia antimicrobiana asociada y habilita la posibilidad de contrastar la eficacia bactericida in vitro del nuevo péptido AP-CECT7121. En paralelo se buscará un desarrollo farmacotécnico del péptido para que sea estable tanto para la vía oral como para la inyectable, para proceder a los estudios preclínicos propuestos.

Esta sección experimental apunta al desarrollo farmacotécnico del inmunomodulador PEF7121 buscando la mejor formulación farmacéutica para que el mismo permanezca activo el tiempo necesario en el organismo provocando las modificaciones inmunológicas deseadas.

El desarrollo de nuevas formulaciones involucra la aplicación de principios biofarmacéuticos y tecnológicos con el objetivo de diseñar un sistema óptimo, seguro y eficaz de liberación de un principio activo desde una forma farmacéutica.

Entre las consideraciones que se deben tener en cuenta en las etapas de preformulación y formulación desde el punto de vista del fármaco y de los excipientes involucrado son las propiedades físicas de las partículas (forma, tamaño, superficie específica), solubilidad (naturaleza del/los solventes, temperatura, características del cristal, tamaño de partícula, pH, efecto de los aditivos), características de cristal y polimorfismo (difracción de rayos X, infrarrojo, análisis térmico, microscopia) y compatibilidad fármaco excipiente (estudios de estabilidad, análisis térmico y métodos cromatográficos).

Se trabajará inicialmente con dos tipos de sistemas farmacéuticos:

*Micropartículas obtenidas a partir de esferas de azúcar (MEA)*

Las esferas de azúcar, como soporte, proveen una plataforma confiable para la carga del principio activo. Esta estrategia es interesante para principios activos que se vehiculizan en bajas concentraciones y que se encuentran en un medio líquido.

En este caso se parte de un soporte sólido que se incorpora a un secadero de lecho fluido (marca Caleva) para luego adsorber el activo sobre la superficie de las esferas inertes.

Se utilizaron SUGLETS® 16/18 Mesh de la empresa Colorcon®.

Se evaluaron diferentes sistemas de trabajo. Finalmente se seleccionó el siguiente:

Agitador: 30%, Ventilador: 100%, calentador: 50%, bomba: 50% y aire de atomización: 25 psi.

En el proceso de obtención de micropartículas se procedió al recubrimiento con polímeros sensibles al pH.

Además la obtención de micropartículas está siendo puesta a punto mediante un diseño factorial de experimentos.

*Recubrimiento por lecho fluido*

Cuando se diseña un proceso de microencapsulación el primer paso es la elección apropiada del material de recubrimiento. Esto será determinante al momento de evaluar la liberación de la sustancia encapsulada ya que dependerá de la permeabilidad que presente el recubrimiento.

En el sistema utilizado, las micropartículas se mantienen en suspensión gracias a la corriente de aire que penetra por la parte inferior a la vez que se pulveriza sobre las mismas la disolución del polímero de recubrimiento.

La elección se hace en base a una amplia variedad de polímeros sintéticos y naturales, los cuales pueden mezclarse a fin de obtener propiedades de barrera y mecanismos de liberación específicos. Además de ello

el recubrimiento deberá presentar ciertas características que dependerán del tipo de sustancia, tipo de proceso y destino final de las micropartículas obtenidas.

El proceso de recubrimiento se llevó a cabo utilizando el copolímero aniónico de ácido metacrílico y acrilato de etilo (Eudragit® L30D-D50), triacetina y agua.

Se realizaron pruebas de eficiencia en medios ácidos.

*Secado por spray drying*

Paralelamente a la obtención de micropartículas a partir de esferas de azúcar, se realizó el secado de diferentes muestras en solución acuosa, conteniendo el principio activo (extracto de pared bacteriana) y los excipientes mediante aire caliente.

Se están realizando los estudios de estabilidad de las muestras obtenidas.

*Ensayos fisicoquímicos, fisicomecánicos y biofarmacéuticos in vitro*

Paralelamente estamos evaluando las propiedades fisicoquímicas y fisicomecánicas con el fin de evaluar la estabilidad física de los sistemas obtenidos y su potencial incorporación como micropartículas en formas farmacéuticas sólidas. Estamos utilizando las técnicas DSC, FTIR y Reología.

**Producción científica relevante**

Capítulos de libros

Therapeutic Nanostructures: Chapter: "Therapeutic use of monoclonal antibodies: General aspects and challenges for drug delivery". Autores: Daniela Alejandra Quinteros, José María Bermúdez, Soledad Ravetti, Alicia Cid, Daniel Alberto Allemandi, Santiago Daniel Palma. 2015. Nanostructures for Drug Delivery 1st Edition. Editores: Ecaterina Andronescu, Alexandru Grumezescu. Hardcover ISBN: 9780323461436. Elsevier. Fecha de publicación: 19 de abril de 2017. Páginas contadas: 1024.

Artículos científicos

"Validation of UV-Visible and HPLC method for the determination of sodium p-aminosalicylate and m-aminophenol in a new pharmaceutical formulation". Autores: Hergert LY, Ravetti S, Mazzieri MR. Int J Pharm Compund. 20 (1) (2016). Formato impreso, 63-70.

"Challenges in protein formulation focused on extrusion-spheronization process". Autores: Ravetti S, Hergert LY, Sparo M, Sánchez-Bruni S, Palma SD. Journal of Pharmaceutical Research and Clinical Practice. 5(3) (2016). Formato impreso, 29-38.

“Challenges in antiparasitic drug discovery: a regional approach”. Ravetti S, Hergert LY, Sanchez-Bruni SF, Palma SD. Current Updates in Nanotechnology. 1: 1.1 (2016). Formato impreso, 2-4.

#### Presentaciones en eventos científicos

“Síntesis de nuevos derivados de mentol por asociación con diferentes aminoácidos con potencial actividad contra *L. panamensis*”. Autores: Ravetti, S.; Aciar, R.; Robledo S.; Hergert, L. XVIII Reunión de la Comisión Permanente y XII Asamblea General de la Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia (COIFFA) - VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas - XLVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología - III Congreso Sudamericano de Biofarmacia y Farmacocinética. 2 al 6 de noviembre de 2015. Córdoba, Argentina. Con referato.

“Síntesis de nuevos derivados de mentol por asociación con diferentes aminoácidos con potencial actividad contra *L. panamensis*”. X Jornada de Investigación. Universidad Nacional de Villa María. 25 de noviembre de 2015. Villa María, Córdoba, Argentina.

“Evaluation of the antimicrobial activity of a new preservative agent for contact lenses”. Autores: Martínez S.; Ravetti S.; Lirio M.; Becerra MC.; Hergert L. IV Reunión Internacional de las Ciencias Farmacéuticas. 27 y 28 de octubre de 2016. Rosario, Santa Fe. Los resúmenes con referato se publicarán en la revista científica International Journal of Pharmaceutical Science and Research (IJPSR).

“Nutritional development for use in the treatment of benign prostatic hyperplasia”. Autores: Bosaz A.; Ravetti S.; Benavidez E.; Hergert L. IV Reunión Internacional de las Ciencias Farmacéuticas. 27 y 28 de octubre de 2016. Los resúmenes con referato se publicarán en la revista científica International Journal of Pharmaceutical Science and Research (IJPSR).