

BREVE PROGRAMA TEORICO PRELIMINAR

Seminario 1: Liposomas: preparación y caracterización.

Seminario 2: Dendrimeros y megameros: preparación y caracterización.

Seminario 3: Sistemas nanoparticulados: nanoparticulas lipídicas sólidas/de quitosan, superparamagneticas, micelas polimericas. Preparación y caracterización.

Seminario 4: Nanomedicinas: Estudios de estabilidad *in vitro*. Herramientas básicas de estudio de tráfico intracelular.

Seminario 5: Nanomedicinas: Comportamiento *in vivo*: vías de administración y biodistribución.

Seminario 6: Nanovacunas

Seminario 7: Nano-toxicidad.

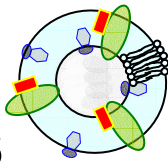
Seminario 8: Tópicos especiales: Rompiendo barreras: la piel, la mucosa gastrointestinal.

Seminario 9: Aspectos regulatorios y medio ambiente.

Drug delivery a través de la piel: Dr. Jonathan Hadgraft (Professor of Biophysical Chemistry, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, London University)

Drug delivery a través de mucosa gastrointestinal: Dr. David Brayden, Associated Professor, University College Dublin and Conway Institute of Biomolecular & Biomedical Research

LUNES



9.00 Apertura

2da Escuela de
Nanotecnología
Farmacéutica

NANOTEC FARMA

en Córdoba



Seminario 1: Liposomas: preparación y caracterización

9.30 **Fundamentos y métodos de preparación de liposomas.** Dra. Morilla, UNQ, Argentina.

11.00 Intervalo café

11.15 **Caracterización fisicoquímica.** Dra. Hermida, INTI, Argentina.

12.15 **Determinación de tamaño en el rango nanométrico.**
Dr. Ramón Barnadas, Universidad Autónoma de Barcelona, España

13.15 Almuerzo

14.30 **Liposomas especiales: pH sensibles.** Prof. Romero, UNQ, Argentina.

15.30 **Liposomas especiales: ultradeformables.** Romero

16.30 Intervalo café

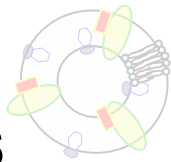
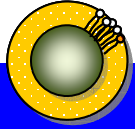
Lab 1: Preparación y caracterización de nano vesículas

Lic. A P Perez, Lic. L Higa, Lic. J Montanari, Lic. P Schillreff. PROGRAMA NANOMEDICINAS-UNQ.

16.45 **Modulo A.** Preparación y caracterización de MLV, SUV y LUV, incorporación de moléculas de bajo y alto PM.

Separación de las moléculas no-incorporadas: columnas de exclusión molecular, diálisis, ultrafiltración, ultracentrifugación.

MARTES



Seminario 2: Dendrimeros y megameros

9.00 **Preparación y caracterización.** Romero

Seminario 3: Sistemas nanoparticulados

10.00 **Nanopartículas (NP) Lipídicas Sólidas.** Romero

11.00 Intervalo café

11.15 **NP superparamagnéticas.** Prof. Gustavo Marchetti, UNLP, Argentina

11.50 **Micelas poliméricas.** Prof. Alejandro Sosnik, Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina.

12.25 **Sistemas nanoestructurados na melhoria das propriedades terapêuticas de compostos de origem natural.** Prof. Elenara Lemos-Senna, Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde Dep. de Ciências Farmacêuticas, Florianópolis.

13.15 Almuerzo

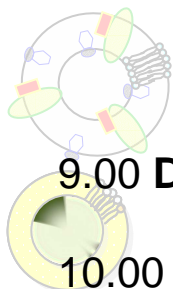
14.30 **Radionucleidos en Nanomedicina.** Prof. Henia Balter, Centro de Investigaciones Nucleares, Universidad de la República, Uruguay

Lab 1: Preparación y caracterización de nano vesículas

Lic. A P Perez, Lic. L Higa, Lic. J Montanari Lic. P Schilrreff PROGRAMA NANOMEDICINAS-UNQ.

15.30 **Modulo B:** Caracterización liposomas: cuantificación de fosfolípidos, determinación de tamaño y Potencial Z.

MIERCOLES



9.00 **Determinación de Potencial Z.** Barnadas.

10.00 **Homogeneización a alta presión.** Barnadas

11.00 Intervalo café

Lab 2: Homogenización a alta presión

Preparación de liposomas a escala piloto mediante homogeneización de alta presión (Emulsiflex C-50). Procesos en ciclos y en modo recirculación. Extrusión en línea. Control de proceso mediante espectrofotometría UV-visible y *Dinamic Light Scattering*.

13.15 Almuerzo

14.30 **Introducción a la Microscopía de Fuerza Atómica.**

Dr. Carlos Moina-INTI

Lab 3: MFA

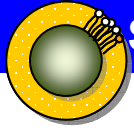
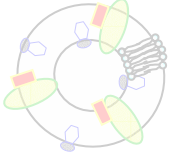
Microscopía de Fuerza Atómica: preparación de muestras, ajuste de parámetros en la observación de liposomas, nanopartículas y dendrímeros. Dr. Gabriel Ybarra (Unidad de Nanoscopías-INTI).

Lab 4: NP-Quitosan

Nanopartículas de Quitosan Fundamentos.

Preparación y caracterización Bioq. MV Defain Tesoriero

JUEVES



Seminario 4: Nanomedicinas: estudios predictivos *in vitro*

9.00 **Estudios de estabilidad *in vitro*.** Morilla

10.00 **Herramientas básicas de estudios de tráfico intracelular.** Morilla

11.00 Intervalo café

Seminario 5: Nanomedicinas: comportamiento *in vivo*

11.15 **Vías de administración y biodistribución.** Romero

12.15 **Modos celulares de captura.** Romero

13.15 Almuerzo

Seminario 6: Nanovacunas

14.30 **Nanovacunas.** Romero

16.00 Intervalo café

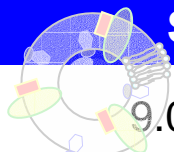
Seminario 7: Nanotoxicidad

16.15 **Nanotoxicidad.** Romero

17.30

Video interactivo: Desarrollo y uso de cultivos celulares/ modelo de barrera gastrointestinal

Lic. A P Perez, Lic. L Higa, Lic. P Schilrreff, Lic. J Montanari- PROGRAMA
NANOMEDICINAS-UNQ.



Seminario 8: Tópicos especiales: Rompiendo barreras

9.00 **Drug delivery a través de la mucosa gastrointestinal** Prof. Brayden. University College Dublin-CONWAY Institute, Irlanda.

10.00 **Targeting a placas de Peyer.** Brayden

11.00 Intervalo Café

11.15 **Drug delivery transdérmico: recientes consideraciones y avances.** Prof. Hadgraft. School of Pharmacy, University of London, Reino Unido.

12.15 **Drug delivery transdérmico:** estudio de mecanismos de penetración y modulación. Hadgraft.

13.15 Almuerzo

Seminario 9: Aspectos regulatorios y medio ambiente

15.30 **Nano-farmacia hospitalaria en Argentina.** Prof. Carlos Bregni, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina.

16.15 Intervalo café

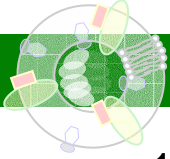
16.30 **Regulaciones en Argentina.** Prof. Adriana Carlucci, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA.

17.15 **Impacto de la nanotecnología sobre los microorganismos.** Prof. Visitacion Conforti, Departamento de biodiversidad y Biología Experimental, FCEyN, UBA

Lab 5: Penetración de nano-SEDs en piel humana

Lic. J Montanari - PROGRAMA NANOMEDICINAS-UNQ.

SABADO



Nanoworkshop : Nanomedicinas en Latinoamerica 2008

10.00

Modalidad A: estado del arte en la región.
Enviar resumen ponencia media carilla A4.

Modalidad B: presentaciones orales de trabajos experimentales (publicados recientemente o por publicar).
Enviar resumen de media carilla A4 objetivos, mat&met, resultados, conclusiones.

Discusión final y mesa redonda (panel a definir).
Empanadas & Vino

Costo actualizado de la Segunda Escuela NF: 1000 \$ argentinos (~310 USD) (Incluye trabajos prácticos, *coffee break* y asistencia a Nanoworkshop). **Costo diferencial** (académicos con acreditación correspondiente: cargos docentes, de investigación, becarios y doctorandos pertenecientes a Universidades. profesionales farmacéuticos no vinculados con actividad empresarial): **600 \$ argentinos.**

Reseña de los Trabajos prácticos

Lab 1: Preparación y caracterización de nano vesículas

Objetivos

Preparar y caracterizar tanto liposomas multilamelares como unilamelares (SUV y LUV). Desarrollarán protocolos experimentales apuntados a incorporar sondas fluorescentes tanto lipofílicas como hidrofílicas, así como moléculas modelo de diferentes pesos moleculares. Asimismo, aprenderán a determinar tamaños y lamellaridad de liposomas y a aplicar estrategias adecuadas para cuantificar moléculas incorporadas.

Preparación de nano vesículas

Durante el primer trabajo práctico los alumnos prepararan liposomas multilamelares (MLVs), que se sonicarán o extruirán con el fin de disminuir su lamellaridad, tamaño y obtener poblaciones homogéneas de liposomas unilamelares (SUVs y LUVs). Luego de incorporadas diferentes tipos de moléculas a las estructuras liposomales, se emplearán columnas de exclusión molecular, diálisis, ultrafiltración y ultracentrifugación con objeto de separar las moléculas libres de aquellas incorporadas a los liposomas.

La caracterización de las nanovesículas comenzará con la cuantificación de fosfatos (presentes en fosfolípidos liposomales) mediante un método colorimétrico sencillo. Además, se determinará el tamaño y el potencial Z de las nanovesículas mediante *light scattering* utilizando un equipo NanoZsizer (Malvern).

También se seleccionará un método de cuantificación de la droga/sonda incorporada, (espectroscopia de absorción y de fluorescencia, detección por HPLC). Finalmente se analizarán y se interpretarán los resultados obtenidos, en forma de % de recuperación de lípidos, % (eficiencia) de incorporación de moléculas en liposomas, relación moléculas/masa lipídica liposomal (%droga/liposoma).

Video interactivo: Desarrollo y uso de cultivos celulares/ modelo de barrera gastrointestinal

Objetivos

Adquirir conocimientos sobre el desarrollo y uso de cultivos celulares y de un posible modelo de barrera gastrointestinal.

Este video interactivo indicará en forma detallada cómo se lleva a cabo el mantenimiento de células en cultivo (repique en monocapa, recuento de células, congelación de células), como se diseñan ensayos de citotoxicidad (MTT y LDH), así como de *binding* a y transitocis por células símil M.

Por otro lado, se analizarán e interpretarán datos de citotoxicidad con el fin de elucidar el efecto tóxico que pueden producir las formulaciones liposomales en

células *in vitro*. Un número seleccionado de alumnos tendrá acceso a ensayos *in vitro*.

Lab 5: Penetración de nano-SEDs en piel humana

Objetivo

Estudiar la penetración de liposomas ultradeformables/ convencionales cargados con una sonda fluorescente en piel humana por la técnica de *Saarbrücken Penetration Model* (SPM) y se separarán las capas del estrato córneo por la técnica de *tape stripping*. Los resultados se evaluarán cualitativamente por microscopía de fluorescencia y cuantitativamente por fluorimetría, obteniéndose un perfil de concentración de sonda en función de la profundidad de la piel.

Background

La vía tópica presenta una dificultad principal cuando se desea acceder a blancos ubicados en capas profundas de la piel o cuando se pretende una liberación sistémica: el estrato córneo -compuesto por una veintena de capas de células muertas muy compactadas- constituye una barrera superficial prácticamente impermeable que aísla el interior del interior del cuerpo del medio externo. La enorme mayoría de los productos nanocosméticos que hoy día se encuentran ampliamente disponibles en el mercado no consiguen atravesar esta barrera, y por lo tanto actúan solamente como depósitos externos para liberación sostenida del principio activo. Los liposomas ultradeformables, en cambio, tienen la capacidad de alterar su forma para atravesar los nanocanales del estrato córneo -cuya abertura es mucho menor que el diámetro de aquéllos- sin sufrir pérdidas estructurales o de contenido cuando son impulsados por el gradiente de humedad existente a través de la piel, el cual genera una presión suficiente para que se produzca el evento de penetración.

En el SPM la suspensión (nanopartículas, liposomas, etc) es incubada sobre una porción de piel entera para permitir su penetración. Luego, las capas apiladas del estrato córneo son retiradas de a una por medio de sucesivos pedazos de cinta adhesiva (*tape stripping*), a partir de los cuales se puede recuperar y cuantificar la muestra, teniendo referencia de la profundidad de cada estrato del que fue recuperada.

Otras técnicas como los estudios en *celdas de Franz* permiten evaluar la permeación en lugar de la penetración, es decir, se centran en la detección de los nanosistemas que atravesaron completamente el explanto ensayado en un compartimiento receptor ubicado por debajo de éste.

El estudio del perfil de penetración de un nanosistema de entrega de droga a través del estrato córneo es entonces fundamental para evaluar su potencial éxito como sistema de delivery tópico, así como para conocer en detalle la interacción de éste con la barrera impermeable que otros estudios -por ejemplo permeación solamente- dejan irresolutos al tratar al espesor de la piel como un modelo de "caja negra".

El uso de un marcador fluorescente confinado en el interior de liposomas permitirá a la vez detectar la presencia de los mismos al microscopio de fluorescencia en cada capa de queratinocitos, así como evaluar su integridad de acuerdo al confinamiento puntual o no de la sonda. A partir de una extracción

sencilla con etanol se podrá solubilizar la marca fluorescente para su cuantificación en espectrofluorómetro, permitiendo obtener un perfil de penetración graficando cantidad de sonda vs profundidad del estrato. El ensayo con liposomas convencionales permitirá contrastar los perfiles de penetración para liposomas ultradeformables y verificar la mayor eficacia de estos para eludir la barrera impermeable.