

**MICROCÁPSULAS DE CIPROFLOXACINO CON DISOLUCIÓN AUMENTADA PARA EL
TRATAMIENTO DE BIOPELÍCULAS BACTERIANAS EN INFECCIONES PULMONARES**

Tesis para optar al Grado de
Magister en Bioactividad de Productos Naturales y de Síntesis

LUIS MARCELO MONRREAL ORTEGA

Director de tesis: Daniel Moraga Espinoza

Codirector: Tania Bahamondez Cañas

2025



Índice

Tabla de contenido

Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Objetivo General:	12
Objetivos Específicos:	12
Materiales y Métodos:	13
Materiales	13
Métodos	13
1. Producción de microcápsulas respirables de ciprofloxacino mediante la técnica de SD.....	13
2. Evaluación del perfil de liberación de ciprofloxacino desde las microcápsulas con dos estrategias de formador de poro (D-manosa o NaCl).....	15
3. Evaluación de las propiedades aerodinámicas de las microcápsulas de ciprofloxacino:	16
4. Evaluación de la morfología de más microcápsulas con porógenos:	16
5. Cuantificar la capacidad de encapsulación de microcápsulas de ácido palmítico y gelatina:	17
6. Evaluación de acción antimicrobiana de las microcápsulas en cultivos de biopelículas de <i>P. aeruginosa</i>	17
Resultados	21
1. Perfil de liberación de ciprofloxacino desde las microcápsulas recubiertas con formadores de poro (D-manosa o NaCl):	21
2. Evaluación de las propiedades aerodinámicas de las microcápsulas de ciprofloxacino:	22
3. Determinación de la capacidad de encapsulación del sistema de reservorio-matriz de ácido palmítico y gelatina:	23
4. Evaluación de la morfología de más microcápsulas con porógenos:	24
5. Evaluación de acción antimicrobiana de las microcápsulas en cultivos de biopelícula de <i>P. aeruginosa</i>:	27
6. Evaluación del perfil de citotoxicidad de la formulación de microcápsulas inhalables de ciprofloxacino en la línea celular de epitelio alveolar:	28
Discusión	30
Conclusión	39
Referencias	41

Resumen

Las infecciones crónicas por *Pseudomonas aeruginosa* en fibrosis quística (FQ) representan un desafío terapéutico debido a la formación de biopelículas resistentes y la limitada eficacia de las terapias actuales. En este estudio se desarrollaron microcápsulas inhalables de ciprofloxacino (CIP) con recubrimiento lipídico y porógenos (NaCl o D-manosa), mediante secado por atomización. Estas microcápsulas fueron diseñadas para modular la liberación del antibiótico y mejorar su biodisponibilidad pulmonar usando gelatina (GA) como agente de matriz y ácido palmítico como encapsulante. Se evaluaron sus propiedades aerodinámicas, cinética de liberación, eficiencia de encapsulación, morfología, actividad antimicrobiana y citotoxicidad *in vitro*.

Las microcápsulas con D-manosa en el recubrimiento mostraron una eficiencia de encapsulación de 88,9%, similar a las microesferas CIP-GA desnudas (90,3%), y superior a las microcápsulas sin porógeno (74,8%). En celdas de Franz, las microcápsulas con D-manosa liberaron 17,2% de su dosis, equivalente a 64,5 µg/mL de CIP en la primera hora en los ensayos de eficacia antimicrobiana, superando al control y correlacionándose con mayor actividad antimicrobiana sobre biopelículas de *P. aeruginosa*. El perfil aerodinámico de estas formulaciones (MMAD = 4,63 µm, FPF >60%) demostró sobresalientes características respirables. Se estimó que, con cuatro dosis inhalables (i.e. cápsulas cargadas con la formulación), se alcanzarían 32,7 µg/mL en fluido epitelial pulmonar; sin embargo, la concentración efectiva observada en los ensayos fue de 64,5 µg/mL, lo que sugiere que aumentar la carga de microcápsulas por dosis o utilizar un DPI con cápsulas de mayor volumen permitiría alcanzar la dosis requerida.

En conjunto, estos resultados validan el diseño propuesto como una estrategia eficaz para mejorar la biodisponibilidad pulmonar de CIP, ofreciendo una plataforma adaptable para enfermedades crónicas con necesidades terapéuticas insatisfechas.

Abstract

Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis (CF) represent a therapeutic challenge due to the formation of resistant biofilms and the limited efficacy of current therapies. In this study, inhalable ciprofloxacin (CIP) microcapsules were developed with a lipid coating and porogens (NaCl or D-mannose) using spray drying. These microcapsules were designed to modulate antibiotic release and improve pulmonary bioavailability using gelatin (GA) as a matrix agent and palmitic acid as the encapsulant. Their aerodynamic properties, release kinetics, encapsulation efficiency, morphology, antimicrobial activity, and in vitro cytotoxicity were evaluated.

The microcapsules with D-mannose in the coating showed an encapsulation efficiency of 88.9%, similar to the bare CIP-GA microspheres (90.3%) and higher than the microcapsules without porogen (74.8%). In Franz cells, the D-mannose microcapsules released 17.2% of their dose, equivalent to 64.5 µg/mL of CIP in the first hour in antimicrobial efficacy tests, outperforming the control and correlating with greater antimicrobial activity against *P. aeruginosa* biofilms. The aerodynamic profile of these formulations (MMAD = 4.63 µm, FPF >60%) demonstrated outstanding respirable characteristics. It was estimated that, with four inhalable doses (i.e., capsules loaded with the formulation), 32.7 µg/mL would be reached in pulmonary epithelial fluid; however, the effective concentration observed in the assays was 64.5 µg/mL, suggesting that increasing the microcapsule load per dose or using a DPI with higher-volume capsules would allow the required dose to be achieved.

Overall, these results validate the proposed design as an effective strategy to improve the pulmonary bioavailability of CIP, offering an adaptable platform for chronic diseases with unmet therapeutic needs.

Introducción

El desarrollo de formas farmacéuticas inhalables de liberación controlada es de gran interés debido a que actualmente es necesario administrar múltiples dosis durante el día para tratar enfermedades crónicas como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis quística (FQ) (1). En el caso de esta última enfermedad se ha identificado que la falta de tiempo, olvido y falta de disposición para administrar medicamentos de inhalación oral en público son algunas de las principales barreras disminuyendo la adherencia al tratamiento (2–4).

Adicionalmente, se ha reportado que en pacientes cursando enfermedad infecciosa en estados moderado-avanzado no existen alternativas altamente efectivas frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* (5). Este microorganismo es uno de los agentes más problemáticos en este tipo de pacientes ya que su presencia se correlaciona mayor con la mortalidad y morbilidad que otros microorganismos presentes durante el curso de la enfermedad (1,5,6).

En este trabajo se propone modular la liberación y potenciar el efecto antibacteriano de ciprofloxacino (CIP), un antibiótico cuya solubilidad fue aumentada al ser formulado como dispersión sólida amorfa (ASD) en gelatina. El proyecto se enfoca en crear una plataforma que use CIP como dispersión sólida amorfa o ASD por sus siglas en inglés (Amorphous Solid Dispersion), mejorando la disolución, asociado a excipientes que aumenten la eficacia antibiótica. El objetivo es crear un tratamiento inhalable antimicrobiano contra *Pseudomonas aeruginosa*, que permita disminuir la frecuencia de administración del tratamiento en pacientes con FQ y aumentar la adherencia a la terapia.

La FQ es una enfermedad genética actualmente sin cura cuyo manejo supone altos costos con una baja expectativa de vida (7). Se ha estimado que el costo promedio por persona para el abordaje integral de la enfermedad se encuentra entre los \$11,070 y \$45,658 USD, y que pacientes afectados por infección crónica por *P. aeruginosa* conllevan un gasto hasta 3 veces mayor que el paciente no infectado (8–11). Dentro de la fisiopatología de la enfermedad, una mutación de la proteína CFTR, que actúa como canal transportador de cloro desde el medio celular hacia el lumen respiratorio produce una disminución de la disponibilidad del ion cloro en el espacio respiratorio. Esto conlleva a una reducción en la atracción de agua al lumen respiratorio y con esto una menor humectación de las secreciones mucosas del pulmón, las cuales se vuelven espesas y pegajosas, lo que dificulta su eliminación (12). Así, en pacientes que cursan esta enfermedad se produce una acumulación de la mucosidad en las vías respiratorias, lo que

produce obstrucción, inflamación y **un ambiente idóneo para el desarrollo de infecciones recurrentes (Figura 1)** (12). La progresión de estas infecciones conduce a un estado crónico en el que se produce daño continuo en el parénquima pulmonar por lo que se vuelve fibrótico y deplora su función (12). Por esto se ha determinado que la **resolución de las infecciones crónicas en FQ son el mayor predictor de morbi-mortalidad en los pacientes (5)**.

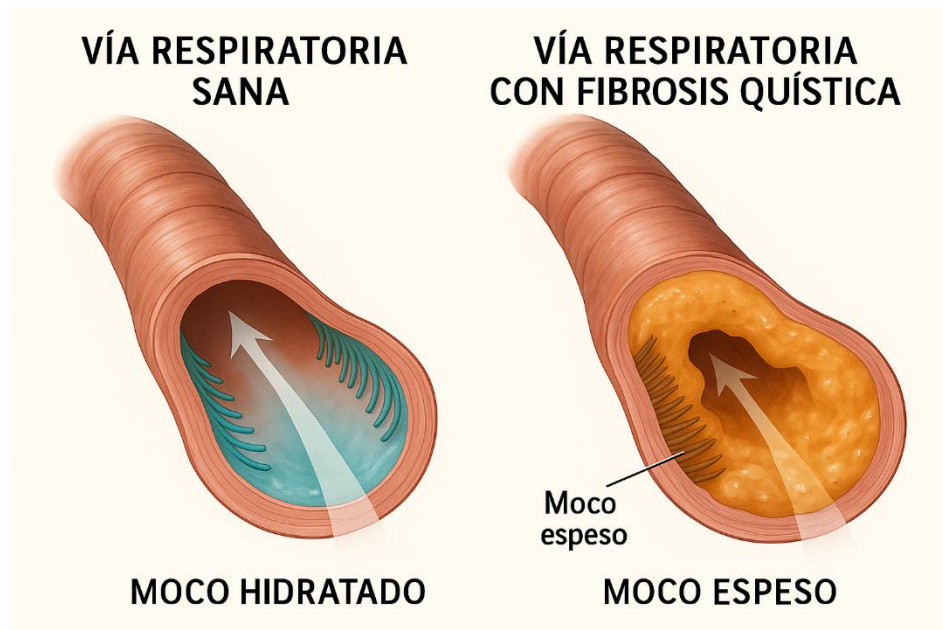


Figura 1. Diferencias en las vías respiratorias entre individuos sanos y pacientes con enfermedades mucoobstructivas, como la fibrosis quística. Se observa una capa de moco más gruesa en los pacientes, lo que reduce el calibre de la vía aérea y dificulta el transporte de aire.

En los últimos años, con el empleo de tratamientos combinados de moduladores de la proteína CFTR como Trikafta® (elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor e ivacaftor) (Vertex Pharmaceuticals) o Symdeko® (tezacaftor/ivacaftor e ivacaftor) (Vertex Pharmaceuticals) se ha logrado aumentar la supervivencia media de los pacientes con FQ de 45 años entre los años 2015-2019 a 65 años en los años 2020 - 2025 (13). Pese a este considerable aumento, el tratamiento con moduladores de CFTR es un tratamiento costoso (Trikafta® \$300.000 USD por persona por año) y permanente (14). Adicionalmente alrededor de 10% de los pacientes no son elegibles para el tratamiento por los moduladores por genotipo no compatible o por edad avanzada (13).

En estos pacientes, la acumulación de mucus y la colonización de *P. aeruginosa* sobre la matriz rígida del moco continúa siendo un gran problema. *P. aeruginosa* continúa siendo el microorganismo más predominante en los pacientes con sobrevida más alta (**Figura 2**), y por

ende se evidencia que el abordaje integral de este patógeno es de los hitos más importante a sobrellevar en la enfermedad infecciosa de la FQ (6). Sin embargo, el desafío es grande, ya que entre los patógenos comúnmente afectando a pacientes con FQ, *P. aeruginosa* es la **más problemática** de tratar debido a la gran variedad de factores de virulencia expresados por la especie (5). Entre estos se encuentra la expresión de lipopolisacárido, porinas, lectinas, flagelo, pili, sistemas de secreción de enzimas proteolíticas y exotoxinas, y el despliegue de una biopelícula externa de polisacárido de alginato de alto peso molecular (15). Este último mecanismo ha sido ampliamente investigado ya que el despliegue de la biopelícula ha determinado en gran medida la alta resistencia antibiótica de las cepas productoras de biopelícula (16–20). Esto se debe a la gran robustez de la barrera física del polisacárido de alginato, el cual es el componente principal de la biopelícula e impide la penetración de agentes antimicrobianos y células fagocíticas (21–24). El alginato en la biopelícula presenta entrelazamiento entre sus monosacáridos fundamentales ácido D-manurónico y L-gulurónico, además de encontrarse parcialmente O-acetilado, lo que aumenta su viscosidad y lo hace presentarse al lumen respiratorio con una capa externa de carga negativa (21–24). Por medio de esta carga negativa se ha identificado también la capacidad de unir antibióticos de carga positiva, tales como la tobramicina, ampliamente utilizada en la vía inhalable, de manera que disminuye su capacidad de permear la biopelícula (25–28).

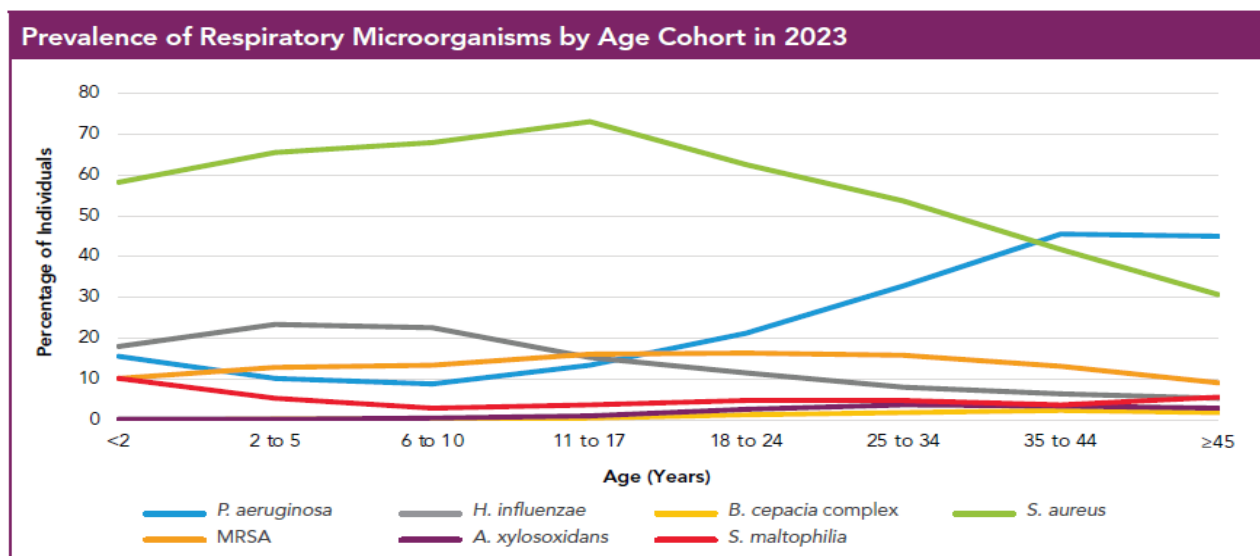


Figura 2. Prevalencia de microorganismos respiratorios por cohorte de edad hasta 2023. Se observa una prevalencia general de *Staphylococcus aureus* hasta los 35 años, donde en los últimos dos cohortes *P. aeruginosa* se convierte en el microorganismo más prevalente. (Figura extraída de reporte de pacientes anual, fundación de fibrosis quística (6))

En pacientes con fibrosis quística las cepas de *P. aeruginosa* toman provecho del moco con viscosidad aumentada de los pacientes para adherirse y colonizarlo (**Figura 3**). Crecer dentro de la matriz rígida del moco también ayuda a la maduración, adhesión, arquitectura y estabilidad de la biopelícula (22,29,30).

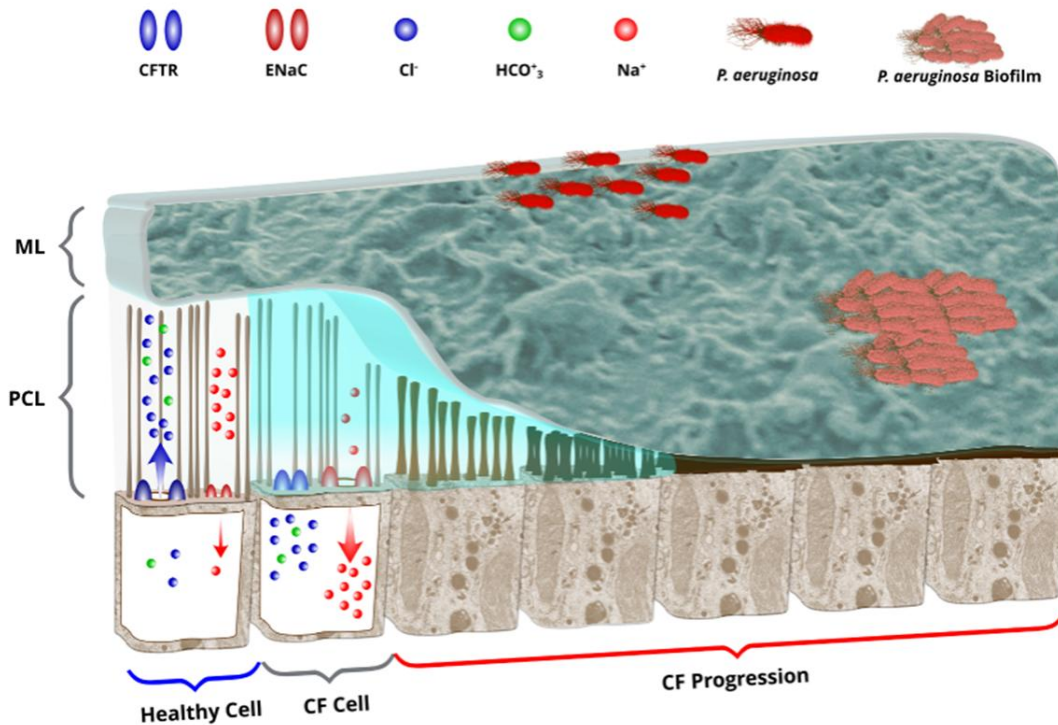


Figura 3. Representación esquemática de la progresión de infección por *P. aeruginosa* en el pulmón con fibrosis quística (CF) (3). La disfunción del canal regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés) altera el equilibrio iónico y disminuye la altura del líquido periciliar (PCL), lo que favorece la acumulación de la capa de moco (ML, por sus siglas en inglés) y la colonización bacteriana persistente por bacterias oportunistas.

El arsenal de tratamiento actual para estas infecciones está dado principalmente por antibióticos orales, o inhalables por nebulización o a través de inhaladores de polvo seco (1). En Chile no existe un consenso en el esquema de tratamiento entre centros asistenciales para infección crónica en estos pacientes, sin embargo, algunas de las alternativas más practicadas son tobramicina inhalada (nebulizada o polvo seco) por 28 días y luego 28 de descanso. De forma similar, colistina inhalada se administra en el mismo esquema que tobramicina. Ante respuesta insuficiente se recurre a la alternación de estos medicamentos con azitromicina como coadyuvante. Ante fallo al tratamiento anterior y con evidencia de resistencia a otros agentes

antimicrobianos la tercera línea es aztreonam nebulizado 75 mg cada 8 h por 30 días, alternando después de este plazo con colistina o tobramicina (4). Así, y considerando el estado crónico del paciente, los antibióticos orales ven limitado su uso porque presentan toxicidades elevadas ya que altas dosis deben ser administradas para remediar su baja distribución al pulmón. Por otro lado, los antibióticos nebulizados como aztreonam, colistina o tobramicina requieren largos tiempos de administración, reiteradas veces al día, lo que disminuye la adherencia a la terapia y determina el fracaso terapéutico(7,31–33). A su vez, los antibióticos que han sido formulados como polvo seco de inhalación en el mercado como tobramicina (Tobi Podhaler, Novartis) o Colistina no gozan de la eficacia deseada para erradicar la infección en pacientes cursando estados infecciosos moderados a severos (5,34). Por lo tanto, para prolongar la expectativa de vida de los pacientes **se necesita un tratamiento eficaz contra *P. aeruginosa*, de cómoda administración, y que permita** aumentar la pobre adherencia a los tratamientos actuales.

Los inhaladores de polvo seco o Dry powder inhalers (DPIs) son un sistema de inhalación ideal para lograr el objetivo de entregar alta carga de activos en el pulmón en un corto período de administración debido a la gran versatilidad que permiten. Su característica distintiva como alternativa inhalable es que la forma farmacéutica es un sólido con bajo porcentaje de humedad lo que reduce la oportunidad de degradación o problemas de estabilidad. Además, esta forma farmacéutica permite mayor variedad de configuraciones al momento de procesar la formulación (i.e. droga pura, mezclas binarias, sistemas matriciales, microencapsulación), además de una estabilidad elevada del producto final comparada con los otros sistemas de inhalación (35–37). El problema, es que pese a la flexibilidad de la tecnología para formular DPIs la regulación tiene una lista realmente acotada de excipientes aprobados para inhalación oral (38,39). En el trabajo de Behrend et al, (2023) nuestro grupo de investigación consideró el uso de gelatina como transportador de fármacos, usando gelificación ionotrópica como estrategia para modular la liberación de activos en formulaciones inhalables en polvo seco para COPD y EPOC. En dicho estudio se demostró que tanto los activos (cromoglicato de sodio y bromuro de ipratropio) como la gelatina y el entrecruzador utilizado fueron compatibles con células de epitelio alveolar (células A549) (40). La ventaja de este acercamiento fue que gelatina tiene su uso permitido para la vía inhalable oral por la FDA en altas dosis y permitió generar formulaciones de polvo seco altamente aerosilizables (FPF >55%) (41).

Posterior al trabajo de Behrend, nuestro grupo de investigación exploró la misma estrategia para el desarrollo de una plataforma de inhalación para CIP, un antibiótico con alta eficacia contra infecciones producidas por *P. aeruginosa* pero con solubilidad pH dependiente (42). En tal trabajo

se produjeron microesferas de gelatina (CIP-GA) para aumentar su disolución en pH fisiológico del pulmón (pH 7,4) mediante la formación de ASD (**Figura 4**). Las microesferas de CIP-GA aumentaron 10 veces la disolución de CIP y superaron a CIP como sal conjugada (CIP HCl) en cuanto a capacidad de erradicación de biopelículas de *P. aeruginosa in vitro* (43). No obstante, a pesar de que en el trabajo se demostró el aumento en la solubilidad del activo y la disolución prolongada en el tiempo de CIP por al menos 6 horas, **la plataforma de las microesférás no permite maximizar la liberación del activo** ni reducir la agregación intrínseca de partículas micronizadas en el rango respirable.

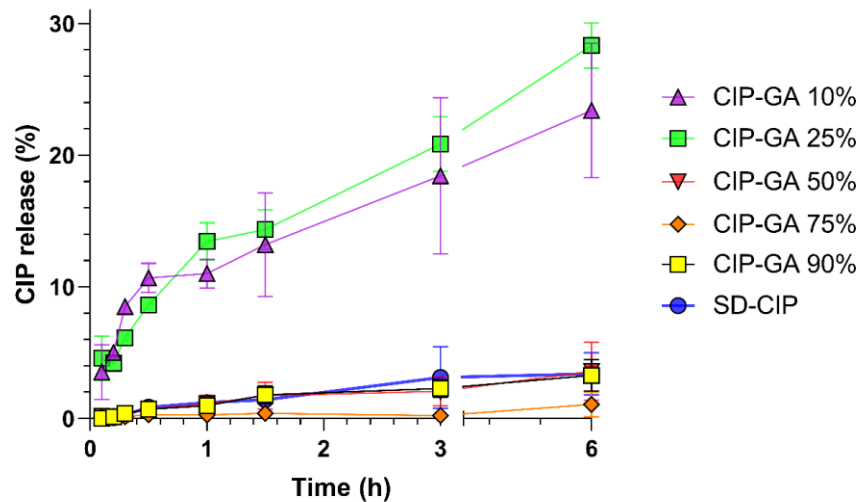


Figura 4. Perfil de disolución de las microesferas de CIP. CIP-GA a distintas proporciones CIP (de 10 al 90%) comparado a CIP procesado por secado por atomización sin gelatina (SD-CIP) mediante test de disolución con celdas de Franz.

En el siguiente trabajo se propuso como estrategia para modular la liberación y reducir la aglomeración de partículas micronizadas el uso de recubrimientos lipídicos en base a ácido palmítico, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (surfactante natural del pulmón) y dos formadores de poros para mediar la salida de activos desde microcápsulas respirables. Estos nuevos agentes de recubrimiento y porógenos ofrecen la oportunidad mejorar la funcionalidad de la formulación. Así, el recubrimiento lipídico busca reducir las energías de superficie remanentes en partículas micronizadas, como estrategia para facilitar la desagregación de partículas, siguiendo la estrategia de Fults y colaboradores (44). Por otro lado, la estrategia considera el uso de manosa como formador de poro. Manosa es un monosacárido soluble en el pH pulmonar y se ha evidenciado que puede ayudar a inhibir infecciones del tracto urinario, posiblemente impidiendo la adhesión de bacterias al epitelio (45–48). Por este mismo mecanismo podría ayudar para

prevenir re-infecciones en el tracto respiratorio dado que ha demostrado que es capaz de reducir la viabilidad de biopelículas de *P. aeruginosa* (49). Por lo tanto, sería un promisorio agente porógeno para complementar la acción de CIP en a formulación.

Relacionado al recubrimiento, entre diversas investigaciones que han probado varios ácidos grasos, el ácido palmítico fue seleccionado como material de recubrimiento porque posee una cadena de 12 carbonos desde el grupo carboxilo, lo que le otorga una densidad suficiente para formar una pared rígida para encapsular las microesferas. El objetivo es que dicha densidad no convierta a la partícula en una microcápsula demasiado pesada, perdiendo así sus características aerodinámicas en mayor medida. El DPPC fue agregado también al recubrimiento ya que este es el surfactante fisiológico del pulmón y al depositar las microcápsulas en el alveolo puede disminuir la tensión superficial del epitelio, distendiéndolo para aumentar la superficie de intercambio gaseoso, además de aumentar la solubilidad de las partículas de CIP que se filtren fuera del reservorio a lo largo del tiempo. Se ha reportado también que *in vitro* ácido palmítico potencia la acción de DPPC como surfactante, ayudándolo a disminuir la tensión superficial del alvéolo contraído (50–52).

Hasta la fecha, no existe un trabajo que explore el potencial impacto bivalente de D-manosa como un excipiente porógeno en la disolución y como antimicrobiano complementario. Actualmente las estrategias de manufactura se centran en la formación de estructuras altamente porosas y de baja densidad para lograr un desempeño aerodinámico adecuado para depositarse en los sitios de acción. Alternativamente se utilizan estructuras lipídicas con porogenos por degradación para liberar controladamente el activo por un largo periodo de tiempo. Este trabajo explora la efectividad de aumentar la disolución de un agente terapéutico altamente efectivo como CIP por medio de la combinación de dos estrategias, la formación de una dispersión solida amorfa del activo con gelatina, y el potencial de porógenos por disolución para generar canales y una estructura semipermeable que utilice un mecanismo osmótico para atraer medio de disolución hacia la microcápsula. La ventaja de este último acercamiento es que el empleo de porogenos por disolución como D-manosa es que permite una formación de poros in situ mucho más rápida que los polímeros empleados como porógeno por degradación, lo que podría aumentar la efectividad antimicrobiana del tratamiento. Este enfoque podría llenar el vacío que existe hoy en día para el tratamiento de estados complejos por infección de *P. aeruginosa* en pacientes con FQ.

Por lo anterior, el diseño de la formulación busca generar un sistema similar a microcápsulas osmóticas, usando a la gelatina como un agente osmótico que atrae al interior al agua del medio, aprovechando los poros de la capa lipídica para aumentar la salida del activo desde el núcleo.

Objetivo General:

Desarrollar microcápsulas inhalables de CIP amorfizado con recubrimiento lipídico y un formador de poro por secado por atomización para mejorar su eficacia antimicrobiana contra biopelículas de *P. aeruginosa*.

Objetivos Específicos:

1. Producir microcápsulas ciprofloxacino recubiertas con una película lipídica (ácido palmítico y DPPC) discontinuada por un formador de poros (D-manosa o NaCl) mediante la técnica de SD.
2. Determinar la capacidad de encapsulación de las microcápsulas con dos estrategias de formador de poros (D-manosa o NaCl) vs microcápsulas sin formadores de poros.
3. Evaluar el perfil de liberación de ciprofloxacino desde las microcápsulas con 2 estrategias de formador de poro (D-manosa o NaCl) y sus propiedades aerodinámicas.
4. Comprender la morfología de las microcápsulas con formadores de poro comparado a las microesferas.
5. Determinar la eficacia antimicrobiana de las microcápsulas de ciprofloxacino sobre biopelículas de *P. aeruginosa*.
6. Evaluar el perfil de citotoxicidad de las microcápsulas sobre un modelo de monocapa epitelio alveolar *in vitro*.

Materiales y Métodos:

Materiales

Ciprofloxacino fue utilizado como su conjugado de sal clorhidrato de ciprofloxacino (CIP HCl), junto con gelatina de tipo A (300 g; Shaanxi Bloom Tech Co., Ltd., Shaaxi, China). Ácido palmítico, D-manosa y 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MA, EE.UU.). Se utilizó ácido acético glacial, acetato de sodio, ácido fosfórico, cápsulas de gelatina número 3 (Capsugel Lonza, Morristown, NJ, EE.UU.), bromuro de potasio (KBr) (Supelco, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), placas de 12 y 96 pocillos (Corning), filtros 0,45 µm de nitrocelulosa, hidróxido de sodio (NaOH), cepa de *P. aeruginosa* (ATCC 27853; Microbiologics Inc. St. Cloud, MN, EE.UU.), caldo de cultivo Luria Bertani y glicerol (Sigma-Aldrich). La línea celular A549 (células epiteliales alveolares) fue adquirida de Merck desde European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Son aisladas de carcinoma de pulmón humano y su modo de crecimiento es en monocapa adherente. Resazurin y azul de tripán fueron obtenidos de Sigma-aldrich.

Métodos

1. Producción de microcápsulas respirables de ciprofloxacino mediante la técnica de SD.

1.1. Preparación de solución de alimentación para el SD: Para producir partículas dentro del perfil de tamaño aerodinámico deseado ($>0,1 \mu\text{m}$ y $<5 \mu\text{m}$) se preparó una solución de alimentación al 1% p/v de sólidos para la fase interna (matriz). CIP y GA fueron disueltos en una proporción 1:3 en buffer acetato pH 4,5 a 45 °C y constante agitación. Estas condiciones demostraron en un estudio previo los mejores perfiles de DSA, disolución y actividad antimicrobiana (43). La solución de recubrimiento fue preparada solubilizando ácido palmítico y DPPC en etanol 96% v/v a 60 °C, mientras que los formadores de poro, D-manosa o NaCl, fueron añadidos posterior a una micronización por molienda tipo jet hasta conseguir un tamaño de partícula de 2 µm (D_{50}) para obtener una suspensión homogénea previo a la atomización (**Figura 5**). Se preparó también una formulación sin la adición de porógenos para verificar el efecto de la adición de estos. En todos los casos la concentración máxima de los sólidos en la solución de recubrimiento se mantuvo en 0,5% p/p como se muestra en la **tabla 1**.

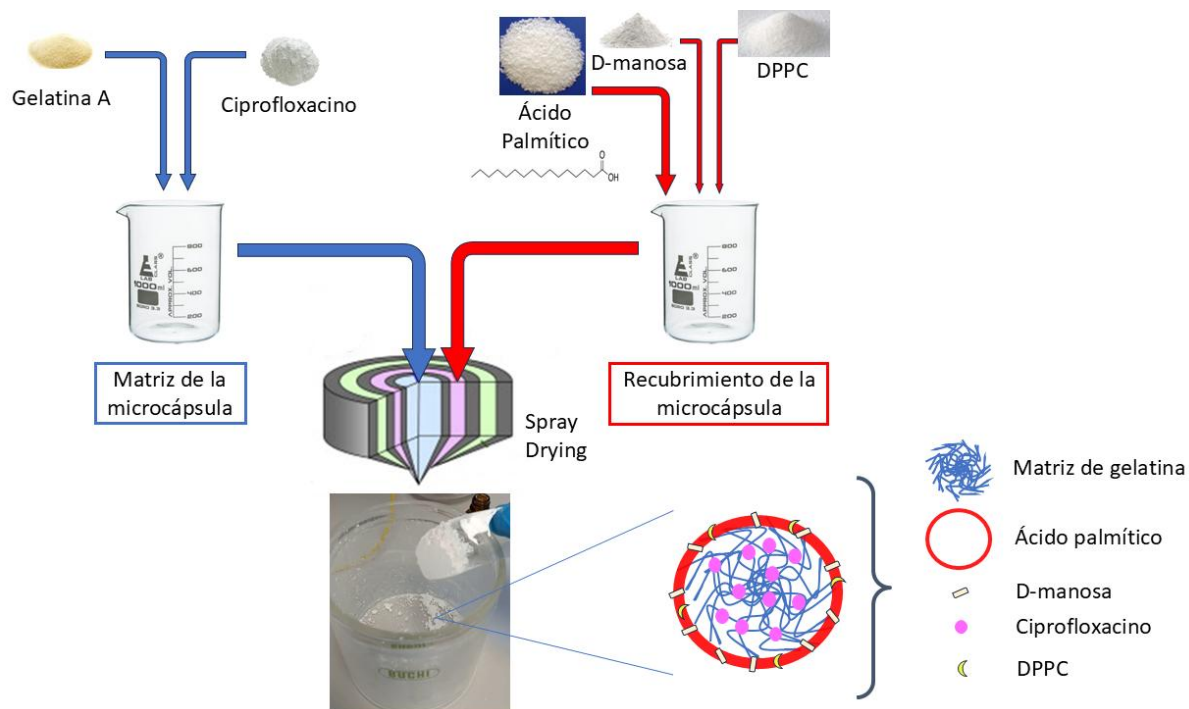


Figura 5. Esquema de método para formación microcápsulas de ciprofloxacino. DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina.

Tabla 1. Formulaciones de microcápsulas de ciprofloxacino con/sin formador de porógeno.

Formulaciones	Fase interna (1%) (matriz)		Fase externa (0,5%) (recubrimiento)	
	Componente	Concentración	Componente	Concentración
Sin porógeno	CIP	0,25%	Ácido palmítico	0,40%
	GA	0,75%	D-manosa	-
			DPPC	0,10%
D-manosa	CIP	0,25%	Ácido palmítico	0,30%
	GA	0,75%	D-manosa	0,15%
			DPPC	0,05%
NaCl	CIP	0,25%	Ácido palmítico	0,3%
	GA	0,75%	NaCl	0,15%
			DPPC	0,05%

CIP: Ciprofloxacino; GA: Gelatina A; DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina.

1.2. Proceso de atomización mediante SD: Las soluciones de alimentación se mantuvieron en agitación y temperatura (45 °C) durante todo el proceso de atomización. Parámetros como velocidad de la bomba de alimentación, flujo de atomización y temperatura de entrada fueron fijados tras un trabajo de optimización realizado previamente en el laboratorio (43). En dicho trabajo se optimizaron las condiciones de operación en base a la fracción de partículas finas (FPF) de las microesferas de gelatina. La velocidad de alimentación se fijó en 0,75 mL/min para la solución del núcleo y en 0,25 mL/min para la solución de recubrimiento. La temperatura de entrada y el flujo de atomización se ajustaron a 200 °C y 742 L/h respectivamente. Una vez terminado el proceso de atomizado, se esperó a que disminuyera la temperatura residual del equipo para facilitar la recolección de las partículas. Una vez había disminuido su energía superficial y su interacción con superficies, estas fueron recolectadas.

1.3 Conservación de muestras: Una vez recolectadas del vaso colector las muestras fueron inmediatamente cerradas con tapa, selladas en Parafilm y guardadas en un desecador para minimizar la absorción de peso en agua e hinchamiento de las microesferas por el comportamiento higroscópico de la gelatina.

2. Evaluación del perfil de liberación de ciprofloxacino desde las microcápsulas con dos estrategias de formador de poro (D-manosa o NaCl).

Las celdas de Franz son un modelo utilizado usualmente para evaluar la permeación a través de membranas (53). En este estudio, las celdas de difusión de Franz fueron usadas para determinar la velocidad de liberación de CIP desde el sistema de reservorio-matriz proporcionado por las microcápsulas. En este ensayo, se masó una cantidad de formulación equivalente en contenido de CIP sobre membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm. La membrana fue posteriormente cubierta entre la tapa superior de la celda de Franz y el compartimiento receptor. Buffer fosfato pH 7,4 fue utilizado como medio de disolución en el compartimiento receptor y fue mantenido a 37 °C mediante un baño termostático y sistema de circulación. Se tomaron muestras desde el compartimiento receptor a los 5, 10, 15, 30, 60, 90, 180 y 360 minutos. En el último tiempo se retiró el filtro y se lavó con buffer acetato de pH 4,5 para solubilizar todo aquel principio activo que no logró disolverse durante la prueba. El porcentaje de activo liberado desde las microcápsulas en el tiempo fue calculado en base al porcentaje de activo disuelto acumulado y el remanente en el filtro.

3. Evaluación de las propiedades aerodinámicas de las microcápsulas de ciprofloxacino:

El diámetro aerodinámico de masa media (MMAD), FPF y fracción respirable (RF) fueron determinados mediante impactación en cascada en un impactador de cascada de nueva generación (NGI). Antes de cada ensayo, la bomba de vacío fue ajustada para generar un diferencial de presión de 4 kPa-s entre la presión interna con la externa del inhalador de polvo seco. Posterior a esto se midió el flujo de aire de entrada con un flujómetro electrónico y se ajustó la válvula solenoide de dos direcciones con un tiempo determinado para permitir que la bomba de vacío estuviese activa solo por el tiempo necesario para simular una inhalación de 4 L de aire, correspondientes al volumen inspiratorio máximo del pulmón de un individuo sano promedio, de acuerdo con lo establecido por el capítulo 601 de la USP para aerosoles, spray nasales e inhaladores de dosis medida (54). Por cada replicado de este ensayo se testearon tres cápsulas cargadas con una masa 15 mg de formulación por cada una. Para todos los replicados se utilizó el mismo dispositivo de DPI (High-Resistance RS01 Monodose DPI, Plastiapex, Berry). La recolección de muestra en los platillos se realizó con buffer acetato pH 4,5 a 45 °C para facilitar la disolución y desprendimiento de la matriz de gelatina desde los platos. Se midió la absorbancia de una muestra de cada sección del impactador y se comparó con una curva de calibrado preparada el mismo día de la medición. A partir de la distribución de masa a lo largo del NGI se determinaron los parámetros de FPF, RF y MMAD.

4. Evaluación de la morfología de más microcápsulas con porógenos:

4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM): Muestras de cada formulación fueron cargados en platillos de metal con cubiertas de carbono. Los platillos luego fueron suavemente golpeados para remover el exceso de polvo. Luego las muestras fueron recubiertas con vapor de oro mediante un EMS 550 sputter coater (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE.UU.). Las muestras fueron analizadas utilizando un FEI Quanta 650 ESEM (FEI, Hillsboro, OR, EE.UU.) bajo vacío a un voltaje de 20 kV con una distancia de trabajo de alrededor de 9 mm.

4.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM): Para la medición, las muestras en suspensión fueron ultra-sonicadas por 3 minutos para separar agregados. Luego una gota (20 µL) de la suspensión fue puesta sobre una grilla de cobre recubierta de carbono y luego secada bajo campana de gases. Las muestras fueron caracterizadas utilizando

un microscopio electrónico de transmisión (Philips CM20, Philips Electron Optics division, Amsterdam, Netherlands).

5. Cuantificar la capacidad de encapsulación de microcápsulas de ácido palmítico y gelatina:

La capacidad de encapsulación de las microcápsulas se determinó mediante el cálculo de la eficiencia de encapsulación (EE). Para esta prueba, se masó una cantidad conocida de muestra y se disolvió en buffer acetato pH 4,5. Para asegurar completa salida de CIP desde las microcápsulas se dejaron los aforos a 37 °C durante 24 h en constante agitación. Luego de este tiempo se tomó una muestra y se determinó la concentración de CIP al comparar su absorbancia con una curva de calibrado de CIP HCl. La absorbancia se midió mediante espectrofotometría UV a $\lambda = 350$ nm en el espectrofotómetro Synergy H1M (Biotek Instruments, Santa Clara, CA, EE.UU.). Con la concentración de la muestra en el aforo se determinó la masa experimental de CIP en la muestra. Así, la eficiencia de encapsulación se calculó mediante la siguiente fórmula:

Eficiencia de encapsulación

$$= \frac{\text{Masa cuantificada experimentalmente de CIP en muestra}}{\text{Masa teórica de CIP en la formulación}} \times 100$$

6. Evaluación de acción antimicrobiana de las microcápsulas en cultivos de biopelículas de *P. aeruginosa*.

6.1. Cultivo de *P. aeruginosa* (PA): PA (ATCC 27853) fue cultivada a partir de stocks almacenados a -80 °C en medio de cultivo Luria Bertani (LB) con 50% glicerol v/v. Al momento del cultivo, una muestra de la suspensión congelada de PA fue inoculada en placas de agar LB a 37 °C. Para formar cultivos en suspensión por crecimiento planctónico, colonias uniformes y homogéneas de las placas de agar previamente cultivadas fueron dispersadas en tubos con 10 mL medio LB. Los tubos fueron llevados a una incubadora agitadora durante la noche a 80 rpm y 37 °C. (55–58)

6.2. Formación de biopelículas de PA: Primero los cultivos en suspensión fueron recolectados por centrifugación. Luego el sedimento de cada tubo fue re-dispersado en medio de cultivo suficiente para ajustar la concentración bacteriana a 3×10^7 Unidades Formadoras de Colonias por mL (UFC/mL) mediante un espectrofotómetro con densidad

óptica 600 nm (DO_{600nm}). Posteriormente se agregaron 2000 μ L de la suspensión ajustada a los pocillos de una placa de 12 pocillos, la que luego fue sellada e incubada a 37 °C durante 1,5 h en un agitador orbital a 75 rpm y 37 °C. Finalmente, se descartó cuidadosamente el sobrenadante de los pocillos y se adicionaron 2000 μ L del medio LB y la placa fue sellada y reincubada a 75 rpm y 37°C por 24 h. (55–58)

6.3. Evaluación de acción de microcápsulas en biopelículas de PA: Para la evaluación en biopelículas, se retiró el medio de cultivo, luego las biopelículas fueron lavadas con 500 μ L de buffer fosfato (PBS) para remover células que no lograron adherirse a los pocillos de las placas. Para agregar el tratamiento CIP HCl, se disolvió una cantidad conocida en buffer acetato pH 4,5 y luego se diluyó ($F_d=30$) con medio de cultivo hasta obtener una concentración de CIP de 125 μ g/mL. Para agregar el tratamiento de las microcápsulas de CIP, se masó una cantidad suficiente de formulación para obtener una concentración de CIP de 125 μ g/mL al ser esta vertida como polvo directamente sobre los pocillos prellenados con 3 mL de medio de cultivo. Los controles negativos fueron llenados con 3 mL de medio de cultivo. Posterior a la adición de los tratamientos, las placas fueron selladas y dispuestas dentro de un incubador a 37 °C y 75 rpm. Después de 1 h la placa fue retirada del incubador para sustraer el medio de cultivo con tratamiento de los pocillos de 1h. Estos pocillos se lavaron con PBS y fueron posteriormente rellenos con medio de cultivo. Luego la placa fue sellada y reincubada con las mismas condiciones previas. Este procedimiento se repitió a las 6 h para los pocillos con tratamiento de 6h. A las 24 h todos los medios fueron retirados, lavados con PBS y las biopelículas restantes fueron dispersadas mediante la adición de PBS y sonicación por 30 min (GT sonic-P3 Professional Ultrasonic Cleaner Washing). Para determinar la viabilidad de las biopelículas se utilizó el método de siembra por goteo para recuento de colonias viables. Las biopelículas dispersadas por sonificado fueron diluidas al décimo y sembradas en placas de agar LB. Luego de 24 h, se determinó la dilución contable (aquella con 3-30 UFC/gota). Con esto se comparó el cambio logarítmico de UFC/mL entre biopelículas tratadas y el grupo control negativo. (55–58).

7. Evaluación del perfil de citotoxicidad de la formulación de microcápsulas inhalables de ciprofloxacino en la línea celular tumoral de epitelio alveolar A549.

7.1. Cultivo celular: Las células alveolares de adenocarcinoma humano (A549) fueron obtenidas de la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) y almacenadas

a -80 °C. Un criovial fue descongelado y se añadieron 200 µL de medio suplementado a 37 °C. Se homogenizó y las células en el criovial se redispersaron completamente en medio de cultivo suplementado a 37 °C. Se verificó la viabilidad celular contabilizando en cámara de Neubauer añadiendo 20 µL de azul de tripán y 20 µL del medio con las células en suspensión. Posteriormente, la suspensión fue sembrada en 3 frascos de cultivo T-25 (5 mL en cada frasco) (Falcon, BD), los que fueron incubados a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% CO₂. El cambio de medio fue efectuado 24 h después y posteriormente día por medio hasta alcanzar una confluencia entre 80-85%.

7.2. Ensayo de viabilidad con resazurin: Frascos con confluencias de 80-85% fueron tripsinizados para obtener una suspensión celular y sembrar 2×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos. A diferencia de la evaluación en biopelículas, las microcápsulas fueron dispersadas previo al tratamiento de las células A549, de acuerdo a la metodología usada por Behrend et al. (40). Para preparar las soluciones tratamiento se masó una cantidad de tratamiento y se dispersó en medio suplementado, facilitando la homogenización mediante agitador vórtex durante 30 segundos. Para desagregar las microcápsulas, las formulaciones fueron sometidas a ultrasonido (GT sonic-P3 Professional Ultrasonic Cleaner Washing) durante 10 min a 37 °C a potencia ultrasónica 100%, equivalente a 100 W. Para asegurar la máxima liberación desde las microcápsulas, las soluciones fueron incubadas por 90 min a 37 °C. El tiempo de incubación fue determinado de acuerdo con los resultados de los estudios de liberación por celda de Franz. Finalmente, cada tratamiento fue filtrado utilizando una jeringa y filtro de 0,45 µm. De lo anterior se obtiene la concentración 1 (C1), la cual fue diluida dos veces en factores de 2 y 5 en medio DMEM suplementado al 2% con FBS, obteniendo concentración 2 y concentración 3, respectivamente. Este procedimiento fue utilizado también en las muestras puras de Ácido palmítico y D-manosa, con la salvedad de que el primero fue disuelto en etanol al 95% para llegar a una concentración de 4mg/mL, y luego diluido con un FD 50 para obtener la C1. Las placas fueron luego incubadas por 24 h a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% CO₂. Posteriormente se descartó el medio suplementado de cada pocillo, y se añadieron 150 µL de resazurin (44 µM) a cada pocillo de la placa. La placa fue luego incubada a 37 °C durante 4 h en atmósfera humidificada con 5% CO₂, protegido de la luz directa. La fluorescencia fue medida con un lector de microplacas Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific) longitud de onda de excitación de 560 nm y 590 nm de emisión. La fluorescencia registrada se correlaciona con el número de células A549 viables por formulación. Los resultados fueron expresados como porcentaje de viabilidad respecto a la

fluorescencia emitida por el grupo control negativo. Se estableció un valor de 80% como umbral de viabilidad.

8. Análisis estadístico de datos

Todos los resultados están representados como el valor promedio \pm la desviación estándar de al menos tres replicados (dos replicados para actividad antibacteriana). Diferencias significativas fueron evaluadas por análisis de varianza aplicando ANOVA one way, con un estudio post-hoc de Tukey HSD $p < 0,05$. Los análisis fueron realizados con el software JMP®10.

Resultados

Tras el proceso de manufactura de las microcápsulas inhalables con recubrimiento y formadores de poro, se seleccionaron los mejores candidatos para su caracterización completa. De este proceso, los datos presentados a continuación resumen la caracterización de la formulación optimizada, siendo la propuesta final de este estudio.

1. Perfil de liberación de ciprofloxacino desde las microcápsulas recubiertas con formadores de poro (D-manosa o NaCl):

En los ensayos de disolución en celdas de Franz las microcápsulas sin porógenos lograron una mayor liberación comparado con CIP Spray dried a todos los tiempos de muestreo, donde al final de 6 h logró disolver un 13,8% de CIP comparado con el 3,4% logrado por CIP spray dried. Por otro lado, las microesferas originales de CIP-GA 25% poseen una disolución más elevada que las microcápsulas sin porógenos, donde estas alcanzan una disolución de ~25 % de CIP a las 6 h. Las formulaciones de microcápsulas con adición de porógenos al 30% de NaCl o D-manosa lograron superar la disolución máxima de CIP de las microesferas a las 6 h, alcanzando un total de disolución de 40,0% y 37,4% respectivamente (**Figura 6**).

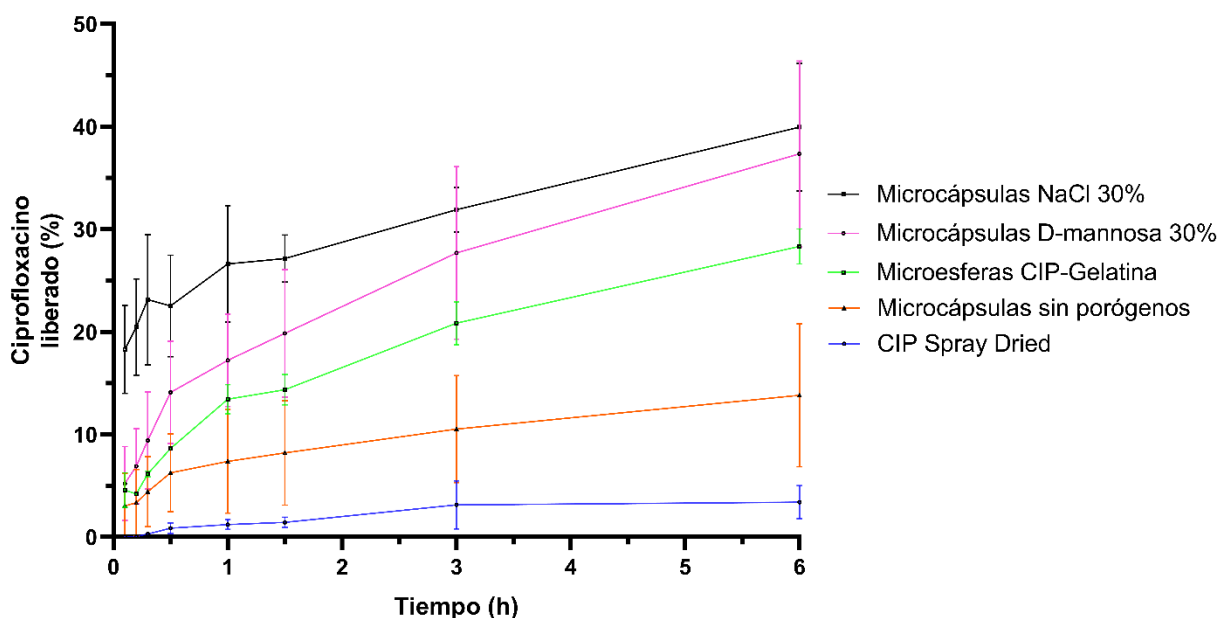


Figura 6. Disolución de CIP desde las diferentes formulaciones. Estudio de la liberación de CIP desde microcápsulas con NaCl o D-manosa (como porógenos), microcápsulas sin adición de porógeno, microesferas y CIP spray dried sin excipientes durante 6 horas (n=3, promedio \pm D.E.).

2. Evaluación de las propiedades aerodinámicas de las microcápsulas de ciprofloxacino:

En el ensayo *in vitro* para conocer el tamaño aerodinámico de las formulaciones se pudo apreciar perfiles similares de deposición a lo largo del impactador para las formulaciones de microcápsulas de D-manosa y microesferas CIP-GA 25% (**Figura 7**). Ambas formulaciones presentaron una tasa de deposición en el puerto de inducción de alrededor del 20% de la formulación (21,7% microcápsulas D-manosa y 22,2% microesferas CIP). No se encontraron diferencias significativas entre porcentajes de deposición de activo, salvo en el platillo o stage 1, representado por partículas con diámetro aerodinámico entre 8,06 y 4,46 micras. Al realizar los cálculos de FPF se evidencia que las microcápsulas mantienen una buena eficiencia aerodinámica tras su proceso de encapsulación, siendo la diferencia de tan solo un 6,26% FPF entre ambas formulaciones (FPF=61,0 ± 1,5% microcápsulas D-manosa, vs 67,3 ± 2,7% microesferas CIP). Esta diferencia se vuelve un poco más pequeña al comparar la RF, donde un 5,15% es lo que separa las fracciones respirables de estas formulaciones (RF=55,4 ± 3,0% microcápsulas D-manosa, vs 60,5 ± 3,2% microesferas CIP), considerando la totalidad de la masa impactada en el impactador, dispositivo y cápsulas. El MMAD de la formulación de microcápsulas fue de 4,6 ± 0,3 µm y de 3,6 ± 0,1 µm para las microesferas (**Tabla 2**)

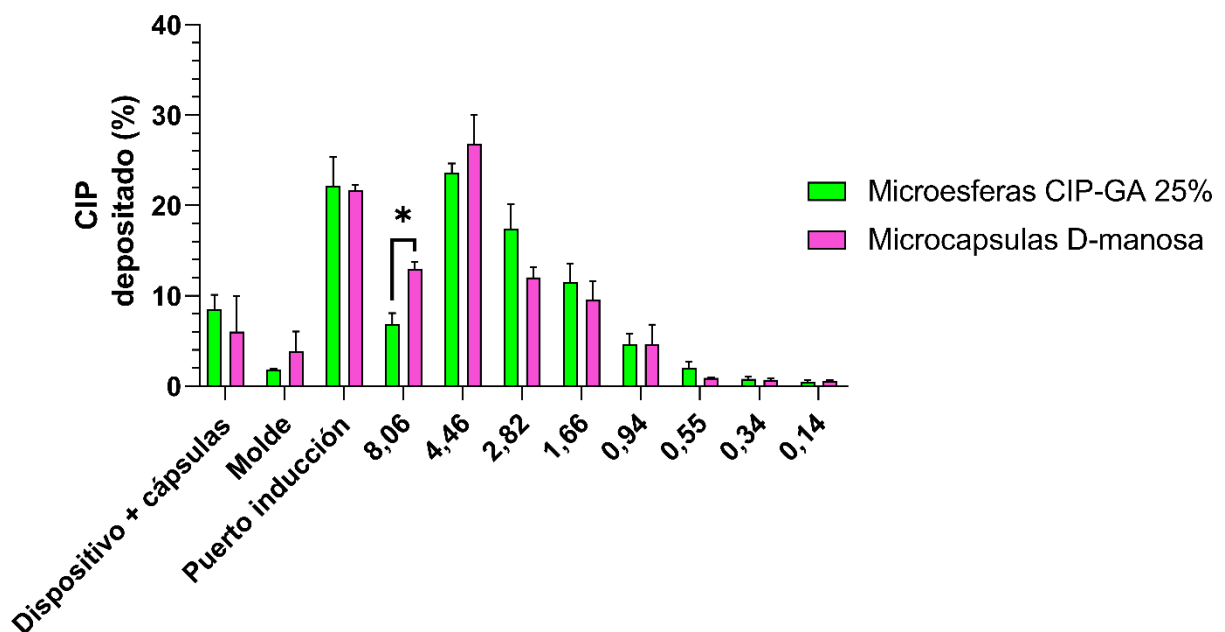


Figura 7. Deposición de microesferas de CIP con y sin recubrimiento a lo largo del impactador de cascada de nueva generación, y el dispositivo inhalador. *p<0,05 (n=3, promedio ± D.E.).

Tabla 2. FPF, RF y MMAD de formulaciones de microcápsulas recubiertas con con D-manosa como porógeno y microesferas de CIP determinadas según impactación en cascada con impactador de nueva generación.

Formulaciones	Microcápsula D-manosa	Microesferas CIP
FPF (%)	61,0 ± 1,5	67,3 ± 2,7
RF (%)	55,4 ± 3,0	60,5 ± 3,2
MMAD (µm)	4,6 ± 0,3	3,6 ± 0,1

3. Determinación de la capacidad de encapsulación del sistema de reservorio-matriz de ácido palmítico y gelatina:

Como se aprecia en la **Figura 8**, la formulación de microcápsulas sin adición de porógeno resultó la composición con menor eficiencia de encapsulación de las probadas, con un 74,8% de encapsulación de CIP. Frente a esto, tanto la formulación de microcápsulas con NaCl, microcápsulas con D-manosa y las microesferas obtuvieron eficiencias mayores al 80% de encapsulación, con un 80,5, 88,9 y un 90,3% respectivamente. No hubo diferencias significativas entre las microcápsulas D-manosa y las microesferas de CIP.

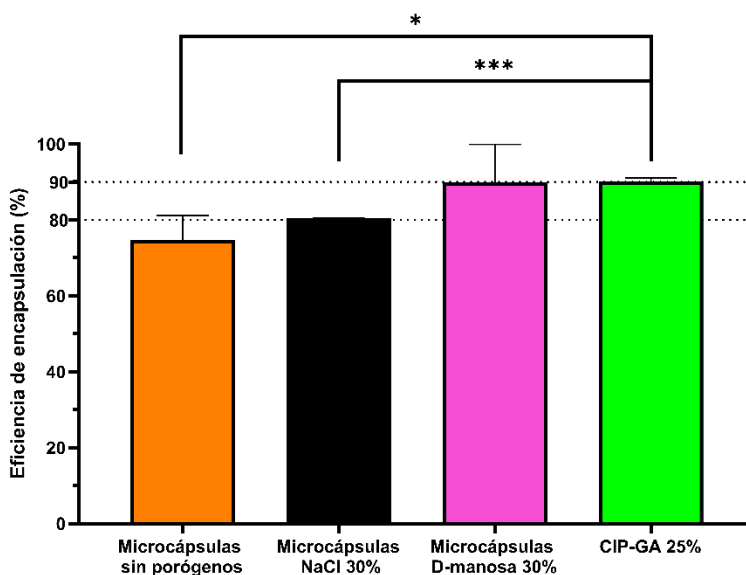


Figura 8. Eficiencia de encapsulación de formulaciones de microcápsulas con NaCl o D-manosa como porógenos, microcápsulas sin porógenos y microesferas. *p<0,05; ***p <0,001. (n=3, promedio ± D.E.).

4. Evaluación de la morfología de más microcápsulas con porógenos:

Al visualizar la morfología superficial de las formulaciones de microcápsulas con D-manosa, microcápsulas con NaCl y microesferas de CIP gelatina se aprecian estructuras esféricas colapsadas irregularmente (**Figura 9**). Las partículas generadas se observan en general indistintas unas de otras. Por otro lado, se pueden identificar diferentes grados de agregación entre las agrupaciones de partículas observadas, donde aparentemente las microcápsulas con NaCl son las que presentan mayor agregación (**Figura 9, A**), luego las microcápsulas con D-manosa (**Figura 9, B**) y finalmente las microesferas se ven más dispersas y utilizando con mayor amplitud el espacio (**Figura 9, C**).

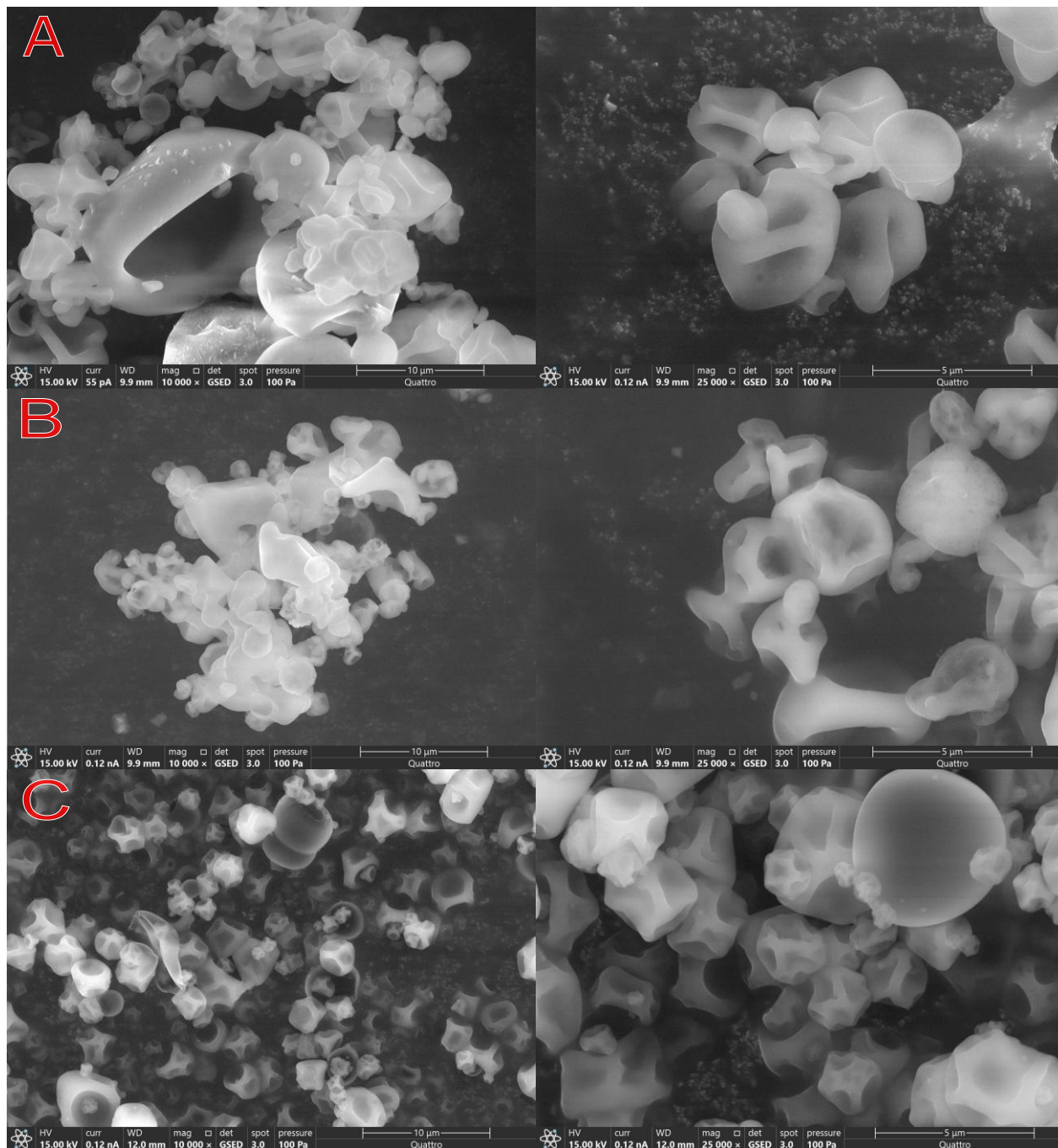


Figura 9. Morfología de microcápsulas con D-manosa (A), microcápsulas con NaCl (B) y microsferas de CIP gelatina (C). Columna izquierda magnificación x10 y columna derecha magnificación x25. En general se observan estructuras esferóides colapsadas con distintos grados de agregación entre la agrupación de partículas observadas.

Al analizar las partículas de microcápsulas con porógenos de D-manosa mediante el microscopio electrónico de transmisión se pueden observar distintos estratos de una

microcápsula convencional, con una capa de recubrimiento y un núcleo de la microcápsula (**Figura 10**). La capa de recubrimiento se encuentra conformada por una delgada y uniforme pared exterior, y un borde interno de mayor grosor, aunque heterogéneo, conformado por unidades irregulares de características cristalinas. Al interior de la microcápsula se observa una estructura amorfa anexada por depósitos de carácter aparentemente cristalinos de variables tamaños. Este núcleo se encuentra levemente separado de algunas de las paredes de la microcápsula por vacío, mientras que se encuentra adherido a otras de las paredes del recubrimiento. En general, la microcápsula en específico observada parece tener un diámetro de alrededor de 1,4 μm .

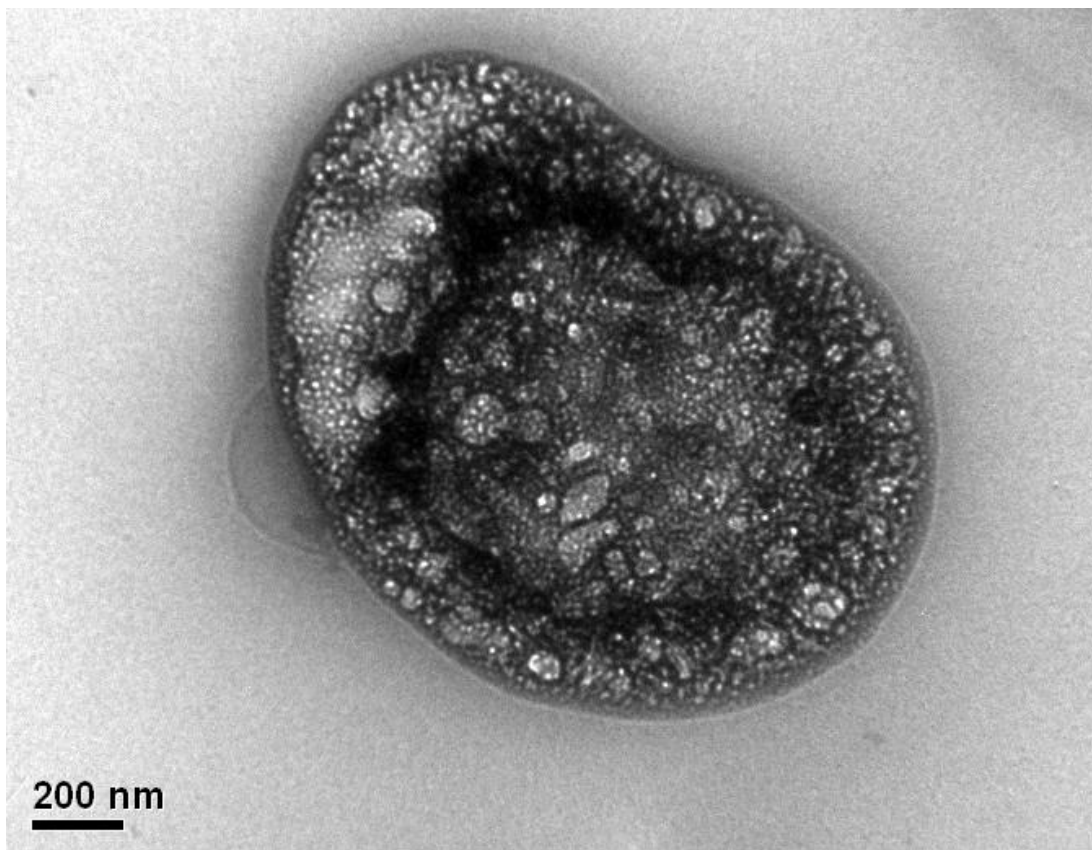


Figura 10. Morfología de microcápsulas de D-manosa observadas mediante microscopio electrónico de transmisión. Se puede observar una delgada capa uniforme delimitante de la microcápsula. Rodeando el borde interno de la capa de recubrimiento se pueden observar una segunda capa de grosor heterogéneo, conformada por depósitos de apariencia cristalina. Luego se evidencia un vacío separando esta última capa de una estructura grande y concisa de aspecto amorfo y rugoso, comprendiendo el núcleo de la microcápsula. Anexado a este núcleo se

observan también algunos depósitos de apariencia cristalina, similares a los observados en el borde interno de la capa de recubrimiento.

5. Evaluación de acción antimicrobiana de las microcápsulas en cultivos de biopelícula de *P. aeruginosa*:

En el estudio de la bioactividad antimicrobiana de las microcápsulas frente a biopelículas de *P. aeruginosa* en el tiempo se visualizaron reducciones significativas de la viabilidad desde el primer tiempo de muestreo a la 1 h (**Figura 11**). A este tiempo se puede ver una mayor reducción de colonias viables de *P. aeruginosa* por parte de la formulación de microcápsulas con D-manosa como porógeno, seguida por las microcápsulas con NaCl, luego las microcápsulas sin porógenos y finalmente CIP disuelto en buffer pH 4,5. Este orden de reducción logarítmica de colonias viables se mantuvo constante durante los siguientes tiempos de muestreo y la viabilidad de las biopelículas continuó disminuyendo de acuerdo con el paso del tiempo para todos los tratamientos aplicados. A pesar de esto no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos de microcápsulas con porógenos de D-manosa y microcápsulas con porógenos de NaCl a las 6 y 24 h.

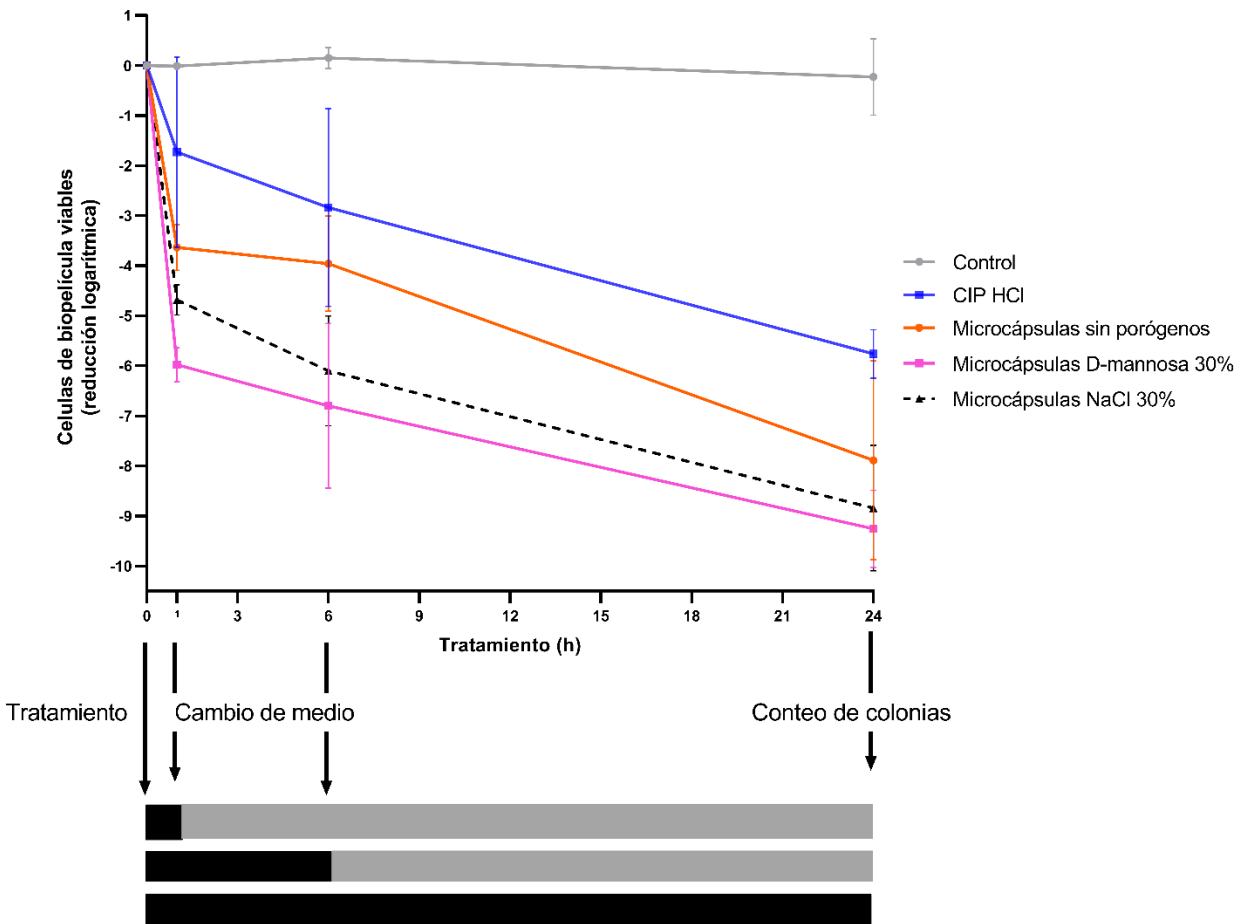


Figura 11. Viabilidad de biopelículas de *P. aeruginosa* tratadas con microcápsulas de CIP. Las biopelículas fueron expuestas a los tratamientos por 1, 6 y 24 h previo a su dispersión y recuento de colonias viables (n=2; promedio \pm D.E.)

6. Evaluación del perfil de citotoxicidad de la formulación de microcápsulas inhalables de ciprofloxacino en la línea celular de epitelio alveolar:

Se pudo observar una relación inversa entre la concentración de microcápsulas CIP con D-mannosa y la viabilidad celular, de modo que concentraciones más bajas mostraron una mayor viabilidad (**Figura 12A**). Por otra parte, esta relación no se presentó de manera tan clara en las formulaciones de microcápsulas CIP con NaCl como porógeno ni en las formulaciones con ácido palmítico como material puro, ya que no se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular entre las tres concentraciones evaluadas (**Figuras 12B y 12C**). Por otro lado, el tratamiento con D-mannosa pura mostró la tendencia opuesta: la viabilidad celular disminuyó al disminuir la concentración del tratamiento (**Figura 12D**). Cabe señalar que para

los tratamientos con materias puras (ácido palmítico y D-manosa) hubo un aumento de viabilidad por sobre 80% del umbral establecido para el experimento. En cuanto a las formulaciones de microcápsulas, solo se lograron valores de viabilidad dentro de los límites establecidos con la concentración más diluida de la microcápsula con porógenos de D-manosa.

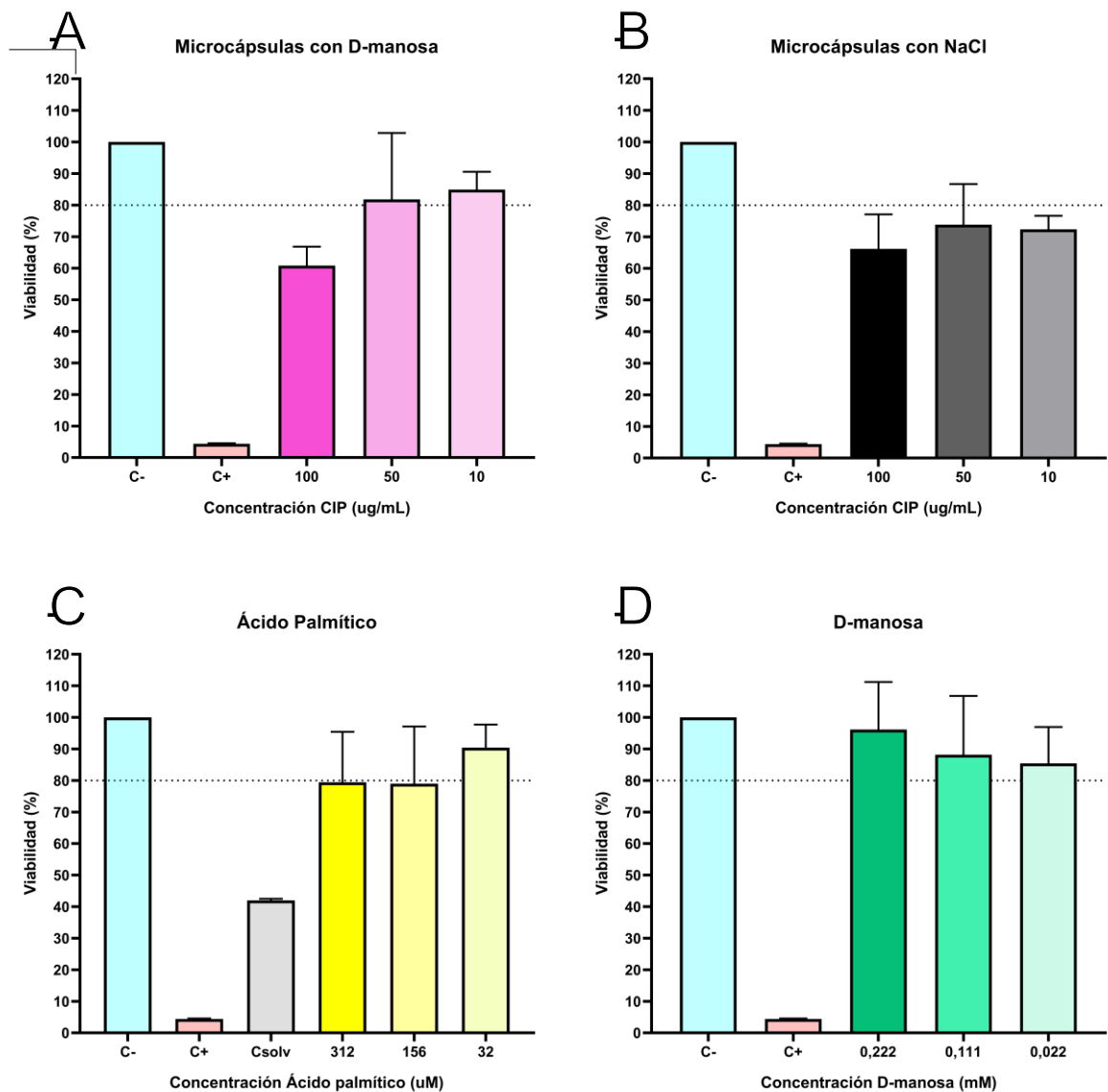


Figura 12. Viabilidad de línea celular A549 en presencia de A) microcápsulas de CIP con D-manosa como porógeno, B) microcápsulas CIP con NaCl como porógeno, C) ácido palmítico, D) D-manosa. (n=2; promedio \pm D.E.)

Discusión

Este estudio propuso y validó una estrategia novedosa para encapsular CIP en una matriz inhalable con recubrimiento lipídico y formadores de poros, orientada al tratamiento de infecciones respiratorias por *P. aeruginosa* en fibrosis quística. Los resultados obtenidos revelan hallazgos relevantes tanto desde el punto de vista biofarmacéutico y consecuentemente con su eficacia antimicrobiana.

La adición de porógenos a microcápsulas aumenta la liberación de CIP por sobre microesferas desnudas

De acuerdo con lo esperado, las microcápsulas sin porógenos mostraron una liberación más lenta de CIP comparado con las microesferas de gelatina con CIP amorfo (CIP-GA), debido a la presencia de una barrera lipídica que retrasa la disolución del fármaco (**Figura 6**). Esta observación es consistente con literatura previa donde recubrimientos con ácido palmítico o DPPC han sido empleados para retardar la liberación de activos hidrofílicos mediante la creación de una membrana semipermeable (59–62).

No obstante, un hallazgo inesperado fue que la incorporación de porógenos hidrosolubles (NaCl o D-manosa) no solo contrarrestó el efecto de barrera del recubrimiento lipídico, sino que promovió una liberación de CIP significativamente mayor que incluso las microesferas desnudas. Esto sugiere que la presencia de porógenos generó microestructuras dentro del recubrimiento lipídico que facilitaron el ingreso del medio de disolución y la posterior liberación del activo. Es posible que se haya producido un mecanismo análogo al de las microcápsulas osmóticas, donde primero ocurre la disolución del porógeno presente en el recubrimiento, luego el ingreso de solvente a través de los poros por gradiente osmótico gatillado por la gelatina generando un aumento de la presión interna que facilita la expulsión del contenido (63,64).

Una de las limitaciones ampliamente conocida sobre los secadores por atomización es su incapacidad de crear partículas mono dispersas. Por lo tanto, no es descartable que se produzcan no solo microcápsulas con CIP, sino también microesferas en las que no se creó la barrera lipídica, otras microesferas parcialmente recubiertas, microcápsulas sin contenido polimérico o CIP dentro, tanto como CIP secado libre de cualquier entramado. Mientras más complejo el sistema en atomización mayor es el grado de error y de polidispersidad de las partículas creadas (65). Incluso se ha identificado que, a las altos flujos de atomización para generar partículas con

características inhalables, mayor es el grado de polidispersidad (66). Añadido a esto se encuentra que, si bien la atomización mediante las tres boquillas del secador por atomización es conducente a las microcápsulas con porógenos estudiadas en este trabajo, el sistema no goza del control para ubicar perfectamente los componentes en el lugar intencionado, como lo tendría un sistema de microfluídica (67,68). Como explica Boel en su revisión, en cada atomización durante la fase de atomizado se genera una distribución de tamaños de gotas. Estas gotas, debido a su variabilidad en tamaño, presentan diferentes patrones de evaporación, masa, aceleración y fuerzas resultantes. En consecuencia, las partículas obtenidas mostrarán características diversas, ya que seguirán distintas trayectorias dentro de la cámara de secado y experimentarán diferentes interacciones, tanto entre las propias gotas como con las paredes internas de la cámara (65).

Es posible entonces que durante la rutina de secado por atomización de las microcápsulas con porógenos, parte de los materiales porógenos se hayan integrado dentro de las microcápsulas, ejerciendo beneficiosamente un efecto osmótico que aumentó la disolución de estas fórmulas por sobre las microesferas desnudas. La alta solubilidad de ambos porógenos en condiciones fisiológicas del pulmón podría haber contribuido a esta dinámica, generando canales de liberación tras su disolución. En los ensayos de microscopía de transmisión se evidenciaron estructuras cristalinas segregadas entre el borde interno de la capa de recubrimiento de la microcápsula formulada con porógenos de D-manosa, tanto como en su interior adheridas al núcleo de estructura amorfa (**Figura 10**). Resulta probable que estas estructuras correspondan a cristales de D-manosa, en vista de que espacialmente se encuentran principalmente concebidas en el borde de la microcápsula, lo cual se encuentra altamente fomentado por el diseño de la boquilla de tres fluidos utilizada para la atomización (**Figura 5**), lo que entrega soporte sobre la teoría de la integración de los porógenos dentro de la microcápsula por limitaciones de la técnica. Aún con esto son necesarios estudios con calorimetría diferencial de barrido para identificar con mayor precisión la identidad de las figuras cristalinas observadas.

Eficacia antimicrobiana aumenta al incrementar la tasa de liberación de CIP y D-manosa potencia el efecto antimicrobiano

En cuanto a la eficacia antimicrobiana, se evidenció una correlación positiva entre la mayor disolución de CIP y la mayor capacidad de erradicación de biopelículas de *P. aeruginosa* a tiempos tempranos. Las formulaciones con D-manosa y NaCl como porógenos lograron

reducciones logarítmicas significativamente superiores en la primera hora de exposición (**Figura 11**). Esto es especialmente relevante, considerando que en condiciones fisiológicas las partículas inhaladas con tamaño entre 3 y 5 μm presentan tasas de aclaramiento alveolar de hasta un 50% en las primeras 2–3 h (69). Por tanto, lograr una rápida liberación inicial puede maximizar la eficacia terapéutica antes de la eliminación física del sistema de administración.

Interesantemente, a pesar de que la formulación con NaCl mostró una mayor liberación de CIP que la de D-manosa, esta última logró una erradicación ligeramente superior durante el primer punto de muestreo. Este resultado sugiere que D-manosa podría tener una acción antimicrobiana o antiadherente intrínseca, probablemente mediante un mecanismo análogo al visto sobre su capacidad para inhibir la adhesión bacteriana mediada por lectinas tipo FimH, descrita previamente para infecciones urinarias (16–20).

Aunque el mecanismo específico en el contexto pulmonar no está completamente dilucidado, es plausible que un efecto similar se manifieste también en biopelículas respiratorias. En efecto, si bien en *P. aeruginosa* no se encuentra descrita la expresión de adhesinas tipo FimH, la D-manosa podría interferir con la adhesión por medio de lectinas tipo B (LecB), las cuales presentan alta afinidad por los monosacáridos L-fucosa y D-manosa (70,71). Esta afinidad por D-manosa podría resultar en una menor formación de biopelículas e incluso una estructura más frágil (72). Efectivamente, en la literatura ya ha sido descrito que D-manosa tiene un efecto considerable en cuanto a la reducción de la proliferación de biopelículas de *P. aeruginosa* en presencia y ausencia de tobramicina con dosis de 2 $\mu\text{g/mL}$, pero sin mayor efecto sobre la proliferación del microorganismo creciendo en su forma planctónica (49). Estos resultados pueden ser explicados también por la estructura actividad que ha sido descrita para el sacárido, donde se ha evidenciado que gracias a la orientación de sus grupos OH puede interactuar con iones de calcio, hendiduras y el residuo de serina 23 de la proteína LecB (73–75), la cual juega un rol importante en cuanto a la maduración, mantención y arquitectura de la biopelícula. Además de esto, Hauber en el pasado evaluó como objetivos las lectinas A y B con los sacáridos fucosa y galactosa en pacientes afectados por FQ y cursando infección con *P. aeruginosa*, y probó que se puede reducir la carga bacteriana recibiendo dosis de 10 mL de fucosa 0,1M/galactosa 0,1M dos veces al día por 21 días (76). Si bien este sería un efecto deseable de D-manosa, la proporción de D-manosa en la formulación es muy baja (7,5%) y futuros estudios específicos sobre el efecto de las formulaciones en la adhesión podrían contribuir a confirmar esta hipótesis.

Microcápsulas con NaCl resultan citotóxicas, microcápsulas con D-manosa superan límite de viabilidad.

En cuanto a la citotoxicidad, se observó una mayor reducción de viabilidad celular con las microcápsulas de D-manosa a concentraciones elevadas de la formulación (**Figura 12A**). Sin embargo, lo opuesto ocurrió al aplicar el tratamiento D-manosa pura, donde en general las concentraciones más altas obtuvieron viabilidades celulares similares a lo observado en el control negativo, y la dilución del tratamiento tuvo un impacto negativo disminuyendo la viabilidad celular. Resultados similares obtuvieron Zhang y colaboradores al tratar células A549 con concentraciones crecientes (0,1mM – 10mM) de D-manosa (77). Respecto al tratamiento con ácido palmítico puro, si bien se observó una tendencia en la que la concentración más diluida mostró un menor impacto negativo sobre la viabilidad celular, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas (**Figura 12C**). La información actualmente disponible sobre los efectos del ácido palmítico en la línea celular utilizada es limitada. No obstante, en contraste con los resultados obtenidos en el presente estudio, algunos reportes han descrito un efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular a partir de concentraciones iguales o superiores a 100 μ M, según criterios similares a los aquí aplicados (77). Los tratamientos efectuados con las microcápsulas con NaCl fueron los que demostraron el peor desempeño, donde ninguna concentración alcanzó el límite de viabilidad por sobre 80% (**Figura 12B**). Las concentraciones de CIP entre tratamientos de microcápsulas de D-manosa y NaCl se encuentran en paridad pues se masaron cantidades diferenciadas según la capacidad de liberación de cada formulación evidenciada en los ensayos de disolución. Por ende, luego de los 90 min de incubación ambas C1 son equivalentes a 100 μ g/mL de CIP. En su mayor parte el ácido palmítico no es capaz de disolverse incluso tras ser sometido por vórtex y ultrasonido por 10 min, por lo que sería filtrado antes de ser aplicado como tratamiento. La diferencia entonces entre estos tratamientos son los porógenos D-manosa y NaCl, los cuales son completamente disueltos en el procesamiento para conseguir el tratamiento final. Sin embargo, los aportes de mOsmoles por parte de los tratamientos con NaCl C1, C2 y C3 son de 1,37; 0,60 y 0,14 mOsmoles respectivamente, por lo que el cambio en la osmolaridad es despreciable y por ende no jugaría un rol relevante en este fenómeno tampoco. Finalmente, si bien entre las microcápsulas de D-manosa y las de NaCl se identificó solo una concentración que cumplió con el límite de viabilidad fijado, se puede discutir también que los valores de viabilidad celular podrían encontrarse subestimados. Algunos autores han postulado la actividad antiproliferativa de CIP sobre células cancerígenas (78–80). Esta hipótesis se basa principalmente en su mecanismo de acción, el cual consiste en la inhibición de la topoisomerasa IV, afectando principalmente aquellos organismos

vivos capaces de rápida replicación de ADN y proliferación, como lo son microorganismos unicelulares como las bacterias, y también células cancerígenas. Consecuentemente, la línea celular A549 utilizada comúnmente para estudios de monocapa celular por su facilidad de replicación y morfología semejante a tejido alveolar, es una línea aislada de adenocarcinoma pulmonar humano. En base a esto, se puede esperar que estudios futuros en líneas celulares epiteliales de origen primario podrían mostrar un efecto de las formulaciones de microcápsulas más citocompatible. Aunque preliminarmente se logró identificar un set parámetros donde la concentración de la formulación de microcápsulas con D-manosa es citocompatible estudios adicionales con células epiteliales primarias y modelos 3D continúan siendo necesarios para establecer con mayor precisión el perfil de seguridad *in vitro* de las microcápsulas desarrolladas.

Desempeño aerodinámico equivalente a microesferas no muestra mejora por cohesividad de partículas micronizadas:

Desde el punto de vista aerodinámico, las microcápsulas mantuvieron un comportamiento respirable adecuado, con un MMAD de $4,63 \pm 0,25 \mu\text{m}$, y una FPF sobre el 60%, indicadores que permiten prever una deposición efectiva en regiones distales del árbol bronquial, superando alternativas actualmente disponibles en el mercado (81–84). El leve aumento en tamaño aerodinámico medio en comparación con las microesferas puede atribuirse al recubrimiento lipídico aumentando la densidad del aerosol, aunque esto no pareció comprometer la fracción respirable de forma significativa (Tabla 2). El análisis estadístico señaló la presencia de diferencias significativas entre las formulaciones solo en la proporción de partículas depositadas en el stage 1 del impactador en cascada, correspondiendo a las partículas con tamaño aerodinámico $>8,06 \mu\text{m}$ ($13,0 \pm 0,6\%$ microcápsulas vs $6,9 \pm 1,0\%$ microesferas) (**Figura 7**). Además de esto, aunque no fue estadísticamente relevante se puede apreciar una leve tendencia de mayor frecuencia de deposición de las microcápsulas de D-manosa entre los stages 1 y 2, mientras que las microesferas tendieron a depositarse en mayor proporción en los stages más avanzados en comparación con las microcápsulas (**Figura 7**). Esto podría ser beneficioso para la formulación de microcápsulas ya que algunos autores han observado que en el caso específico de formulaciones de CIP inhalable podría ser mejor un perfil de deposición mixto – con tendencia hacia deposición bronquial para disminuir los efectos adversos sistémicos del activo tras su absorción a través del epitelio alveolar (85). Aún con esto se debe mantener en cuenta que la deposición prematura en el árbol bronquial también conducirá a la remoción por la barrera mucociliar hacia la deglución y posterior absorción en estomago e intestinos, contrarrestando la ventaja deseada de la vía inhalatoria oral. Por otro lado, las fracciones remanentes en el

dispositivo y cápsulas no varió entre las formulaciones (6,07 +/- 3,21% microcápsulas vs 8,54 +/- 1,27% microesferas) (**Figura 7**). Esto sugiere que la adición de la barrera externa de ácido palmítico no mejoró sobre la excelente desagregación de la formulación de microesferas como era esperado. Las observaciones realizadas mediante la microscopía de barrido entregan confirmación suplementaria sobre este efecto, donde en general las agrupaciones de partículas observadas mostraban mayor agregación por parte de las microcápsulas en comparación con las microesferas (**Figura 9**). Este efecto podría deberse a una mayor cohesión entre las partículas por interacciones hidrofóbicas debido a la capa lipofílica del recubrimiento, además de la ausencia de interacción por cargas, la cual podría en cambio facilitar la dispersión de las microesferas por repulsiones electroestáticas entre las cadenas positivas de la gelatina.

En general la alta retención de la dosis en los dispositivos de inhalación de polvo seco es una barrera de innovación conocida en la literatura (86–88). Por este mismo hecho en la actualidad se continúan investigando distintos mecanismos de aerosolización y diseños de dispositivos que minimicen el efecto de adhesión del polvo a las paredes del inhalador y la cápsula que transporta la formulación (87–89). Sin embargo, es posible que la adición de esta barrera lipídica sobre las microcápsulas pueda conseguir mejores resultados que las microesferas desnudas repitiendo este ensayo posterior a un estudio de estabilidad de estantería. En el presente trabajo las formulaciones fueron evaluadas entre 4 a 6 semanas luego de su producción por spray drying. Además de esto las muestras de polvo bruto recolectadas fueron cuidadosamente resguardadas en frascos ámbar sellados con tapa y Parafilm antes de ser dispuestos dentro de un desecador, muy distinto a las condiciones ambientales a las que se enfrentarían de ser un producto finalizado para ser comercializado. En el pasado se ha estudiado que incluso las diferencias de higroscopicidad de las cápsulas que resguardan la formulación inhalable pueden repercutir en gran medida en la estabilidad de la forma farmacéutica (90,91). Alhaji también comentó en su revisión sobre varios esfuerzos para formular CIP amorfo que se vieron limitados por la rápida pérdida del estado amorfo debido a la higroscopicidad de los polímeros empleados (5). La gelatina, presente en ambas microcápsulas y microesferas como polímero dispersante, no se encuentra ausente de este inconveniente (90,91). La formación de un sistema de reservorio con las microcápsulas podría limitar la absorción de moléculas de agua desde el ambiente para facilitar el estado hidratado o relajado de la gelatina, y por ende mantener los atributos de calidad demostrados en los ensayos de deposición *in vitro* demostrados en este trabajo, comparado con las microesferas. Al comparar el porcentaje acumulativo liberado (porcentaje de dosis emitida) entre las formulaciones de microcápsulas y microesferas no se encuentran mayores diferencias

entre estas, donde ambas obtienen un 90,1% y un 89,6% de fracción liberada desde el inhalador, respectivamente. Esto demuestra la alta compatibilidad entre dispositivo seleccionado y formulación elaborada en este trabajo, siendo estos los dos parámetros modificables en la triada de paciente-dispositivo-formulación que determinan la efectividad de una terapia inhalada.

Eficiencia de encapsulación asegura alto porcentaje de entrega:

La eficiencia de encapsulación (EE) es un parámetro crítico en el diseño de sistemas de liberación controlada, ya que determina la fracción del principio activo incorporado de manera efectiva dentro de la matriz de la formulación. En este estudio, las microcápsulas formuladas con CIP demostraron valores de EE consistentemente altos, todos superiores al 74%, lo que confirma la robustez del sistema desarrollado (**Figura 8**). Particularmente, si bien las microesferas de gelatina (CIP-GA) previamente desarrolladas presentaron la eficiencia de encapsulación más alta con un 90,3%, las microcápsulas diseñadas en este estudio lograron valores altamente competitivos. Las formulaciones con D-manosa y NaCl como porógenos alcanzaron eficiencias de encapsulación de 88,9% y 80,5%, respectivamente, mientras que la formulación sin porógenos presentó un 74,8%. Estos resultados indican que la inclusión de porógenos no compromete la eficiencia del encapsulamiento en gran medida, y en el caso de la D-manosa se equipara al de las microesferas desnudas, ya que no se encontraron diferencias significativas entre las dos formulaciones. La obtención de estos resultados podría atribuirse a varios factores: por un lado, la adición de porógenos podría contribuir a una mayor estabilidad estructural de la matriz durante el secado por atomización, reduciendo la pérdida de CIP hacia el exterior. Por otro, podrían generarse interacciones favorables entre el CIP y los componentes del recubrimiento, contribuyendo a una retención más eficaz del activo. Además, la menor eficiencia de encapsulación observada en las microcápsulas sin porógenos podría deberse a la incompatibilidad fisicoquímica entre el CIP, un principio activo hidrofílico, y la barrera lipídica externa compuesta por ácido palmítico y DPPC, ambos predominantemente hidrofóbicos. En ausencia de regiones polares en la matriz externa, es posible que parte del CIP se difunda hacia el exterior durante el proceso de atomización, o que no quede adecuadamente retenido en el interior de la cápsula, lo que se traduce en una menor EE. Por el contrario, la inclusión de porógenos hidrosolubles como D-manosa o NaCl podría haber favorecido interacciones más estables entre el CIP y el recubrimiento, al generar micro dominios hidrofílicos dentro de la matriz lipídica. Estas regiones polares podrían actuar como puntos de anclaje electrostático con la amina protonada de CIP en el pH ligeramente ácido (pH=4,5) del medio de alimentación, o formar puentes de hidrógeno con CIP a través de su ácido carboxílico y amina y cetona, mejorando así su retención durante el secado y reduciendo su pérdida. Esta

hipótesis es coherente con los valores superiores de EE observados en las formulaciones con porógenos, especialmente con D-manosa, que presenta múltiples grupos hidroxilo capaces de interactuar con el antibiótico.

Estos resultados demuestran que, a pesar de no superar numéricamente a las microesferas, las microcápsulas mantienen una capacidad de retención del principio activo comparable, validando su potencial como una evolución tecnológica con beneficios adicionales en términos de control de liberación y funcionalidad terapéutica. De esta misma forma, estos valores se encuentran dentro del rango superior reportado en la literatura para sistemas de liberación inhalable, lo que refuerza la solidez tecnológica de la plataforma. En formulaciones similares, por ejemplo, con otros polímeros biodegradables como quitosano, polietilenglicol (PEG), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) o Poly- ϵ -caprolactona (PCL), la EE puede variar entre un 3% y 93%, dependiendo del método de encapsulación y polímeros empleados (5,92,93). En conjunto, la elevada EE observada respalda la viabilidad del sistema como plataforma de entrega inhalable, maximizando la eficiencia terapéutica y reduciendo la pérdida de fármaco durante el proceso de formulación y almacenamiento.

Con los resultados de este trabajo se puede identificar un espacio óptimo de diseño para la formulación de CIP como microcápsulas inhalables. Al integrar los datos de inhalación comprobamos que mediante la formulación de microcápsulas es posible administrar una dosis de partículas finas de hasta 2,16 mg mediante la inhalación de cuatro cápsulas. Aunque es sabido que la capacidad de solvatación del pulmón presenta grandes variaciones interpersonales, en una publicación reciente Hastedt en conjunto a un grupo de expertos fundamentaron sobre principios y un marco operativo para avanzar a un sistema de clasificación biofarmacéutica para productos de inhalación (iBCS) (94). En este trabajo admitiendo las variabilidades interpersonales se sugiere un volumen conservador de 10 mL de líquido de revestimiento epitelial pulmonar para calcular y modelar la disolución de activos *in vivo*. En base a estos parámetros se puede estimar en base a los estudios de disolución que se puede lograr una concentración de 32,67 $\mu\text{g/mL}$ dentro de la primera 1 h de disolución. En el caso de los estudios de biopelícula, aunque la concentración de CIP no fue medida durante el ensayo se puede calcular mediante los datos de disolución. En este ensayo los resultados favorables de las microcápsulas de D-manosa se lograron con una liberación de 64,5 $\mu\text{g/mL}$ dentro de la primera hora, y concentraciones de 103,84 y 140,06 a las 3 y 6 h, respectivamente. Estas últimas concentraciones sin embargo podrían también variar en un sistema *in vivo* por medio de los sistemas de depuración alveolar y absorción

sistémica. Si bien la concentración estimada de CIP en las microcápsulas de D-manosa cargadas en las cápsulas utilizadas para las pruebas de deposición (32,67 µg/mL en la primera hora) es inferior a la concentración de 64,5 µg/ml asociado al efecto antimicrobiano observado en los ensayos de biopelículas, esta diferencia es operativamente corregible. En el ensayo de deposición *in vitro*, las cápsulas empleadas fueron llenadas únicamente hasta aproximadamente la mitad de su capacidad total, lo cual implica que la carga de microcápsulas podría incrementarse significativamente sin comprometer la viabilidad del sistema de administración. Además, existe la posibilidad de utilizar cápsulas de mayor volumen y adaptar el dispositivo de inhalación en consecuencia, permitiendo administrar una mayor masa de partículas respirables en una sola inhalación o en dosis fraccionadas (ejemplo cada 12 horas). Estas estrategias permitirían alcanzar concentraciones de CIP más cercanas a las necesarias para inducir efectos antimicrobianos, sin modificar la arquitectura del sistema formulado ni sus propiedades aerodinámicas clave. Esta flexibilidad en la dosificación destaca una de las principales ventajas del sistema de microcápsulas desarrollado, posicionándolo como una plataforma adaptable para terapias inhalatorias con requerimientos de concentración elevados o escalables según la severidad de la infección o la Inter variabilidad personal del entorno pulmonar de los pacientes.

Algunas limitaciones de este estudio como actividades futuras a realizar son algunas relacionadas al ensayo de eficacia antimicrobiana, donde solo se trataron biopelículas formadas como monocapa, por lo cual resta volver a probar las formulaciones en un modelo *in vitro* donde se pueda replicar el crecimiento de las biopelículas de *P. aeruginosa* en una matriz mucosa rígida como las presentes *in vivo*. Por otro lado, si bien se ha evidenciado la formación de la dispersión sólida amorfa de la matriz de gelatina-ciprofloxacino mediante las técnicas aquí empleadas, no se estudió si la formulación de microcápsulas logra igual, mayor o menor grado de amorficidad del principio activo. Sería ideal un estudio de estado amorfo mediante técnicas como calorimetría diferencial de barrido o difracción de rayos X sobre la formulación a varios tiempos para evaluar la presencia y estabilidad de la fase amorfa de la formulación. También como se discutió previamente, se conseguiría información importante suplementando los estudios de citotoxicidad con modelos *in vitro* con células de origen primario o al menos una línea no tumoral para evaluar si efectivamente el mecanismo de CIP sobre la replicación de ADN produce la sobreestimación de citotoxicidad que se presume en este trabajo, lo que aumentaría también el margen terapéutico del tratamiento. Otros estudios que podrían resultar interesantes para entender el mecanismo antibiótico de la formulación es realizar estudios de permeación sobre matrices de alginato para evaluar si la capa externa de ácido palmítico y su ausencia de cargas y una mayor lipoficidad

supone una ventaja por sobre la matriz desnuda de las microesferas al momento de atravesar la barrera polipeptídica de la biopelícula. Otras interacciones relevantes en cuanto a este efecto serían estudiar la capacidad de gelatina en la formulación para interactuar iónicamente con las cargas negativas de las cadenas poliméricas de alginato para generar un proceso de coagulación, y si este efecto pudiese verse disminuido por la adición de la capa lipídica. Finalmente, se deberían estudiar algunas de las unidades formadoras de colonias sobrevivientes a las formulaciones de microcápsulas para evaluar la expresión de algunos factores indicativos de resistencia a los antibióticos tras el uso de ciprofloxacino, el cual ha sido estudiado por inducir la proliferación de variantes resistentes (95–99).

Conclusión

En este trabajo se desarrolló una plataforma inhalable basada en microcápsulas de CIP con recubrimiento lipídico y porógenos hidrosolubles, con el propósito de postular una mejora a los tratamientos de infecciones pulmonares crónicas, como las causadas por *P. aeruginosa* en fibrosis quística. Se demostró que la formulación de microcápsulas con D-manosa como porógeno permitió una liberación sostenida de CIP, alcanzando altas concentraciones capaces de erradicar las biopelículas de *P. aeruginosa*. El desempeño aerodinámico de la formulación fue adecuado para la deposición profunda en el pulmón, posicionándola por sobre otros productos ya disponibles en el mercado. Adicionalmente, las microcápsulas de D-manosa lograron una alta eficiencia de encapsulación y perfil de citocompatibilidad en línea celular A549, lo que la posiciona la formulación como una alternativa prometedora como tratamiento antimicrobiano inhalable. La estrategia propuesta permite escalar o ajustar la dosis administrada para alcanzar concentraciones terapéuticas independiente de variabilidades interpersonales, validando el potencial de la tecnología como plataforma adaptable y clínicamente relevante.

Algunas limitaciones de este estudio como actividades futuras a realizar son algunas relacionadas al ensayo de eficacia antimicrobiana, donde solo se trataron biopelículas formadas como monocapa, por lo cual resta volver a probar las formulaciones en un modelo *in vitro* donde se pueda replicar el crecimiento de las biopelículas de *P. aeruginosa* en una matriz mucosa rígida como las presentes *in vivo*. Por otro lado, si bien se ha evidenciado la formación de la dispersión sólida amorfa de la matriz de gelatina-ciprofloxacino mediante las técnicas aquí empleadas, no se estudió si la formulación de microcápsulas logra igual, mayor o menor grado de amorficidad del principio activo. Sería ideal un estudio de estado amorfo mediante técnicas como calorimetría

diferencial de barrido o difracción de rayos X sobre la formulación a varios tiempos para evaluar la presencia y estabilidad de la fase amorfa de la formulación. También como se discutió previamente, se conseguiría información importante suplementando los estudios de citotoxicidad con modelos *in vitro* con células de origen primario o al menos una línea no tumoral para evaluar si efectivamente el mecanismo de CIP sobre la replicación de ADN produce la sobreestimación de citotoxicidad que se presume en este trabajo, lo que aumentaría también el margen terapéutico del tratamiento. Otros estudios que podrían resultar interesantes para entender el mecanismo antibiótico de la formulación es realizar estudios de permeación sobre matrices de alginato para evaluar si la capa externa de ácido palmítico y su ausencia de cargas y una mayor lipoficidad supone una ventaja por sobre la matriz desnuda de las microesferas al momento de atravesar la barrera polipeptídica de la biopelícula. Otras interacciones relevantes en cuanto a este efecto serían estudiar la capacidad de gelatina en la formulación para interaccionar iónicamente con las cargas negativas de las cadenas poliméricas de alginato para generar un proceso de coagulación, y si este efecto pudiese verse disminuido por la adición de la capa lipídica. Finalmente, se deberían estudiar algunas de las unidades formadores de colonias sobrevivientes a las formulaciones de microcápsulas para evaluar la expresión de algunos factores indicativos de resistencia a los antibióticos tras el uso de ciprofloxacino, el cual ha sido estudiado por inducir la proliferación de variantes resistentes (95–99).

Referencias

1. Vista de Consenso chileno para la atención integral de niños y adultos con fibrosis quística [Internet]. [cited 2023 Jul 2]. Available from: <https://revchilenfermrespir.cl/index.php/RChER/article/view/963/1782>
2. Bregnballe V, Schiøtz PO, Boisen KA, Pressler T, Thastum M. Barriers to adherence in adolescents and young adults with cystic fibrosis: a questionnaire study in young patients and their parents. *Patient Prefer Adherence* [Internet]. 2011 [cited 2025 Jul 25];5:507. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3218111/>
3. Narayanan S, Mainz JG, Gala S, Tabori H, Grosseohme D. Adherence to therapies in cystic fibrosis: a targeted literature review. *Expert Rev Respir Med* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2025 Jul 25];11(2):129–45. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17476348.2017.1280399>
4. Modi AC, Quittner AL. Barriers to Treatment Adherence for Children with Cystic Fibrosis and Asthma: What Gets in the Way? *J Pediatr Psychol* [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 2025 Jul 25];31(8):846–58. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/jpepsy/jsj096>
5. Alhaji N, O'Reilly NJ, Cathcart H. Developing ciprofloxacin dry powder for inhalation: A story of challenges and rational design in the treatment of cystic fibrosis lung infection. *Int J Pharm*. 2022 Feb 5;613:121388.
6. Patient Registry | Cystic Fibrosis Foundation [Internet]. 2021. Available from: <https://www.cff.org/medical-professionals/patient-registry>
7. Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, Macek M, Madge S, Davies JC, et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med*. 2020 Jan;8(1):65–124.
8. Baumann U, Stocklossa C, Greiner W, von der Schulenburg JMG, von der Hardt H. Cost of care and clinical condition in paediatric cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2003 Jun 1;2(2):84–90.
9. Robson M, Abbott J, Webb K, Dodd M, Walsworth-Bell J. A cost description of an adult cystic fibrosis unit and cost analyses of different categories of patients. *Thorax* [Internet]. 1992 Sep 1 [cited 2025 Jul 25];47(9):684–9. Available from: <https://thorax.bmj.com/content/47/9/684>
10. Van Gool K, Norman R, Delatycki MB, Hall J, Massie J. Understanding the Costs of Care for Cystic Fibrosis: An Analysis by Age and Health State. *Value Heal*. 2013 Mar 1;16(2):345–55.
11. Heimeshoff M, Hollmeyer H, Schreyögg J, Tiemann O, Staab D. Cost of illness of cystic fibrosis in Germany: Results from a large cystic fibrosis centre. *Pharmacoeconomics* [Internet]. 2012 Dec 27 [cited 2025 Jul 25];30(9):763–77. Available from: <https://link.springer.com/article/10.2165/11588870-000000000-00000>
12. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2005 May 12 [cited 2023 Apr 8];352(19):1992–2001. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15888700/>
13. 2024 Patient Registry Highlights | Cystic Fibrosis Foundation [Internet]. [cited 2025 Jul 25]. Available from: <https://www.cff.org/medical-professionals/2024-patient-registry-highlights>
14. Guo J, Wang J, Zhang J, Fortunak J, Hill A. Current prices versus minimum costs of production for CFTR modulators. *J Cyst Fibros*. 2022 Sep 1;21(5):866–72.
15. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci* 2021, Vol 22, Page 3128 [Internet]. 2021 Mar 18 [cited 2025 Jul 27];22(6):3128. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/6/3128/htm>
16. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019 Jan 1;37(1):177–92.

17. Hancock REW, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat*. 2000 Aug 1;3(4):247–55.
18. Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clin Exp Optom* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2025 Jul 27];101(2):162–71. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1111/cxo.12621>
19. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* [Internet]. 2002 [cited 2025 Jul 27];95(Suppl 41):22. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1308633/>
20. Smith DJ, Ramsay KA, Yerkovich ST, Reid DW, Wainwright CE, Grimwood K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance in Australian cystic fibrosis centres. *Respirology* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2025 Jul 27];21(2):329–37. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/resp.12714>
21. Boyd A, Chakrabarty AM. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J Ind Microbiol* [Internet]. 1995 Sep 1 [cited 2025 Jul 27];15(3):162–8. Available from: <https://dx.doi.org/10.1007/BF01569821>
22. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2025 Jul 27];77(15):5238–46. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00637-11>
23. Stapper AP, Narasimhan G, Ohman DE, Barakat J, Hentzer M, Molin S, et al. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2025 Jul 27];53(7):679–90. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.45539-0>
24. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* [Internet]. 2001 [cited 2025 Jul 27];183(18):5395–401. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.183.18.5395-5401.2001>
25. Goltermann L, Tolker-Nielsen T. Importance of the exopolysaccharide matrix in antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* aggregates. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2025 Jul 27];61(4). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.02696-16>
26. Anderson GG, Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. In vitro analysis of tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis-derived airway epithelial cells. *Infect Immun* [Internet]. 2008 Apr [cited 2025 Jul 27];76(4):1423–33. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.01373-07>
27. Du J, Bandara HMHN, Du P, Huang H, Hoang K, Nguyen D, et al. Improved biofilm antimicrobial activity of polyethylene glycol conjugated tobramycin compared to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Pharm* [Internet]. 2015 May 4 [cited 2025 Jul 27];12(5):1544–53. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp500846u>
28. Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1985 [cited 2025 Jul 27];27(4):619–24. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.27.4.619>
29. Strateva T, Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol* 2011 614 [Internet]. 2011 May 15 [cited 2025 Jul 27];61(4):717–32. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1007/s13213-011-0273-y>
30. Orgad O, Oren Y, Walker SL, Herzberg M. The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment. *Biofouling* [Internet]. 2011 Aug

- [cited 2025 Jul 27];27(7):787–98. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927014.2011.603145>
31. Coleman CI, Limone B, Sobieraj DM, Lee S, Roberts MS, Kaur R, et al. Dosing Frequency and Medication Adherence in Chronic Disease. *J Manag Care Pharm*. 2012 Sep;18(7):527–39.
 32. Quittner AL, Zhang J, Marynchenko M, Chopra PA, Signorovitch J, Yushkina Y, et al. Pulmonary Medication Adherence and Health-care Use in Cystic Fibrosis. *Chest*. 2014 Jul;146(1):142–51.
 33. Knudsen KB, Pressler T, Mortensen LH, Jarden M, Skov M, Quittner AL, et al. Associations between adherence, depressive symptoms and health-related quality of life in young adults with cystic fibrosis. *Springerplus*. 2016 Dec 29;5(1):1216.
 34. Mayer-Hamblett N, Kloster M, Rosenfeld M, Gibson RL, Retsch-Bogart GZ, Emerson J, et al. Impact of Sustained Eradication of New *Pseudomonas aeruginosa* Infection on Long-term Outcomes in Cystic Fibrosis. *Clin Infect Dis [Internet]*. 2015 Sep 1 [cited 2023 Aug 2];61(5):707–15. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/cid/civ377>
 35. Smyth H. Excipients for Pulmonary Formulations. In: *Excipient Development for Pharmaceutical, Biotechnology, and Drug Delivery Systems*. CRC Press; 2006. p. 225–49.
 36. Barrons R, Pegram A, Borries A. Inhaler device selection: Special considerations in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Heal Pharm*. 2011 Jul 1;68(13):1221–32.
 37. Smyth HD, Hickey AJ. *Controlled Pulmonary Drug Delivery*. Smyth HDC, Hickey AJ, editors. New York, NY: Springer New York; 2011.
 38. Bodier-Montagutelli E, Mayor A, Vecellio L, Respaud R, Heuzé-Vourc'h N. Designing inhaled protein therapeutics for topical lung delivery: what are the next steps? *Expert Opin Drug Deliv*. 2018 Aug 3;15(8):729–36.
 39. Zillen D, Beugeling M, Hinrichs WLJ, Frijlink HW, Grasmeijer F. Natural and bioinspired excipients for dry powder inhalation formulations. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2021 Dec;56:101497.
 40. Behrend-Keim B, Castro-Muñoz A, Monrreal-Ortega L, Ávalos-León B, Campos-Estrada C, Smyth HDC, et al. The forgotten material: Highly dispersible and swellable gelatin-based microspheres for pulmonary drug delivery of cromolyn sodium and ipratropium bromide. *Int J Pharm*. 2023 Sep 25;644:123331.
 41. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products [Internet]. [cited 2022 Oct 29]. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm?event=BasicSearch.page>
 42. Pas T, Vergauwen B, Van den Mooter G. Exploring the feasibility of the use of biopolymers as a carrier in the formulation of amorphous solid dispersions – Part I: Gelatin. *Int J Pharm*. 2018 Jan 15;535(1–2):47–58.
 43. Monrreal-Ortega L, Iturriaga-Gallardo R, Vilicic-Rubio A, Torres P, Leyton P, Morales JO, et al. Gelatin-Based Microspheres of Ciprofloxacin for Enhanced Lung Delivery and Biofilm Eradication in *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infections. *Gels* 2025, Vol 11, Page 567 [Internet]. 2025 Jul 23 [cited 2025 Jul 25];11(8):567. Available from: <https://www.mdpi.com/2310-2861/11/8/567/htm>
 44. Fults KA, Miller IF, Hickey AJ. Effect of Particle Morphology on Emitted Dose of Fatty Acid-Treated Disodium Cromoglycate Powder Aerosols. *Pharm Dev Technol [Internet]*. 1997 [cited 2025 Jul 25];2(1):67–79. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10837459709022610>
 45. Domenici L, Monti M, Bracchi C, Giorgini M, Colagiovanni V, Muzii L, et al. D-mannose: a promising support for acute urinary tract infections in women. A pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci [Internet]*. 2019 Jul 1 [cited 2023 Aug 2];20(13):2920–5. Available from: <https://iris.uniroma1.it/handle/11573/906322>

46. Kyriakides R, Jones P, Somani BK. Role of D-Mannose in the Prevention of Recurrent Urinary Tract Infections: Evidence from a Systematic Review of the Literature. *Eur Urol Focus*. 2021 Sep 1;7(5):1166–9.
47. Kranjčec B, Papeš D, Altarac S. D-mannose powder for prophylaxis of recurrent urinary tract infections in women: A randomized clinical trial. *World J Urol [Internet]*. 2014 Feb [cited 2023 Aug 2];32(1):79–84. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00345-013-1091-6>
48. Lenger SM, Bradley MS, Thomas DA, Bertolet MH, Lowder JL, Sutcliffe S. D-mannose vs other agents for recurrent urinary tract infection prevention in adult women: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2020 Aug 1;223(2):265.e1-265.e13.
49. Bahamondez-Canas T, Smyth HDC. Influence of Excipients on the Antimicrobial Activity of Tobramycin Against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Pharm Res [Internet]*. 2018 Jan 1 [cited 2023 Aug 22];35(1):1–13. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-017-2301-5>
50. Ding J, Takamoto DY, Von Nahmen A, Lipp MM, Lee KYC, Waring AJ, et al. Effects of lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, and palmitic acid on monolayer stability. *Biophys J [Internet]*. 2001 May 1 [cited 2023 Aug 21];80(5):2262–72. Available from: <http://www.cell.com/article/S000634950176198X/fulltext>
51. Nakahara H, Lee S, Shoyama Y, Shibata O. The role of palmitic acid in pulmonary surfactant systems by Langmuir monolayer study: Lipid–peptide interactions. *Soft Matter [Internet]*. 2011 Nov 28 [cited 2023 Aug 21];7(24):11351–9. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2011/sm/c1sm06345f>
52. Cockshutt AM, Absolom DR, Possmayer F. The role of palmitic acid in pulmonary surfactant: enhancement of surface activity and prevention of inhibition by blood proteins. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab*. 1991 Sep 11;1085(2):248–56.
53. Salama RO, Traini D, Chan HK, Young PM. Preparation and characterisation of controlled release co-spray dried drug-polymer microparticles for inhalation 2: evaluation of in vitro release profiling methodologies for controlled release respiratory aerosols. *Eur J Pharm Biopharm [Internet]*. 2008 Sep [cited 2024 Mar 18];70(1):145–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18534832/>
54. <601> Inhalation and Nasal Drug Products: Aerosols, Sprays, and Powders—Performance Quality Tests [Internet]. [cited 2022 Oct 29]. Available from: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99360_05_01.html
55. Bahamondez-Canas TF, Heersema LA, Smyth HDC. Current Status of In Vitro Models and Assays for Susceptibility Testing for Wound Biofilm Infections. *Biomed 2019, Vol 7, Page 34 [Internet]*. 2019 Apr 30 [cited 2022 Oct 30];7(2):34. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9059/7/2/34/htm>
56. Bahamondez-Canas TF, Ferrati S, Moraga-Espinoza DF, Smyth HDC. Development, Characterization, and In Vitro Testing of Co-Delivered Antimicrobial Dry Powder Formulation for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Pharm Sci [Internet]*. 2018 Aug 1 [cited 2022 Oct 30];107(8):2172–8. Available from: <http://jpharmsci.org/article/S0022354918302181/fulltext>
57. Bahamondez-Canas T, Smyth HDC. Influence of Excipients on the Antimicrobial Activity of Tobramycin Against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Pharm Res* 2018 351 [Internet]. 2018 Jan 2 [cited 2022 Oct 30];35(1):1–13. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-017-2301-5>
58. Lababidi N, Ofosu Kissi E, Elgaher WAM, Sigal V, Haupenthal J, Schwarz BC, et al. Spray-drying of inhalable, multifunctional formulations for the treatment of biofilms formed in cystic fibrosis. *J Control Release*. 2019 Nov 28;314:62–71.
59. Lengyel M, Kállai-Szabó N, Antal V, Laki AJ, Antal I. Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Sci Pharm* 2019, Vol 87, Page 20 [Internet].

- 2019 Aug 9 [cited 2025 May 27];87(3):20. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-0532/87/3/20/htm>
60. Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaer W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2025 May 27];8(5):e09394. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9118483/>
 61. Campos Pacheco JE, Vitali A, Falkman P, Marauri A, Marchès A, Al-Najjar H, et al. Bioinspired lipid coated porous particle as inhalable carrier with pulmonary surfactant adhesion and mucus penetration. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2025 May 22 [cited 2025 May 27];137967. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002197972501358X>
 62. Xie Y, Jin Z, Ma D, Yin TH, Zhao K. Palmitic acid- and cysteine-functionalized nanoparticles overcome mucus and epithelial barrier for oral delivery of drug. *Bioeng Transl Med* [Internet]. 2023 May 1 [cited 2025 May 27];8(3):e10510. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10189451/>
 63. Zhang W, Qu L, Pei H, Qin Z, Didier J, Wu Z, et al. Controllable Fabrication of Inhomogeneous Microcapsules for Triggered Release by Osmotic Pressure. *Small* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2025 May 29];15(42):1903087. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/sml.201903087>
 64. Lee S, Lee TY, Kim DJ, Kim B, Kim SH. Osmotic-Stress-Mediated Control of Membrane Permeability of Polymeric Microcapsules. *Chem Mater* [Internet]. 2018 Oct 23 [cited 2025 May 29];30(20):7211–20. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemmater.8b03230>
 65. Boel E, Koekoekx R, Dedroog S, Babkin I, Vetrano MR, Clasen C, et al. Unraveling Particle Formation: From Single Droplet Drying to Spray Drying and Electrospraying. *Pharm* 2020, Vol 12, Page 625 [Internet]. 2020 Jul 4 [cited 2025 May 29];12(7):625. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/7/625/htm>
 66. Walzel P. Influence of the Spray Method on Product Quality and Morphology in Spray Drying. *Chem Eng Technol* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2025 May 29];34(7):1039–48. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ceat.201100051>
 67. Liu W, Chen XD, Selomulya C. On the spray drying of uniform functional microparticles. *Particuology*. 2015 Oct 1;22:1–12.
 68. Bi D, Wilhelmy C, Unthan D, Keil IS, Zhao B, Kolb B, et al. On the Influence of Fabrication Methods and Materials for mRNA-LNP Production: From Size and Morphology to Internal Structure and mRNA Delivery Performance In Vitro and In Vivo. *Adv Healthc Mater* [Internet]. 2024 Oct 1 [cited 2025 May 29];13(26):2401252. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adhm.202401252>
 69. Geiser M. Update on Macrophage Clearance of Inhaled Micro- and Nanoparticles. <https://home.liebertpub.com/jamp> [Internet]. 2010 Aug 9 [cited 2025 May 27];23(4):207–17. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jamp.2009.0797>
 70. Chemani C, Imberty A, De Bentzmann S, Pierre M, Wimmerová M, Guery BP, et al. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun* [Internet]. 2009 [cited 2025 May 27];77(5):2065–75. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.01204-08>
 71. Scribano D, Sarshar M, Prezioso C, Lucarelli M, Angeloni A, Zagaglia C, et al. d-Mannose Treatment neither Affects Uropathogenic *Escherichia coli* Properties nor Induces Stable FimH Modifications. *Mol* 2020, Vol 25, Page 316 [Internet]. 2020 Jan 13 [cited 2025 May 27];25(2):316. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/2/316/htm>
 72. Passos da Silva D, Matwichuk ML, Townsend DO, Reichhardt C, Lamba D, Wozniak DJ, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2025 Jul 25];10(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-10201-4>

73. Loris R, Tielker D, Jaeger KE, Wyns L. Structural Basis of Carbohydrate Recognition by the Lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol*. 2003 Aug 22;331(4):861–70.
74. Mitchell E, Houles C, Sudakevitz D, Wimmerova M, Gautier C, Pérez S, et al. Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Nat Struct Biol* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2025 Aug 2];9(12):918–21. Available from: <https://www.nature.com/articles/nsb865>
75. Sommer R, Hauck D, Varrot A, Wagner S, Audfray A, Prestel A, et al. Cinnamide Derivatives of d-Mannose as Inhibitors of the Bacterial Virulence Factor LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *ChemistryOpen* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2025 Aug 2];4(6):756–67. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/open.201500162>
76. Hauber HP, Schulz M, Pforte A, Mack D, Zabel P, Schumacher U. Inhalation with Fucose and Galactose for Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients. *Int J Med Sci* [Internet]. 2008 Nov 17 [cited 2025 Aug 2];5(6):371. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2586681/>
77. Zhang Y, Zhou Z, Xiao W, Tang Y, Guan W, Wang J, et al. Inosine and D-Mannose Secreted by Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Affect Viability of Lung Epithelial Cells. *Molecules* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2025 May 30];27(9):2994. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/9/2994/htm>
78. The influence of ciprofloxacin on viability of A549, HepG2, A375.S2, B16 and C6 cell lines in vitro - PubMed [Internet]. [cited 2025 Jun 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22125950/>
79. Abdul Latip AF, Hussein MZ, Stanslas J, Wong CC, Adnan R. Release behavior and toxicity profiles towards A549 cell lines of ciprofloxacin from its layered zinc hydroxide intercalation compound. *Chem Cent J* [Internet]. 2013 Jul 12 [cited 2025 Jun 3];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23849189/>
80. Alaaeldin R, Nazmy MH, Abdel-Aziz M, El-Din A. Abuo-Rahma G, Fathy M. Cell Cycle Arrest and Apoptotic Effect of 7-(4-(N-substituted carbamoylmethyl) piperazin-1-yl) Ciprofloxacin-derivative on HCT 116 and A549 Cancer Cells. *Anticancer Res* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2025 Jun 3];40(5):2739–49. Available from: <https://ar.iijournals.org/content/40/5/2739>
81. Yildiz-Peköz A, Akbal O, Tekarslan SH, Sagirli AO, Mulazimoglu L, Morina D, et al. Preparation and Characterization of Doripenem-Loaded Microparticles for Pulmonary Delivery. <https://home.liebertpub.com/jamp> [Internet]. 2018 Dec 6 [cited 2023 May 21];31(6):347–57. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jamp.2017.1378>
82. Ciciliani AM, Langguth P, Wachtel H. In vitro dose comparison of respimat® inhaler with dry powder inhalers for COPD maintenance therapy. *Int J COPD* [Internet]. 2017 May 26 [cited 2023 May 21];12:1565–77. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=dcop20>
83. Palander A, Manila T, Karhu M, Muttonen E. In vitro comparison of three salbutamol-containing multidose dry powder inhalers, Buventol Easyhaler®, Inspiryl Turbuhaler® and Ventoline Diskus®. *Clin Drug Investig* [Internet]. 2000 Sep 17 [cited 2023 May 21];20(1):25–33. Available from: <https://link.springer.com/article/10.2165/00044011-200020010-00004>
84. Demoly P, Hagedoorn P, De Boer AH, Frijlink HW. The clinical relevance of dry powder inhaler performance for drug delivery. *Respir Med*. 2014 Aug 1;108(8):1195–203.
85. Stass H, Nagelschmitz J, Willmann S, Delesen H, Gupta A, Baumann S. Inhalation of a Dry Powder Ciprofloxacin Formulation in Healthy Subjects: A Phase I Study. *Clin Drug Investig* [Internet]. 2013 Jun [cited 2025 Jun 2];33(6):419. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3664741/>
86. Donovan MJ, Kim SH, Raman V, Smyth HD. Dry Powder Inhaler Device Influence on Carrier Particle Performance. *J Pharm Sci*. 2012 Mar 1;101(3):1097–107.

87. Islam N, Gladki E. Dry powder inhalers (DPIs)—A review of device reliability and innovation. *Int J Pharm*. 2008 Aug 6;360(1–2):1–11.
88. Frijlink HW, De Boer AH. Dry powder inhalers for pulmonary drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* [Internet]. 2004 Nov [cited 2025 Jun 2];1(1):67–86. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/17425247.1.1.67>
89. Donovan MJ, Gibbons A, Herpin MJ, Marek S, McGill SL, Smyth HDC. Novel Dry Powder Inhaler particle-dispersion Systems. *Ther Deliv* [Internet]. 2011 [cited 2025 Jun 2];2(10):1295–311. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4155/tde.11.103>
90. Barham AS, Tewes F, Healy AM. Moisture diffusion and permeability characteristics of hydroxypropylmethylcellulose and hard gelatin capsules. *Int J Pharm*. 2015 Jan 30;478(2):796–803.
91. Yang N, Chen H, Jin Z, Hou J, Zhang Y, Han H, et al. Moisture sorption and desorption properties of gelatin, HPMC and pullulan hard capsules. *Int J Biol Macromol*. 2020 Sep 15;159:659–66.
92. Egorov AR, Kurliuk A V., Rubanik V V., Kirichuk AA, Khubiev O, Golubev R, et al. Chitosan-Based Ciprofloxacin Extended Release Systems: Combined Synthetic and Pharmacological (In Vitro and In Vivo) Studies. *Mol* 2022, Vol 27, Page 8865 [Internet]. 2022 Dec 13 [cited 2025 May 28];27(24):8865. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/24/8865/htm>
93. Du J, El-Sherbiny IM, Smyth HD. Swellable Ciprofloxacin-Loaded Nano-in-Micro Hydrogel Particles for Local Lung Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2014 Nov 27 [cited 2025 May 28];15(6):1535. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4245439/>
94. Hastedt JE, Bäckman P, Cabal A, Clark A, Ehrhardt C, Forbes B, et al. iBCS: 1. Principles and Framework of an Inhalation-Based Biopharmaceutics Classification System. *Mol Pharm* [Internet]. 2022 Jul 4 [cited 2025 Jun 3];19(7):2032–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00113>
95. Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat*. 1999 Feb 1;2(1):38–55.
96. Su HC, Ramkissoon K, Doolittle J, Clark M, Khatun J, Secrest A, et al. The development of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* involves multiple response stages and multiple proteins. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2010 Nov [cited 2025 Aug 8];54(11):4626–35. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.00762-10>
97. Peng J, Cao J, Ng FM, Hill J. *Pseudomonas aeruginosa* develops Ciprofloxacin resistance from low to high level with distinctive proteome changes. *J Proteomics*. 2017 Jan 30;152:75–87.
98. Rehman A, Patrick WM, Lamont IL. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *pseudomonas aeruginosa*: New approaches to an old problem. *J Med Microbiol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 Aug 8];68(1):1–10. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000873>
99. Xu C, Liu H, Pan X, Ma Z, Wang D, Zhang X, et al. Mechanisms for Development of Ciprofloxacin Resistance in a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* [Internet]. 2021 Jan 8 [cited 2025 Aug 8];11:598291. Available from: www.frontiersin.org

