



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“INFILTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES EN VEHÍCULOS BIODEGRADABLES POROSOS PARA EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. SERGIO ALCALÁ ALCALÁ

TUTOR: Dr. DAVID QUINTANAR GUERRERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTOR: Dra. PATRICIA GUADARRAMA ACOSTA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES
Dr. JOSÉ JUAN ESCOBAR CHAVEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MÉXICO, D.F. JUNIO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

- Presidente:** Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira
(FESCuautitlán-UNAM)
- Primer Vocal:** Dra. Helgi Jung Cook
(Facultad de Química-UNAM)
- Segundo Vocal:** Dr. Francisco Hernández Luis
(Facultad de Química-UNAM)
- Tercer Vocal:** Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda
(UAM-Xochimilco)
- Secretario:** Dra. Patricia Guadarrama Acosta
(Instituto de Investigaciones en Materiales-UNAM)

Tutor: Dr. David Quintanar Guerrero

Comité Tutor: Dra. Patricia Guadarrma Acosta
Dr. José Juan Escobar Chávez

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS

Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología en Farmacéutica (L-323), Campo 1, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma México** (UNAM), por formarme con estudios de posgrado de calidad.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por la beca recibida durante mis estudios de doctorado en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. Becario 223443.

A los proyectos **PAPIIT IN222411 e IT201914, DGAPA-UNAM**, por el financiamiento otorgado durante la realización de este trabajo de investigación.

A mi asesor, el **Dr. David Quintanar Guerrero**, por la paciencia, el apoyo y la confianza que me ha brindado desde el primer momento en que trabajamos juntos en el desarrollo de este proyecto. Con quien además comparto los logros obtenidos.

A los miembros de mi Comité Tutor, la **Dra. Patricia Guadarrama Acosta** y al **Dr. José Juan Escobar Chávez**, por las aportaciones y consejos recibidos en cada una de las evaluaciones semestrales.

A los miembros del **Jurado**, por su tiempo, atención y valiosos comentarios que enriquecieron la presentación de este trabajo.

Al técnico **Rodolfo Robles** de la FESCuautitlán-UNAM, por su asistencia en los estudios de microscopía electrónica.

Al **Dr. Enrique Lima Muñoz** del Instituto de Investigaciones en Materiales-UNAM y a la **Dra. Claudia Benítez Cardoza** de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación-ENMyH-IPN, por su apoyo en las determinaciones de área superficial y difracción circular.

A la **QFB. Damaris Cabrero** del Instituto de Investigaciones en Materiales-UNAM, por su colaboración en los estudios de Termogravimetría.

A la **Dra. Flora Adriana Ganem Rondero**, por su amistad, apoyo incondicional, profesionalismo, consejo y por impulsarme a compartir el conocimiento.

A mis **compañeros de laboratorio** y ahora amigos: Gerardo Leyva, Irene Aguilar, Zaida Urbán, Antonio Escobar, Pablo Martínez, Lupita Nava, Elizabeth Piñón, Viridiana Llera, Néstor Mendoza y Sergio Alberto Bernal. A los amigos que me han escuchado y apoyado todo este tiempo: Carlos Chávez, Blas González, Alma Limón, Noel Gutiérrez (†), Hilda Aguayo, Martha Escobar y Erick Híjar.

“Por mi raza hablará el Espíritu”

DEDICADO A:

A mis padres, José y Lola;
A mis hermanos, Eliza, Evelia, Laura, José Alberto, Conchita y Dulce.
A todos mis sobrinos.
Mi mayor tesoro y mi más grande bendición, los amo.
A Dios, por estar presente.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO DE REFERENCIA	5
2.1 Sistemas de liberación controlada (SLC) de fármacos	5
2.1.1 Clasificación de los SLC	7
2.1.2 SLC poliméricos	8
2.2 Polímeros Biodegradables	9
2.2.1 Ácido Poliláctico-co-glicólico (PLGA)	12
2.2.1.1 Propiedades fisicoquímicas y de degradación del PLGA	13
2.2.1.2 Aplicaciones del PLGA en sistemas de liberación de fármacos	15
2.3 Microesferas poliméricas	15
2.3.1 Definición, características y propiedades	15
2.3.2 Métodos de preparación	17
2.3.3 Microesferas porosas	19
2.4 Nanopartículas poliméricas	20
2.4.1 Definición, características y propiedades	20
2.4.2 Métodos de preparación	22
2.5 Péptidos y proteínas como agentes terapéuticos	24
2.5.1 Formulación: propuestas, retos y limitaciones	25
2.5.2 Adsorción de péptidos y proteínas: definición, aplicaciones y características ...	27
2.5.2.1 Isotermas de adsorción	31
2.6 Péptido modelo empleado: acetato de leuprolide	33
2.7 Proteína modelo empleada: α -amilasa	34
III. JUSTIFICACIÓN	36
IV. HIPÓTESIS	38
V. OBJETIVOS	39

5.1 General	39
5.2 Particulares	39
VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	41
6.1 Diagrama de flujo de la metodología experimental	41
6.2 Selección de materiales	42
6.2.1 Polímero biodegradable	43
6.2.2 Fármacos-moléculas modelo	43
6.3 Obtención de microesferas porosas de PLGA	43
6.4 Caracterización de las microesferas porosas de PLGA	43
6.4.1 Talla de partícula y su distribución	43
6.4.2 Morfología	44
6.4.3 Diámetro de poro expuesto	44
6.4.4 Análisis del área superficial y porosidad	44
6.5 Obtención de nanopartículas sólidas de PLGA	44
6.6 Caracterización de las nanopartículas de PLGA	45
6.6.1 Determinación de la talla y distribución de partícula	45
6.6.2 Potencial Z	45
6.6.3 Morfología y análisis del área superficial	46
6.7 Desarrollo y validación de métodos analíticos	46
6.8 Estudios de adsorción sobre los componentes del sistema	46
6.8.1 Adsorción sobre microesferas porosas	46
6.8.2 Adsorción sobre nanopartículas	47
6.9 Obtención de los sistemas ensamblados empleando la tecnología desarrollada por “adsorción/infiltración” de nanopartículas poliméricas en microesferas porosas	47
6.10 Caracterización física de los sistemas ensamblados	48
6.10.1 Eficiencia de adsorción de los fármacos modelo	48
6.10.2 Eficiencia de adsorción e infiltración de nanopartículas	49
6.10.3 Morfología	49
6.10.4 Análisis de área superficial	49
6.10.5 Calorimetría diferencial de barrido	49
6.10.6 Termogravimetría	49
6.11 Estudios de liberación <i>in vitro</i>	50
6.11.1 Determinación del mecanismo de liberación	50
6.12 Evaluación de la estabilidad de los fármacos modelo	50

6.12.1 Dicroísmo circular	50
6.12.2 Actividad enzimática	51
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
7.1 Obtención y caracterización de microesferas porosas biodegradables	52
7.2 Obtención y caracterización de nanopartículas sólidas biodegradables	53
7.3 Adsorción de los fármacos modelo sobre los componentes del sistema, microesferas porosas y nanopartículas	55
7.4 Obtención y caracterización de los sistemas ensamblados por adsorción/infiltración..	58
7.4.1 Eficiencias de adsorción de los fármacos modelo: encapsulación	58
7.4.2 Adsorción e infiltración de nanopartículas	59
7.4.3 Microscopia electrónica de barrido (MEB)	60
7.4.4 Determinación del área superficial: adsorción de N ₂ (BET)	62
7.4.5 Interacción de los componentes del sistema: DSC y TGA	63
7.5 Perfiles de liberación <i>in vitro</i> y mecanismo de liberación	65
7.5.1 Mecanismo de liberación	67
7.6 Estabilidad de los fármacos modelo en los sistemas ensamblados	69
7.6.1 Evaluación de la estructura secundaria por dicroísmo circular (CD)	69
7.6.2 Actividad enzimática de la proteína liberada desde los sistemas ensamblados..	70
VIII. CONCLUSIONES	73
IX. PERSPECTIVAS	76
X. REFERENCIAS	77
XI. ANEXOS	86
11.1 Clasificación y ejemplos de los polímeros biodegradables	86
11.2 Tablas de ANOVA de los análisis estadísticos realizados	87
11.3 Lista de presentaciones en congresos y artículos escritos	90
11.3.1 Congresos nacionales	90
11.3.2 Congresos internacionales	91
11.3.3 Artículos escritos	92
11.4 Publicaciones	93
11.5 Otros productos	114

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Perfiles de concentración de fármaco en circulación. A1-4: liberación inmediata desde una forma convencional administrada en múltiples dosis, B: liberación controlada (orden cero) y C: Liberación sostenida (primer orden). Tomada y modificada de referencia 33. **5**
- Figura 2.** Clasificación de los sistemas de liberación controlada. A: Sistemas preprogramados para un determinado perfil de liberación. B: Sistemas modulados por activación. C: Sistemas regulados por retroalimentación. D: Sistemas vectorizados. Tomada y modificada de referencia 31. **7**
- Figura 3.** Representación esquemática de los tipos de erosión. Tipo I: degradación de macromoléculas solubles, Tipo II: disolución de macromoléculas insolubles y Tipo III: degradación de macromoléculas insolubles con enlaces lábiles. Tomada y modificada de referencia 40. **11**
- Figura 4.** Estructura del ácido poliláctico-co-glicólico, PLGA, donde m= residuo de ácido glicólico y n= residuo de ácido láctico. A) PLGA con grupo terminal carboxilo libre y B) PLGA con grupo terminal esterificado. **13**
- Figura 5.** Hidrólisis del ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y perfiles de liberación *in vitro* para PLGA 50:50, 65:35, 75:25 y 85:25; donde por ejemplo 65:35 significa 65% de ácido láctico y 35% de ácido glicólico. Tomada y modificada de referencia 42. **14**
- Figura 6.** Diferencias entre los tipos de micro- y nanopartículas. Tomada y modificada de referencia 45. **16**
- Figura 7.** Método de doble emulsión- evaporación de disolvente para la obtención de microesferas. (a) emulsificación con altas fuerzas de corte, (b) emulsificación con bajas fuerzas de corte y (c) evaporación de la fase orgánica. Tomada y modificada de referencia 80. **19**
- Figura 8.** Esquema del método de emulsificación-difusión para la obtención de nanopartículas (NP). (1) Disolvente orgánico parcialmente soluble en agua saturado con agua, (2) agua saturada con disolvente, (3) fase orgánica con polímero disuelto, (4) fase acuosa compuesta de agua y tensoactivo, (5) emulsificación y (6) adición de agua para la difusión de disolvente y formación de la nanopartícula. Tomada y modificada de referencia 80. **23**
- Figura 9.** Pasos y etapas en la micro- o nanoencapsulación durante la preparación de acarreadores propuestos para péptidos y proteínas, indicando posibles causas de degradación en cada paso. **26**
- Figura 10.** Esquema de las cinéticas de adsorción. 1: transporte de la proteína hacia la superficie, 2: adhesión del proteína a la superficie, 3: cambios conformacionales, 4: desorción de la molécula y 5: incorporación al medio de disolución y reversibilidad al estado nativo (cuando aplica). Notas: (/////) = grupos hidrofóbicos, (-----) = grupos hidrofílicos, y (+++++) = grupos cargados. Tomada y modificada de referencia 100. **28**
- Figura 11.** Isotermas de adsorción de albúmina sérica bovina en partículas de poliestireno sulfonado, en función del pH. Modelo: Langmuir-Freundlich. Notas: -L-F regr = regresión de Langmuir-Freundlich. Tomada de referencia 107. **32**

Figura 12. Esquema que representa la adsorción de una proteína globular (a) y una proteína cilíndrica (b). (i) adsorción lateral-“side-one” y (ii) adsorción terminal-“end-one”. Tomada y modificada de referencia 99.	32
Figura 13. A) Estructura química del acetato de leuprolide y B) conformación de β -giro en medio acuoso de la porción 4-7 del acetato de leuprolide, tomada de referencia 111.	33
Figura 14. Representación computacional de la estructura terciaria de la α -amilasa. Los tres dominios se identifican como A, B, y C. Los iones de Calcio (Ca) y Gadolinio (Gd) se representan como esferas de color rosa y amarillo, respectivamente. Tomada y modificada de referencia 119.	35
Figura 15. Esquema general de las etapas del proyecto de investigación. NP's = nanopartículas.	41
Figura 16. Proceso de fabricación de los sistemas ensamblados por adsorción/infiltración de nanopartículas poliméricas en microesferas porosas biodegradables. (1): resuspensión de diferentes concentraciones de nanopartículas, (2): incorporación del fármaco para adsorberse sobre las nanopartículas y (3) inmersión de microesferas porosas para infiltrar nanopartículas adsorbidas con fármaco y al mismo tiempo adsorber fármaco sobre la superficie de las microesferas.	48
Figura 17. Micrografías de microesferas porosas de PLGA 50:50. Notas: (A): dispersión de microesferas porosas; barra = 1000 μ m, (B) microesferas porosas; barra = 100 μ m y (C) poros en la matriz interna de las microesferas; barra = 1 μ m.	52
Figura 18. Distribución de tamaño de partícula de las microesferas porosas de PLGA 50:50, obtenidas por el método modificado de doble emulsión- evaporación de disolvente.	53
Figura 19. Micrografías de nanopartículas poliméricas de PLGA 50:50. Nota: Barra = 1 μ m.	53
Figura 20. Distribución de tamaño de partícula de las nanopartículas de PLGA 50:50 obtenidas por el método de emulsificación-difusión de disolvente para tres lotes diferentes.	54
Figura 21. Eficiencias de adsorción (%EA) de las moléculas modelo, α -amilasa y leuprolide, sobre microesferas porosas de PLGA 50:50. Notas: muestras; A (10% p/p), B (20% p/p), C (30% p/p), D (40% p/p) y E (50% p/p). % p/p = peso de péptido o proteína/peso de microesferas).	56
Figura 22. Micrografías de microesferas poliméricas de PLGA (50:50) con y sin infiltración de nanopartículas. A: microesferas libres y B: microesfera saturada con nanopartículas infiltradas. Nota: Barra = 10 μ m.	60
Figura 23. Micrografías de los sistemas ensamblados con y sin la infiltración de nanopartículas poliméricas empleando el péptido modelo (acetato de leuprolide). A: sistema S1 sin infiltración de NP's, B: sistema S2 con suspensión de NP's de 25 mg/mL, C: sistema S3 con suspensión de NP's de 50 mg/mL, D: sistema S4 con suspensión de NP's de 75 mg/mL y E: sistema S5 con suspensión de NP's de 100 mg/mL. Notas: Barra = 1 μ m y NP's = nanopartículas.	61
Figura 24. Micrografías de los sistemas ensamblados con y sin la infiltración de nanopartículas poliméricas empleando la proteína modelo (α -amilasa). A: sistema S2 con suspensión de NP's de 25 mg/mL, B: sistema S3 con suspensión de NP's de 50 mg/mL, C: sistema S4 con suspensión de NP's de 75 mg/mL y D: sistema S5 con suspensión de NP's de 100 mg/mL. Nota: NP's = nanopartículas.	61

- Figura 25.** Isotermas de adsorción de N₂ y áreas superficiales de los sistemas ensamblados. Notas: Microesferas blanco: estructuras libres, S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas. **62**
- Figura 26.** Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para cada uno de los sistemas ensamblados (del S1 al S5), PLGA puro, acetato de leuprolide (A) puro y α -amilasa pura (B). Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas. **63**
- Figura 27.** Termogramas obtenidos por termogravimetría (TGA) para cada uno de los sistemas ensamblados (del S1 al S5), PLGA puro y α -amilasa pura. Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas. **64**
- Figura 28.** Perfiles de liberación del péptido modelo: acetato de leuprolide, a partir de los sistemas ensamblados por adsorción/infiltración. Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas. **65**
- Figura 29.** Perfiles de liberación de la proteína modelo: α -amilasa, a partir de los sistemas ensamblados por adsorción/infiltración. Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas. **65**
- Figura 30.** Líneas de ajuste de los perfiles de liberación al modelo de Higuchi (raíz cuadrada del tiempo). Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas. **68**
- Figura 31.** Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano para del péptido modelo: acetato de leuprolide. Control = leuprolide libre sin proceso de adsorción, Sistema 1 (System 1) = leuprolide liberado desde S1, sin infiltración de NP's, Sistema 2 (System 2) = leuprolide liberado desde S3 con suspensión de NP's de 50 mg/mL de NP's y Sistema 3 (System 3) = leuprolide liberado desde S5 con suspensión de NP's de 100 mg/mL de NP's. NP's = nanopartículas. **69**
- Figura 32.** Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano para la proteína modelo: α -amilasa. Notas: Free amylase = Amilasa libre, S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas. **70**
- Figura 33.** Reacción de hidrólisis del sustrato 2-cloro-4-nitrofenil-maltotriosa (CNP-G3) catalizada por la enzima α -amilasa. **70**
- Figura 34.** Ensayo de actividad de la α -amilasa en presencia del sustrato (CNP-G3). Notas: B = blanco (muestra sin enzima), AL = amilasa libre (muestra control), S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas. **71**
- Figura 35.** Actividad enzimática expresada en UI/L de la α -amilasa liberada desde los sistemas ensamblados por adsorción/infiltración de NP's en microesferas porosas. Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas. **71**

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Miligramos adsorbidos de las moléculas modelo, α -amilasa y leuprolide, sobre microesferas porosas de PLGA 50:50. Notas: se presenta la media \pm desviación estándar. Muestras; A (10%p/p), B (20% p/p), C (30% p/p), D (40% p/p) y E (50% p/p). % p/p = peso de péptido o proteína/peso de microesferas.	55
Tabla 2. Potencial ζ de nanopartículas de PLGA 50:50 adsorbidas con diferentes cantidades de las moléculas modelo. Blanco = nanopartículas sin moléculas adsorbidas.	57
Tabla 3. Cantidades de fármaco adsorbido, nanopartículas infiltradas y eficiencias de adsorción de los sistemas ensamblados. Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas. %EA = eficiencia de adsorción expresada en porcentaje.	59
Tabla 4. Parámetros obtenidos del ajuste de los perfiles de liberación al modelo de Higuchi para cada uno de los sistemas ensamblados. Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.	67
Tabla 5. Análisis de varianza de la talla promedio de tres lotes de microesferas porosas. No existen diferencias significativas en la talla promedio ($p=0.64$).	87
Tabla 6. Análisis de varianza de la talla promedio de tres lotes de nanopartículas poliméricas. No existen diferencias significativas en la talla promedio ($p=0.24$).	87
Tabla 7. Análisis de varianza del potencial ζ para muestras de nanopartículas de PLGA 4A (con grupo carboxílico terminal) con diferentes cantidades adsorbidas de acetato de leuprolide. Existen diferencias estadísticamente significativas en el potencial ζ ($p=0.001$).	87
Tabla 8. Análisis de varianza del potencial ζ para muestras de nanopartículas de PLGA 4A (con grupo carboxílico terminal) con diferentes cantidades adsorbidas de α -amilasa. Existen diferencias estadísticamente significativas en el potencial ζ ($p=3.8 \times 10^{-11}$).	88
Tabla 9. Análisis de varianza del potencial ζ para muestras de nanopartículas de PLGA 5E (con grupo éster terminal) con diferentes cantidades adsorbidas de acetato de leuprolide. No existen diferencias estadísticamente significativas en el potencial ζ ($p=0.82$).	88
Tabla 10. Análisis de varianza de la actividad enzimática de α -amilasa liberada a partir de los sistemas ensamblados en comparación con una muestra control de α -amilasa libre. No existen diferencias estadísticamente significativas de la actividad enzimática entre los sistemas ($p=0.057$). Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.	89

LISTA DE ABREVIATURAS

DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
TGA	Termogravimetría
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
%EA	Eficiencia de Adsorción
K_H	Constante de Higuchi
M_t	cantidad de fármaco liberado al tiempo t
M_∞	cantidad total de fármaco que se ha liberado
n	Constante difusional
r²	Coeficiente de determinación
Γ	Concentración adsorbida
Γ_m	Valor máximo de adsorción o saturación
K	Constante de equilibrio entre adsorción y desorción
NP's	Nanopartículas
PLGA	Ácido Poliláctico-co-glicólico
PLA	Ácido Poliláctico
PGA	Ácido Poliglicólico
PVAL	Alcohol Polivinílico
T_g	Temperatura de transición vítrea
BCA	Ácido Bicinconínico
ANOVA	Análisis de Varianza
ASTM	American Society for Testing and Materials
FDA	Food and Drug Administration
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico

ABSTRACT

In this research, the development of a new drug delivery system assembled by a "bottom-up" approach is described as an alternative to administrate and formulate sensitive molecules to physicochemical stress, such as peptides and proteins. The proposed methodology for preparing the assembled systems, named as "assembly by adsorption/infiltration", involves polymeric nanoparticles that are adsorbed and infiltrated into porous biodegradable microspheres. In the first step, the drug is adsorbed onto polymeric nanoparticles in an aqueous medium that favours the interactions between them. Then, in a second step these drug adsorbed nanoparticles are infiltrated into porous microspheres when they are immersed in the suspension of nanoparticles. The polymeric structures that form the assembled system are obtained by separate, without drug, using common methods and preformed polymers; the nanoparticles are prepared by "emulsification-solvent diffusion" method and microspheres by "double emulsion-solvent evaporation" method.

A peptide (leuprolide acetate) and a protein (the enzyme α -amylase) were used as model drugs, while the biodegradable polymer was the polylactic-co-glycolic acid (PLGA). Several amounts of nanoparticles (25, 50, 75 and 100 mg/mL) were resuspended in an aqueous medium (pH 7.2 to leuprolide and pH 4.0 to α -amylase) where the model drug was previously dissolved at a concentration of 10% w/w related to the weight of microspheres. 25 mg of microspheres were immersed into the drug adsorbed nanoparticle suspension in order to be infiltrated, under gentle agitation. The assembled systems were characterized in morphology (by scanning electron microscopy), particle size and its dispersion (by dynamic light scattering), the adsorption efficiency (by UV spectrophotometry and liquid chromatography), surface area-porosity (by nitrogen adsorption, BET), interaction of the components of the system (by differential scanning calorimetry) and stability of the secondary structure (by circular dichroism). The *in vitro* release profile of each model drug in pH 7.2 phosphate buffer was also assessed. Furthermore, for the case of the protein, enzymatic activity tests were carried out employing 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotriose as substrate.

The assembled systems were obtained with a mean size of $103.9 \pm 6.28 \mu\text{m}$; therefore it is possible to inject the systems using conventional syringes (size $\leq 150 \mu\text{m}$). The results also showed that the efficiency of adsorption and the drug release rate are dependent on the amount of nanoparticles adsorbed and infiltrated into the porous microsphere. For instance, when an amount of 100 mg/mL of nanoparticles was used, adsorption efficiencies of 95% and 51% were found for leuprolide and amylase, respectively. However, from those loaded amounts, only 20% of leuprolide and 28% of amylase were released within 12 h; while comparing to a system with no infiltrated nanoparticles, more than 90% of the loaded drug was released at the same time. Release profiles fitted the Higuchi's model

($t^{1/2}$), so that it is suggested that the drug is released by a diffusion mechanism through a matrix system. The micrographs from scanning electron microscopy showed a saturation of the microsphere surface because it can be distinguished a nanoparticle film that becomes more continuous when the amount of infiltrated nanoparticles increases. It is suggested that the nanoparticle film could act as a physical barrier during the release of the drug. It was also observed a decrease in the surface area, from 4.21 m²/g (to porous microspheres without infiltration of nanoparticles) to 0.45 m²/g (to the assembled system with the highest amount of infiltrated nanoparticles). These changes in surface area confirmed the process of saturation of the porous structure. Circular dichroism and enzyme activity assays showed that there are not significant changes in the secondary structure and the activity of the drug after being encapsulated in the assembled systems.

Due to the polymeric structures that form the assembly system are obtained in separate stages, without involving the drug, drug protection is assured because this does not have contact with organic solvents (free solvent system) and is not subjected to physicochemical stress generated by emulsification, dispersion and solvent evaporation, processes that are commonly used in conventional encapsulation methods. Additionally, it may suggest an intramuscular injection to administer the systems obtained, which would form a reservoir that sustains the drug release for several days. Finally, we conclude that under "bottom-up" approach and using the assembly process by adsorption/infiltration it can be formulated drugs such as peptides and proteins, which are substances sensitive to physicochemical stress that is present in micro- and nanoencapsulation. The methodology developed in this project will also be useful to develop systems for parenteral administration with other molecules of therapeutic, prophylactic or diagnostic interest, which by its nature cannot be formulated by conventional processes, such as DNA or RNA analogs, or synthetic, natural or biotechnological drugs that are affected by hydrolysis, high temperature or with low solubility.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se describe el desarrollo de un nuevo sistema de liberación de fármacos ensamblado bajo un enfoque “bottom-up” (construcción de abajo y hacia arriba) como una alternativa para formular y administrar moléculas sensibles al estrés fisicoquímico, como son los péptidos y las proteínas. La metodología propuesta para preparar los sistemas ensamblados, denominada como “ensamblaje por adsorción/infiltración”, involucra nanopartículas poliméricas que se adsorben e infiltran en microesferas porosas biodegradables. En un primer paso el fármaco es adsorbido sobre la superficie de nanopartículas poliméricas en un medio acuoso tal que favorezca las interacciones entre ellos. En un segundo paso, estas nanopartículas ya adsorbidas con el fármaco son infiltradas en microesferas porosas cuando estas son sumergidas en la suspensión de nanopartículas. Las estructuras poliméricas que componen el sistema se obtienen por separado sin involucrar el principio activo y con métodos comunes, empleando polímeros preformados; las nanopartículas se preparan por el método de “emulsificación-difusión de disolvente” y las microesferas por el de “doble emulsión-evaporación de disolvente”.

Se utilizaron un péptido (acetato de leuprolide) y una proteína (la enzima α -amilasa) como fármacos modelo, mientras que el polímero biodegradable empleado fue el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Diferentes cantidades de nanopartículas (25, 50, 75 y 100 mg/mL) se resuspendieron en un medio acuoso (pH 7.2 para leuprolide y pH 4.0 para α -amilasa) donde el fármaco modelo fue previamente disuelto a una concentración del 10% w/w con respecto al peso de microesferas. Las nanopartículas ya adsorbidas con fármaco se infiltraron en 25 mg de microesferas porosas que fueron sumergidos al medio bajo agitación suave. Los sistemas ensamblados se caracterizaron en morfología (Microscopía electrónica de barrido), talla y dispersión de partículas (dispersión dinámica de luz), eficiencia de adsorción (espectrofotometría UV y cromatografía de líquidos), área superficial-porosidad (adsorción de nitrógeno, BET), interacción de los componentes del sistema (calorimetría diferencial de barrido) y estabilidad de la estructura secundaria (dicroísmo circular). También se evaluó la liberación *in vitro* de los fármacos modelo en buffer de fosfatos pH 7.2. Además, para el caso de la proteína se llevaron a cabo pruebas de actividad enzimática empleando como sustrato el 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriosa. Se obtuvieron sistemas ensamblados con un tamaño promedio de $103.9 \pm 6.28 \mu\text{m}$; lo cual hace posible poder inyectarlos usando jeringas convencionales (tamaño ≤ 150 micras). Los resultados también mostraron que la eficiencia de adsorción y la velocidad de liberación del fármaco son dependientes de la cantidad de nanopartículas que se adsorben e infiltran en la microesfera porosa. Por ejemplo, cuando se empleó una cantidad de 100 mg/mL de nanopartículas se encontraron eficiencias de adsorción del 95% para leuprolide y 51% de amilasa; de esas cantidades cargadas, sólo

el 20% del leuprolide y el 28% de la amilasa habían sido liberados en las primeras 12 h; mientras que al comparar con un sistema sin nanopartículas infiltradas, más del 90% del fármaco cargado había sido liberado en el mismo tiempo. Los perfiles de liberación obtenidos se ajustaron al modelo de Higuchi ($t^{1/2}$), lo que sugiere que el fármaco se libera por un mecanismo de difusión a través de un sistema tipo matricial. Las micrografías por microscopía electrónica de barrido evidenciaron la saturación de la superficie de la microesfera y sus poros, pues puede distinguirse una película de nanopartículas que se vuelve más continua al aumentar la cantidad de nanopartículas infiltradas. Se sugiere que esta película de nanopartículas podría actuar como barrera física durante la liberación del fármaco. También se pudo observar una disminución del área superficial, de 4.21 m²/g (para las microesferas porosas sin infiltración de nanopartículas) a 0.45 m²/g (para el sistema ensamblado con la mayor cantidad de nanopartículas infiltradas), lo cual confirma un proceso de saturación de la estructura porosa. El dicroísmo circular y los ensayos de actividad enzimática mostraron que no hay cambios significativos en la estructura secundaria y actividad de las moléculas en estudio después de ser encapsulados en los sistemas ensamblados.

Debido a que las estructuras poliméricas que componen el sistema ensamblado se obtienen en etapas separadas sin involucrar el fármaco, se resguarda la integridad física de este, ya que no tiene contacto con disolventes orgánicos (libre de disolvente), ni tiene que ser sometido al estrés fisicoquímico generado por la emulsificación, dispersión y evaporación del disolvente, procesos que son comúnmente utilizados en los métodos convencionales de encapsulación. Adicionalmente, se puede sugerir una inyección intramuscular para administrar los sistemas obtenidos, la cual formaría un depósito que mantiene la liberación del fármaco durante varios días. Por último, podemos concluir que con el enfoque "bottom-up" y bajo el proceso de ensamblaje por adsorción/infiltración se pueden formular fármacos como los péptidos y las proteínas, sustancias sensibles al estrés fisicoquímico que presenta los procesos comunes de micro- y nanoencapsulación. La metodología desarrollada en este proyecto también sería de utilidad para formular sistemas de administración parenteral con otras moléculas de interés terapéutico, profiláctico o de diagnóstico, que por sus características no puedan ser formulados por procesos convencionales, como los análogos de ADN o ARN, así como fármacos de síntesis, de origen natural o biotecnológico que son afectados por hidrólisis, altas temperaturas o con baja solubilidad.

I. INTRODUCCIÓN

La Nanotecnología es una ciencia que nace en la década de los sesenta cuando Richard Feynman desarrolló la idea de conocer y sobre todo manipular o controlar la materia en la escala atómica o molecular con la finalidad de aplicar este conocimiento en diferentes áreas de la tecnología como la óptica, la química, la eléctrica, la medicina, la farmacia, etc. Con base en lo expuesto por la *National Nanotechnology Initiative* (NNI), se puede definir a la Nanotecnología como el área encargada del estudio, diseño, caracterización, síntesis y aplicación de materiales y sistemas, cuyas estructuras y componentes exhiben nuevas y mejoradas propiedades físicas, químicas o biológicas debido a su tamaño nanométrico ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) [1]. Estas nuevas propiedades ganan importancia debido al incremento del área superficial; de tal manera que los efectos cuánticos, las propiedades de superficie y la relación área-volumen de superficie adquieren significancia, haciendo posible la manipulación de los materiales a nivel atómico, molecular o supramolecular con diferentes intenciones u objetivos [2, 3]. La nanotecnología se ha aplicado con éxito en la tecnología farmacéutica para tratar una variedad de problemas asociados a los principios activos y su formulación, como son la baja biodisponibilidad, estabilidad y solubilidad, la generación de efectos adversos, la entrega no específica del fármaco, la poca eficacia terapéutica, los niveles sanguíneos inconstantes y las dosis frecuentes; todo lo anterior con el objetivo de mejorar los tratamientos actuales y ofrecer alternativas más eficaces [4]. La nanotecnología se ha abordado de dos maneras: un enfoque “top-down” o producción de arriba hacia abajo en la cual los materiales se transforman en la estructura deseada utilizando el maquinado, gravado o impresión; o un enfoque “bottom-up” o producción de abajo hacia arriba a través de un proceso de ensamblaje de diminutas estructuras hasta obtener la forma y tamaño deseados [2, 4]. Durante las últimas tres décadas, biomoléculas como péptidos, proteínas y análogos de ADN se han estudiado y propuesto como agentes terapéuticos debido a su alta selectividad en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, deficiencias enzimáticas, genéticas e incluso en infecciones como el VIH [5, 6, 7]. Los recientes avances en técnicas biotecnológicas como la fermentación y proceso de clonación han hecho posible una mejor comprensión de las funciones, la estructura y las propiedades de péptidos y proteínas, además de una producción eficiente y a gran escala de estas moléculas, en cantidades que son suficientes para la investigación y el desarrollo de productos farmacéuticos. Sin embargo, la formulación de péptidos y proteínas ha sido un gran reto para el científico farmacéutico, ya que su estructura conformacional y su integridad están completamente relacionadas con la actividad terapéutica.

Existe una inestabilidad fisicoquímica inherente de estas moléculas en diferentes ambientes, por ejemplo:

- Con respecto a la administración, muestran inestabilidad en fluidos corporales debido a la susceptibilidad enzimática (enzimas proteolíticas en la saliva, jugo gástrico, intestino, piel y pulmones), mientras que su gran tamaño y su hidrofiliidad impiden el acceso a las células diana. Por otro lado, su rápida eliminación del cuerpo produce baja eficacia terapéutica debido a su vida media corta y baja biodisponibilidad cuando son administradas por la vía oral, transdérmica o pulmonar. Esto significa que la vía parenteral, inyección intramuscular, intravenosa, entre otras, es la más adecuada para su administración [6, 7]. Más de 324 biomacromoléculas, en su mayoría proteínas, se encuentran en etapas de ensayos clínicos [8]. La tendencia general es el uso de medicamentos producidos por técnicas de ADN recombinante, ya que se espera que los biotecnológicos sean menos tóxicos y más predecibles en cuanto a su comportamiento in vivo.
- Desde el punto de vista tecnológico, los métodos de formulación propuestos para péptidos y proteínas están basados en la microencapsulación, dispersión y/o liofilización, los cuales incluyen etapas que involucran el uso de disolventes orgánicos o estrés fisicoquímico que pueden provocar la desnaturalización de las proteínas durante su formulación [9]; así, factores como el pH, la temperatura, altas fuerzas de cizallamiento, superficies hidrofóbicas y la generación de interfaces durante la producción, almacenamiento, manipulación y formulación de péptidos y proteínas crean condiciones indeseables que las llevan a sufrir procesos como desnaturalización, desamidación, agregación, oxidación, hidrólisis del enlace peptídico, intercambio de puentes disulfuro, entrecruzamiento o cambios conformacionales intramoleculares que finalmente provocan cambios en su actividad terapéutica. Por lo tanto, el éxito en la formulación de péptidos y proteínas depende del conocimiento y la comprensión de sus propiedades físicas, químicas y biológicas, así como del conocimiento y uso de materiales y acarreadores que pudieran ser utilizados en la obtención de nanosistemas que los contengan y en la composición de la forma farmacéutica para su administración. Por las razones anteriores, es que se ha venido sugiriendo diversas estrategias que presenten un mínimo de inconvenientes biológicos y tecnológicos para estas moléculas [10, 11, 12].

Para formular y administrar este tipo de agentes terapéuticos se han propuesto tecnologías como la PEGilación y la obtención, con distintos procedimientos, de nanoacarreadores como los liposomas, las micro- y nanopartículas. Las proteínas PEGiladas mejoran sus propiedades farmacocinéticas, sin embargo se ha descrito que pueden generar anticuerpos anti-PEG o bien verse alteradas por el proceso de entrecruzamiento empleado en la PEGilación [13]. De igual manera, diversos estudios han demostrado que el uso de nanoacarreadores, tales como nanopartículas poliméricas, lipídicas y liposomas, proporcionan al fármaco estabilidad *in vivo*, tiempo de circulación prolongado, liberación controlada y dirigida, así como menos efectos secundarios en comparación con formulaciones convencionales [14, 15, 16]. No obstante a lo anterior, los métodos utilizados para preparar los nanoacarreadores generalmente incluyen procedimientos de polimerización, emulsificación y/o homogenización de polímeros naturales o preformados, además de la eliminación de iniciadores y disolventes, los cuales son eventos que generan un ambiente desfavorable para las biomoléculas [9]. También se ha propuesto el uso de microesferas fabricadas con polímeros biodegradables como vehículos para este tipo fármacos, ya que protegen la molécula durante su administración, regulan los niveles en sangre y controlan la liberación, por lo que se reducen las dosis frecuentes [6, 17, 18, 19], mientras que las microesferas porosas biodegradables se han empleado como soportes de implantes en la ingeniería de tejidos debido a su gran área superficial [20]. Sin embargo, las microesferas propuestas y cargadas con proteínas han sido preparadas comúnmente utilizando métodos como el secado por aspersión, doble emulsión evaporación-disolvente o técnicas de separación de fases, los cuales presentan los mismos inconvenientes antes mencionados [18, 21]. También se han hecho algunos intentos para evitar la degradación de biomoléculas durante la formulación, tales como la adición de azúcares, polioles o de otras proteínas como la albúmina, así como el uso de procesos no acuosos u orgánicos para evitar la interface agua/aceite, la reducción del tiempo de homogeneización, la incorporación de crioprotectores, estabilización por ligandos (tensoactivos, ciclodextrinas, iones metálicos, aniones, etc), modificaciones químicas, o bien el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos [9, 11, 12, 22, 23, 24]. Por otro lado, las nanopartículas poliméricas y depósitos inyectables de microesferas cargadas con péptidos y proteínas y preparadas con materiales biodegradables como el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) tienen actualmente un lugar importante en este campo porque algunos de los productos han sido aceptados por la FDA e incluso ya están en uso clínico y en el mercado [25, 26].

Algunos estudios han propuesto a la adsorción de fármacos como estrategia alterna para evitar procesos de alta energía en la carga del fármaco al emplear un acarreador, principalmente en la formulación de moléculas hidrofílicas. De hecho, esta táctica se ha aplicado con éxito para adsorber macromoléculas sobre la superficie de nanopartículas poliméricas [27].

Otros trabajos han discutido el uso de estructuras hechas con polímeros biodegradables como el PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico) para adsorber proteínas con el fin de evitar el riesgo de degradación a causa de la interacción con disolventes orgánicos, interfaces y procesos de homogeneización o secado [22]. Recientemente, ha llamado la atención el uso de microesferas poliméricas porosas y estructuras como las nanopartículas mesoporosas de sílica, las cuales presentan una gran superficie y poros interconectados en el interior, para la carga por adsorción, de péptidos, proteínas, genes y otros fármacos, con un método sencillo de inmersión en medio acuoso [22, 28, 29, 30]. Esta estrategia basada en adsorción toma en cuenta la interacción entre la superficie de las estructuras poliméricas y el fármaco en un medio acuoso, haciendo uso del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas del polímero y de la molécula (estructura primaria, punto isoeléctrico, pKa, grupo funcional terminal, etc).

Considerando todo lo anterior y bajo un enfoque “bottom-up”, el objetivo principal de este trabajo fue proponer y caracterizar un nuevo sistema de liberación para péptidos y proteínas, que utiliza una técnica de inmersión acuosa y un método de ensamblaje basado en la adsorción del fármaco en nanopartículas poliméricas biodegradables y su posterior infiltración en microesferas porosas biodegradables que son obtenidas en diferentes etapas a fin de evitar el uso de disolventes orgánicos, interfaces, calor y fuerzas de corte elevadas durante la carga del fármaco en la formulación. Por lo tanto, se sugiere que el proceso de preparación descrito en esta investigación y que se ha denominado como “ensamblaje por adsorción/infiltración” protege el fármaco, ya que los péptidos y proteínas no están involucrados en los procedimientos de obtención de la estructuras poliméricas que conforman el sistema. Así mismo se considera en el diseño del sistema el obtener características tecnológicas para que los sistemas ensamblados puedan ser administrados por diferentes vías, incluida la parenteral.

II. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Sistemas de liberación controlada (SLC) de fármacos.

Desde hace varias décadas los tratamientos para las enfermedades que preocupan a la humanidad han sido acompañados con el uso de agentes terapéuticos formulados en formas farmacéuticas convencionales como comprimidos, soluciones, cápsulas etc. Sin embargo, la forma en que los agentes terapéuticos se han venido administrando, empleando estas formulaciones, ha presentado algunas desventajas debido a que la liberación del fármaco es simple, rápida e inmediata, es decir que la forma farmacéutica proporciona un control muy pobre de las concentraciones del activo en plasma lo que conlleva al uso de altas dosis iniciales que son administradas frecuentemente, generando una fluctuación significativa de los niveles plasmáticos, ver figura 1.

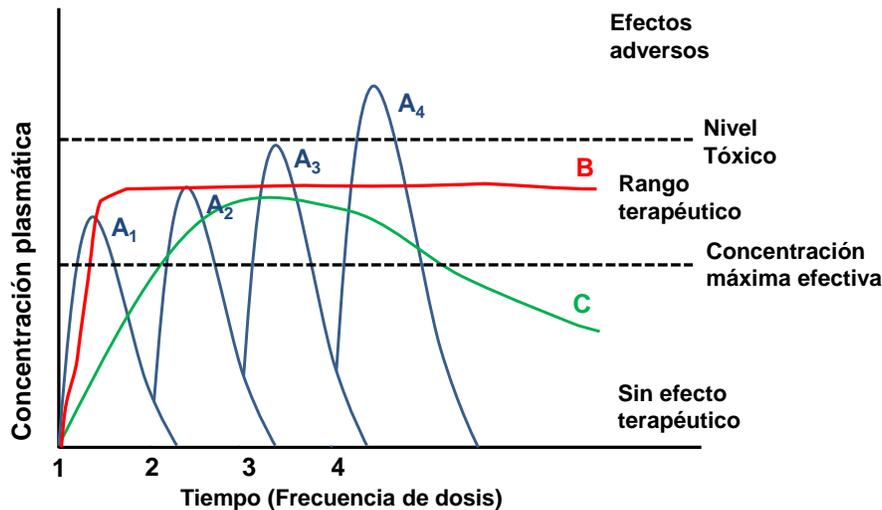


Figura 1. Perfiles de concentración de fármaco en circulación. A1-4: liberación inmediata desde una forma convencional administrada en múltiples dosis, B: liberación controlada (orden cero) y C: Liberación sostenida (primer orden). Tomada y modificada de referencia 33.

Estos cambios en la concentración del fármaco en circulación llevan a una eficacia reducida o a la ausencia del efecto terapéutico debido a degradaciones parciales o procesos de eliminación, mientras que por otro lado, se podrían elevar los niveles provocando daños asociados a efectos adversos o tóxicos sobre todo si la ventana terapéutica del fármaco es estrecha, sin dejar de mencionar la falta de apego al régimen posológico por parte del paciente y los altos costos por dosis frecuentes.



Es por ello que la investigación científica ha puesto considerable atención en el desarrollo de técnicas y métodos para obtener nuevos sistemas de liberación de fármacos con uno o más de los siguientes beneficios [31, 32]:

- Localizar la entrega de los fármacos en un sitio u órgano específico (vectorización)
- Controlar la velocidad de liberación
- Mantener niveles terapéuticos constantes y por tanto el efecto terapéutico
- Maximizar la relación dosis-eficacia
- Reducir el tamaño y el número de dosis a administrar
- Promover la aceptación por parte del paciente
- Minimizar los efectos indeseables
- Proteger al fármaco en la formulación y facilitar la administración

El desarrollo de tecnologías para la obtención de sistemas de liberación controlada requiere de la consideración de varios factores, como son: las propiedades fisicoquímicas de la sustancia activa, la vía de administración, el mecanismo de liberación que se desea obtener, la naturaleza del acarreador, la habilidad de este para ser vectorizado y la biocompatibilidad. Es por ello que su desarrollo se ha enfocado al empleo de sistemas basados en el conocimiento de la relación sustancia activa-acarreador, lo cual implica un entendimiento detallado del comportamiento del acarreador y la sustancia activa, la interacción entre ellos y con la célula, tejido u órgano, así como de las limitaciones del sistema obtenido con respecto a su formulación, proceso de obtención y estabilidad [33].

Se puede definir un sistema de liberación controlada (SLC) como un sistema que libera un fármaco a una velocidad y/o en una localización determinada en función de las necesidades de un organismo y durante un período de tiempo específico. Esta liberación del fármaco puede ser temporal (control de la velocidad), espacial (control sobre el lugar de liberación) o bien una combinación de los dos aspectos anteriores. Entonces, se puede decir que la liberación controlada pretende entregar la cantidad adecuada de fármaco, en el momento justo y en el lugar deseado, con el objetivo de mantener concentraciones terapéuticas por periodos prolongados y reducir los niveles que excedan los requerimientos terapéuticos [34]. La figura 1 también muestra las diferencias en los perfiles de concentración de fármaco en sangre que se esperan para los SLC en comparación con los perfiles que generan las formas farmacéuticas convencionales.

2.1.1 Clasificación de los SLC.

De forma general y con base en la sofisticación de su tecnología los SLC pueden ser clasificados en cuatro grupos [31]; los cuales están descritos en la figura 2.

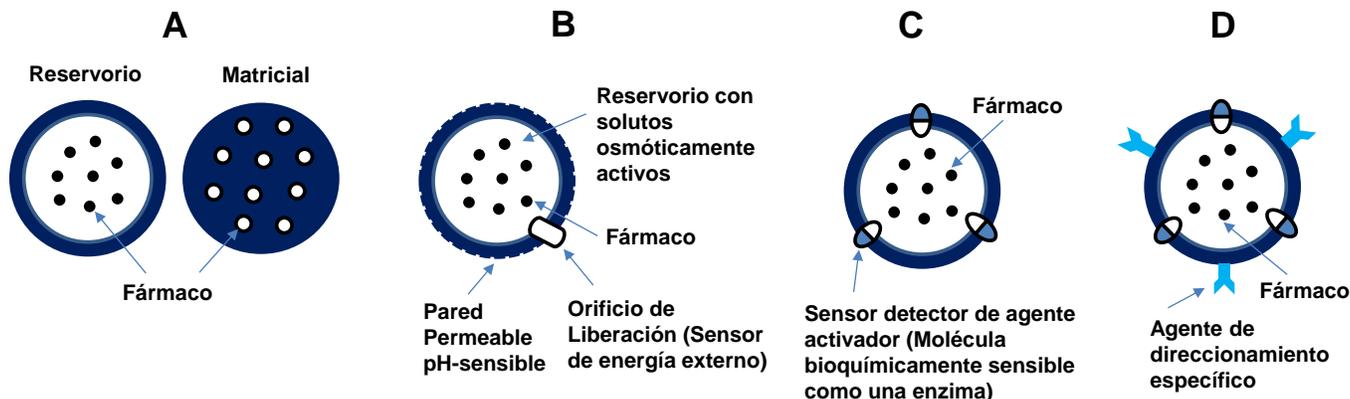


Figura 2. Clasificación de los sistemas de liberación controlada. A: Sistemas preprogramados para un determinado perfil de liberación. B: Sistemas modulados por activación. C: Sistemas regulados por retroalimentación. D: Sistemas vectorizados. Tomada y modificada de referencia 31.

- A. Sistemas preprogramados para un determinado perfil de liberación. En este tipo de sistemas se desea programar la liberación del fármaco a una velocidad específica. Para lograr esto se controla la difusión molecular del activo a través del uso de barreras que rodean o componen el sistema. Los mecanismos de difusión siguen las leyes de Fick. Entre ellos podemos distinguir SLC con membranas poliméricas permeables (sistema reservorio, la membrana rodea un depósito que puede contener al fármaco de forma sólida o líquida, disperso o en solución), como matriz polimérica (sistema matricial, en el que existe una dispersión molecular homogénea del fármaco en la matriz, donde el activo puede estar unido químicamente o adsorbido a la superficie), híbridos (matriz/reservorio) y microreservorios (donde el fármaco es suspendido en una solución acuosa de un polímero miscible como el PEG).
- B. Sistemas modulados por activación. En este grupo la liberación del fármaco es activada por algún proceso físico (presión osmótica, hidrodinámica, de vapor, fuerza mecánica, hidratación), químico (pH-, termo- o ión-sensibles, por hidrólisis), o bioquímico (activación enzimática o bioquímica) y/o facilitado por suministro externo de energía (magnetismo, fotoirradiación, sonoforesis, iontoforesis).

- C. Sistemas regulados por retroalimentación. La característica principal de estos sistemas es que contienen en su diseño un sensor que detecta presencia o cambios en la concentración de un agente activador (ejemplo: una sustancia bioquímica como la urea, glucosa, etc.), regulando la velocidad de liberación del fármaco.
- D. Sistemas vectorizados. Se componen de una estructura biodegradable y biocompatible a la que se han adherido moléculas que dirigen al sistema hacia un sitio o tejido específico. Las moléculas unidas pueden ser un grupo de direccionamiento específico hacia la proximidad de una célula diana (ejemplo: receptores moleculares), un agente solubilizante que le permite al sistema ser transportado y reconocido para ser absorbido por un tejido en particular (ejemplo: anticuerpos) o un residuo que está unido covalentemente al sistema y que sólo puede ser escindido por una enzima específica de cierto tejido.

Es importante mencionar que dichos grupos no son excluyentes, es decir, que muchos de los SLC que se han propuesto combinan uno o más de las características antes descritas en cada una de las clasificaciones. Así, una gran variedad de sistemas han sido desarrollados como SLC, algunos ya están en el mercado y otros en etapas de investigación; entre los que podemos mencionar se encuentran los sistemas coloidales como los liposomas, microesferas, nanopartículas, micelas, microemulsiones; los matriciales como anillos, parches e implantes; las bombas osmóticas, hidrogeles; además de los sistemas proteicos (preparados a base de albúmina) y los celulares (como los eritrocitos resellados).

2.1.2 SLC poliméricos.

El uso de materiales poliméricos en el desarrollo de soportes para cargar y administrar fármacos ha sido de gran interés en los últimos años, pues se ha aprovechado la ventaja de que la velocidad con que el fármaco es liberado está regulada principalmente por las propiedades del polímero (tipo, peso molecular, grupos funcionales, biodegradabilidad, viscosidad, etc.), del diseño del sistema y en menor medida por las propiedades del activo y de factores ambientales como el pH o los fluidos orgánicos. Incluso se ha reportado que los sistemas de liberación a base de polímeros hacen posible la administración de sustancias activas por diferentes vías como la oral, parenteral, transdermal, nasal, ocular, pulmonar, etc. La metodología aplicada en el desarrollo de sistemas poliméricos toma en cuenta diferentes factores como las propiedades del fármaco, el tipo de terapia (si se desea efecto local o sistémico), la vía de administración, dónde se localizará el sistema o a dónde se desea dirigir (localización de la terapia), el mecanismo de liberación que se desea y por supuesto las propiedades fisicoquímicas del polímero. De forma general los polímeros son manipulados de forma sencilla con una gran variedad de métodos [34].



Desde el punto de vista de la tecnología farmacéutica y de la farmacología, los SLC poliméricos presentan algunas ventajas, como son: niveles plasmáticos de fármaco controlados en un tiempo deseado, se disminuye el número de dosis debido a una liberación sostenida, se reducen los efectos no deseables, se resguarda el fármaco de las condiciones externas, se protege a los tejidos que son sensibles a determinadas moléculas, por lo que el aprovechamiento del fármaco es más eficaz. Sin embargo, también existen desventajas que se pueden presentar y que deben considerarse en el desarrollo de sistemas poliméricos, entre las que se podrían mencionar se encuentran la falta de biocompatibilidad, la formación de residuos secundarios tóxicos cuando el polímero es degradado, en algunos casos se requiere cirugía para colocar o retirar el sistema y altos costos debido al precio del polímero y su procedimiento de obtención [35].

Respecto a los materiales empleados, se han utilizado polímeros tanto naturales como sintéticos, incluyendo polímeros naturales con modificaciones químicas. Lo que se busca en la selección de los materiales para su uso en el área clínica y para la obtención de un SLC es que estos sean inocuos, químicamente inertes, libres de impurezas y residuos, lo cual ha llevado al desarrollo de materiales que presenten una mejorada biocompatibilidad (aceptados por el organismo) y una adecuada degradabilidad (forma en que son eliminados). La tendencia en el desarrollo de sistemas de liberación controlada es el uso de polímeros biodegradables debido a que no deben aplicarse técnicas quirúrgicas para retirar el sistema, a su alta biocompatibilidad y a que generan residuos que son fácilmente eliminados por el organismo; incluso algunos de ellos ya han sido aprobados para su uso clínico [36].

2.2 Polímeros Biodegradables.

Los materiales poliméricos biodegradables pueden ser definidos como polímeros que son degradados *in vivo*, enzimática o no enzimáticamente o ambas, generando subproductos seguros, biocompatibles y no tóxicos que son eliminados posteriormente por procesos metabólicos normales. Los polímeros biodegradables al ser degradados generan cadenas más cortas que inciden en la reducción del peso molecular del material polimérico.

La biodegradación procede hasta que los fragmentos obtenidos del polímero sean oligómeros o monómeros solubles no dañinos. La biodegradación es un proceso natural por medio de la cual los compuestos orgánicos del ambiente son convertidos a compuestos más simples, o bien son expuestos a mineralización o redistribución a través de ciclos naturales como el de carbono, nitrógeno y azufre, donde los organismos vivos, incluidos los microorganismos, juegan un papel primordial. De acuerdo con el estándar de la ASTM D-5488-94d, biodegradable significa “capaz de descomponerse en dióxido de carbono, agua, metano, compuestos inorgánicos y biomasa”. En el caso de organismos vivos

complejos, como el ser humano, estos polímeros pueden ser metabolizados y excretados a través de vías fisiológicas normales como el ciclo de Krebs y procesos enzimáticos [37, 38].

Los materiales principalmente usados para la liberación de fármacos han sido los polímeros naturales y sintéticos, sin embargo, desde la primera vez que se emplearon los polímeros biodegradables en sistemas de liberación por Yolles y Startori en 1970, la investigación científica ha puesto su atención en el desarrollo y uso de polímeros sintéticos, debido a que estos son fácilmente obtenidos, estandarizados y controlados en comparación con los polímeros naturales. Estos últimos en algunos casos han generado una respuesta inmunológica y su composición varía considerablemente dependiendo de su origen de obtención. La mayoría de los polímeros biodegradables están diseñados para degradarse como resultado de la hidrólisis de las cadenas de polímero en compuestos progresivamente más pequeños y biológicamente aceptables. Para algunos polímeros biodegradables (polianhídridos y poliorioésteres) la degradación se produce sólo en la superficie del polímero, lo que resulta en una velocidad de liberación que es proporcional al área superficial del sistema [39].

Los materiales poliméricos que pueden degradarse en componentes biológicamente compatibles bajo condiciones fisiológicas han presentado una alternativa más atractiva para la preparación de sistemas de liberación controlada de sustancias activas, sobre todo para aquellas que tienen tiempos de vida media cortos, como es el caso de algunos péptidos y proteínas. Las ventajas de usar polímeros biodegradables radican en que estos materiales son degradados dentro del cuerpo como resultado de procesos biológicos naturales, por lo tanto se elimina la necesidad de retirar el sistema una vez que este ha liberado todo el fármaco. Lo anterior también es una ventaja en caso de implantes o insertos mediante incisión, ya que no se tendría que recurrir a una segunda cirugía, porque el sistema degrada en subunidades no tóxicas que son subsecuentemente eliminadas por vías metabólicas normales. En tales casos, los agentes terapéuticos son liberados de forma constante y controlada, durante un periodo de tiempo, es decir que sostienen el efecto terapéutico. Adicionalmente los sistemas elaborados con estos materiales contribuyen a resguardar la estabilidad física y química del principio activo. Entre sus desventajas se puede mencionar que pueden presentar un efecto "burst" o de liberación abrupta inicial y el hecho de que los sistemas obtenidos una vez que son inyectados no son recuperables [40]. Con base en su fuente de obtención, los polímeros se pueden clasificar en tres grupos; naturales, sintéticos, y semisintéticos. El anexo 1 muestra la clasificación de los polímeros biodegradables y ejemplos de ellos [41]. El desarrollo de sistemas de liberación empleando estos polímeros también ha considerado la erosión de la superficie polimérica, que por consecuencia va entregando el fármaco que ha sido encapsulado de forma concomitante, ya sea porque este se ha unido covalentemente o porque se ha adsorbido al polímero. Es así que la erosión del material va controlando la liberación del fármaco por mecanismos de difusión.

Entre las propiedades físicas de los polímeros que contribuyen a la velocidad de degradación y por tanto al control de la liberación se incluyen:

- La solubilidad y la permeabilidad al agua; pues determinan el grado de hidrólisis o la degradación hidrolítica de la superficie, es decir la erosión.
- La cristalinidad del polímero; la fase amorfa es más accesible a la permeación del agua o a la actividad enzimática.
- La temperatura de transición vítrea; la cual determina la movilidad de las cadenas del polímero y la susceptibilidad a la hidrólisis y al ataque enzimático.
- Dimensiones físicas (tamaño, relación volumen-superficie, peso molecular); toman un papel importante en etapas avanzadas de degradación, como por ejemplo cuando ocurren fenómenos como la fagocitosis.
- Hidrofilicidad; los polímeros con mayor cantidad de grupos hidrofóbicos son degradados más lentamente que aquellos de naturaleza hidrofílica.

Otros factores que afectan la biodegradación y la selección del polímero a emplear en el desarrollo de sistemas de liberación son la composición y estructura química, la conformación de las cadenas, la presencia de grupos iónicos, la distribución de unidades (monómeros) repetidas o bloques, la presencia de compuestos de bajo peso molecular, las condiciones de procesamiento, la talla (micro- o nanoparticulados), el sitio de implantación, el proceso de esterilización, si contienen o no compuestos adsorbidos, la forma del sistema (matriz, reservorio, hidrogel, película) y los mecanismos de hidrólisis [39, 40]. Considerando el mecanismo que controla la liberación del fármaco se pueden reconocer tres tipos de metodologías de liberación controlada basada en tres mecanismos de erosión del polímero, a través de los cuales el principio activo es liberado por difusión, erosión o por combinación de ambos, ya sea porque el activo esté unido a la columna vertebral del polímero o esté rodeado por una membrana polimérica (ver figura 3).

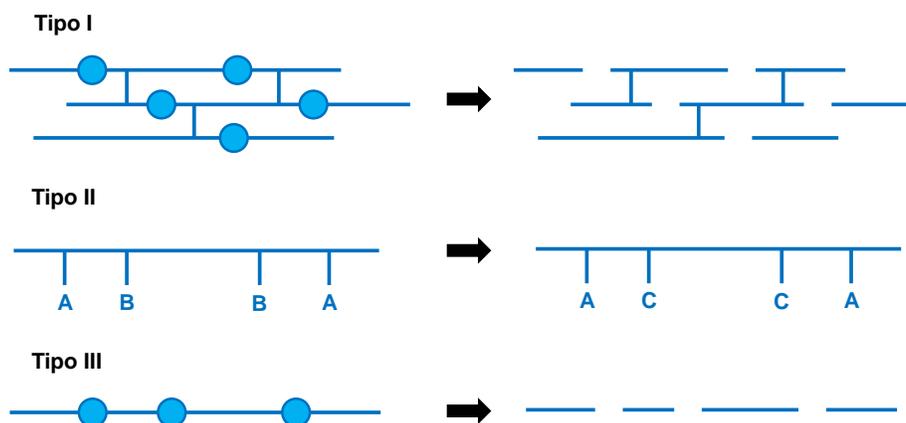


Figura 3. Representación esquemática de los tipos de erosión. Tipo I: degradación de macromoléculas solubles, Tipo II: disolución de macromoléculas insolubles y Tipo III: degradación de macromoléculas insolubles con enlaces lábiles. Tomada y modificada de referencia 40.

La erosión Tipo I refiere a polímeros insolubles en agua debido a la presencia de enlaces covalentes cruzados, los cuales generan polímeros solubles al sufrir una escisión hidrolítica (ejemplo la gelatina o el alcohol polivinílico). En el tipo II, los polímeros que son inicialmente insolubles en agua se solubilizan por hidrólisis, ionización, o protonación de un grupo colgante (ejemplo acetato de celulosa y sus derivados, copolímeros de ácido maléico que son solubilizados por ionización de un grupo carboxilo). Finalmente, en el tipo III de erosión, los polímeros hidrófobos se convierten en moléculas pequeñas solubles en agua por escisión de residuos de la columna vertebral (ejemplo, los policianoacrilatos, los poliésteres como el ácido poli láctico, el ácido poli glicólico o copolímeros de estos como el ácido poliláctico-co-glicólico, PLGA) [40].

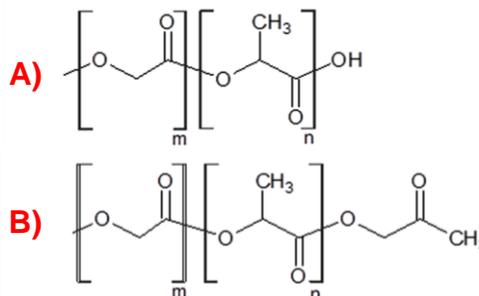
2.2.1 Ácido Poliláctico-co-glicólico (PLGA).

Los poliésteres son una clase de polímeros que han sido ampliamente empleados en la obtención de sistemas farmacéuticos, ya que algunos de ellos son polímeros biodegradables. En este grupo se incluyen los copolímeros del ácido láctico y glicólico conocidos como ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), los cuales cuentan con excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. Desde hace más de dos décadas una gran cantidad de trabajos han sido publicados describiendo el uso del PLGA en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos y soportes para la ingeniería de tejidos. Varios acarreadores poliméricos como microesferas, microcápsulas, nanopartículas, pellets, implantes y películas se han fabricado utilizando estos polímeros para el control de la liberación de una gran variedad de clases de fármacos. También son fáciles de formular en acarreadores para diversas aplicaciones, tales como, administración de fármacos para procesos ortopédicos o en el uso de equipos de diagnóstico [25].

Los PLGA son además una familia de polímeros biodegradables aprobados por FDA (Food and Drug Administration de los Estados Unidos de Norteamérica) para la formulación de fármacos, péptidos, proteínas y otras macromoléculas como ADN. Estos materiales presentan características de biodegradación favorables, un amplio rango de tiempos de erosión y propiedades que pueden ser manipuladas para sostener la liberación de fármacos implantando el sistema sin necesidad de retirarlo. Las propiedades físicas que se manipulan para cargar y controlar la liberación del principio activo desde la matriz polimérica son el peso molecular, la proporción de láctico y glicólico en el cuerpo del polímero y el grupo funcional terminal (grupo carboxílico libre o grupo terminal esterificado). El PLGA es un copolímero de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA). El ácido poliláctico contiene un carbono α asimétrico que se describe típicamente como forma D- o L- en términos estereoquímicos clásicos y a veces como R y S, respectivamente. De esta forma el PLGA es descrito como ácido poli-D,L-láctico-co-glicólico donde las formas D- y L- del ácido láctico están en igual proporción [42].

La estructura química del PLGA se muestra en la figura 4.

Figura 4. Estructura del ácido poliláctico-co-glicólico, PLGA, donde m= residuo de ácido glicólico y n= residuo de ácido láctico. A) PLGA con grupo terminal carboxilo libre y B) PLGA con grupo terminal esterificado.



2.2.1.1 Propiedades fisicoquímicas y de degradación del PLGA.

Este polímero es soluble en varios disolventes como tetrahidrofurano, acetona, diclorometano y acetato de etilo. La presencia de un grupo lateral metilo en el monómero correspondiente al ácido poliláctico (PLA) lo hace más hidrofóbico que el monómero correspondiente al ácido poliglicólico (PGA), por lo tanto un PLGA con mayor proporción de ácido láctico, es menos hidrofílico, genera una menor absorción de agua y en consecuencia una velocidad de degradación más lenta (ver figura 5). En general, las propiedades fisicoquímicas, incluidas las mecánicas, dependen de factores como el peso molecular inicial y su dispersión, así como de la relación ácido láctico/ácido glicólico, incluso estas propiedades determinan el tipo de sistema que se puede formular, el grado de hidrólisis y el control de la degradación del sistema acarreador. Otra de las características que influye directamente en las propiedades de degradación y posible hinchamiento es la cristalinidad. El grado de cristalinidad depende de la relación molar de los monómeros en la cadena polimérica, de tal forma que cuando PGA copolimeriza con PLA reduce el grado de cristalinidad en el PLGA (generando una estructura menos ordenada), aumentando la velocidad de degradación debido a que se facilita la hidratación y por lo tanto la hidrólisis. Se ha reportado que los PLGA que tienen menos del 70% de PGA son amorfos de naturaleza. Un PLGA de proporción 50:50 láctico/glicólico presenta la mayor velocidad de degradación, aproximadamente un mes dependiendo del peso molecular. Por otro lado, la temperatura transición vítrea (T_g) reportada para los PLGA (45-56 °C) se encuentra por encima de la temperatura corporal (37 °C), por lo que son vítreos en la naturaleza y presentan una fuerza mecánica adecuada para ser formulados como sistemas de liberación de fármacos. Esta T_g disminuye cuando se reduce la proporción de ácido láctico y el peso molecular. Finalmente, la viscosidad intrínseca está completamente relacionada con el peso molecular [25, 42].

El PLGA es degradado por erosión uniforme de la matriz polimérica a través de la hidrólisis de los enlaces éster de la cadena cuando este se encuentra en un ambiente acuoso, tanto *in vitro* como *in vivo*. La biodegradación ocurre por medio de escisiones hidrolíticas aleatorias a lo largo de la cadena que van generando pedazos de polímero que al mismo tiempo incrementan cada vez más la cantidad de grupos carboxilos terminales, los cuales de alguna manera catalizan el proceso de biodegradación al ser más hidrofílicos. Este proceso de degradación es rápido al principio (alrededor del 30%) y se va haciendo lento eventualmente. El PLGA es biodegradado en un mecanismo de tres fases [25]:

- 1) Proceso de escisión aleatoria de la cadena. El peso molecular del polímero disminuye significativamente, pero no hay apreciable pérdida de peso y como producto se obtienen monómeros insolubles.
- 2) En la fase intermedia hay una disminución en el peso molecular acompañado por la pérdida rápida de masa. Se van formando oligómeros y monómeros solubles.
- 3) Monómeros y oligómeros solubles son obtenidos como productos. Esta es la fase de la completa solubilización del polímero.

De manera general el PLGA es degradado a residuos de ácido láctico y ácido glicólico, como puede apreciarse en la figura 5. Los residuos de ácido láctico entran al ciclo de los ácidos tricarboxílicos donde son metabolizados y finalmente eliminados del cuerpo como dióxido de carbono y agua, a través del proceso de respiración. Los residuos de ácido glicólico son excretados de la misma forma, o sin cambios a través del riñón. El papel que juegan las enzimas en la degradación del PLGA no es muy claro aún, la mayoría de la literatura indica que la hidrólisis es la principal vía de degradación de esta familia de polímeros [43, 44].

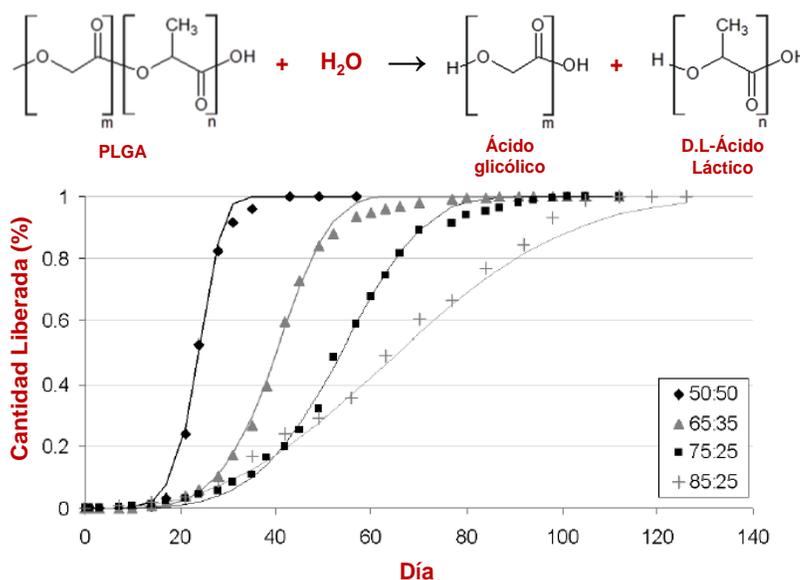


Figura 5. Hidrólisis del ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y perfiles de liberación *in vitro* para PLGA 50:50, 65:35, 75:25 y 85:25; donde por ejemplo 65:35 significa 65% de ácido láctico y 35% de ácido glicólico. Tomada y modificada de referencia 42.

2.2.1.2 Aplicaciones del PLGA en sistemas de liberación de fármacos.

Diferentes fármacos, además de péptidos y proteínas se han formulado utilizando acarreadores de PLGA. La inestabilidad durante la formulación y la corta vida media de algunos principios activos ha llevado a la obtención de sistemas parenterales debido a que se desea eliminar el paso por tracto gastrointestinal y evitar el efecto de primer paso, como es el caso de los péptidos y proteínas. Se han propuesto diferentes acarreadores de PLGA, entre los que se podrían mencionar se encuentran las micropartículas, nanopartículas e implantes, los cuales pueden tener diferentes características y funcionalizaciones. Sin embargo, el desarrollo de micro- y nanopartículas inyectables ha adquirido mayor interés con respecto al uso de implantes dado que se evita los procesos quirúrgicos para la inserción de los sistemas.

El tipo de fármaco y sus propiedades fisicoquímicas juegan un papel importante en la formulación y determinan la eficiencia con que son encapsulados en los sistemas propuestos. De hecho, las interacciones de las sustancias activas con el PLGA dadas por los grupos funcionales que poseen las moléculas tienen un efecto importante en la forma que son liberadas. Se ha observado que las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y puentes de hidrógeno juegan un papel importante en la adsorción, encapsulación y posterior liberación a partir del sistema. Una vez que el fármaco es cargado en los acarreadores, posteriormente se libera en un medio acuoso a través de un proceso de difusión y por erosión de la matriz polimérica en función de las propiedades fisicoquímicas del polímero como el peso molecular, la cristalinidad y la proporción de ácido láctico/ácido glicólico previamente descritas (ver figura 5) [25, 42].

2.3 Microesferas poliméricas.

2.3.1 Definición, características y propiedades.

Las microesferas son definidas como partículas sólidas, generalmente esféricas, con un talla entre 1 y 1000 μm , las cuales presentan una relación volumen-área superficial grande. En el rango de tallas menores a 10 μm presentan propiedades coloidales. Podemos distinguir dos clases de microesferas; I) microcápsulas, cuando la sustancia activa (líquida, sólida, en suspensión o solución) es encapsulada en el centro de la partícula y rodeada por una pared polimérica que protege y controla la liberación y II) micromatrices, cuando la sustancia activa se encuentra dispersa, unida químicamente o adsorbida a través toda la matriz polimérica o en su superficie [45]. La figura 6 muestra los tipos de microesferas que se pueden obtener de acuerdo a su arquitectura.

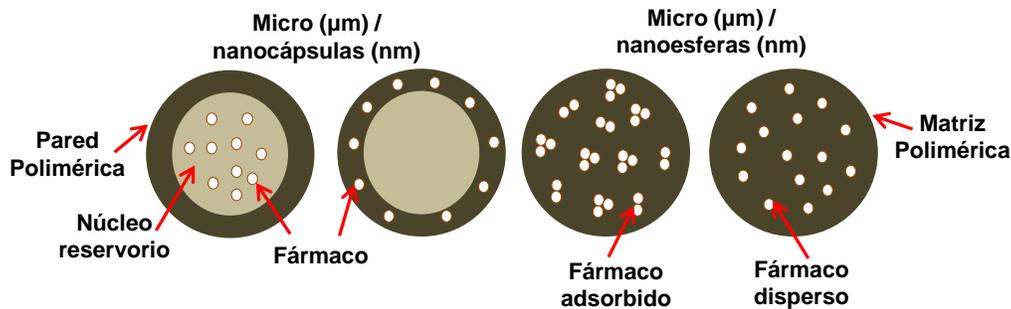


Figura 6. Diferencias entre los tipos de micro- y nanopartículas. Tomada y modificada de referencia 45.

Las microesferas son atractivas desde el punto de vista farmacéutico porque son sistemas de fácil manejo, presentan control en la administración de los fármacos, modifican su velocidad de liberación, pueden enmascarar olor o sabor, además los protegen antes y después de la administración, lo cual es beneficioso sobre todo para sustancias activas lábiles como lo son péptidos, las proteínas, ADN y ARN [46]. En el mercado actual existe un número importante de productos farmacéuticos basados en microencapsulación (vitaminas, hormonas, antihipertensivos, péptidos y proteínas) que están dirigidos a la administración parenteral, sin embargo, este número no refleja la cantidad de trabajos de investigación que proponen el uso de microesferas como sistemas acarreadores de fármacos, incluso para una vía distinta a la parenteral. Por ejemplo, se ha descrito el potencial uso de sistemas basados en microesferas como productos para inhalación [6, 47].

Para la obtención de microesferas se han empleado almidones, gomas, proteínas o ceras, pero se destaca el uso de materiales poliméricos, sintéticos o naturales. De los polímeros naturales que han sido empleados en la obtención de microesferas se encuentran la gelatina, el quitosán, la albúmina, etc. Los polímeros sintéticos preformados ampliamente estudiados y utilizados en el desarrollo de microesferas han sido el ácido poli láctico (PLA), el ácido poli glicólico (PGA) y sus copolímeros, el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) [48].

Las características fisicoquímicas más importantes que pueden ser controladas en la manufactura de las microesferas son la talla de partícula y su dispersión [49, 50], su morfología y la carga de sustancia activa utilizada con respecto a la cantidad de polímero [51, 52]. En la caracterización de microesferas se considera principalmente la talla y su distribución, morfología, área superficial y carga. La talla y su distribución pueden ser analizadas por varios métodos entre los que se incluyen microscopía, análisis por Coulter y técnicas de dispersión de luz (láser o correlación de fotones). La microscopía electrónica de barrido se ha empleado para caracterizar la morfología y la de transmisión para analizar la ultraestructura. Técnicas basadas en microelectroforesis se han empleado para caracterizar la carga eléctrica y potencial zeta de la dispersión. El área superficial expuesta y la porosidad han sido

analizadas por estudios de adsorción de gases o moléculas capaces de formar monocapas sobre la superficie de las partículas, como la técnica de adsorción de nitrógeno o de intrusión de mercurio. Técnicas como la calorimetría diferencial de barrido es empleada para caracterizar la distribución de la sustancia activa en la matriz polimérica [45, 53, 54].

Finalmente, las aplicaciones terapéuticas de las microesferas se han enfocado a la obtención de sistemas de liberación controlada y vectorización de sustancias activas. La liberación controlada del fármaco a partir de las microesferas ocurre por difusión de la sustancia activa a través de los poros que se generan conforme el polímero empieza a erosionar; en el caso de microesferas de PLGA, la estructura del poro y porosidad determinan la capacidad de hidratación para que ocurran los procesos de difusión y erosión en la liberación de los principios activos [55]. Si la sustancia activa es liberada por difusión a través del polímero sin que ocurra erosión, la liberación depende del área superficial de la microesfera y de la distancia que debe recorrer la sustancia activa hacia el medio, de tal manera que, al incrementar el área superficial por reducción de la talla de partícula se observa un incremento en la velocidad de liberación. La distancia a recorrer en la matriz polimérica puede ser controlada manipulando la cantidad de sustancia activa que se carga en el sistema, de tal forma que microesferas con alto contenido de sustancia activa liberan más rápido que aquellas que tienen una menor carga. Se debe tomar en cuenta que la velocidad de liberación puede verse afectada además por las propiedades fisicoquímicas de la sustancia activa, el tipo de polímero empleado, el grado de cristalinidad de los componentes y la inclusión de diluentes o plastificantes [56].

2.3.2 Métodos de preparación.

Los métodos utilizados en la preparación de microesferas dependen de la naturaleza del material empleado, de la sustancia activa, las especificaciones de carga, el tamaño deseado y el mecanismo de liberación esperado. En general, son métodos basados en microencapsulación cuyas técnicas utilizan procesos de polimerización de monómeros y el uso de polímeros preformados. La elección de técnica de microencapsulación depende de la naturaleza del polímero, del fármaco, del uso previsto y de la duración que se espera para el sistema (terapia). La técnica empleada debe considerar los siguientes requisitos: (i) la estabilidad y la actividad biológica del fármaco, no debería verse afectada durante la encapsulación en el producto final, (ii) el rendimiento de microesferas con una talla requerida (hasta 250 μm , idealmente $<125 \mu\text{m}$) y la eficiencia de encapsulación en esencia deben ser altos, (iii) la calidad de las microesferas y los perfiles de liberación del fármaco deben ser reproducibles dentro de ciertos límites o especificaciones y (iv) las microesferas como producto final deben ser un polvo libre de flujo sin procesos de agregación o adherencia [57].



Entre los métodos empleados para su manufactura se encuentran los siguientes [42, 45]:

Por polimerización de monómeros;

- a) Suspensión
- b) Emulsión
- c) Por entrecruzamiento químico o térmico ("*cross-linking*")

Empleando polímeros preformados;

- a) Evaporación de disolvente
- b) Coacervación o separación de fases
- c) Secado por aspersión ("*spray drying*")
- d) Recubrimiento por aspersión ("*spray coating*")
- e) Secado por congelación ("*freeze drying*")
- f) Precipitación

De los métodos antes mencionados, los de evaporación de disolvente han sido los más ampliamente utilizados. La metodología incluye un paso previo de emulsificación (simple o múltiple) que es seguido por la evaporación de la fase orgánica empleada. Cuando en la primera etapa se tiene una emulsión sencilla que generalmente es del tipo W/O entonces se tiene el método llamado simple emulsión- evaporación de disolvente. En este método el polímero es disuelto en un disolvente orgánico inmisible (como el diclorometano) y el fármaco en una fase acuosa (la cual es una solución de un estabilizante como el alcohol polivinílico); las fases se mezclan y emulsifican a temperatura ambiente. Sin embargo esta técnica es adecuada para obtener microesferas o microcápsulas cargadas con fármacos principalmente hidrofóbicos [58].

El método de doble emulsión- evaporación de disolvente es uno de los más populares y ampliamente utilizados para encapsular sustancias activas hidrofílicas y fue la técnica seleccionada para la obtención de microesferas en el presente trabajo. En este método el polímero y la sustancia activa son solubles en el disolvente orgánico, frecuentemente diclorometano o acetato de etilo. Se obtiene una primera emulsión W_1/O a altas revoluciones para generar pequeñas y discretas gotas que después son transferidas a un gran volumen de una solución acuosa W_2 que contiene un agente estabilizante (como el alcohol polivinílico o poloxámeros). La mezcla anterior se somete a agitación para generar una segunda emulsión $W_1/O/W_2$ [59]. Si la fase acuosa (W_2) presenta una capacidad suficientemente alta para extraer la mayoría del disolvente orgánico de la fase orgánica (O), el proceso se denomina de extracción del disolvente. La figura 7 resume el método de doble emulsión evaporación de disolvente. Finalmente, las microesferas pueden ser recuperadas mediante filtración o centrifugación.

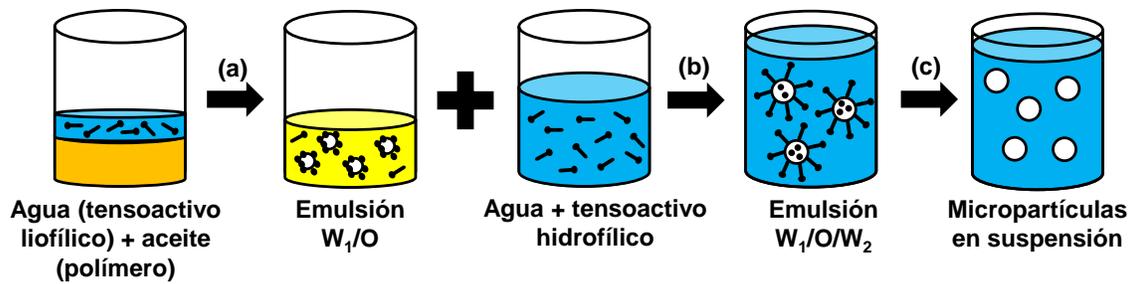


Figura 7. Método de doble emulsión-evaporación de disolvente para la obtención de microsferas. (a) emulsificación con altas fuerzas de corte, (b) emulsificación con bajas fuerzas de corte y (c) evaporación de la fase orgánica. Tomada y modificada de referencia 80.

Una de las principales ventajas de este método es que se pueden obtener microsferas de un tamaño deseado (en un rango amplio de tamaños) con sólo manejar las variables de control del proceso [60, 61]. Una modificación al método $W/O/W$ descrito es agregar un agente generador de poros en la primera emulsión para obtener microsferas con alta porosidad. Entre los agentes empleados como generadores de poros se encuentran algunas sales como el cloruro de sodio, carbohidratos como la sacarosa, ceras hidrocarbonadas y sales efervescentes como el bicarbonato de amonio. Este último es utilizado para generar estructuras mesoporosas con macroporos debido a la producción de burbujas de dióxido de carbono y amoniaco que provocan la expansión de los poros [20, 62].

Dependiendo del método empleado es como se definen las características del producto final, las cuales toman en consideración aspectos asociados al tamaño de partícula (menor a $150\ \mu\text{m}$ para poder ser inyectado con jeringas y agujas convencionales), morfología (regularidad en la superficie, porosidad cuando se requiere), eficiencia de encapsulación (pretendiendo que sea alta, ya que las sustancias activas y los polímeros empleados son materiales costosos que no se recuperan fácilmente) y cinética de liberación (una rápida liberación inicial o efecto “burst” entre el 20 y 30% durante las primeras 24 horas) [61].

2.3.3 Microesferas porosas.

Recientemente los sistemas porosos han mostrado ser excelentes acarreadores de moléculas y células debido a su alta porosidad, área superficial e interconectividad de los poros a través del sistema. Se ha reportado que las microsferas porosas podrían actuar como acarreadores de células al ser inyectadas como una suspensión de cultivo celular en la reconstrucción de tejidos dañados, ya que su gran área superficial facilita la adhesión de las células al acarreador favoreciendo el aumento en la densidad celular, mientras que la porosidad ayuda al transporte de nutrientes o sustancias activas, además de presentar como ventaja el poder ser administradas por vía parenteral [63]. En el área de liberación de fármacos se ha propuesto como alternativa el formular fármacos a través de

mecanismos de adsorción, ya que por un lado pueden cargar cantidades terapéuticas de fármaco al igual que las microesferas convencionales y por otro se resguarda la integridad de los principios activos al no someterlos a procesos de microencapsulación, mientras que el grado de porosidad generado les permite controlar la liberación de la sustancia activa, aun cuando tienen la desventaja de presentar una rápida liberación inicial de la sustancia activa (conocida como efecto “burst” o liberación abrupta), entregando el 100% del fármaco cargado en sólo 24 h [22, 64, 65]. Los trabajos con microesferas porosas en la liberación de fármacos se han encaminado a utilizar sus ventajas buscando técnicas que permitan mantener la liberación de fármacos durante un tiempo adecuado para la terapia y la reducción de la frecuencia de dosis [52]. Existen trabajos que destacan el uso de microesferas de alta porosidad y baja densidad para la administración pulmonar debido a que sus propiedades de flujo las hacen adecuadas para depositarse en las vías respiratorias altas [66, 67].

2.4 Nanopartículas poliméricas.

2.4.1 Definición, características y propiedades.

Las nanopartículas poliméricas son partículas sólidas con propiedades coloidales, en las que la sustancia activa puede estar encapsulada, adsorbida o unida químicamente a la partícula. La talla es considerada entre de 1 y 1000 nm, algunos autores indican tallas entre 5-100 nm, sin embargo la literatura farmacéutica reconoce como nanopartículas aquellas dispersiones con tallas menores a un micrómetro [15, 68]. Se pueden distinguir dos tipos de nanopartículas de forma muy similar a las micropartículas (ver figura 6): nanoesferas que son sistemas matriciales donde la sustancia activa puede estar dispersa o adsorbida en la matriz polimérica y nanocápsulas que son sistemas reservorios compuestos de una membrana polimérica que rodea un núcleo acuoso u oleoso donde la sustancia activa se encuentra disuelta, pero puede estar adsorbida a la superficie de la cápsula [69].

Para la obtención de nanopartículas se han empleado materiales poliméricos naturales (como proteínas y lípidos) o sintéticos (por polimerización o preformados). Los polímeros naturales, como se ha mencionado anteriormente, han ido perdiendo interés en la obtención de nanopartículas, ya que se desea evitar el uso de materiales (por ejemplo proteínas o lípidos) que pudieran estimular el sistema inmunológico (puedan presentar antigenicidad), además de que se desea también reducir el uso de agentes tóxicos durante procesos como el entrecruzamiento o “*cross-linking*”. Por otra parte, residuos de monómeros o subproductos que pudieran ser tóxicos o no biodegradables limitan la preparación de nanopartículas por procesos de polimerización para el uso terapéutico. Así que debido a lo anterior es que la atención se ha enfocado al uso de polímeros preformados biodegradables, como el PLA, PGA y PLGA [15, 70].

Las nanopartículas poliméricas se han convertido en un área importante de investigación en el campo de los sistemas de liberación de fármacos porque se ha encontrado que pueden formular y entregar una gran cantidad de sustancias activas (fármacos hidrofílicos, hidrofóbicos, proteínas, vacunas, biomacromoléculas, etc.) en diferentes partes y órganos del cuerpo y además por periodos sostenidos de tiempo. Estas estructuras presentan varias características favorables en el desarrollo de productos farmacéuticos, entre las que se pueden mencionar se encuentran la capacidad para controlar la liberación, pueden ser vectorizadas de forma activa o pasiva (ser capturadas por un tumor debido al efecto EPR; promoción en la permeación y retención), protegen al fármaco contra factores externos (luz, oxígeno u otros agentes) y cuentan con una gran área superficial, de tal forma que al estar en contacto con el medio incrementan la velocidad de disolución de las sustancias activas, mejorando su humectación, incrementando su solubilidad o favoreciendo la adsorción de moléculas [71]. Como dispersiones coloidales, las nanopartículas presentan movimiento browniano el cual es aleatorio e irregular en el medio de dispersión, esto aunado a las fuerzas de atracción y repulsión entre las partículas son lo que determina su grado de agregación, el cual puede ser estimado por medio del potencial zeta. Una nanosuspensión físicamente estable debido únicamente a repulsiones electrostáticas tendrá un potencial Z mínimo de ± 30 mV [72]. Diferentes técnicas fisicoquímicas son aplicadas para caracterizar nanopartículas, algunas de ellas se indicaron anteriormente en la caracterización de microesferas. Los principales parámetros considerados son la forma, la talla, las propiedades de superficie (carga y área), densidad y concentración [73].

Otra de las ventajas que caracteriza a las nanopartículas en comparación con las microesferas es que estas pueden ser administradas por la vía intravenosa. Los capilares más pequeños en el organismo tienen un diámetro de 5-6 μm que permite la entrega de los sistemas nanoparticulados a prácticamente cualquier parte del cuerpo, es decir que pueden diseminarse de forma sistémica; existen reportes de liberación de fármacos desde nanopartículas hacia sistema linfático, cerebro, pulmones, hígado, vaso, paredes arteriales, tumores, articulaciones, etc. [74]. Sin embargo, a pesar de ello las nanopartículas deben presentar estabilidad de tal manera que no generen agregados que puedan causar embolias al ser introducidas al organismo.

Una vez administradas, la distribución de la nanopartículas en el cuerpo es controlada por el tamaño y la gran área superficial que poseen; estas propiedades generan un mayor contacto con el medio que las rodea, incluso para algunos materiales se han observado propiedades mucoadhesivas que favorecen su localización y biodisponibilidad. La desventaja de lo anterior es que pueden ser reconocidas y eliminadas por el sistema fagocítico mononuclear o por macrófagos, es por ello que se han empleado técnicas para modificar la superficie con polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEGilación) o poloxámeros que puedan evitar el proceso de opsonización y posterior fagocitosis [75,

76]. Las nanopartículas administradas por vía parenteral (intravenosa, subcutánea o por inyección intramuscular como sistema depósito o “depot”) han mostrado control en la liberación y vectorización de sustancias activas, incluidos péptidos y proteínas, mejoran su absorción y localización, adicionalmente se ha visto que los protegen contra la degradación enzimática y en muchos casos han sido capaces de reducir sus efectos secundarios [77]. Los resultados obtenidos son prometedores para la industria farmacéutica debido a que los métodos de preparación de nanopartículas son simples y fácilmente escalables. Algunas de las aplicaciones terapéuticas que se han propuesto para las nanopartículas se han enfocado a la liberación controlada y vectorización de sustancias activas (por ejemplo antibióticos, antivirales, oligonucleótidos, citoestáticos, péptidos y proteínas) para el tratamiento de infecciones intracelulares y diferentes tipos de cáncer. Desde el punto de vista de la tecnología farmacéutica se busca desarrollar sistemas nanoparticulados capaces de mejorar la administración parenteral de péptidos y proteínas y ofrecer la posibilidad de utilizar otras vías de administración [71].

2.4.2 Métodos de preparación.

Durante las últimas tres décadas se han desarrollado numerosos métodos para la obtención de nanopartículas poliméricas. La técnica de preparación puede ser elegida en función de las características fisicoquímicas del fármaco, el tipo de polímero a utilizar y la terapia que se desea alcanzar.

Al igual que con las micropartículas, las nanopartículas poliméricas convencionalmente se han preparado a través de procesos de nanoencapsulación, empleando dos vías [78, 79, 80]:

Por polimerización de monómeros;

- a) Emulsión
- b) Interfacial

Utilizando polímeros preformados;

- a) Emulsificación-Evaporación de disolvente
- b) Separación por sales (“*salting out*”)
- c) Desplazamiento de disolvente
- d) Emulsificación-difusión de disolvente
- e) Nanoprecipitación
- f) Tecnología de fluidos supercríticos

Los métodos de preparación son en general parecidos entre sí en el sentido de que involucran una fase orgánica donde es disuelto el material polimérico y la incorporación de un no disolvente (como el agua) que contiene un agente un estabilizante, con la finalidad de generar la agregación del polímero y la formación de la nanoestructura. En el presente trabajo se seleccionó el método de emulsificación difusión de disolvente para la obtención de nanopartículas debido a que puede emplearse para varios tipos de polímeros y genera resultados que son reproducibles de lote a lote en talla y morfología. La figura 8 resume el método de emulsificación-difusión de disolvente. Consiste en el uso de disolventes parcialmente miscibles en agua que previamente son saturados en el medio acuoso. Esta saturación de la fase orgánica con agua y de la fase acuosa con el disolvente orgánico permite mejorar el equilibrio termodinámico del sistema. La técnica consiste en la formación de una emulsión OW entre la solución de un polímero en el disolvente orgánico saturado con agua y una fase acuosa saturada con el disolvente orgánico que contiene el estabilizante (por ejemplo alcohol polivinílico o poloxámeros). La subsecuente adición de agua causa que el disolvente orgánico difunda hacia la fase externa provocando la formación de las nanopartículas [81]. Finalmente las nanopartículas son recuperadas con técnicas como el secado por aspersión, liofilización o filtración.

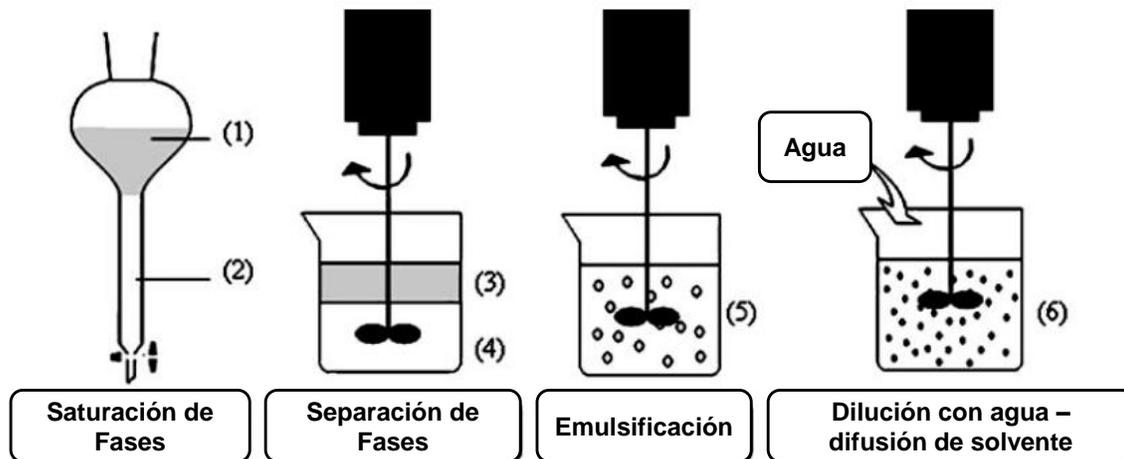


Figura 8. Esquema del método de emulsificación-difusión para la obtención de nanopartículas (NP). (1) Disolvente orgánico parcialmente soluble en agua saturado con agua, (2) agua saturada con disolvente, (3) fase orgánica con polímero disuelto, (4) fase acuosa compuesta de agua y tensoactivo, (5) emulsificación y (6) adición de agua para la difusión de disolvente y formación de la nanopartícula. Tomada y modificada de referencia 80.

2.5 Péptidos y proteínas como agentes terapéuticos.

A principios de los años 70 del siglo XX, los avances en biología molecular y en ingeniería genética permitieron una mejor comprensión de las raíces moleculares y de la función de los péptidos y las proteínas en algunas enfermedades que afectan a la humanidad, como el cáncer, desordenes inmunológicos, artritis, inflamación, diabetes, esclerosis múltiple, infecciones virales o enfermedades neurodegenerativas. Desde la primera vez que se produjo el ADN recombinante por Paul Berg en 1972, se crearon grupos de investigación como el de Herbert Boyer quien en 1973 transformó genéticamente la bacteria *Escherichia coli* empleando plásmidos recombinantes. Boyer perfeccionó los métodos tecnológicos de ingeniería genética y con la ayuda de la empresa Ely Lilly produjeron la primera proteína humana recombinante para uso terapéutico en 1982, Humulin® (insulina humana recombinante) [8, 82]. De entonces a la fecha, varias tecnologías han sido utilizadas para la producción de fármacos biotecnológicos; como la clonación del material genético humano y el desarrollo de sistemas para la producción *in vitro* de biomoléculas, las cuales han permitido la obtención de casi cualquier sustancia biológica basada en ADN recombinante (como péptidos y proteínas) a escala industrial dando paso al crecimiento de la investigación científica en esta área y al desarrollo de medicamentos empleando estas moléculas [83]. A partir de entonces crece un mercado emergente que emplea las técnicas de ingeniería genética, clonación y ADN recombinante para producir péptidos y proteínas terapéuticos, sentando las bases de la industria farmacéutica biotecnológica que al día de hoy cuenta con más 110 compañías que incluyen en sus productos más de 80 moléculas en estudios clínicos y más de 73 productos que ya se encuentran en el mercado y que han sido aprobados por la FDA. Ejemplo de esas moléculas son la eritropoyetina, el filgrastim, la insulina humana recombinante, el interferón β 1, el interferón α , las interleucinas-1 y -2, hormona de crecimiento, etc, con ventas de 54 millones de dólares para el 2011 [84].

Los péptidos y las proteínas son parte integral del organismo, desempeñan importantes funciones en procesos biológicos y fisiológicos, actúan como ligandos en señalización, como enzimas en procesos metabólicos, como anticuerpos en eventos inmunológicos, además participan en la replicación, transcripción y traducción del DNA. Partiendo de este punto de vista muchos de los fármacos biotecnológicos presentan mejores ventajas que los orgánicos en el tratamiento de enfermedades crónicas porque en general se espera que sean menos tóxicos al ser moléculas endógenas y que se pueda predecir su comportamiento *in vivo*. Sin embargo, la eficacia y seguridad está relacionada, como en otros fármacos, con la presencia de contaminantes tales como residuos virales, celulares u otras biomoléculas, de ahí que los procesos de purificación y caracterización analítica sean etapas críticas en sus procesos de obtención [85].

Aun cuando el avance en la producción de péptidos y proteínas ha sido rápido, los avances en formulación y desarrollo de sistemas de liberación para este tipo de moléculas comenzó recientemente, pues la investigación en las últimas dos décadas ha mostrado que la vía de administración y las propiedades fisicoquímicas de las moléculas tienen efecto en la absorción y la eficacia *in vivo*; pues los péptidos y proteínas sufren degradación en fluidos corporales (sobre todo por la vía oral) e inestabilidad en su manipulación. Es por ello que las formulaciones actuales son soluciones, liofilizados o suspensiones que son administradas como inyecciones subcutáneas o intramusculares.

Las estrategias en el desarrollo de sistemas de liberación de péptidos y proteínas se ha enfocado proponer vías de administración no invasivas como la vía bucal, nasal, rectal, vaginal y pulmonar, o bien empleando otros enfoques como el uso de técnicas como la iontoforesis, sonoforesis y microagujas para evitar las barreras enzimáticas altamente presentes en la vía oral y en la liberación gastrointestinal debido a la presencia de proteasas como la tripsina y peptina o aminopeptidasas que degradan y eliminan el fármaco reduciendo la biodisponibilidad y para reducir el rápido aclaramiento por filtración glomerular, endocitosis y fagocitosis. Por el lado tecnológico se han concentrado en diseñar sistemas y formulaciones que aseguren la integridad de las moléculas, que faciliten la administración, reduzcan los efectos secundarios y adversos, que entreguen el fármaco en el sitio de acción, que extiendan la vida media en anaquel y de permanencia en el organismo, además de que se mejore la aceptación por parte del paciente y su calidad de vida [18, 26, 86, 87].

2.5.1 Formulación: propuestas, retos y limitaciones.

El éxito en la formulación de los péptidos y las proteínas depende del grado de conocimiento que se tenga acerca de sus propiedades fisicoquímicas (peso molecular, tamaño, forma, carga, coeficiente de partición, estructura secundaria, hidrofiliidad, permeabilidad, etc), propiedades biológicas (funcionalidad), de su estabilidad física y química (degradación, agregación y precipitación), de su inmunogenicidad (reconocimiento celular), del mecanismo de eliminación del organismo y propiedades farmacocinéticas (vida media, metabolismo y aclaramiento) [88]. Así pues, a pesar de sus atractivas propiedades como agentes terapéuticos, los fármacos biotecnológicos presentan serias limitaciones; suelen ser moléculas grandes, con estructuras complejas (hasta estructuras cuaternarias), enlaces lábiles en fluidos corporales o acuosos, y una alta dependencia de la actividad terapéutica con la estructura conformacional, es así que estas características representan el principal reto en su formulación, ya que la estructura de las proteínas es sensible a las condiciones externas. De este modo, durante la formulación y la administración se deben considerar factores como el pH, la temperatura, la interacción con superficies, labilidad al estrés físico e interfaces [12, 24, 89].

Debido a su frágil naturaleza, la investigación farmacéutica tecnológica ha propuesto por su parte el desarrollo de sistemas acarreadores en escala micro- y nanométrica, empleando sobre todo materiales poliméricos biodegradables de origen natural o sintético, con la finalidad de reducir las limitantes en la administración y liberación de péptidos y proteínas. Procesos de sustitución o modificación química (como la PEGilación o la acilación) y la creación de sistemas acarreadores de proteínas como liposomas, hidrogeles, microesferas, nanopartículas, nanocápsulas e implantes han sido utilizados para formular péptidos y proteínas, ofreciendo como ventajas un control en la liberación con niveles plasmáticos constantes, protección durante la administración, mayor tiempo en circulación y entrega del fármaco en el sitio de acción [90, 91, 92].

Desde hace más de una década se ha discutido el uso del PLGA en la preparación de acarreadores poliméricos, como nanopartículas y microesferas, empleando métodos de micro- y nanoencapsulación para cargar péptidos y proteínas con altas eficiencias [93]. Sin embargo, se ha visto una liberación incompleta de la proteína nativa debido a problemas de estabilidad, generando especies proteicas degradadas o desnaturalizadas que no solo son terapéuticamente inactivas sino que también pueden presentar efectos inmunogénicos o tóxicos [94]. Esta inestabilidad de los péptidos y las proteínas durante la preparación de sistemas acarreadores está asociada con el estrés físico y químico presente en cada uno de los pasos críticos de la micro- y nanoencapsulación, los cuales se encuentran resumidos en la figura 9, donde el uso de disolventes orgánicos, altas temperaturas, agitación, altas fuerzas de corte, cambios de pH e interfaces son eventos comunes.

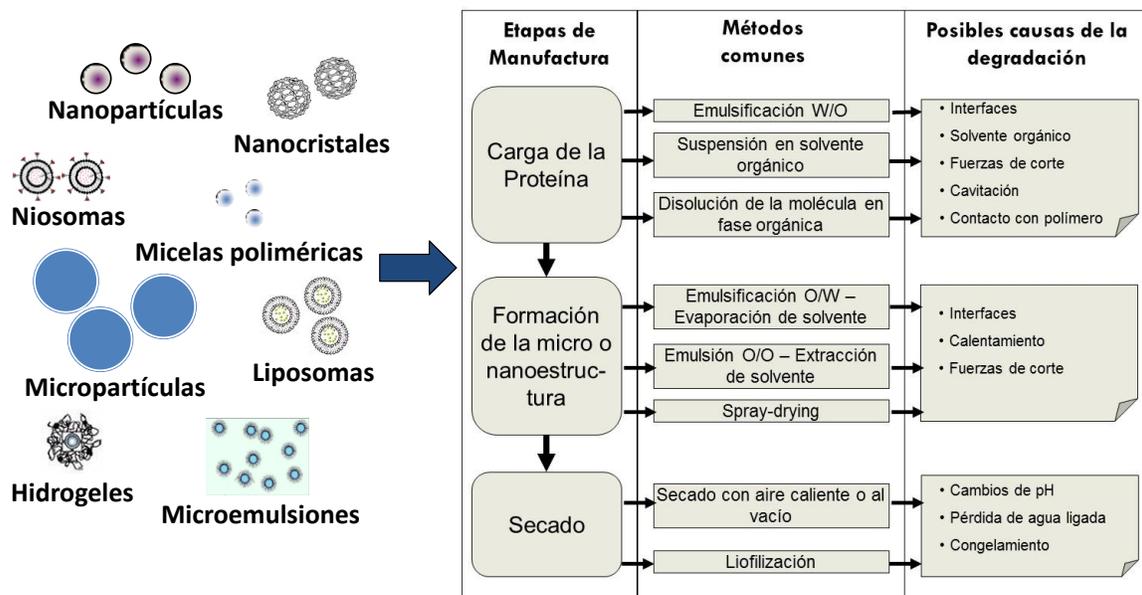


Figura 9. Pasos y etapas en la micro- o nanoencapsulación durante la preparación de acarreadores propuestos para péptidos y proteínas, indicando posibles causas de degradación en cada paso.

De este modo, procesos de oxidación, hidrólisis, deamidación, agregación, precipitación y despliegue de la estructura secundaria y exposición de regiones hidrofóbicas son posibles causas de degradación e inefectividad, que en la mayoría de los casos no son efectos reversibles [9, 95, 96]. Observando estas evidencias es posible mencionar que los procesos comunes de encapsulación han dificultado, en algunos casos, la formulación de proteínas. Con base en lo anterior es que se han venido sugiriendo enfoques de estabilización, métodos y mecanismos que reduzcan al mínimo estos efectos, entre los que se han reportado se incluyen [9, 27]:

- a) La adición de azúcares, polioles o polientielglicol para evitar el despliegue la protección de la estructura conformacional en las interfaces.
- b) Incrementar la concentración de fármaco o agregar otras proteínas para reducir el radio interface/proteína o para competir por las interfaces.
- c) Evitar la emulsificación empleando fases no acuosas o reducir el tiempo de emulsificación para evitar las fuerzas de corte.
- d) Empleo de par iónico hidrofóbico para competir por la interacción con el polímero.
- e) Añadir crioprotectores durante la liofilización o empleando otros métodos de secado a bajas temperaturas para evitar la desnaturalización.
- f) Empleo de soluciones tampón para controlar el pH.
- g) Evitar el uso de disolventes orgánicos, adsorbiendo sobre superficies en un medio acuoso.

La adsorción de fármacos sobre nanopartículas y microesferas poliméricas constituye una opción para acarrear activos; pues además de preservar el fármaco de una degradación potencial en los pasos antes descritos, también evita la posibilidad de reacción durante procesos de polimerización o de unión química con el polímero [22, 28, 29, 65].

2.5.2 Adsorción de péptidos y proteínas: definición, aplicaciones y características.

La adsorción es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas (adsorbato) son adheridos o retenidos en la superficie de un material (adsorbente). Cabe distinguir dos tipos de adsorción: física o de naturaleza química. La adsorción que tiene lugar debido a las fuerzas de Van der Waals se llama generalmente adsorción física o fisorción. En este caso, la molécula adsorbida no está fija en un lugar específico de la superficie, sino más bien está libre de trasladarse dentro de la interface. Esta adsorción, en general, predomina a temperaturas bajas. Si el adsorbato sufre una interacción química con el adsorbente, el fenómeno se llama adsorción química, adsorción activa o quimisorción. Las energías de adsorción son elevadas, del orden de las de un enlace químico, debido a que el adsorbato forma unos enlaces fuertes localizados en los centros activos del adsorbente. Esta adsorción suele estar favorecida a una temperatura elevada.

Entender como ocurre el proceso de adsorción en un ambiente acuoso y sobre una superficie sólida ha permitido aplicar este conocimiento en diferentes áreas de la química y la biología. Por ejemplo, la adsorción de péptidos y proteínas sobre partículas poliméricas, tanto *in vivo* como *in vitro*, ha sido aprovechada en la biomedicina con aplicaciones en el uso de órganos y tejidos artificiales, en la creación de biosensores, en las tecnologías de los inmunoensayos y técnicas de separación cromatográficas, en la inmovilización de enzimas y separación de células inmunomagnetizadas en tumores, así como en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos [97, 98, 99]. En los sistemas de liberación de fármacos puede ser útil la adsorción *in vivo* para el reconocimiento del sistema y su vectorización, mientras que la adsorción *in vitro* puede emplearse para atrapar fármacos en los sistemas o bien para funcionalizarlos. De ahí que se puedan adsorber en superficies planas como la de los implantes poliméricos o en superficies en movimiento cuando se emplean partículas [99].

La adsorción es un proceso complejo que se ve afectado por el pH, la temperatura, la fuerza iónica, las propiedades del disolvente, así como por las propiedades del adsorbato (fármaco) y el adsorbente (superficie polimérica), y es conducido por las fuerzas que se generan entre las moléculas y las superficies, incluyendo fuerzas débiles como las de van der Waals, fuerzas hidrofóbicas y/o electrostáticas. Las cinéticas de adsorción, desorción y reversibilidad de péptidos y proteínas sobre una superficie polimérica pueden apreciarse en la figura 10.

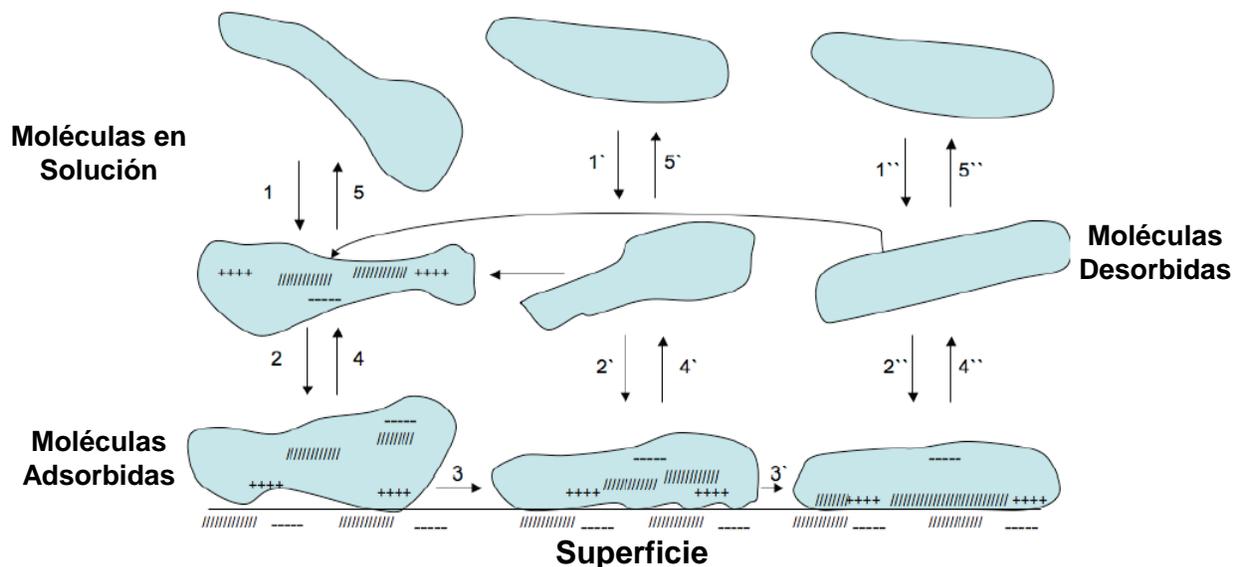


Figura 10. Esquema de las cinéticas de adsorción. 1: transporte de la proteína hacia la superficie, 2: adhesión del proteína a la superficie, 3: cambios conformacionales, 4: desorción de la molécula y 5: incorporación al medio de disolución y reversibilidad al estado nativo (cuando aplica). Notas: (//////) = grupos hidrofóbicos, (-----) = grupos hidrofílicos, y (+++++) = grupos cargados. Tomada y modificada de referencia 100.



En el proceso de adsorción, antes de ocurrir los pasos indicados, primero la molécula y la superficie deben ser hidratadas, las proteínas deben obtener una orientación espacial adecuada hacia la superficie y debieron haber vencido las repulsiones electrostáticas entre ellas [100]. La velocidad con que se las moléculas se acercan a la superficie, la cantidad que permanece adsorbida, la estabilidad en la superficie, el tiempo que permanecen adheridas, la velocidad con que son separadas, los cambios conformacionales y la reversibilidad para obtener nuevamente la estructura nativa se ven influenciados por varios factores:

- a) Conformación de la molécula: estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria. Los péptidos y las proteínas tiene una estructura tridimensional asociada con el tipo y la proporción de aminoácidos (hidrofílicos e hidrofóbicos) que componen su cadena y la forma en que estos interactúan formando bucles aleatorios (“*coils*”), α -hélices y β -láminas. En estos arreglos existe una gran cantidad de puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura de la proteína sobre todo en disolventes no polares. En un ambiente acuoso, los aminoácidos hidrofóbicos mantienen las proteínas plegadas, pues los aminoácidos hidrofílicos se orientan hacia el medio, manteniendo en el interior de la molécula un núcleo hidrofóbico. Así, dependiendo de la polaridad del medio o del disolvente es que una proteína puede desnaturalizarse para crear una conformación estable. Con base en esto se conocen dos tipos de proteínas: las duras y las suaves; las primeras tienen un núcleo hidrofóbico altamente estable que no se ve expuesto al cambiar de medio o al interactuar con superficies hidrofílicas y las segundas tienen una baja estabilidad interna, por lo que despliegan su forma ante los cambios del medio en que se encuentran y con cualquier superficie que interactúen [101].
- b) Efecto del pH. La carga total de una proteína depende de la distribución de cargas sobre la superficie y está relacionada con la proporción de aminoácidos polares y si estos están ionizados o no en función del pH. Cálculos matemáticos y experimentales muestran que los péptidos y las proteínas presentan un punto isoeléctrico, el cual es el pH donde carga total de la molécula es neutra. Fenómenos de atracción y repulsión, entre las moléculas y las superficies, serán observados en función de los cambios de pH. Un medio que tenga un pH por encima del punto isoeléctrico provocará que la molécula tenga una carga positiva y por debajo una carga negativa. Las interacciones electrostáticas son uno de los principales factores que favorecen el proceso de adsorción. Estudios muestran que la máxima adsorción y los menores cambios conformacionales se encuentran en los puntos más cercanos al punto isoeléctrico debido a que las repulsiones entre las moléculas ya adsorbidas en la superficie es mínima [102, 103].

- c) Tipo de superficie. En general las moléculas proteicas cambian su conformación en gran medida cuando son adsorbidas sobre superficies hidrofóbicas en comparación con las superficies hidrofílicas, debido a las interacciones entre el interior hidrofóbico de las moléculas y la hidrofobicidad de la superficie. Esto provoca que la proteína se extienda sobre la superficie, cambie su conformación y exponga su núcleo hidrofóbico. Más aún, una interacción con una superficie hidrofóbica se ve energéticamente más favorecida en comparación con una superficie hidrofílica, ya que las moléculas de agua que generalmente colindan una superficie hidrofílica, son liberadas al medio, lo que aumenta la entropía, reduce la energía libre de Gibbs y despeja la superficie. Lo anterior también genera que la desorción sea más lenta (velocidad de liberación) o vaya decreciendo con el tiempo. Experimentos realizados con gradientes de hidrofobicidad han demostrado que al incrementar esta propiedad aumenta la cantidad adsorbida, incluso en mayor cantidad que una superficie hidrofílica (a menos que existe un efecto de concentración). Sin embargo, para crear menores cambios o reversibilidad de la conformación es preferible adsorber sobre superficies pobremente hidrofóbicas, hidrofílicas y favoreciendo las interacciones electrostáticas [100, 103].
- d) Efecto de la concentración. El área que ocupa una molécula proteica sobre una superficie es llamada marca o *"footprint"*. Normalmente esta marca aumenta cuando el tiempo de contacto aumenta, deformando la molécula; este fenómeno es llamado extensión o *"spreading"*. La extensión de la marca dependerá de las propiedades de la molécula y de la superficie como se mencionó anteriormente, pero también estará determinada por la presencia de moléculas vecinas en la superficie. De tal manera que una alta concentración de moléculas acercándose a la superficie ocuparán más rápido el espacio, habrá una mayor cantidad adsorbida y con una menor extensión, es decir que el empaquetamiento o conformación de la molécula se verá afectada en menor medida a altas concentraciones. Se ha visto que una molécula proteica no cuenta con tiempo suficiente para extenderse completamente en una superficie hidrofílica debido a la vecindad de las moléculas y a la presencia de moléculas de agua en comparación con una superficie hidrofóbica donde la velocidad de extensión es más rápida y el grado de desnaturalización es mayor. Incluso, la forma también podría determinar el grado en que las moléculas se ordenan en la superficie haciendo evidente los efectos estéricos [104].
- e) Temperatura. Los péptidos y proteínas presentan una mayor adsorción a altas temperaturas. Lo anterior es debido a que a una mayor temperatura el grado de desnaturalización se ve aumentado, exponiendo grupos hidrofóbicos o bien generando puentes disulfuro en aminoácidos de cisteína que elevan dramáticamente el grado de adsorción [105]. Es importante

tomar en cuenta que existen moléculas termoestables, las cuales no presentan cambios conformacionales en un amplio rango de temperaturas.

Una vez adsorbidos, los péptidos y proteínas no desorben libremente, generalmente lo que se hace es diluir el medio para crear un gradiente de concentración y una posterior difusión, pero si esto no es suficiente entonces se puede modificar el pH, la fuerza iónica o bien adicionando pequeñas moléculas como electrólitos u otras proteínas de bajo peso molecular para hacer un intercambio en la superficie. El tipo de superficie y las fuerzas que interactúan controlan el proceso de desorción o liberación, siendo más rápido cuando la superficie es hidrofílica, cuando se involucra un solo tipo de fuerzas (es decir, que no hay combinación de interacciones polares y no polares), cuando las fuerzas son predominantemente de van der Waals o electrostáticas, o bien cuando la superficie se encuentra saturada con gran cantidad y poca distancia entre las moléculas vecinas. Convencionalmente la energía de Gibbs es mucho menor en el proceso de adsorción que en el de desorción, por lo que esta última suele ser más lenta [105]. La reversibilidad de los cambios conformacionales al estado nativo dependerá de los factores que influyen en la adsorción como se menciona arriba.

2.5.2.1 Isotermas de adsorción.

Los procesos de adsorción son normalmente representados por isotermas, donde la concentración adsorbida (Γ) es graficada contra la concentración (C en $\mu\text{g/mL}$) de las moléculas en solución, a temperatura constante. Las formas de las isotermas obtenidas de forma experimental son muy similares a las isotermas propuestas por Langmuir [$\Gamma/\Gamma_m = KC/(1+KC)$], donde Γ es la cantidad adsorbida por unidad de área, Γ_m es el valor máximo de adsorción o saturación, C es la concentración de proteína o péptido y K es la constante de equilibrio entre adsorción y desorción. La figura 11 muestra una isoterma de proteínas característica, en la que se muestra la dependencia de la cantidad adsorbida de una proteína modelo (albúmina sérica bovina) y la influencia del pH sobre la cantidad adsorbida. Sin embargo, otros autores han propuesto modelos de isotermas que emplean el modelo anterior al que además le incluyen un parámetro constante (n) que depende del tipo y forma de la proteína; como el modelo de Langmuir-Freunlich [$\Gamma/\Gamma_m = KC^{1/n}/(1+KC^{1/n})$], el cual considera que una molécula proteica no se une solamente a un único sitio activo, donde “ K ” depende de la superficie y la proteína y “ n ” solamente de la proteína [106].

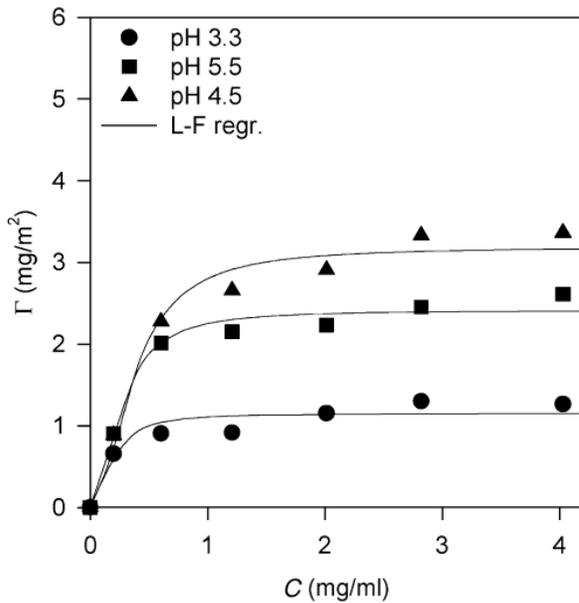
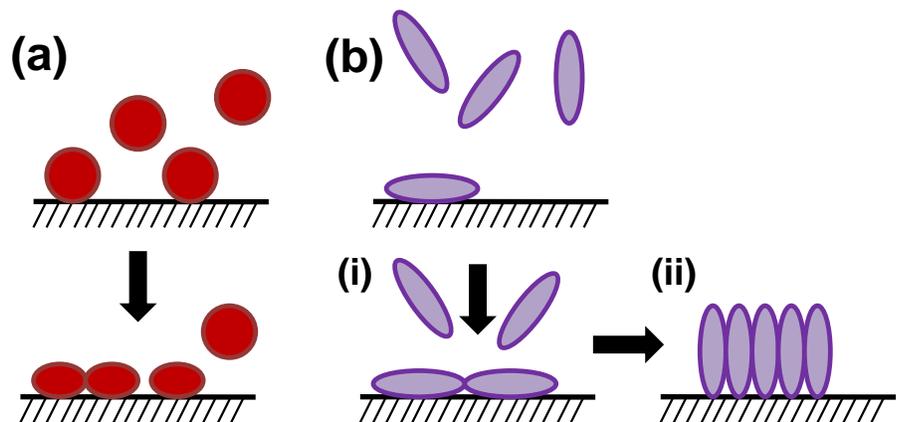


Figura 11. Isothermas de adsorción de albúmina sérica bovina en partículas de poliestireno sulfonado, en función del pH. Modelo: Langmuir-Freundlich. Notas: - L-F regr = regresión de Langmuir-Freundlich. Tomada de referencia 107.

Las proteínas globulares presentan una clara meseta asociada a la formación de una monocapa debido al empaquetamiento cercano de las moléculas en la superficie. A bajas concentraciones esta monocapa no es continua. Mientras que en moléculas más pequeñas de peso molecular o tamaño es posible ver más de una meseta que representa la formación de multicapas a partir de la superficie de adsorción. Así, a partir de la isoterma se pueden inferir el tipo de adsorción tomando en cuenta la forma de la proteína, la concentración y el tipo de superficie para determinar si hay adsorción tipo lateral (“side-one”) o terminal (“end-one”), ver figura 12 [99].

Figura 12. Esquema que representa la adsorción de una proteína globular (a) y una proteína cilíndrica (b). (i) adsorción lateral-“side-one” y (ii) adsorción terminal-“end-one”. Tomada y modificada de referencia 99.



2.6 Péptido modelo empleado: acetato de leuprolide.

El acetato de leuprolide es un potente agonista sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas (GrRH), inicialmente estimula a la pituitaria para que se lleve a cabo la liberación de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), conocidas como gonadotropinas. Paradójicamente después de su administración crónica se alcanza una saturación de los receptores de la pituitaria, de tal manera que se inhibe la secreción de la testosterona y estrógenos de forma abrupta en un proceso conocido como “castración química” que reduce los niveles plasmáticos de testosterona generando una reducción en el crecimiento tumoral. Cabe mencionar que estos efectos son temporales y reversibles. Es efectivo en el tratamiento de enfermedades hormona-dependientes como el cáncer de próstata, de mama, endometriosis, pubertad precoz, tumor uterino y adenomiosis, sin la necesidad de castración quirúrgica y sin presentar serios efectos secundarios [108, 109].

Es un nonapéptido con la siguiente secuencia (estructura primaria) 5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-Leu-Leu-Arg-Pro-NHEt-CH₃COOH. Este péptido es obtenido por síntesis química. Su estructura química se puede observar en la figura 13.

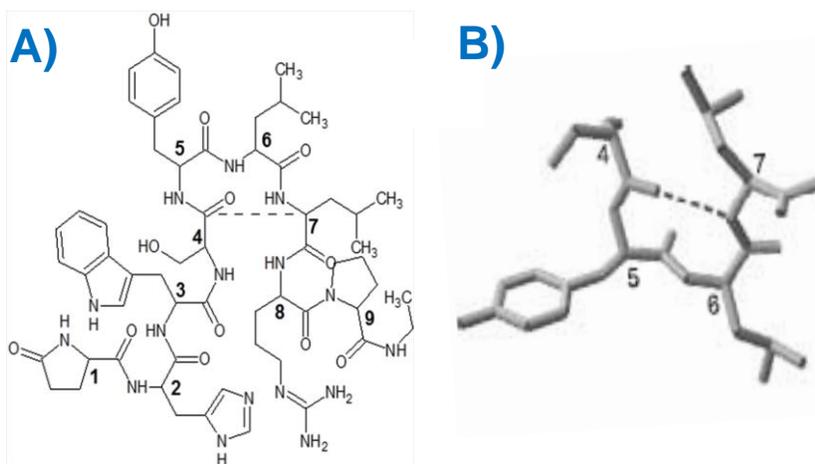


Figura 13. A) Estructura química del acetato de leuprolide y B) conformación de β -giro en medio acuoso de la porción 4-7 del acetato de leuprolide, tomada de referencia 111.

El leuprolide es generalmente administrado por vía subcutánea o intramuscular, ya que por otras vías presenta baja biodisponibilidad (de 0.1 a 5% aprox.) [108]. Es un polvo fino, esponjoso, altamente hidrofílico, soluble en agua (solubilidad de ~400 mg/mL), etanol, dimetilsulfóxido y propilenglicol, tiene un pKa de 9.6 [109], es inestable en los fluidos corporales por degradación enzimática, a 37°C y en medio acuoso presenta degradación principalmente por hidrólisis con una cinética de pseudo-primer orden, en medio no acuoso se degrada por agregación y oxidación [110]. La molécula en solución presenta un conformero activo que consiste de un β -giro formado por puentes de hidrógeno entre los aminoácidos 4 y 7, ver figura 13 [111].

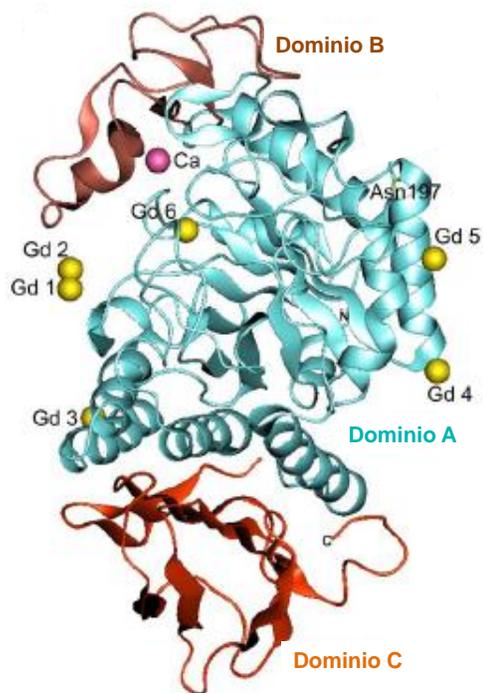
Existen en el mercado sistemas basados en microesferas de PLGA que son utilizados como sistemas depósito o tipo “depot” (Lupron®, Eligard®, Prostatap®) con concentraciones de 3.75 o 7.5 mg para 1 mes, 22.5, 30 o 45 mg para 3, 4 y 6 meses respectivamente [109]. El péptido es liberado por dos mecanismos: una etapa inicial de difusión de la sustancia activa ubicada en la superficie de la microesfera, seguida por una etapa de elución conforme el polímero se erosiona [108]. Recientemente la FDA aprobó un implante osmótico no-biodegradable subcutáneo (Viadur®) de 72 mg para 12 meses, el cual es indicado para el tratamiento de cáncer de próstata en etapa avanzada [112]. Algunos parámetros farmacocinéticos encontrados del acetato de leuprolide son: un volumen de distribución promedio de 37 L, tiempo de vida media de 3.6 h, una biodisponibilidad estimada de 94% por vía intramuscular y subcutánea y menor al 0.1% por vía oral [113, 114].

2.7 Proteína modelo empleada: α -amilasa.

Como proteína modelo se empleó la enzima α -amilasa, obtenida por biotecnología a partir del microorganismo *Aspergillus oryzae*. Es una glicoproteína globular con una estructura primaria de 475 aminoácidos, con un peso molecular de ~51,000-54,000 kD, cuyo núcleo pesa aproximadamente 50,000 kD, con dos residuos con grupo tiol (SH) formando cuatro enlaces disulfuro. También es conocida como 1,4- α -D-Glucan-glucanohidrolasa. Su pH óptimo es de 6.2 a 7.0 y su punto isoeléctrico es de 4.2. Los iones de calcio (Ca^{+2}) y cloruros (Cl^{-1}) son esenciales para su estabilidad. Posee tres regiones o dominios bien conservados en su estructura primaria, los cuales contienen los aminoácidos que forman parte del centro activo (dominio A) y que estabilizan la molécula (dominios B y C) [115, 116], ver figura 14.

Es una enzima presente en la saliva y jugos gástricos, se produce en las glándulas salivales y el páncreas, participa en los procesos metabólicos de carbohidratos y polisacáridos, hidrolizando los enlaces 1-4 alfa de polisacáridos como el almidón y el glucógeno, generando glucosa y maltosa. En condiciones de pancreatitis se secreta α -amilasa en sangre, es por ello que las mediciones de α -amilasa son importantes en el diagnóstico de pancreatitis aguda, ya que es considerada como la prueba de detección más práctica, precisa y sensible [117,118]. Debido a que su temperatura de desnaturalización es de 60 °C o más es empleada como modelo para estudiar técnicas de estabilización térmica de enzimas [119].

Figura 14. Representación computacional de la estructura terciaria de la α -amilasa. Los tres dominios se identifican como A, B, y C. Los iones de Calcio (Ca) y Gadolinio (Gd) se representan como esferas de color rosa y amarillo, respectivamente. Tomada y modificada de referencia 119.



La enzima α -amilasa se ha encapsulado en matrices de almidón de papa para obtener sistemas matriciales que degraden enzimáticamente al absorber agua y que puedan liberar sustancias activas a un tiempo, velocidad y condición deseada [120]. También se ha empleado para la producción industrial de glucosa y fructuosa a partir de almidones, en la obtención de ciclodextrinas y geles de almidón termosensibles, así como en el tratamiento industrial de algodones y fibras [121].

III. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de tecnologías para la obtención de sistemas de liberación controlada requiere de la consideración de varios factores, como son: las propiedades fisicoquímicas de la sustancia activa, la posible vía de administración, la naturaleza del sistema, la habilidad para ser vectorizado y su biocompatibilidad. La formulación de péptidos y proteínas debe considerar que su inestabilidad en procesos de micro- y nanoencapsulación está relacionada a la pérdida de la conformación, desnaturalización, agregación (covalente o no covalente) y cambios químicos cuando las moléculas son sometidas a interfaces durante etapas de emulsificación, presencia de superficies hidrófobas, contacto con disolventes orgánicos, altas fuerzas de corte en etapas de homogenización y altas temperaturas en el secado. Es por lo anterior y por el interés terapéutico de este tipo de moléculas en el tratamiento de enfermedades crónicas, que se ha venido proponiendo nuevos sistemas de liberación, mejoras o nuevas técnicas en los procesos de formulación para que se reduzcan al mínimo los efectos no deseados.

Con base en las ventajas que tiene el uso de materiales biodegradables, la gran área superficial con que cuentan las nanopartículas poliméricas, así como el soporte que representan las microesferas porosas al ser usadas como vehículos acarreadores de fármacos debido a su gran área superficial, a sus poros interconectados y a las alternativas que ofrece el fenómeno de adsorción física en un medio acuoso; en el presente trabajo se aprovechan todas estas propiedades para proponer un sistema de liberación de fármacos sensibles ensamblado bajo un enfoque “bottom-up (producción de abajo y hacia arriba)”, empleando un proceso llamado “ensamblaje por adsorción/infiltración”. En este proceso, nanopartículas, adsorbidas con fármaco en un medio libre de disolventes orgánicos, son infiltradas en microesferas porosas empleando una técnica simple de inmersión acuosa. Este nuevo sistema no involucra al fármaco sensible en los procesos de obtención de los componentes (micro- y nanopartículas), sino hasta el momento del ensamblaje del sistema, el cual se lleva a cabo en un ambiente amigable para este tipo de moléculas, es decir, en un medio acuoso donde las condiciones fisicoquímicas favorecen la interacción entre los componentes y el biofármaco.

La propuesta es ensamblar sistemas a través de nanoestructuras infiltradas en vehículos porosos para obtener un nuevo sistema de liberación para péptidos y proteínas que en su proceso de obtención:

- Se promueva la protección de la integridad del fármaco (péptidos y proteínas).
- Que sea libre de disolventes orgánicos
- Que evite el estrés fisicoquímico.
- Se incorporen cantidades terapéuticas de los fármacos.
- Se reduzcan las posibles causas de degradación.
- Se modifique la velocidad de liberación. Una liberación controlada o prolongada que permita regular las dosis y disminuir la frecuencia de administración.
- Se preparen sistemas eficaces.
- Se produzcan sistemas que puedan ser administrados por diferentes vías, es decir que durante el desarrollo se tome en cuenta la mejor vía de administración (sistemas que puedan ser inyectados con jeringas convencionales).

IV. HIPÓTESIS

Si es posible adsorber e infiltrar nanopartículas poliméricas biodegradables igualmente adsorbidas con fármaco, en un vehículo o soporte poroso biodegradable de talla micrométrica (microesferas porosas), bajo un proceso simple de inmersión en medio acuoso, entonces se podrá obtener sistemas ensamblados para ser empleados como acarreadores de agentes terapéuticos sensibles al estrés fisicoquímico, como son los péptidos y las proteínas, que puedan administrarse por diferentes vías, incluida la parenteral.

Si este proceso de “ensamblaje por adsorción/infiltración” de nanopartículas produce un proceso de saturación superficial del vehículo poroso en diferentes grados entonces será posible cargar cantidades terapéuticas del fármaco y modificar la velocidad de liberación.

Si el proceso de ensamblaje se realiza en un medio amigable para los péptidos y proteínas, libre de disolventes orgánicos, sin estrés físicoquímico, donde se mantenga a un mínimo los cambios conformacionales y se tengan tiempos cortos de contacto (e.g. un medio acuoso con condiciones fisicoquímicas adecuadas), entonces como resultado se tendrá que la integridad y por tanto la actividad de la molécula no se verán afectadas por el proceso de formulación.

V. OBJETIVOS

5.1 General.

Obtener, caracterizar y evaluar un nuevo sistema de liberación controlada (SLC) de fármacos sensibles al estrés fisicoquímico, como los péptidos y las proteínas, utilizando un proceso de ensamblaje libre de disolventes orgánicos, basado en la adsorción e infiltración de nanopartículas poliméricas biodegradables en un soporte poroso biodegradable de talla micrométrica (microesferas poliméricas), y empleando un método simple de inmersión en medio acuoso.

5.2 Particulares.

- Seleccionar materiales biodegradables útiles para la obtención de las micro- y nanoestructuras (componentes del sistema), así como los fármacos o moléculas modelo.
- Desarrollar y validar los métodos analíticos para la determinación de la carga y/o la eficiencia de adsorción, la cantidad de péptido y proteína liberada por el sistema, así como la actividad enzimática de la proteína.
- Obtener nanopartículas biodegradables empleando el método de emulsificación-difusión de disolvente y caracterizarlas por su morfología, talla promedio, potencial Z, así como área superficial, utilizando microscopia electrónica de barrido (MEB), dispersión dinámica de luz, movilidad electroforética y adsorción de nitrógeno (BET).
- Optimizar el método de obtención de los soportes o vehículos biodegradables porosos de talla micrométrica (microesferas), tomando como parámetros de referencia la talla promedio, morfología, diámetro de poro expuesto, porosidad y área superficial, empleando técnicas como microscopia electrónica de barrido (MEB), dispersión dinámica de la luz y adsorción de nitrógeno (BET).
- Llevar a cabo estudios de adsorción de las moléculas modelo sobre los componentes del sistema (nanopartículas y microesferas porosas), por separado y empleando el método de inmersión en medio acuoso, para determinar la capacidad de carga de fármaco, así como el tipo de interacción entre ellos, mediante la eficiencia de adsorción y el potencial zeta, con técnicas de espectrofotometría UV, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y movilidad electroforética.

- Ensamblar el sistema de liberación propuesto, bajo el enfoque “bottom-up” y con el proceso de adsorción/infiltración, empleando nanopartículas poliméricas biodegradables, microesferas porosas biodegradables y las moléculas modelo. Llevar a cabo su respectiva caracterización; eficiencia de adsorción, área superficial, morfología, y estudios calorimétricos, utilizando técnicas de espectrofotometría UV, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), adsorción de nitrógeno (BET), microscopia electrónica de barrido (MEB), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TGA).
- Evaluar *in vitro* los perfiles de liberación de las moléculas modelo a partir de los sistemas ensamblados, empleando medios de disolución que simulen las condiciones de la posible vía de administración. Adicionalmente, analizar el ajuste de los datos obtenidos a modelos cinéticos que permitan explicar el mecanismo de liberación asociado.
- Realizar estudios de integridad de las moléculas modelo antes y después de ser cargadas en los sistemas ensamblados, empleando estudios *in vitro* (haciendo uso de sustratos para la actividad enzimática de proteínas) y dicroísmo circular para detectar cambios conformacionales o de la estructura secundaria.

VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1 Diagrama de flujo de la metodología experimental.

La figura 15 muestra un esquema general de la ejecución de las etapas involucradas en el desarrollo de este proyecto de investigación.

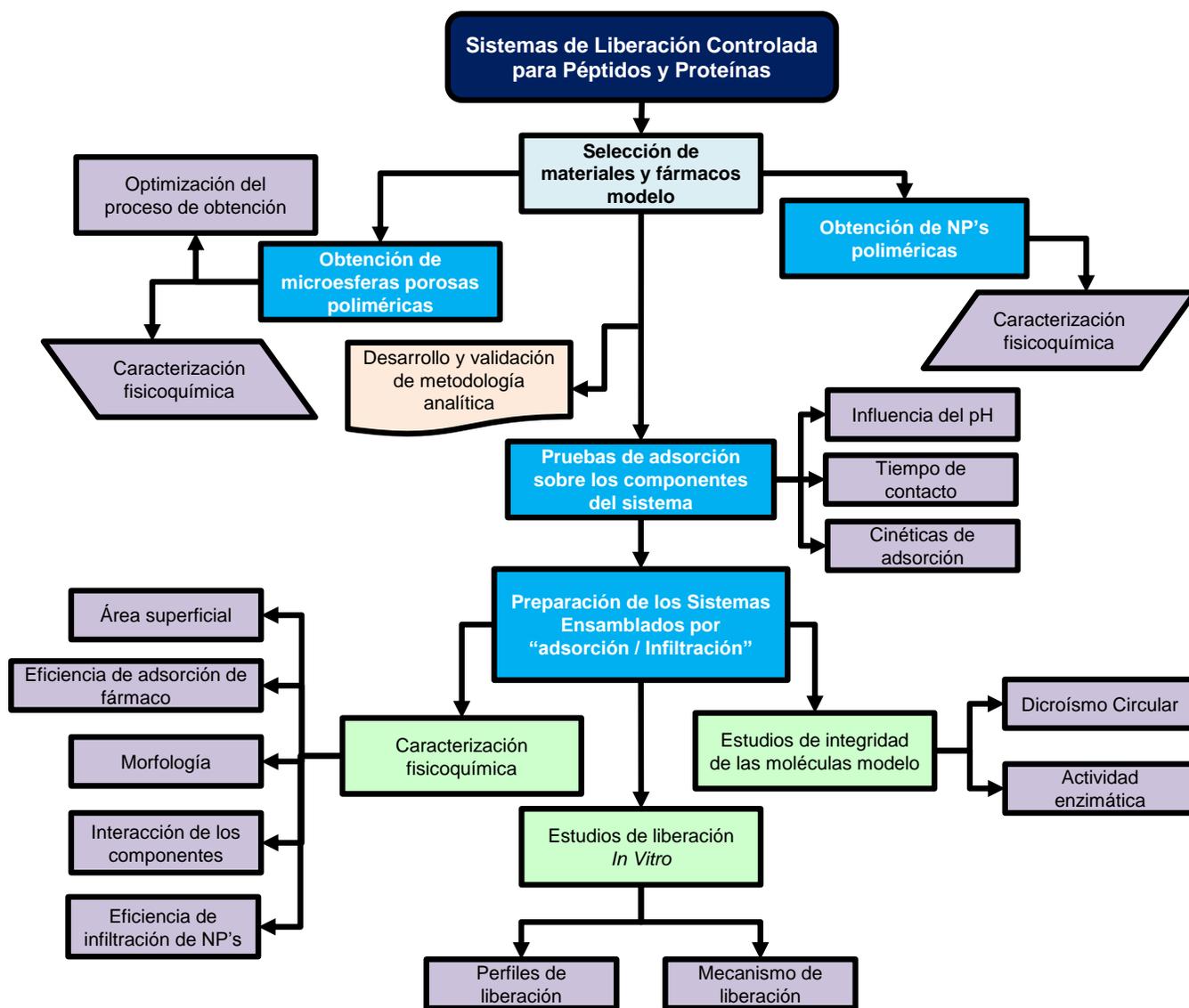


Figura 15. Esquema general de las etapas del proyecto de investigación. NP's = nanopartículas.

6.2 Selección de materiales.

Los reactivos, materiales de apoyo y equipos empleados en el presente estudio se encuentran en la siguiente lista.

Materiales y reactivos	Equipos empleados
<p>Polímeros:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácido Poliláctico-co-Glicólico, PLGA 50:50, DLG 4A, Mw: 38000 (Lakeshore Biomaterials, Birmingham, AL, USA) • Alcohol Polivinílico (PVAL), Mowiol® 4-88, PM: 26,000 g/mol (Glomarza, México) <p>Moléculas modelo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Acetato de Leuprolide EP4 (Donado por Probiomed México), Lote: LP0302. • α-Amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i>. (Sigma-Aldrich 10065-50G). <p>Reactivos y disolventes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Acetato de etilo grado analítico (Fermont, México) • Ácido fosfórico grado reactivo, bicarbonato de amonio grado reactivo y cloruro de metileno (JT Baker, EUA) • Cloruro de metileno grado analítico (JT Baker, México) • Fosfato monobásico de potasio e hidróxido de sodio grado reactivo (Fermont, México) • Manitol grado reactivo (JT Baker, México) • Trietilamina grado analítico (Sigma-Aldrich, Alemania) • Kit de ácido bicinchoninic para determinación de proteínas (BCA1, sigma-aldrich). • Metanol y acetonitrilo grado HPLC (JT Baker, México) • 2-chloro-4-nitrophenyl-α-D-maltotriósido (93834 CNP-G3 Sigma-Aldrich) • Cloruro de sodio, cloruro de calcio y tiocianato de potasio (J.T.Baker®). • Bicarbonato de amonio, fosfato de sodio monobásico, citrato de sodio, ácido cítrico, ácido acético e hidróxido de sodio (Productos Químicos Monterrey, SA) • Agua destilada de RiOs™ distiller (EMD Millipore). • Agua HPLC de Simplicity UV® (Millipore) 	<ul style="list-style-type: none"> • Agitador de velocidad variable (Caframo® RZR-1, Canadá) • Agitador magnético multiplaza (Barnstead 509C International, EUA) • Balanza analítica (Boeco® BBC32, Alemania) • Calorímetro diferencial de barrido DSC Q10 (TA Instruments, EUA) • Cámara Neubauer (Hausser Scientific®, EUA) • Campana de recubrimiento con oro (JEOL®, JFC-1100, Japón) • Contador submicrónico de partículas (Coulter® N4 Plus, EUA) • Columna C8 (250x4.6, 5μm de tamaño de partícula, Microsorb®, EUA) • Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, bomba P210, automuestreador 400, detector UV-Vis 320 (Varian®, EUA) • Espectrofotómetro UV-Vis (Varian®, Cary IE 9531003, Australia) • Liofilizadora (Labconco®, Freezone 6, Reino Unido) • Microscopio Óptico (Iroscope®, SI-PHF, EUA) • Rotaevaporador (Laborota® Heidolph 4000, Alemania) • Sonicador (Bransonic® Branson 5210, EUA) • Ultracentrífuga (Beckman® Optimal LE-80K, EUA) • Ultraturrax® (IKA Labortechnik, T10 y T25 B, USA) • Equipo para adsorción de N₂, Bel-Japón Minisorp II • Zetasizer® (Malvern Instruments, Reino Unido) • Equipo de para termogravimetría TGA Q5000IR (TA Instruments, USA) • Espectropolarímetro JASCO J-815 para dicroísmo circular • Microscopio electrónico (JSM-25 S microscopio II, JEOL, Japón) • Mastersizer®2000, (Malvern, Reino Unido)

6.2.1 Polímero biodegradable.

Para este trabajo se seleccionó el ácido poliláctico-co-glicólico 50:50 (PLGA), ya que es un material ampliamente utilizado en el desarrollo de sistemas de liberación inyectables (algunos ya en el mercado), tales como microesferas, nanopartículas e implantes. Sus propiedades como el peso molecular, la relación molar láctico/glicólico y grupos terminales funcionales, posibilitan poder modificar la liberación del fármaco. Además es un polímero aprobado por la FDA para la administración de fármacos.

6.2.2 Fármacos-moléculas modelo.

Se emplearon un péptido y una proteína como biomoléculas modelo. El péptido modelo elegido fue el acetato de leuprolide, un péptido sintético de nueve aminoácidos que por lo general se administra por vía parenteral debido a su escasa biodisponibilidad oral, vida media corta e inestabilidad en los fluidos corporales [108]. Como proteína modelo se empleó la enzima α -amilasa, la cual es una proteína globular de 475 aminoácidos que participa en los procesos metabólicos de carbohidratos y polisacáridos y que se ha utilizado en sistemas de liberación de fármacos basados en matrices polisacáridas [117].

6.3 Obtención de microesferas porosas de PLGA.

Se adaptó el método propuesto por Kim y colaboradores (2006) "doble emulsión ($W_1/O/W_2$)-evaporación de disolvente" para obtener microesferas porosas de tamaño $\leq 150 \mu\text{m}$ [62]. La fase orgánica (O) se preparó disolviendo 500 mg de PLGA 50:50 en 8 mL de cloruro de metileno. Después, 50 mg de NH_4HCO_3 (un agente que produce poros interconectados a través de la generación de gas) se disolvieron en 5 ml de agua destilada (W_1). La primera emulsión (W_1/O) se preparó con 2.5 mL de la fase W_1 y 8 mL de la fase O, agitando con un homogeneizador (Ultraturrax®, IKA, EE.UU.) a 11000 rpm durante 1 min. Esta emulsión fue luego vertida gota a gota a 300 mL de una solución acuosa al 0.5% p/v de alcohol polivinílico (PVAL), fase W_2 , para ser re-emulsificada con un agitador de velocidad variable (Caframo®, RZR-1, EE.UU.) a 250 rpm durante 4 h o hasta evaporar el completamente el disolvente orgánico. Una vez que el disolvente se evaporó, las microesferas fueron recuperadas por filtración, lavadas tres veces con agua destilada y secadas a temperatura ambiente.

6.4 Caracterización de las microesferas porosas de PLGA.

6.4.1 Talla de partícula y su distribución.

Una muestra de microesferas secas fue suspendida en agua destilada hasta alcanzar una concentración que permite una señal adecuada en el equipo de medición. El diámetro promedio y la

distribución de tamaño de partícula se determinó utilizando un analizador de tamaño de partículas por difracción láser (Mastersizer®2000, Malvern, Reino Unido). La talla fue confirmada por microscopía electrónica de barrido. El diámetro promedio fue determinado en 3 diferentes lotes de microesferas.

6.4.2 Morfología.

Muestras de microesferas porosas se observaron bajo microscopía electrónica de barrido (MEB) (JSM-25 S microscopio II, JEOL, Japón) para evaluar su morfología. Dos gotas de una suspensión acuosa de microesferas porosas se extendieron sobre un cubreobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Después los cubreobjetos se sometieron a una cámara de vacío (Ion Escudo fina catódica JFC-1100, JEOL, Japón) durante 3 min a 1,2 kV, 10 mA y 0,15 torr de presión, para ser recubiertos con una película de oro de aproximadamente 20 nm de grosor. Se observaron diferentes campos y se obtuvieron micrografías.

6.4.3 Diámetro de poro expuesto.

Para la estimación del diámetro del poro superficial se contaron 100 poros de las microesferas observadas por microscopía electrónica de barrido en 5 diferentes campos. Empleando las imágenes anteriores, a cada poro evaluado se le trazó una línea vertical, una horizontal y dos diagonales. Con la escala indicada por la barra de referencia de las imágenes se obtuvo el valor equivalente para cada línea trazada. El diámetro de poro expuesto se estableció como el promedio de los valores resultantes de cada una de las líneas trazadas. Finalmente, se calculó el promedio general y la desviación estándar para los 100 poros. La medición se llevó a cabo en 3 diferentes lotes de microesferas.

6.4.4 Análisis del área superficial y porosidad.

El área superficial se midió sobre muestras de microesferas secas empleando isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno con un equipo de Bel-Japón Minisorp II y aplicando una técnica multipunto. El área superficial específica se calculó con la ecuación de Brunauer-Emmet-Teller (BET) [122, 123], a -196 °C. La porosidad y distribución de tamaño de poro se obtuvo por el método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) [123] en la etapa de desorción. Debido a la baja temperatura de transición vítrea de las muestras ($T_g \approx 45$ °C), previo a la adsorción de nitrógeno, las muestras fueron desgasificadas a 30 °C.

6.5 Obtención de nanopartículas sólidas de PLGA.

Las nanopartículas se prepararon utilizando el método de emulsificación-difusión disolvente descrito por Quintanar-Guerrero y colaboradores (1996) [79]. Brevemente, una proporción 1:3 de una fase orgánica compuesta de un disolvente parcialmente soluble en agua (acetato de etilo) y de una fase

acuosa compuesta solo de agua destilada, se agitaron durante 5 min con el objetivo de saturar las fases; al final de este tiempo las fases ya saturadas se recuperaron empleando un embudo de separación. Con la fase acuosa saturada se preparó una solución al 5% p/v de PVAL; el cual funge como agente estabilizante. Después, 400 mg de PLGA 50:50 se disolvieron en 20 ml de fase orgánica saturada. Esta solución orgánica de polímero se emulsionó con 40 ml de la solución de PVAL utilizando un homogeneizador (Ultraturrax®, IKA, EE.UU.) a 11000 rpm durante 10 minutos para obtener una emulsión de gotas discretas de tamaño nanométrico. Posteriormente, a la emulsión anterior se añadieron 160 ml de agua destilada para conseguir la difusión del disolvente orgánico a la fase acuosa y provocar con ello la agregación del polímero y la formación de las nanopartículas. En el siguiente paso, el disolvente orgánico se eliminó de la suspensión acuosa de nanopartículas con presión reducida a 90 rpm y 30 °C, utilizando un rotaevaporador (Laborota 4000, Heidolph, USA). La recuperación de las nanopartículas se llevó a cabo por centrifugación (Optima® LE-80K, Beckman, USA) a 20,000 rpm durante 20 min. Las nanopartículas fueron luego resuspendidas en 3 ml de agua destilada y lavadas tres veces con agua destilada. Por último, las muestras lavadas se congelaron y liofilizaron (Labconco®, Freezone 6, EE.UU.) a 50×10^{-3} mbar y -40 °C durante 24 h, usando manitol como crioprotector.

6.6 Caracterización de las nanopartículas de PLGA.

6.6.1 Determinación de la talla y distribución de partícula.

La técnica de dispersión dinámica de luz láser fue utilizada para determinar la talla promedio y el índice de polidispersión. Se empleó un contador de partículas submicrométricas (Coulter N4 Plus®, EE.UU.). Nanopartículas secas fueron resuspendidas en agua destilada durante 12 horas con la ayuda de agitación magnética. Posteriormente estas suspensiones fueron diluidas con agua destilada hasta encontrar las cuentas adecuadas en el equipo de medición. Las mediciones se realizaron en un ángulo fijo de 90° durante 60 s a una temperatura de 20 °C; la longitud de onda de la luz láser fue de 678 nm (He / Ne de 10 mW). La medición se llevó a cabo en más de tres lotes.

6.6.2 Potencial Z.

El potencial Zeta (ζ) de las nanopartículas se midió empleando una técnica basada en movilidad electroforética, usando un equipo Zetasizer® (Malvern Instruments, Reino Unido). Diferentes suspensiones acuosas de nanopartículas, preparadas como en el apartado anterior, fueron medidas después de una dilución apropiada con agua destilada. Las mediciones se realizaron por triplicado en 3 diferentes lotes.



6.6.3 Morfología y análisis del área superficial.

Muestras secas de nanopartículas fueron preparadas y analizadas como se indica en los apartados 6.4.2 y 6.4.4.

6.7 Desarrollo y validación de métodos analíticos.

Tres métodos analíticos fueron desarrollados y validados para cumplir con los parámetros de linealidad, repetibilidad, exactitud y límites de detección y de cuantificación. Un primer método fue para cuantificar acetato de leuprolide durante la adsorción y liberación, empleando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El segundo método, conocido como BCA, se validó para cuantificar α -amilasa durante la adsorción y liberación, éste hace uso de agentes que provocan la reducción de un ión metálico (Cobre) que forma un complejo con la proteína y un agente oxidante (ácido bicinconínico), generando un compuesto colorido que es leído espectrofotométricamente a 562 nm. El tercer método fue desarrollado para evaluar la actividad enzimática de la α -amilasa, el cual utiliza como sustrato el compuesto 2-cloro-4-nitrofenil-maltotriosa; este producto es degradado por la enzima en una reacción que genera un producto colorido, el 2-cloro-nitrofenol, que finalmente es leído espectrofotométricamente a 405 nm [117, 118].

6.8 Estudios de adsorción sobre los componentes del sistema.

Estos estudios se llevaron a cabo adsorbiendo cantidades crecientes de cada molécula modelo sobre una cantidad fija de los componentes del sistema (microesferas porosas y nanopartículas de PLGA) por separado. La adsorción sobre microesferas porosas se evaluó para determinar la mejor proporción de péptido-proteína/microesferas para ser utilizada durante la preparación de los sistemas ensamblados. Mientras que la adsorción sobre nanopartículas se realizó para evaluar indirectamente el tipo de interacción que se da entre las moléculas y los componentes del sistema, monitoreando los cambios en el potencial zeta (ζ) cuando las moléculas son adsorbidas.

6.8.1 Adsorción sobre microesferas porosas.

Para realizar estas pruebas, 25 mg de microesferas secas se resuspendieron en 1 ml de buffer de fosfatos pH 7.2 para adsorber acetato de leuprolide, así como en 1 mL de buffer de acetatos pH 4.0 y 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 para adsorber α -amilasa. Posteriormente, se añadieron a la suspensión de microesferas 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 mg de cada molécula; las muestras resultantes fueron etiquetadas como A, B, C, D y E, respectivamente. De esta manera, se alcanzaron proporciones péptido-proteína/microesferas de 10, 20, 30, 40 y 50% p/p. Todas las muestras se agitaron suavemente durante 1 h (Water Bath ShakerTM, American Optical, USA) para después

recuperar por filtración las microesferas ya adsorbidas con las moléculas modelo. La concentración de cada molécula fue cuantificada en el sobrenadante. La cantidad de acetato de leuprolide se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Varian®, EE.UU.) y de α -amilasa por el método espectrofotométrico del ácido bicinconínico (Espectro UV-Vis Varian Cary 50 Conc, Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). La eficiencia de adsorción (%EA) se calculó como el porcentaje dado por la diferencia entre la concentración inicial y final entre la concentración inicial de cada molécula. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

6.8.2 Adsorción sobre nanopartículas.

Para evaluar el efecto de la adsorción de cada molécula en las nanopartículas poliméricas se midió el potencial zeta (ζ) adsorbiendo cantidades crecientes de cada molécula de la siguiente manera; 100 mg de nanopartículas secas fueron re-suspendidas en 1 mL de buffer de fosfatos pH de 7.2 (para leuprolide) y en 1 mL de buffer de acetatos pH 4.0 (para α -amilasa), a continuación, se añadieron a las suspensiones anteriores 10, 20, 30 y 40 mg de cada molécula. Todas las muestras se agitaron suavemente durante 1 h. Una suspensión de nanopartículas en cada buffer sin agregar la molécula modelo se estableció como blanco. El potencial zeta (ζ) de las dispersiones se midió mediante movilidad electroforética usando un Zetasizer® (Malvern Instruments, Reino Unido) después de la dilución apropiada con la misma solución buffer. Tres réplicas por concentración fueron analizadas.

6.9 Obtención de los sistemas ensamblados empleando la tecnología desarrollada por “adsorción/infiltración” de nanopartículas poliméricas en microesferas porosas.

El proceso se llevó a cabo preparando cinco sistemas, etiquetados como S1, S2, S3, S4 y S5. El sistema S1 se ensambló sin infiltración de nanopartículas, mientras que los sistemas S2, S3, S4 y S5 se prepararon mediante la infiltración de suspensiones de nanopartículas a concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mg/ml, respectivamente.

Como primer paso, las cantidades de nanopartículas indicadas anteriormente se colocaron en un vial de vidrio y se resuspendieron en 1 ml de solución buffer de fosfatos pH 7.2 (para el leuprolide) y 1 mL de solución buffer de acetatos pH 4.0 (para α -amilasa) durante 12 h con agitación magnética (Multistirrer®, Velt Científica, USA).

Ya transcurrido el tiempo de resuspensión, como segundo paso, a cada suspensión de nanopartículas se añadieron 2.5 mg de la molécula molécula (acetato de leuprolide o α -amilasa), manteniendo la agitación durante 1 h más (sistemas S2, S3, S4 y S5).

En un tercer paso, 25 mg de microesferas porosas biodegradables fueron previamente pesados en una malla de acero inoxidable con una apertura de 40 μ m. Estas microesferas fueron sumergidas en

cada una las suspensiones de nanopartículas con las moléculas modelo, agitando mecánicamente durante 1 h adicional (Shaker™ Baño de agua, American Optical, USA). Para el sistema 1, se emplearon las mismas condiciones, considerando sumergir solamente las microesferas porosas en 1 ml de la solución buffer conteniendo las moléculas modelo durante 1 h, sin contener nanopartículas. Todos los sistemas se recuperaron por filtración, retirando la malla de acero inoxidable, y se secaron a temperatura ambiente durante 24 h. La figura 16 muestra un esquema general del proceso de “ensamblaje por adsorción/infiltración”, en la que también se puede observar la estructura de los sistemas ensamblados.

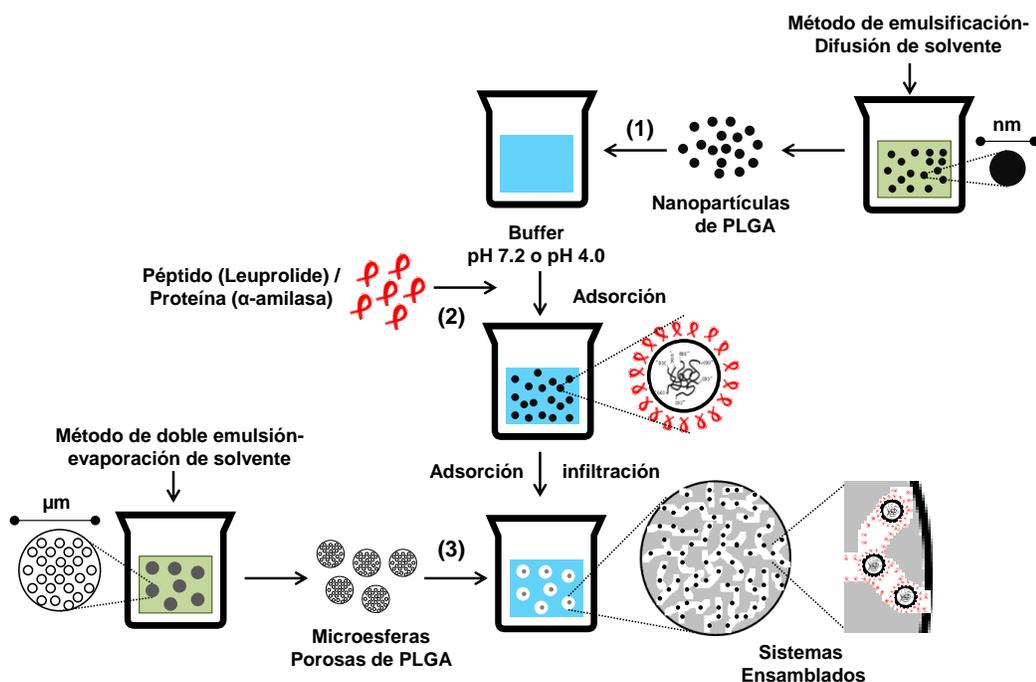


Figura 16. Proceso de fabricación de los sistemas ensamblados por adsorción/infiltración de nanopartículas poliméricas en microesferas porosas biodegradables. (1): resuspensión de diferentes concentraciones de nanopartículas, (2): incorporación del fármaco para adsorberse sobre las nanopartículas y (3) inmersión de microesferas porosas para infiltrar nanopartículas adsorbidas con fármaco y al mismo tiempo adsorber fármaco sobre la superficie de las microesferas.

6.10 Caracterización física de los sistemas ensamblados.

6.10.1 Eficiencia de adsorción de los fármacos modelo.

Una vez filtrados los sistemas, la solución/suspensión residual fue centrifugada a 20,000 rpm por 20 min. Las nanopartículas remanentes se disolvieron y la cantidad de cada molécula se cuantificó en el sobrenadante, empleando los métodos analíticos mencionados anteriormente. Para obtener la eficiencia de adsorción (%EA), se utilizó la expresión $\%EA = W_{CA} / W_{CI} \times 100$, donde %EA es la eficiencia de adsorción; W_{CA} y W_{CI} representan la cantidad adsorbida y la cantidad inicial de cada molécula, respectivamente.



6.10.2 Eficiencia de adsorción e infiltración de nanopartículas.

En experimentos por separado, durante la recuperación de los sistemas ensamblados por filtración se obtuvo una suspensión remanente de nanopartículas, la cual fue colocada en un vial de vidrio previamente seco y pesado. Los viales se llevaron a congelación y posteriormente fueron liofilizados a 50×10^{-3} mbar y -40 °C (Labconco®, Freezone 6, USA) durante 24 h. Finalmente se volvieron a obtener los pesos de los viales conteniendo las nanopartículas remanentes. La eficiencia de infiltración de las nanopartículas cargadas en las microesferas se calculó por diferencia de peso entre la cantidad inicial y la cantidad remanente de nanopartículas.

6.10.3 Morfología.

Muestras en suspensión de los sistemas ensamblados se colocaron sobre un cubreobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente para evaluar su morfología preparando las muestras como se indicó en el apartado 6.4.2.

6.10.4 Análisis de área superficial.

Para el caso del área superficial, se analizaron muestras secas bajo las condiciones y cálculos descritos en el apartado 6.4.4.

6.10.5 Calorimetría diferencial de barrido.

Todos los sistemas se caracterizaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (calorímetro DSCQ10, de TA Instruments, EE.UU.) para evaluar las interacciones de sus componentes. Las pruebas calorimétricas se realizaron en todos los sistemas ensamblados (del S1-S5), así como en los componentes individuales, incluyendo acetato de leuprolide, α -amilasa, el polímero PLGA, nanopartículas y microesferas solas. Se pesaron de 2 a 4 mg de cada uno de los sistemas y componentes en celdas de aluminio no herméticas. Las celdas fueron selladas en colocadas en el equipo de calorimetría previamente ajustado y calibrado. El barrido se llevó a cabo a temperaturas entre 35 y 300 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, bajo un flujo de nitrógeno de 50 ml/min.

6.10.6 Termogravimetría.

Los análisis de termogravimetría (TGA) se llevaron a cabo con el fin de monitorear la pérdida de masa de los sistemas ensamblados durante calentamiento para caracterizar los procesos de degradación, sobre todo en los sistemas preparados empleando la proteína modelo. Los estudios se realizaron en las mismas condiciones descritas anteriormente para los estudios de DSC, incluyendo todos los

sistemas ensamblados (del S1-S5), PLGA y α -amilasa libres, pero utilizando moldes de platino y un equipo de TGA Q5000IR (TA Instruments, USA).

6.11 Estudios de liberación *in vitro*.

Para caracterizar la velocidad de liberación de cada una de las moléculas modelo (acetato de leuprolide y α -amilasa) a partir de los sistemas ensamblados se obtuvieron los perfiles de liberación por triplicado para cada uno de ellos (del S1-S5). Así, 25 mg de cada sistema se pesaron directamente en una membrana de diálisis de celulosa para la liberación de acetato de leuprolide y en una malla de acero inoxidable de 10 μm de apertura para la liberación de α -amilasa. La longitud de la membrana y de la malla en ambos casos fue de 5 cm. Los sistemas se sumergieron en 10 mL de una solución buffer de fosfatos pH 7.2 previamente colocados en un vial de vidrio, manteniendo condiciones "sink" durante todo el estudio (concentración ≤ 250 mg/mL). Los viales se llevaron inmediatamente a un baño controlado a una temperatura de 37 °C, donde se mantuvieron bajo agitación magnética. A intervalos predeterminados, se tomaron muestras del medio de liberación agregando la misma cantidad de medio fresco. La cantidad liberada de cada molécula se determinó en cada tiempo muestreado, empleando los métodos analíticos previamente mencionados.

6.11.1 Determinación del mecanismo de liberación.

Una vez obtenidos los perfiles de liberación, los datos se ajustaron a diferentes modelos matemáticos con la finalidad de conocer el mecanismo de liberación. Para cada perfil de liberación y su ajuste se obtuvo el valor de r^2 y la constante correspondiente.

6.12 Evaluación de la estabilidad de los fármacos modelo.

La estabilidad de los fármacos modelo empleados se determinó al revisar si hubo cambios en la estructura secundaria de las moléculas antes y después de ser adsorbidos por técnicas de difracción circular y a través de la evaluación de la actividad enzimática de la proteína modelo después de ser liberada a partir de los sistemas ensamblados.

6.12.1 Difracción circular.

Para los estudios de difracción circular (CD), cada sistema ensamblado del S1 al S5 (tanto de acetato de leuprolide como α -amilasa) se colocaron en un vial de vidrio que contenía 10 ml de una solución buffer de fosfato pH 7.2, 20 mM. Los sistemas fueron llevados a un baño de agua a 37 °C durante 12 h. Después de este tiempo, 500 μl de cada muestra se retiraron y se centrifugaron a 25,000 rpm durante 20 min. Posteriormente, las muestras se diluyeron con la misma solución buffer hasta alcanzar

una concentración entre 100-400 µg/ml. Finalmente, se midieron los espectros de CD en un equipo JASCO J-815 espectropolarímetro (Jasco Inc., Easton, MD), equipado con un soporte de celda de tipo Peltier PFD-425S para el control de temperatura y agitación magnética. Los espectros de CD se registraron de 200 a 250 nm de longitud de onda, usando celdas de 1 cm de longitud. Las elipticidades se reportan en miligrados. Una medición de dicroísmo circular para el acetato de leuprolide y la α -amilasa libres se determinaron con la finalidad de emplearlos como control.

6.12.2 Actividad enzimática.

Para el caso de la α -amilasa, se midió la actividad enzimática empleando el sustrato 2-cloro-4-nitrofenil-maltotriosa (CNP-G3). En la reacción enzimática se genera un producto de color amarillo, el 2-cloro-4-nitrofenol [117]. El reactivo para el ensayo se preparó empleando una solución buffer de citratos pH 6.2, CNP-G3 (2.25 mM), cloruro de sodio (300 mM), cloruro de calcio (5 mM) y tiocianato de potasio (900 mM). 75 µL de muestra de cada uno de los sistemas fue tomada durante los estudios de liberación "in vitro" a las 12, 24 y 48 h. Cada muestra se colocó en tubos de ensayo que tenían 3 ml del reactivo, previamente incubados a 37 °C en un baño de agua. Los tubos se agitaron con un vortéx al colocar la muestra y se colocaron nuevamente en el baño de incubación. Un tubo sin muestra fue utilizado como blanco y otro tubo como control positivo al agregar 75 µL de una solución de α -amilasa libre a una concentración conocida. Posteriormente, se midió la absorbancia a 405 nm cada minuto durante 3 minutos.

La actividad α -amilasa de cada muestra y control se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\alpha\text{-amilasa (U/L)} = (\Delta A/\text{mins} - \Delta A/\text{minb}) \cdot TV \cdot 1000 / \epsilon \cdot SV \cdot d$$

donde, $\Delta A/\text{mins}$ = el cambio en la absorbancia por minuto para la muestra o el control, $\Delta A/\text{minb}$ = cambio en la absorbancia por minuto para el blanco, TV = volumen total del ensayo (3.075 ml), 1,000 = conversión de U/mL a U/L, ϵ = coeficiente de extinción milimolar del 2-cloro-4-nitrofenol a 405 nm (12.9), SV = volumen de la muestra (0.075 ml) y d = trayectoria de la luz (1 cm). Los estudios se realizaron por triplicado.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención y caracterización de microesferas porosas biodegradables.

Se empleó el método de doble emulsión- evaporación de disolvente adaptado con el uso de un agente porógeno para preparar microesferas porosas biodegradables de PLGA 50:50 [62]. El tiempo y la velocidad de agitación, la concentración de estabilizante (PVAL), y la concentración del agente porógeno (NH_4HCO_3) fueron controlados con el fin de generar micropartículas con propiedades adecuadas para el proceso de ensamblaje. Las micrografías de las muestras de microesferas porosas analizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) se pueden observar en la figura 17.

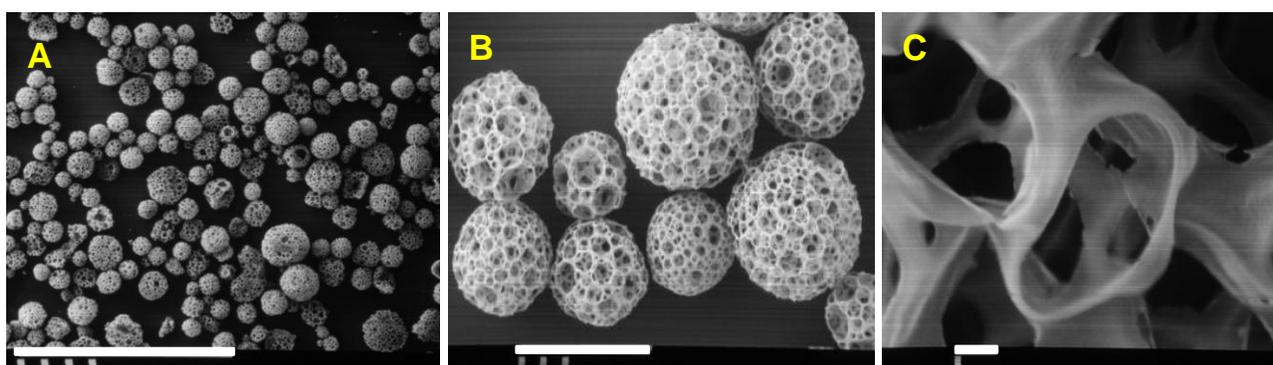


Figura 17. Micrografías de microesferas porosas de PLGA 50:50. Notas: (A): dispersión de microesferas porosas; barra = 1000 μm , (B) microesferas porosas; barra = 100 μm y (C) poros en la matriz interna de las microesferas; barra = 1 μm .

Adecuando el método se obtuvieron estructuras esféricas con alta porosidad (Fig. 17-A-B) y poros interconectados en su interior (Fig. 17-C). Su tamaño promedio fue $103.9 \pm 6.28 \mu\text{m}$ (ver figura 18), con una uniformidad de 0.61 ± 0.023 y sin diferencias significativas en 3 diferentes lotes (ANOVA $p > 0.05$). Este hallazgo además fue confirmado por MEB. La talla puede ser disminuida controlando los parámetros de proceso en el desarrollo de la técnica, como son la concentración de estabilizante, cantidad de polímero, tiempo y velocidad de agitación en la primera emulsión. Las microesferas obtenidas son similares en morfología a las obtenidas por Kim et al [62], estos autores probaron diferentes concentraciones del agente porógeno, el NH_4HCO_3 , de 0-10% m/v, como medio para expandir o abrir los poros, mostrando que conforme se aumenta la cantidad de este agente el diámetro de poro se incrementa. En el presente trabajo se utilizó una concentración de 1% m/v del porógeno, para obtener un diámetro de poro de $\sim 10 \mu\text{m}$. De acuerdo con los autores, el NH_4HCO_3 genera burbujas de CO_2 y NH_3 , en la primera emulsión, que causan la apertura del poro y estabilizan la emulsión, ya que estas son generadas en la interface desde la fase acuosa [125, 126]. La talla obtenida es adecuada para obtener sistemas que puedan inyectarse usando jeringas convencionales, ya que su tamaño es menor a 150 micras [46, 110, 127].

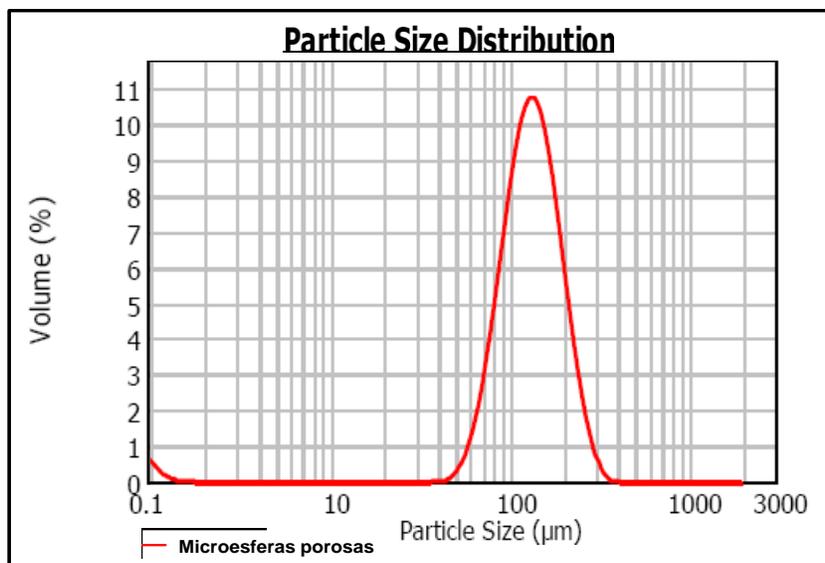


Figura 18. Distribución de tamaño de partícula de las microesferas porosas de PLGA 50:50, obtenidas por el método modificado de doble emulsión- evaporación de disolvente.

El área superficial, obtenida por isothermas de adsorción de N_2 y calculada con el método de BET, fue de $4.40 \text{ m}^2/\text{g}$ y un volumen de total de poro de $0.013 \text{ cm}^3/\text{g}$. La alta porosidad y la interconexión de los poros en el interior de la matriz de las microesferas proporcionan una gran área superficial que está disponible para los procesos de adsorción (véase la figura 17-C). El análisis de imagen ($n=100$, en 5 campos de visión) evidenció un diámetro promedio de poro expuesto de aproximadamente $8.1 \pm 4.1 \text{ }\mu\text{m}$, el cual es lo suficientemente amplio para infiltrar nanopartículas poliméricas de un tamaño $\leq 300 \text{ nm}$.

7.2 Obtención y caracterización de nanopartículas sólidas biodegradables.

El método de emulsificación-difusión de disolvente se utilizó para preparar nanopartículas poliméricas biodegradables de PLGA 50:50 [81]. La microscopía electrónica de barrido (MEB) mostró partículas submicrónicas sólidas, compactas, y esféricas (véase la figura 19).

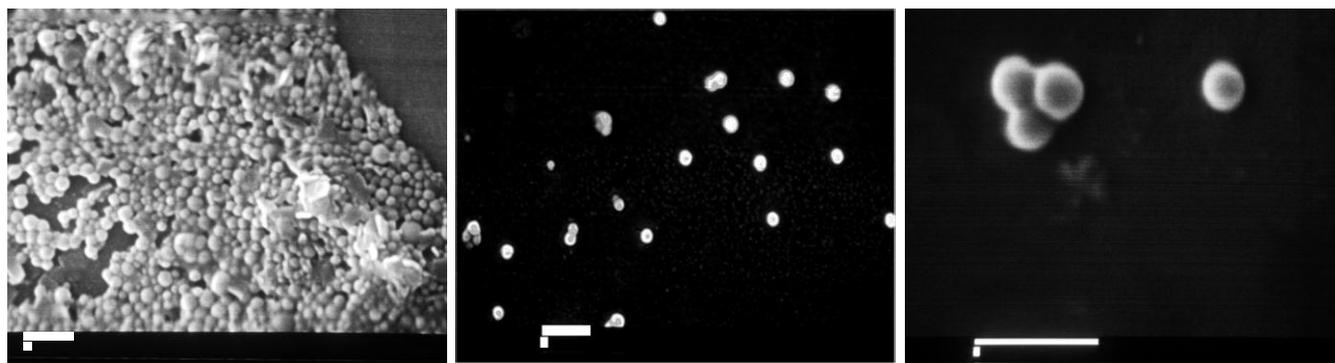
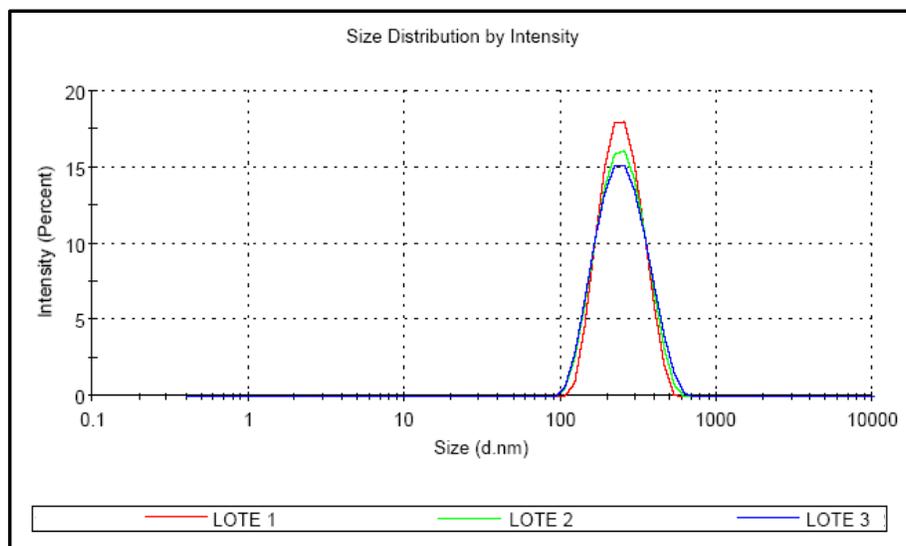


Figura 19. Micrografías de nanopartículas poliméricas de PLGA 50:50. Nota: Barra = $1 \text{ }\mu\text{m}$.

Con el método utilizado se obtuvieron nanopartículas con una talla promedio de 257 ± 12.4 nm y un índice de polidispersión de 0.11 ± 0.03 , ver figura 20. El tiempo y velocidad de agitación, la concentración del polímero y del estabilizante, entre otros, son factores que afectan el tamaño de partícula, sin embargo Quintanar-Guerrero et al han definido algunas condiciones para obtener nanopartículas poliméricas con las características que este estudio fueron encontradas [79, 128]. Incluso otros autores han reportado resultados similares en sus trabajos [129, 130]. Al analizar la talla de partícula en 3 diferentes lotes no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (ANOVA $p > 0.05$). Con base en los resultados se puede observar que se tienen poblaciones monodispersas, ya que su índice de polidispersión se encuentra entre 0 y 0.5.

Figura 20. Distribución de tamaño de partícula de las nanopartículas de PLGA 50:50 obtenidas por el método de emulsificación-difusión de disolvente para tres lotes diferentes.



Adicionalmente, después de liofilización las nanopartículas fueron resuspendidas en agua destilada sin mostrar agregación, lo anterior es debido a que el alcohol polivinílico (PVAL) y el crioprotector (Manitol) protegen de la coalescencia durante la emulsificación y después del secado, respectivamente [81]. El área superficial de las nanopartículas fue determinada por adsorción de N_2 y calculada con la técnica de BET, obteniéndose un valor de $6.28 \text{ m}^2/\text{g}$. Estas características fueron adecuadas para llevar a cabo el proceso de "ensamblaje por adsorción/infiltración".

7.3 Adsorción de los fármacos modelo sobre los componentes del sistema, microesferas porosas y nanopartículas.

Haciendo uso del método de inmersión acuosa, se adsorbieron diversas cantidades crecientes de cada molécula modelo, α -amilasa y acetato de leuprolide, en las microesferas porosas con el fin de determinar la proporción péptido o proteína/microesferas que mostrara la mayor eficacia de adsorción. Se evaluó el efecto de la concentración de fármaco preparando 5 muestras con concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50% p/p con respecto al peso de microesferas, etiquetadas como A, B, C, D y E respectivamente. También se determinó la influencia del pH. Para el acetato de leuprolide se eligió un solo pH de prueba (7.2) debido a que su pKa es de 9.6 [108, 109], es decir que al pH de simulación fisiológica (7.4) y a pH más ácidos la molécula se encontrará en un estado iónico cargado positivamente. Mientras que para la α -amilasa se han elegido dos pH's de prueba, 4.0 y 7.2, ya que el punto isoeléctrico (PI) de la proteína es de 4.2 [131]; por lo tanto a un pH por debajo del PI (4.0) se tenía una proteína con carga total positiva y a un pH por arriba del PI (7.2) una carga total negativa. Este efecto de las cargas sobre la adsorción se describe más adelante con la evaluación del potencial Z en la adsorción de nanopartículas de PLGA. La tabla 1 incluye los mg de fármaco que han sido adsorbidos para cada muestra preparada, se puede observar claramente que el proceso de adsorción es dependiente de la concentración y del pH (en el caso de la α -amilasa), de tal manera que al aumentar la cantidad inicial agregada de fármaco aumenta la cantidad que es adsorbida.

Tabla 1. Miligramos adsorbidos de las moléculas modelo, α -amilasa y leuprolide, sobre microesferas porosas de PLGA 50:50.

Muestra	mg adsorbidos		
	leuprolide	α -amilasa	
	pH 7.2	pH 7.2	pH 4.0
A	0.1 \pm 0.01	0.3 \pm 0.12	1.1 \pm 0.12
B	0.6 \pm 0.4	0.3 \pm 0.09	1.8 \pm 0.05
C	0.6 \pm 0.01	0.1 \pm 0.05	1.9 \pm 0.12
D	0.7 \pm 0.05	0.4 \pm 0.10	2.2 \pm 0.02
E	1.5 \pm 0.15	0.3 \pm 0.15	2.7 \pm 0.17

Notas: se presenta la media \pm desviación estándar. Muestras; A (10%p/p), B (20% p/p), C (30% p/p), D (40% p/p) y E (50% p/p). % p/p = peso de péptido o proteína/peso de microesferas.

Para el caso del pH se puede observar como a un pH ácido se tiene una mayor cantidad de fármaco que se ha adsorbido. La figura 21 muestra los resultados obtenidos para las eficiencias de adsorción (%EA) de cada una de las muestras a diferentes pH's.

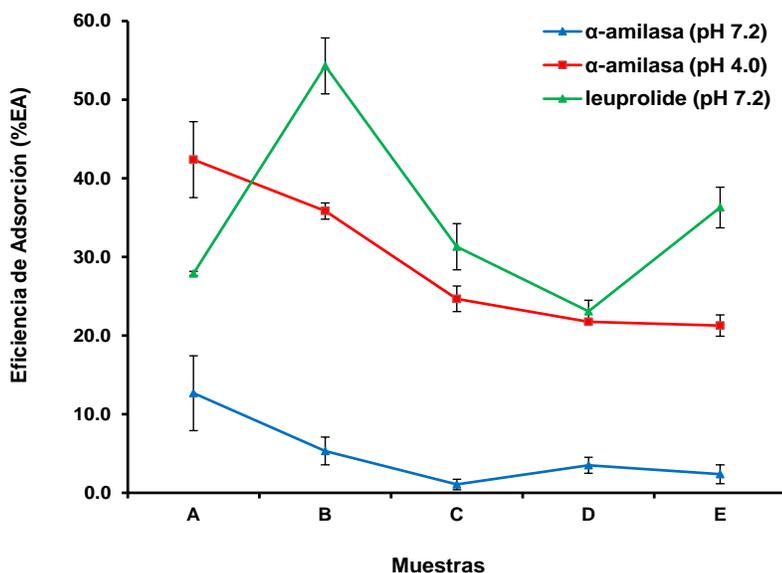


Figura 21. Eficiencias de adsorción (%EA) de las moléculas modelo, α -amilasa y leuprolide, sobre microesferas porosas de PLGA 50:50. Notas: muestras; A (10% p/p), B (20% p/p), C (30% p/p), D (40% p/p) y E (50% p/p). % p/p = peso de péptido o proteína/peso de microesferas).

Con base en estos resultados, es posible notar como la eficiencia de adsorción presenta un máximo de adsorción; cuando se tiene el 20% p/p (muestra B) para el leuprolide y el 10% p/p (muestra A) para la α -amilasa a un pH de 4.0; este hallazgo puede estar relacionado con la saturación de la superficie y el inicio de la formación de multicapas de adsorción para el caso del péptido modelo. La eficiencia de adsorción de la α -amilasa a un pH de 7.2 permanece casi constante, lo cual puede deberse a la repulsión de cargas entre la proteína y la superficie de la microesfera porosa. La eficiencia de adsorción es mayor a pH ácido debido a las atracciones electrostáticas y a que el proceso de adsorción se está llevando a cabo en un punto muy cercano a su punto isoeléctrico. Kondo et al y Bautista et al [131, 132] describen este comportamiento del α -amilasa cuando es adsorbida sobre partículas de sílice y otras superficies, mientras que Li et al [133] hacen referencia al rol que juegan los grupos cargados de las superficies y el pH cuando se adsorbe albúmina sérica de bovino en microesferas poliméricas. Es por ello que tomando en cuenta los resultados obtenidos se decidió utilizar un pH de 4.0 para la preparación de los sistemas ensamblados por adsorción/infiltración al cargar la proteína. Otros autores han visto este efecto de concentración y de pH al adsorber péptidos y proteínas por inmersión en un medio acuoso [22, 28, 52].

Cantidades fijas de nanopartículas fueron resuspendidas en buffer de fosfatos pH 7.2 para adsorber acetato de leuprolide y buffer de acetatos pH 4.0 para adsorber α -amilasa con el objetivo de explicar el tipo de interacción que se da entre las moléculas modelo y el material con que están hechos los componentes del sistema, PLGA. A las suspensiones anteriores se agregaron cantidades crecientes de los fármacos modelo y se midió el potencial ζ , los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Potencial ζ de nanopartículas de PLGA 50:50 adsorbidas con diferentes cantidades de las moléculas modelo. Blanco = nanopartículas sin moléculas adsorbidas.

mg agregados de fármaco	acetato de leuprolide	α -amilasa
	pH 7.2 (mV)	pH 4.0 (mV)
Blanco	-23.6 \pm 0.84	-6.08 \pm 0.10
2.5	-19.8 \pm 1.23	-4.38 \pm 0.09
5.0	-17.1 \pm 2.20	-3.15 \pm 0.22
7.5	-15.6 \pm 2.34	-2.46 \pm 0.17
10.0	-10.6 \pm 2.51	-1.87 \pm 0.08

Los datos de potencial ζ de las nanopartículas cuando se agregan diferentes cantidades de cada molécula a una suspensión de nanopartículas y se permite el contacto entre ellas durante un periodo tiempo (1 h para el estudio) sugieren que una interacción electrostática está teniendo lugar, debido al hecho de que cuando aumenta la cantidad de péptido o proteína en el medio el potencial ζ tiende a ser más positivo por cancelación de cargas en el proceso de adsorción. Existen diferencias estadísticamente significativas en el cambio de potencial ζ cuando aumentan la cantidad de fármaco en el medio y se favorecen las interacciones entre las moléculas y la superficie de las nanopartículas (ANOVA $p < 0.05$).

Se ha mencionado anteriormente que las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, el pH, la fuerza iónica y la temperatura juegan un papel importante en el proceso de adsorción [100]. El pH del medio en la solución de inmersión crea un entorno en el que existen especies cargadas, en consecuencia, las interacciones electrostáticas favorecen el proceso de adsorción. El PLGA 50:50 utilizado en el presente estudio es del tipo 4A, el cual tiene un grupo terminal carboxílico libre (ver figura 4-A). Este grupo terminal tiene un pKa de ~ 3.8 que está en la forma aniónica en el medio de disolución para ambos casos estudiados, pH 7.2 y pH 4.0. Los aminoácidos básicos del leuprolide, (histidina y arginina) adquieren una forma catiónica en el medio que se estudió porque tienen puntos isoeléctricos de ~ 7.8 y ~ 10.7 , respectivamente. Estos aminoácidos se encuentran expuestos en la conformación giro β tipo II que es estabilizada por los residuos Ser-4 y Leu-7 cuando el péptido se encuentra en medio acuoso [135]. En el caso de la α -amilasa que tiene un punto isoeléctrico de 4.2 presenta una carga negativa a pH de 7.2 y una carga

positiva a pH de 4.0. Se puede decir que dependiendo del pH y de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas podemos generar un ambiente que favorezca la adsorción. Okada et al y Luan et al [108, 134] también describieron que los aminoácidos básicos (arginina e histidina) del leuprolide presentan una interacción iónica con el PLGA cuando éste no cuenta con grupos carboxilo terminales protegidos por esterificación, además de reportar procesos de microencapsulación, en sus estudios no evaluaron el potencial ζ como medida directa de la interacción electrostática.

En este estudio también se evaluó el potencial ζ de nanopartículas de PLGA 50:50 5E, el cual es un polímero que tiene un grupo terminal éster (ver figura 4-B). Sin embargo, los resultados mostraron que al adsorber cantidades crecientes de leuprolide a un pH de 7.2 no se encontraron diferencias significativas en los valores del potencial ζ (ANOVA $p > 0.05$). Los resultados fueron de -8.5 ± 1.1 mV para nanopartículas blanco y -9.1 ± 1.4 mV para nanopartículas adsorbidas en todas las concentraciones probadas. Este fenómeno complementa el hecho de que las cargas eléctricas generadas en el medio favorecen la adsorción e incrementan la cantidad de molécula que se deposita sobre la superficie de las nanopartículas.

7.4 Obtención y caracterización de los sistemas ensamblados por adsorción/infiltración.

La encapsulación de acetato de leuprolide y α -amilasa se llevó a cabo obteniendo sistemas ensamblados por adsorción/infiltración de nanopartículas poliméricas biodegradables en microesferas porosas biodegradables, usando un método de inmersión acuosa simple. Basándose en los resultados anteriores, se utilizó una cantidad determinada de cada molécula en el proceso de adsorción/infiltración (proporción de 10% p/p péptido-proteína/microesferas). Se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de nanopartículas sobre la eficiencia de adsorción durante el proceso de ensamblaje y las propiedades tecnológicas de los sistemas ensamblados. Cinco sistemas fueron preparados y caracterizados, S1, S2, S3, S4 y S5; sin infiltración de nanopartículas y con nanopartículas a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente.

7.4.1 Eficiencias de adsorción de los fármacos modelo: encapsulación.

La Tabla 3 resume para cada sistema ensamblado la cantidad de fármaco que se ha cargado, la eficiencia de adsorción y la cantidad de nanopartículas infiltradas. El Sistema S1 representa el proceso de adsorción de las moléculas modelo sin la infiltración de nanopartículas.

Los resultados muestran una evidente dependencia entre la concentración de nanopartículas que había en suspensión y la carga de fármaco, de tal manera que cuando hay más nanopartículas presentes la cantidad de fármaco que es cargado en el sistema también aumenta. Este fenómeno puede deberse al hecho de que en el primer paso del proceso de ensamblaje hay una gran superficial

ofrecida por las nanopartículas, la cual está completamente disponible para que las moléculas de fármaco puedan adsorberse sobre ella, sobre todo si se encuentran en un medio acuoso que favorece el proceso de adsorción (condiciones de pH). Posteriormente, cuando ocurre el proceso de infiltración de las nanopartículas en las microesferas porosas estas arrastran consigo el fármaco hacia al interior de microestructura, por lo que al haber una mayor cantidad de nanopartículas se puede cargar una mayor cantidad de fármaco en el sistema ensamblado.

Tabla 3. Cantidades de fármaco adsorbido, nanopartículas infiltradas y eficiencias de adsorción de los sistemas ensamblados.

Sistema	acetato de leuprolide			α-amilasa		
	Cantidad Adsorbida (mg)	%EA	NP's Infiltradas (mg)	Cantidad Adsorbida (mg)	%EA	NP's Infiltradas (mg)
S1	1.9 ± 0.18	18.9 ± 1.7	0	2.7 ± 0.29	27.2 ± 2.90	0
S2	2.6 ± 0.44	25.3 ± 4.1	9.3 ± 3.7	3.8 ± 0.06	25.2 ± 1.61	8.1 ± 2.2
S3	5.1 ± 0.40	47.1 ± 1.6	22.3 ± 4.4	2.5 ± 0.16	37.7 ± 0.61	16.5 ± 1.3
S4	9.6 ± 0.46	94.6 ± 3.4	58.1 ± 5.2	4.8 ± 0.15	47.4 ± 1.48	32.4 ± 2.4
S5	9.6 ± 0.45	94.9 ± 4.5	67.4 ± 3.1	5.1 ± 0.12	50.7 ± 1.19	57.9 ± 2.6

Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas. %EA = eficiencia de adsorción expresada en porcentaje.

Por otro lado, cuando las microesferas porosas son sumergidas en el medio acuoso donde se encuentran dispersas las nanopartículas y los fármacos disueltos, estas se encuentran en contacto con nanopartículas ya adsorbidas con fármaco y con moléculas de fármaco libre, por lo que al ser del mismo material polimérico (tanto las micro como las nanopartículas son de PLGA 50:50) se sugiere que además que las nanopartículas acarrean cierta cantidad de fármaco, las moléculas libres también pueden adsorberse sobre la superficie de las microesferas porosas. Así, para el proceso de adsorción se tiene disponible tanto el área superficial de las nanopartículas como el área que ofrece la porosidad de las microesferas.

7.4.2 Adsorción e infiltración de nanopartículas.

Igual que ocurre para la carga de las moléculas modelo en los sistemas ensamblados se puede observar a partir de los resultados de la tabla 3 que la cantidad de nanopartículas infiltradas en los sistemas ensamblados se ve incrementada al aumentar la cantidad inicial de nanopartículas durante el proceso de obtención. Sin embargo cuando la cantidad de nanopartículas infiltradas en las microesferas porosas aumenta cuando la concentración inicial de nanopartículas en suspensión es mayor (durante la infiltración), se puede notar como en los sistemas S4 y S5 (sistemas preparados con mayor cantidad de nanopartículas en suspensión) las cantidades de nanopartículas que se han

infiltrado son similares entre sí o cercanas en comparación con los sistemas S2 y S3 (ver tabla 3). Lo anterior puede estar relacionado con un proceso de saturación del área superficial disponible que ofrecen las microesferas porosas para la recepción y adsorción de las nanopartículas en su interior. Este proceso de saturación puede explicarse y relacionarse con los resultados obtenidos con la microscopia electrónica de barrido y el análisis de área superficial que se describen más adelante.

7.4.3 Microscopia electrónica de barrido (MEB).

Estudios de MEB se realizaron sobre muestras de cada uno de los sistemas ensamblados y las micrografías tomadas se encuentran en las figuras 22, 23 y 24. Los resultados evidenciaron la formación de una película de nanopartículas sobre la superficie de las microesferas porosas que se vuelve más continua al aumentar la cantidad de nanopartículas infiltradas, es decir que la homogeneidad de la película aumenta al ir del sistema S2 al S5, hasta alcanzar la saturación de la microesfera porosa. La película de nanopartículas cubre la superficie de las microesferas y parecer ser más continua en los sistemas S4 (75 mg/mL de nanopartículas) y S5 (100 mg/mL de nanopartículas) en los que se infiltraron la mayor cantidad de nanopartículas. Un comportamiento similar fue observado por Rodríguez-Cruz et al [29] llenar membranas porosas con nanopartículas de PLGA y adsorbiendo carbamazepina.

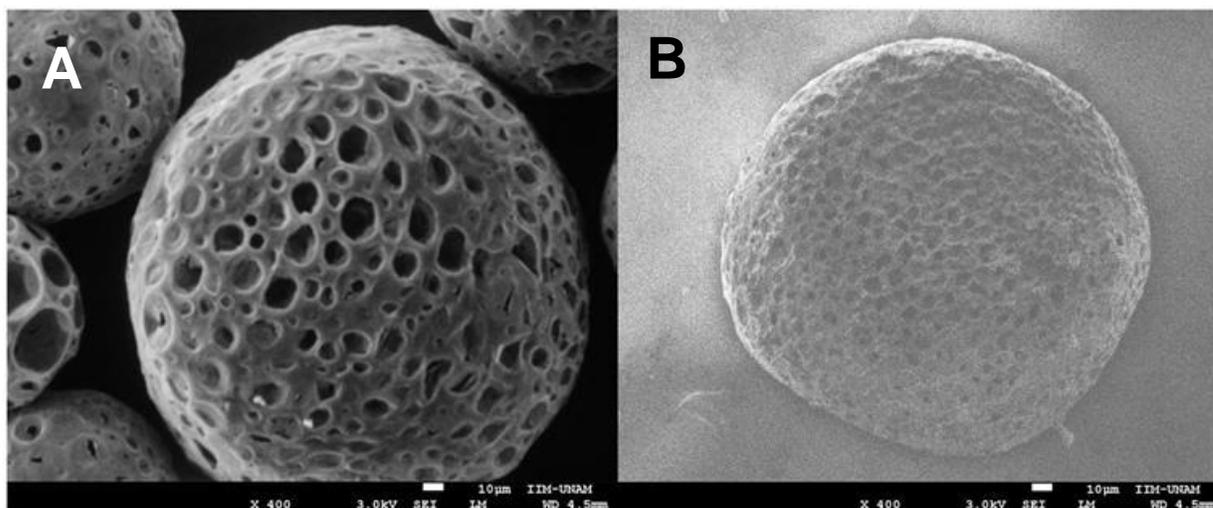


Figura 22. Micrografías de microesferas poliméricas de PLGA (50:50) con y sin infiltración de nanopartículas. A: microesferas libres y B: microesfera saturada con nanopartículas infiltradas. Nota: Barra = 10 µm.

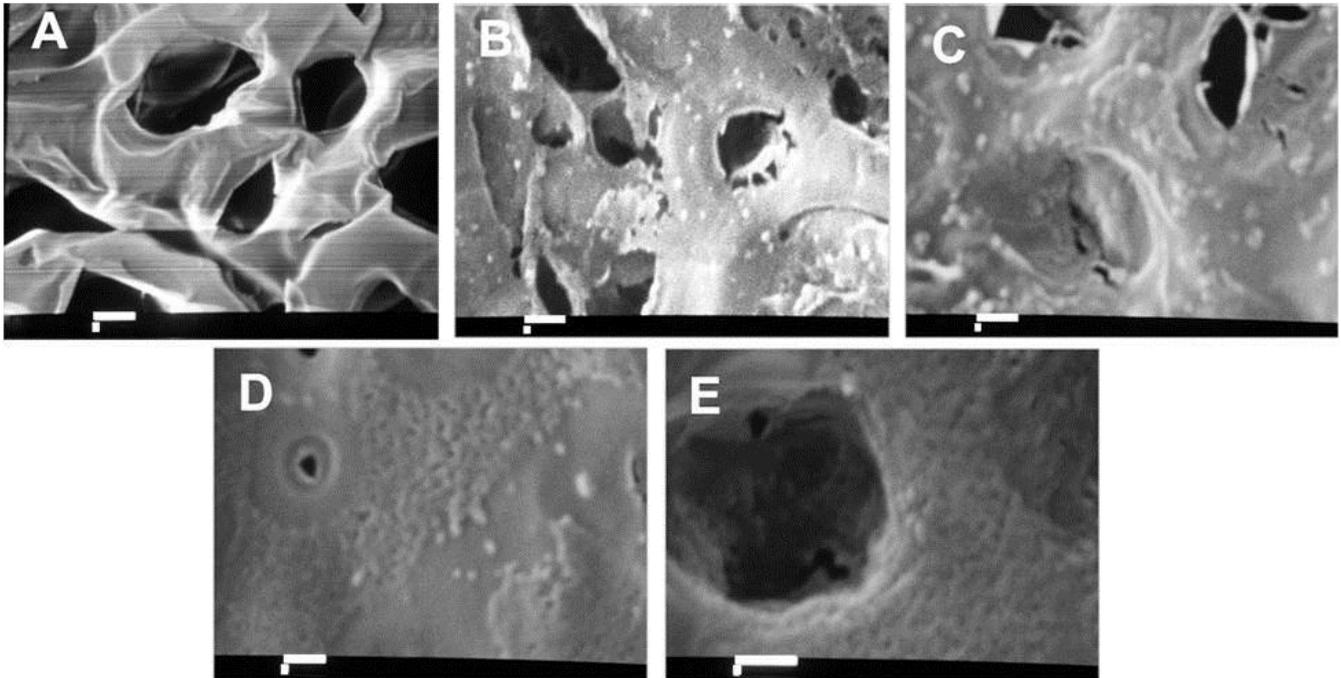


Figura 23. Micrografías de los sistemas ensamblados con y sin la infiltración de nanopartículas poliméricas empleando el péptido modelo (acetato de leuprolide). A: sistema S1 sin infiltración de NP's, B: sistema S2 con suspensión de NP's de 25 mg/mL, C: sistema S3 con suspensión de NP's de 50 mg/mL, D: sistema S4 con suspensión de NP's de 75 mg/mL y E: sistema S5 con suspensión de NP's de 100 mg/mL. Notas: Barra = 1 μ m y NP's = nanopartículas.

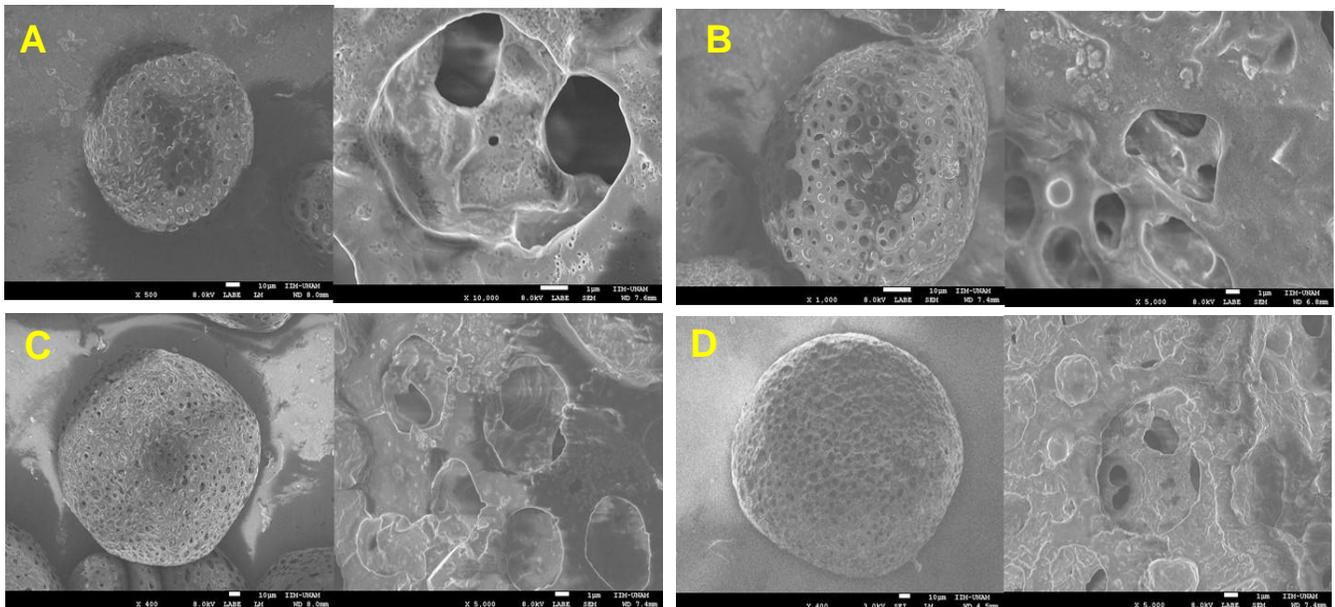


Figura 24. Micrografías de los sistemas ensamblados con y sin la infiltración de nanopartículas poliméricas empleando la proteína modelo (α -amilasa). A: sistema S2 con suspensión de NP's de 25 mg/mL, B: sistema S3 con suspensión de NP's de 50 mg/mL, C: sistema S4 con suspensión de NP's de 75 mg/mL y D: sistema S5 con suspensión de NP's de 100 mg/mL. Nota: NP's = nanopartículas.

7.4.4 Determinación del área superficial: adsorción de N₂ (BET).

Los resultados obtenidos en la MEB y la cantidad de nanopartículas infiltradas en los sistemas ensamblados fueron indicando que había una posible saturación de la microesfera porosa al infiltrar las nanopartículas poliméricas. La determinación del área superficial en los sistemas ensamblados fue analizada por adsorción de N₂ y se realizaron con el objetivo de observar el comportamiento del área superficial en el proceso de adsorción/infiltración. Se obtuvieron las isothermas de adsorción para cada uno de los sistemas ensamblados y se muestran en la figura 25. El área superficial es calculada empleando el método de BET, donde de acuerdo con los autores el área superficial es representada por la pendiente que se obtiene al graficar las isothermas de adsorción de N₂ en función del volumen y la concentración de las moléculas adsorbidas, de tal manera que una pendiente positiva más pronunciada representará una menor área superficial [122]. Las isothermas obtenidas para cada uno de los sistemas ensamblados se encuentran en la figura 25, en la que también se incluye la isoterma correspondiente a las microesferas porosas blanco (aquellas que no han pasado procesos de adsorción e infiltración). Los resultados evidencian una pérdida del área superficial al comparar las áreas desde el sistema S1 al sistema S4. Lo anterior puede asociarse con el proceso de infiltración, con la cantidad de nanopartículas adsorbidas, con la continuidad de la película formada y con la saturación del sistema ensamblado. En la misma figura también es posible observar como el área superficial del sistema S1 (sin infiltración de nanopartículas) y de las microesferas blanco no son tan distintas, por lo que podríamos decir que la reducción del área superficial se debe principal a la adsorción y formación de la película de nanopartículas sobre la superficie de la microesfera porosa.

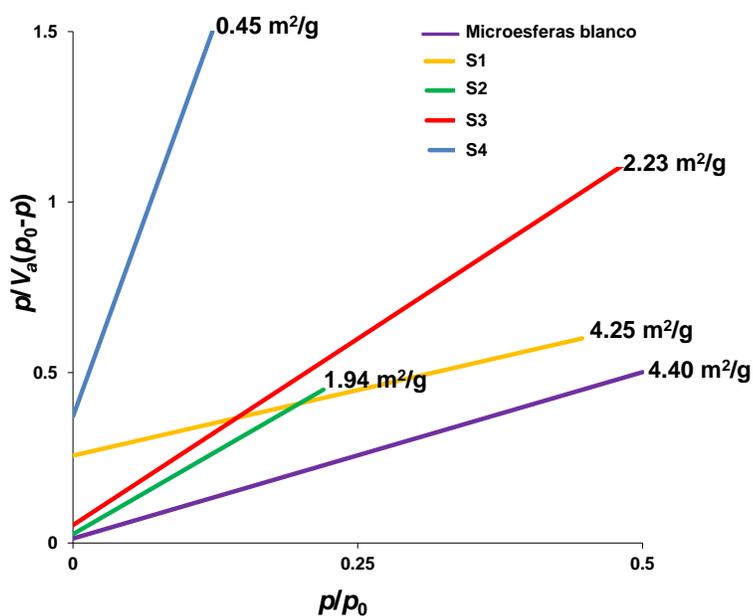


Figura 25. Isothermas de adsorción de N₂ y áreas superficiales de los sistemas ensamblados. Notas: Microesferas blanco: estructuras libres, S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.

7.4.5 Interacción de los componentes del sistema: DSC y TGA.

Se llevaron a cabo estudios calorimétricos para evaluar la interacción entre las moléculas y los componentes del sistema ensamblado, así como para estudiar la pérdida de masa y de este modo hacer inferencia del estado físico de los sistemas ensamblados. La figura 26 muestra los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para los sistemas ensamblados (del S1 al S5) y para los componentes puros; el PLGA (50:50), el leuprolide y la α -amilasa.

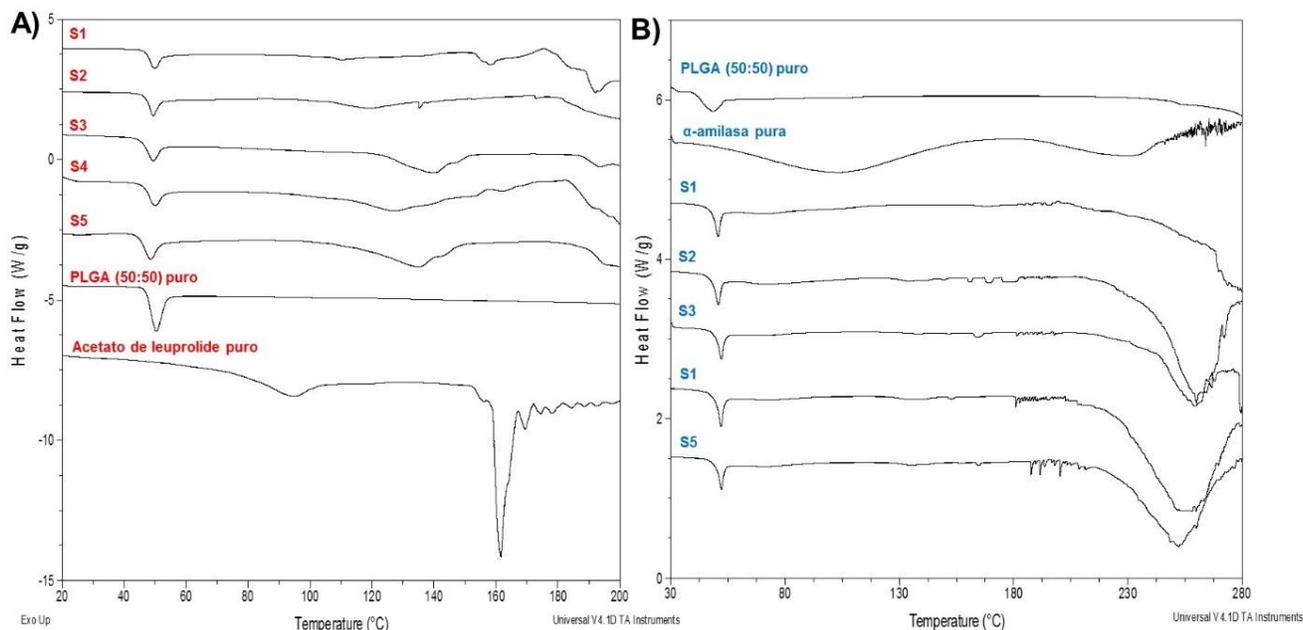


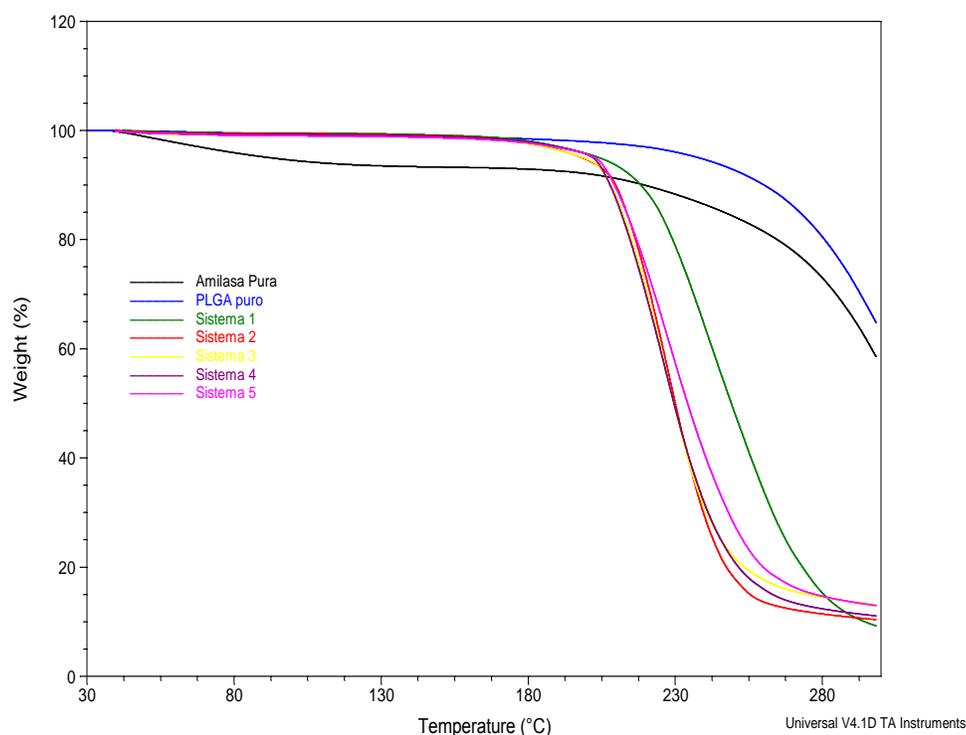
Figura 26. Termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para cada uno de los sistemas ensamblados (del S1 al S5), PLGA puro, acetato de leuprolide (A) puro y α -amilasa pura (B). Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.

En los termogramas de los componentes puros se pueden observar picos endotérmicos característicos a ~ 162 , ~ 110 y $\sim 45-50$ °C, que corresponden a los punto de fusión de leuprolide, pérdida de agua en α -amilasa y la temperatura de transición vítrea (T_g) del PLGA, respectivamente. Como se puede apreciar en la figura 26, el pico endotérmico de la T_g del PLGA puede ser identificado en los termogramas de todos los sistemas ensamblados, del S1 al S5, sin embargo los picos endotérmicos característicos en las moléculas puras no son detectables. Si las moléculas de péptido y proteína se encontraban disueltas durante el proceso de ensamblaje y estas son adsorbidas en ambas superficies (nanopartículas y microesferas porosas) entonces la interacción de las moléculas y los componentes del sistema ocurre a nivel molecular, por lo que sugiere que los fármacos se adsorben y dispersan homogéneamente a través de la superficie de los sistemas ensamblados.

Ligeros movimientos en el pico endotérmico de la Tg del polímero puro en comparación con el mismo evento en los termogramas de los sistemas ensamblados puede explicarse por cambios en la cristalización, agregación, reacomodo e interacción de las moléculas de polímero al generarse las micro- y nanoestructuras [136].

En los termogramas obtenidos para los sistemas cargados con la proteína modelo se pueden apreciar eventos de degradación a partir de los 200 °C que son mayormente marcados en los sistemas ensamblados (S1 al S5) en comparación con la degradación de los componentes puros, ver figura 26-B. Debido a que estos cambios podrían estar relacionados con la interacción de los componentes con la proteína se llevaron a cabo estudios de termogravimetría (TGA) para monitorear la pérdida de peso después de los 200 °C. En la figura 27 se presentan los termogramas por TGA para los componentes puros (PLGA 50:50 y α -amilasa) y los sistemas ensamblados (del S1 al S5); en ellos se puede observar como a partir de los ~200 °C la pérdida de peso es más rápida en los sistemas ensamblados que en los componentes puros, lo cual nos habla de las interacciones que se dan entre los componentes del sistema y la proteína adsorbida que está presente.

Figura 27. Termogramas obtenidos por termogravimetría (TGA) para cada uno de los sistemas ensamblados (del S1 al S5), PLGA puro y α -amilasa pura. Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.



7.5 Perfiles de liberación *in vitro* y mecanismo de liberación.

Se obtuvieron los perfiles de liberación *in vitro* de las moléculas modelo a partir de cada uno de los sistemas ensamblados, es decir del S1 al S5. Estos perfiles se describen en la figura 28 para el acetato de leuprolide y en la figura 29 para la α -amilasa. A partir de los gráficos es posible distinguir que en los primeros minutos existe una rápida liberación o “efecto burst” menor al 30% del fármaco cargado que puede deberse al paso de las moléculas que se adsorbieron sobre la zona más superficial de la estructura porosa hacia el medio de disolución. Este efecto es común en los sistemas que encapsulan fármacos debido a que los sistemas erosionan o hinchan liberando las moléculas más superficiales de forma abrupta.

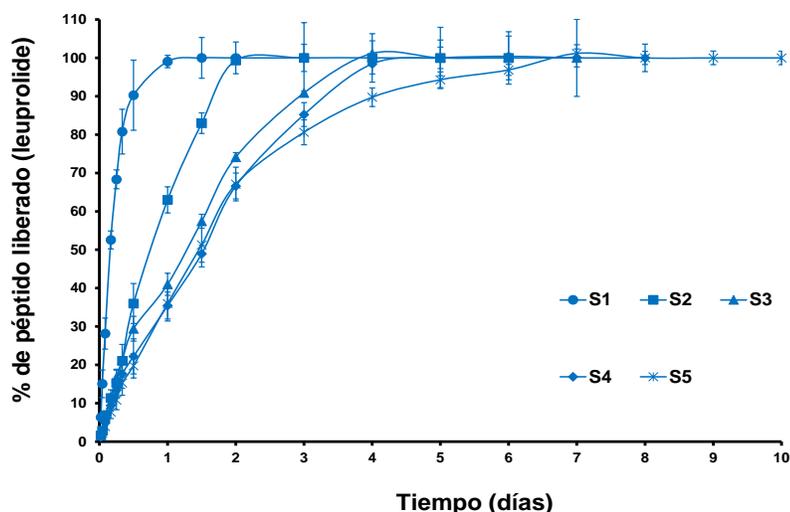
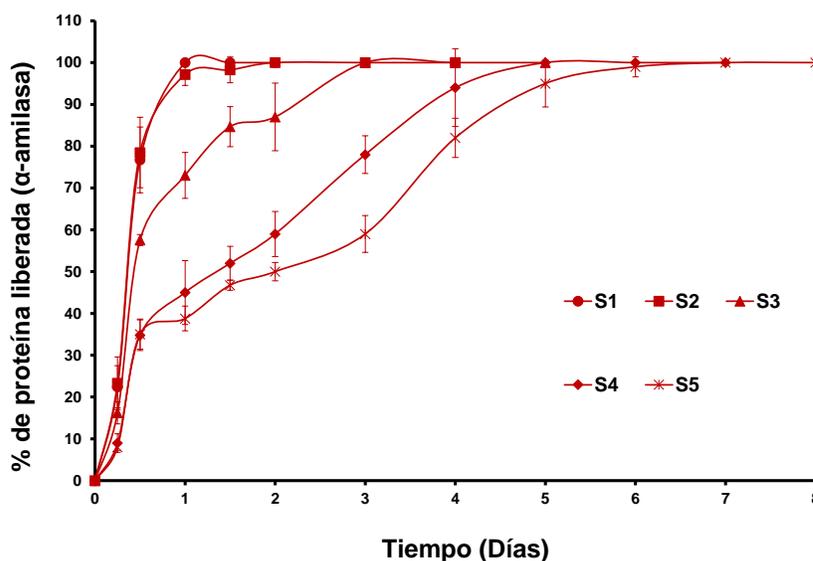


Figura 28. Perfiles de liberación del péptido modelo: acetato de leuprolide, a partir de los sistemas ensamblados por adsorción/infiltración. Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.

Figura 29. Perfiles de liberación de la proteína modelo: α -amilasa, a partir de los sistemas ensamblados por adsorción/infiltración. Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.



Para el caso de procesos de adsorción de biomoléculas en sistemas farmacéuticos, Sun et al y Kilpeläinen et al [22, 28] reportan esta misma condición cuando en sus trabajos se ha adsorbido albúmina sérica humana (proteína modelo) en microesferas porosas y melotan II (péptido modelo) en partículas porosas de sílica con nanocanales, respectivamente. También se puede notar como a las 12 h el sistema 1 (sin infiltración de nanopartículas) ha liberado entre el 80 y el 90% de la molécula cargada, mientras que los sistemas S2, S3, S4 y S5 (con nanopartículas infiltradas a diferentes concentraciones) han liberado sólo entre el 30 y el 70% de la cantidad cargada. Estos resultados señalan de forma general que a través del proceso de adsorción/infiltración es posible modificar la liberación de los principios activos, prolongando la liberación del fármaco desde 1 hasta 7-8 días, dependiendo del grado de saturación que se haya tenido en el sistema ensamblado, de tal manera que una película continua podría reducir la velocidad de liberación más eficazmente que una discontinua. Es así que se obtiene una velocidad de liberación más alta en los sistemas que contienen una película discontinua de nanopartículas en la superficie de las microesferas (sistemas S2 y S3) en comparación con una velocidad de liberación más lenta en aquellos sistemas ensamblados donde la película de nanopartículas que se forma tiende a ser más continua (S4 y S5). Por consiguiente, cuando la cantidad de nanopartículas infiltradas aumenta, la velocidad de liberación disminuye.

Los sistemas son ensamblados a partir de vehículos porosos. Para estructuras porosas se ha sugerido que la difusión es el principal proceso por el cual se libera la molécula desde el interior del sistema, ya que la porosidad presente permite que el agua del medio se absorba y penetre, debido a un gradiente de concentración, para poder solubilizar la molécula adsorbida y sacarla al medio de disolución [61]. Es por ello que con base en las evidencias que se han descrito hasta este punto, podemos sugerir que la película de nanopartículas que se forma durante el proceso de infiltración y posterior adsorción actúa como una barrera física que provoca que el interior del sistema ensamblado sea humectado por completo con mayor dificultad cuando existe una saturación del área y espacio disponible en la microesfera porosa. Incluso, Mao et al [61] describen la influencia de la porosidad superficial y de la morfología interna de microesferas de PLGA sobre el perfil de liberación de moléculas hidrofílicas, mostrando que el efecto “burst” en la fase inicial de liberación es caracterizada por procesos de difusión de las moléculas superficiales a través de los poros. Aunado al hecho de que el agua del medio penetra más lentamente en un sistema saturado, también puede asociarse que tanto el leuprolide como la α -amilasa quedan atrapados entre las superficies de las microesferas y la película de nanopartículas lo que va haciendo lento el proceso de liberación en función de la libertad que tienen las moléculas frente a las superficies donde se encuentran adsorbidas y el acceso del medio de disolución.

7.5.1 Mecanismo de liberación.

Se han propuesto diferentes modelos matemáticos para explicar el mecanismo de liberación de fármacos a partir de diferentes sistemas farmacéuticos. Sin embargo, en el presente trabajo se reporta el ajuste de los datos al modelo matemático propuesto por Higuchi, debido a que fue el mejor modelo al que se ajustaron los datos ($r^2 \geq 0.800$). El modelo matemático se describe como: $M_t/M_\infty = K_H t^{1/2}$; donde, M_t es la cantidad de fármaco liberado al tiempo t , M_∞ la cantidad total de fármaco que se ha liberado, K_H la constante de disolución del modelo (min^{-1}) y t el tiempo.

Los perfiles de liberación obtenidos para las biomoléculas en estudio son explicados en más del 80% de su variación con el modelo de Higuchi (ver figura 30 y tabla 4), el cual se ha propuesto para describir el mecanismo de liberación de un fármaco a partir de sistemas farmacéuticos que liberan por mecanismos de difusión basados en la ley de Fick, entre los que se incluyen los parches transdérmicos y los sistemas matriciales [124]. La figura 30 muestra las líneas de ajuste de los datos al modelo de Higuchi, mientras que la tabla 4 resume las constantes de liberación K_H y el coeficiente de determinación (r^2) para cada uno de los sistemas ensamblados.

Tabla 4. Parámetros obtenidos del ajuste de los perfiles de liberación al modelo de Higuchi para cada uno de los sistemas ensamblados.

Sistema	Leuprolide		α -amilasa	
	r^2	K_H (min^{-1})	r^2	K_H (min^{-1})
S1	0.833	0.042	0.871	0.021
S2	0.942	0.021	0.738	0.014
S3	0.971	0.015	0.862	0.014
S4	0.980	0.014	0.944	0.013
S5	0.985	0.013	0.959	0.010

Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.

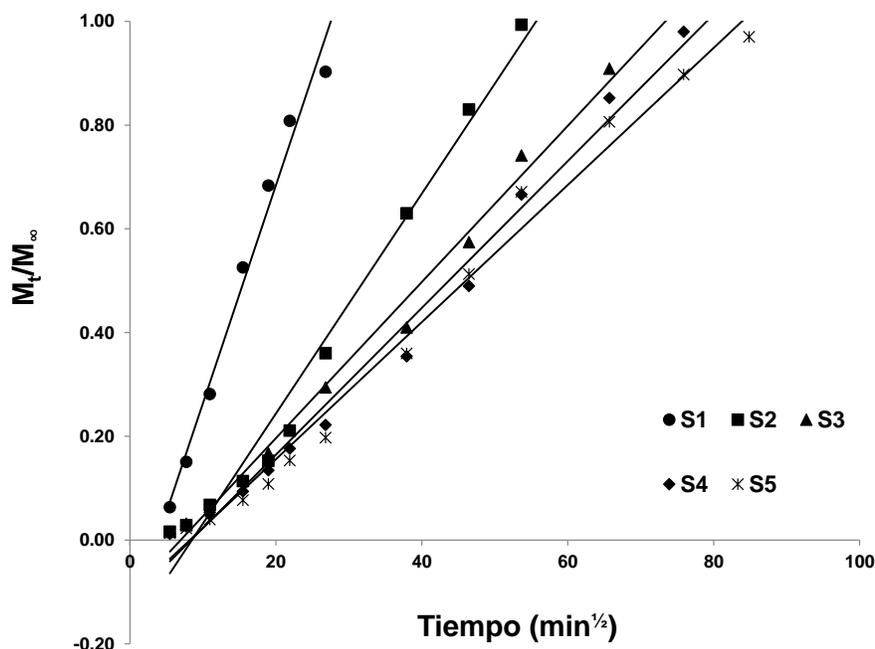


Figura 30. Líneas de ajuste de los perfiles de liberación al modelo de Higuchi (raíz cuadrada del tiempo). Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.

Los sistemas ensamblados cumplen con la definición y características de los sistemas poliméricos tipo matriz, pues se tiene la premisa de que las moléculas se encuentran adsorbidas de forma homogénea sobre la superficie de las micro- y nanopartículas y que los sistemas se vuelven cada vez más compactos al infiltrar nanopartículas en su interior, por lo que este modelo es el que mejor explicaría el mecanismo de liberación. A partir de estos resultados podemos mencionar que los sistemas ensamblados liberan el fármaco comportándose como sistemas tipo matriz y bajo procesos de difusión que siguen las leyes de Fick. En la tabla 4 se puede observar cómo el coeficiente de determinación (r^2) va aumentando del sistema S1 al S5 para ambas moléculas, indicando que hay un mejor ajuste al modelo cuando los sistemas están más saturados con nanopartículas infiltradas. También se puede apreciar cómo los coeficientes de determinación indican que el modelo de Higuchi explica más del 80% y hasta un 98% la variación de los datos. Considerando que los sistemas S5 y S4 están más saturados de nanopartículas infiltradas en comparación con los otros sistemas ensamblados, es posible relacionar esa saturación con un sistema que contiene dispersas las moléculas adsorbidas sobre una estructura más compacta que tiende a comportarse de forma similar a un sistema matricial en el que el fármaco ha sido encapsulado de forma homogénea en toda la matriz polimérica. Otro evento importante es la disminución de la constante de disolución del fármaco (K_H) desde los sistemas S1 hacia los sistemas S5, lo cual explica la reducción de la velocidad de liberación conforme las microesferas porosas se van llenando por efecto de la infiltración de nanopartículas adsorbidas con fármaco.

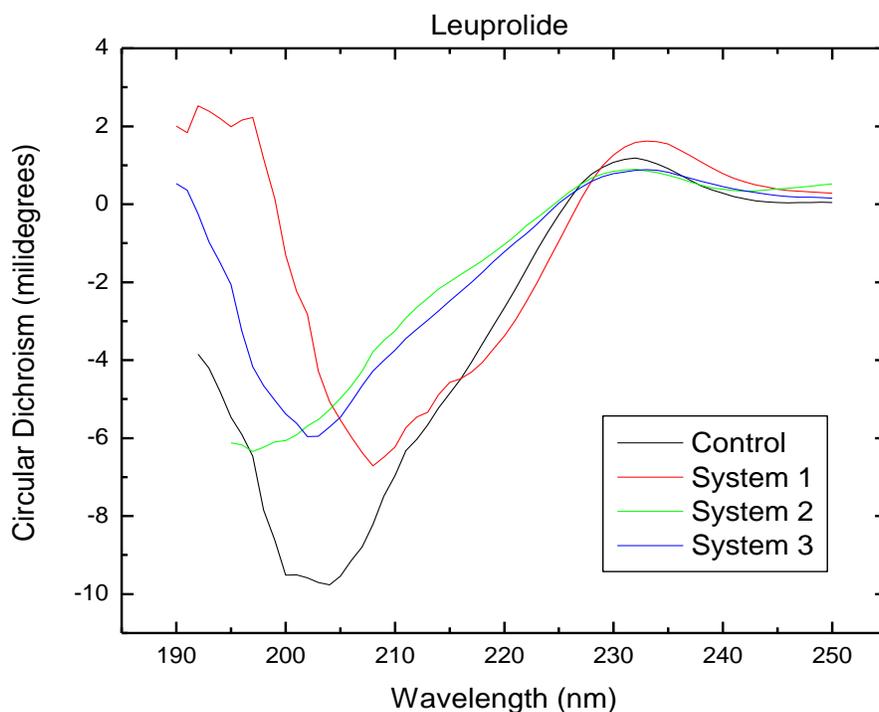
7.6 Estabilidad de los fármacos modelo en los sistemas ensamblados.

De acuerdo con los resultados arriba descritos, los sistemas ensamblados fueron caracterizados evidenciando su eficiencia como sistemas de liberación de fármacos. Para evaluar la integridad de las moléculas en relación a la conservación de su estructura secundaria o arreglo, una vez que los fármacos fueron liberados desde los sistemas ensamblados, se realizaron estudios de dicroísmo circular tanto para el péptido (leuprolide) como para la proteína (α -amilasa). Además, a la proteína modelo se le evaluó su actividad enzimática empleando el 2-cloro-4-nitrofenol-maltotriosa como sustrato.

7.6.1 Evaluación de la estructura secundaria por dicroísmo circular (CD).

Se obtuvieron los espectros de CD en el UV-lejano para las moléculas modelo después de 12 h de liberación a partir de los sistemas ensamblados y para las moléculas libres en solución. Los resultados se muestran en las figuras 31 y 32. De forma general se puede apreciar que los espectros son muy similares entre sí, por lo que podemos decir que no hay cambios significativos en la estructura secundaria a partir de los espectros obtenidos de las moléculas liberadas desde los sistemas ensamblados, en comparación con un espectro control (molécula libre en solución sin haber pasado por procesos de adsorción).

Figura 31. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano para del péptido modelo: acetato de leuprolide. Control = leuprolide libre sin proceso de adsorción, Sistema 1 (System 1) = leuprolide liberado desde S1, sin infiltración de NP's, Sistema 2 (System 2) = leuprolide liberado desde S3 con suspensión de NP's de 50 mg/mL de NP's y Sistema 3 (System 3) = leuprolide liberado desde S5 con suspensión de NP's de 100 mg/mL de NP's. NP's = nanopartículas.



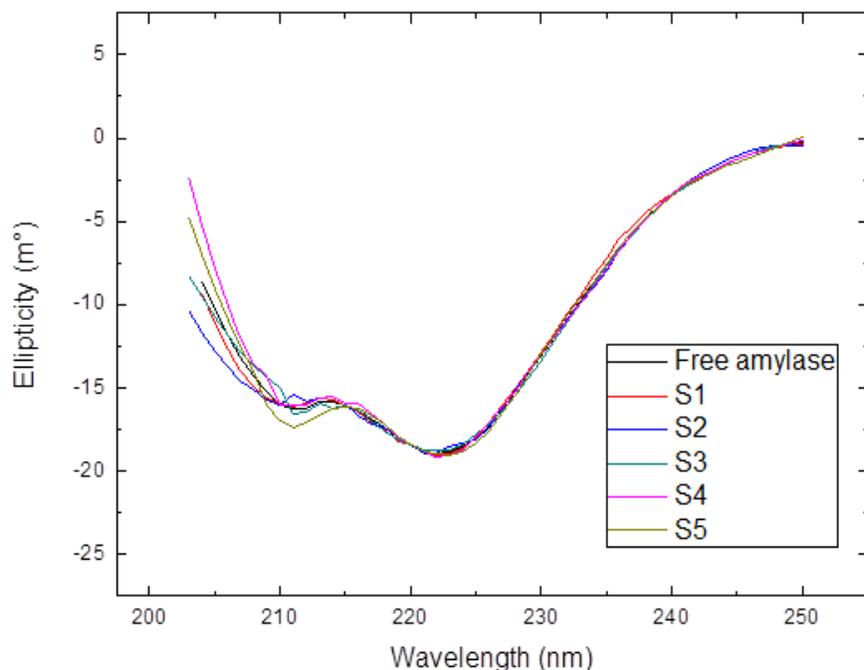


Figura 32. Espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano para la proteína modelo: α -amilasa. Notas: Free amylase = Amilasa libre, S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.

Los espectros CD obtenidos para la α -amilasa son similares a los reportados por Matsuo et al, quienes estudiaron la estructura secundaria de varias proteínas, incluida esta enzima [137]. Al no presentarse cambios en la estructura secundaria de la α -amilasa o en la conformación que toma el acetato de leuprolide en solución, se puede inferir que la actividad de las moléculas no se verá afectada.

7.6.2 Actividad enzimática de la proteína liberada desde los sistemas ensamblados.

Los ensayos de la actividad de α -amilasa son utilizados en el diagnóstico de pancreatitis aguda. Existen diferentes métodos para medir la actividad de la enzima, empleando como sustrato algunos oligosacáridos nitrofenilados que al ser metabolizados liberan un compuesto cromóforo como el 4-nitrofenol [117, 118]. Un ejemplo de esos sacáridos es el 2-cloro-4-nitrofenil-maltotriosa (CNP-G3), cuya estructura puede ser observada en la figura 33.

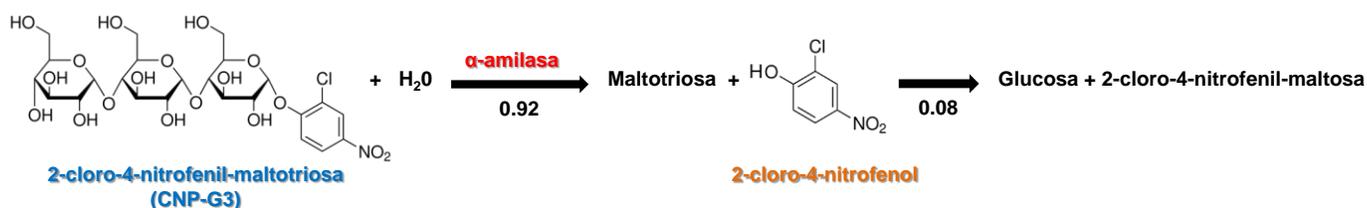
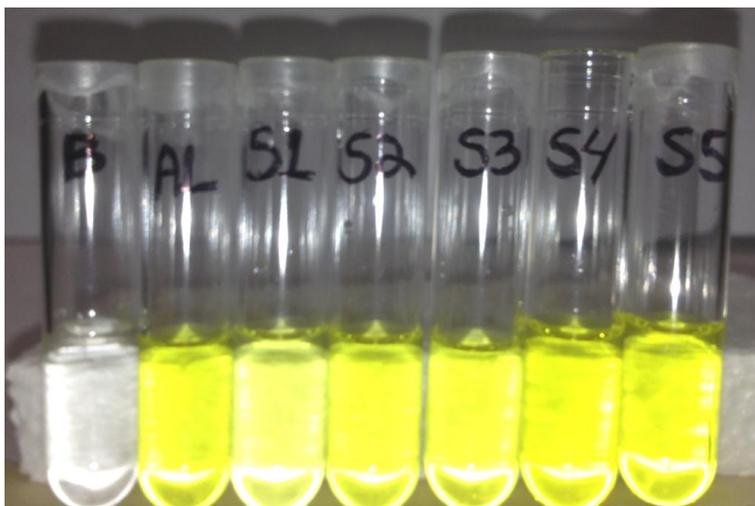


Figura 33. Reacción de hidrólisis del sustrato 2-cloro-4-nitrofenil-maltotriosa (CNP-G3) catalizada por la enzima α -amilasa.

El sustrato es hidrolizado por la α -amilasa sin fase de latencia, sin la necesidad de otras enzimas y en presencia de una alta concentración de tiocianato de potasio. La reacción enzimática produce un compuesto amarillo, el 2-cloro-4-nitrofenol (ver figura 33 y 34), que puede ser monitoreado espectrofotométricamente a 405 nm. Este método es sensible, preciso y libre de interferencias [117].

Figura 34. Ensayo de actividad de la α -amilasa en presencia del sustrato (CNP-G3). Notas: B = blanco (muestra sin enzima), AL = amilasa libre (muestra control), S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.



Se midió la actividad enzimática de la α -amilasa liberada a partir de los sistemas ensamblados (del S1 al S5) después de 12, 24 y 48 horas de liberación. Una solución de α -amilasa (sin haber pasado por procesos de adsorción) fue tratada con las mismas condiciones y utilizada como control. La actividad enzimática es reportada en UI/L para todas las muestras analizadas, ver figura 35. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de las muestras procedentes de los sistemas ensamblados en comparación con la enzima control ($p > 0.05$).

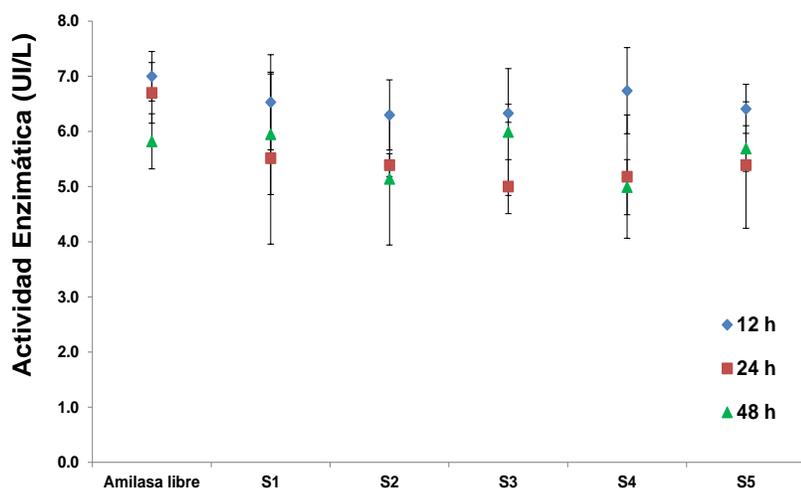


Figura 35. Actividad enzimática expresada en UI/L de la α -amilasa liberada desde los sistemas ensamblados por adsorción/infiltración de NP's en microesferas porosas. Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.

Analizando los resultados, se puede observar que la proteína-enzima sigue activa después del proceso de adsorción y su posterior desorción (liberación), confirmando el hecho de que la molécula estará disponible para llevar a cabo su actividad enzimática. Por otra parte, se ha sido descrito que la afinidad de la α -amilasa por adsorberse en superficies sólidas a pH ligeramente neutros (pH 7.2 en las pruebas de liberación y pH 6.2 de la solución reactivo para el ensayo de actividad enzimática) reduce la extensión de los cambios conformacionales e incrementa su actividad [132]. También se ha reportado que algunas enzimas, al ser adsorbidas, presentan cambios conformacionales que son reversibles cuando entran en contacto con sus sustratos después de la desorción, o bien cuando son adsorbidas sobre superficies con carga opuesta; incluso cuando se adsorben a altas concentraciones, ya que las biomoléculas se cristalizan o depositan muy cercanas entre sí, sobre el adsorbato (superficie), favoreciendo un mejor arreglo o empaquetamiento de las mismas y sin presentar grandes cambios en la conformación [100]. También se sugiere que algunas proteínas pueden presentar cambios en la conformación pero no en el centro activo o en aminoácidos de reconocimiento o anclaje, por lo que en algunos casos el centro bioactivo podría seguir operando después de un proceso de adsorción y posterior liberación o desorción [105].

VIII. CONCLUSIONES

En este proyecto de investigación se logró obtener y caracterizar un nuevo microsistema inyectable de liberación de fármacos. Con ello se comprueban las hipótesis planteadas, por lo que bajo un enfoque “bottom-up” y utilizando el proceso de ensamblaje por adsorción/infiltración, es posible obtener sistemas de liberación de moléculas sensibles al estrés fisicoquímico, ensamblados por adsorción e infiltración de nanopartículas poliméricas biodegradables en microesferas biodegradables porosas, empleando un método inmersión en medio acuoso. El proceso es libre de disolventes orgánicos y es capaz de acarrear fármacos sensibles al estrés fisicoquímico como son los péptidos y las proteínas.

- Con la metodología propuesta fue posible la obtención de sistemas ensamblados cargados con cantidades terapéuticas de moléculas modelo: un péptido (el acetato de leuprolide) y una proteína (α -amilasa).
- Haciendo uso de métodos convencionales y optimizando los parámetros de proceso, se logró preparar microesferas biodegradables porosas y nanopartículas poliméricas, de forma independiente y no habiendo presentado ninguna interacción con las moléculas modelo en este paso; las cuales cumplieron con características físicas y tecnológicas adecuadas para llevar a cabo el proceso de adsorción/infiltración, para obtener sistemas inyectables ensamblados.
- La metodología analítica desarrollada cumplió con los parámetros de linealidad, repetibilidad y exactitud, lo que permitió llevar a cabo las diferentes cuantificaciones de las moléculas modelo en las diferentes etapas del proyecto de investigación.
- A través de estudios de adsorción de las moléculas modelo sobre los componentes del sistema (micro- y nanopartículas), por separado, se pudieron definir las variables de proceso que se emplearon durante ensamblaje por adsorción/infiltración; tales como el pH óptimo del medio y la mejor cantidad de fármaco que debe agregarse al proceso de obtención. Con las condiciones que se establecieron, se tuvo un medio acuoso en el cual se favorecieron las interacciones entre las moléculas y las superficies, se encontró el punto donde se obtienen la mayor cantidad adsorbida de fármaco y la mejor eficiencia de adsorción. Con lo anterior se logró definir la capacidad de carga del sistema. También, por medio de estas determinaciones, se explicó el tipo de interacción entre los componentes del sistema y las moléculas modelo, donde las interacciones electrostáticas juegan el papel más importante durante la adsorción.

- El proceso de ensamblaje por adsorción/infiltración de nanopartículas poliméricas en microesferas porosas se aplicó con éxito, obteniéndose sistemas ensamblados con las siguientes características y ventajas:
 - a) Son sistemas susceptibles de ser dosificados, ya que se observó una dependencia entre la eficiencia de adsorción de las moléculas modelo y la cantidad de nanopartículas infiltradas, de tal modo que cuando existe una mayor cantidad de nanopartículas infiltradas en las microesferas porosas se tiene una mayor cantidad de fármaco cargado en el sistema. De este modo, se podría controlar la cantidad inicial de nanopartículas en suspensión en función de la cantidad de fármaco que se desea cargar en el sistema.
 - b) Se puede fijar un tiempo deseado para la liberación del fármaco al seleccionar la cantidad de nanopartículas que se van a infiltrar. Lo anterior es debido a que se encontró que en los sistemas ensamblados, las nanopartículas infiltradas y adsorbidas crean una película sobre la superficie de las microesferas porosas que parece actuar como barrera de difusión. Esta película, en conjunto con el grado de saturación del área superficial del vehículo poroso, modifican la velocidad de liberación; reduciéndola en función de la continuidad de la película y de la cantidad de nanopartículas infiltradas.
- Las pruebas de liberación *in vitro* permitieron evidenciar que los sistemas ensamblados son capaces de liberar el fármaco, de forma sostenida, hasta por 7 días, en función del grado de saturación del sistema, es decir, de la cantidad de nanopartículas infiltradas. Con base en lo anterior es factible disminuir la frecuencia de administración o bien definirla, ya que se pueden preparar sistemas con diferentes grados de saturación.
- Al aplicar esta metodología se espera que los fármacos sensibles al estrés fisicoquímico puedan mantener su integridad física y química, si estos son formulados mediante el proceso de ensamblaje por adsorción/infiltración; pues durante la preparación, los sistemas se ensamblaron en tiempos cortos, en un medio acuoso, sin que haya contacto de los fármacos con disolventes orgánicos, con altas temperaturas o cambios drásticos de pH, además se evitaron las interfaces agua/aceite y las altas fuerzas de corte. Incluso, los resultados que se obtuvieron por dicroísmo circular y por evaluación de la actividad enzimática mostraron como las moléculas modelo en estudio se encuentran íntegras después de haber sido formuladas con la estrategia propuesta y después de ser liberadas a partir de los sistemas ensamblados.

El enfoque “bottom-up” aplicado en este desarrollo y el proceso de adsorción/infiltración que se propone en este trabajo se pueden utilizar como una alternativa en la formulación de fármacos sensibles al estrés fisicoquímico como son los péptidos y las proteínas. La metodología desarrollada hace frente a los retos actuales para formular este tipo de moléculas, eliminando el inconveniente de preparar sistemas de liberación de proteínas haciendo uso de métodos comunes de microencapsulación que comprometen la integridad de este tipo de fármacos en cada paso de manufactura.

Los microsistemas desarrollados se pueden administrar por diferentes rutas, incluyendo la vía parenteral, incluso se podrían formular con otras biomoléculas como el ADN o ARN. Además, cuentan con la ventaja de ser biodegradables y biocompatibles.

IX. PERSPECTIVAS

Se contempla que el alcance de este proyecto de investigación pueda ampliarse considerando las siguientes perspectivas:

- Ensamblar sistemas empleando otras proteínas globulares de interés terapéutico o bien utilizando ADN, ARN, entre otros.
- Realizar determinaciones *in vivo*, empleando un modelo animal, para evaluar la efectividad de los sistemas ensamblados una vez que son administrados.
- Llevar a cabo un diseño experimental para estudiar y aplicar el proceso de ensamblaje por adsorción/infiltración empleando otros vehículos porosos.
- Estudiar perfiles de degradación de los sistemas ensamblados.
- Evaluar el posible escalamiento, implantación, desarrollo y validación del proceso de producción de un producto farmacéutico de uso clínico, formulado con la metodología propuesta.

X. REFERENCIAS

1. Rocco M.C., (2007). National Nanotechnology Initiative. Handbook of nanosciences, Engineering and Technology. Taylor and Francis. USA. p.p.1-25.
2. Majumder DD, Banerjee R, Ulrichs CH, Mewis I. Nanomaterials: science of bottom-up and top-down. IETE Tech Rev. 2007; 24: 9-25.
3. Williams D. The relationship between biomaterials and nanotechnology. Biomaterials. 2008; 29: 1737-1738.
4. Ochekepe NA, Olorunfemi PO, Ngwuluka NC. Nanotechnology and drug delivery Part 1: Background and Applications. Trop J Pharm Res. 2009; 8(3): 265-274.
5. Martins S, Sarmiento B, Ferreira DC, Souto EB. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery-liposomes versus lipid nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2007; 2: 595-607.
6. Saez V, Hernández JR, Peniche C. Microspheres as delivery systems for the controlled release of peptides and proteins. Biotechnol Apl. 2007; 24: 98-107.
7. Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. Nat Rev. 2009; 4: 298-306.
8. Pavlou AK, Reichert JM. Recombinant protein therapeutics-success rates, market trends and values to 2010. Nat biotechnol. 2004; 22(12): 1513-1519.
9. Van de Weert M, Hennink WE, Jiskoot W. Protein instability in Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) microparticles. Pharm Res. 2000; 17: 1159-1167.
10. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. Pharm Res. 2010; 27(4): 544-575.
11. Fu k, Klibanov AM, Langer R. Protein stability in controlled-release systems. Nat biotechnol. 2000; 18: 24-25.
12. Krishnamurthy R, Manning MC. The stability factor: importance in formulation development. Curr Pharm Biotechnol. 2002; 3(4): 361-371.
13. Jain A, Jain SK. PEGylation: an approach for drug delivery. A review. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2008; 5: 403-47.
14. Solaro R, Chiellini F, Battisti A. Targeted delivery of protein drugs by nanocarriers. Materials. 2010; 3: 1928-1980.
15. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. J Control Release. 2001; 70: 1-20.
16. Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. Int J Pharm. 1996; 143: 133-141.

17. Okada H, Masaki Y, Toshiro H, et al. Drug delivery using biodegradable microspheres. *J Control Release*. 1994; 28: 121-129.
18. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release*. 2003; 90: 261-280.
19. Wei W, Yuan L, Hu G, et al. Monodisperse chitosan microspheres with interesting structures for protein drug delivery. *Adv Mater*. 2008; 20: 2292-2296.
20. Shi X, Sun L, Jiang J, Zhang X, Ding W, Gan Z. Biodegradable polymeric microcarriers with controllable porous structure for tissue engineering. *Macromol Biosci*. 2009; 9: 1211-1218.
21. Rosca ID, Watari F, Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J Control Release*. 2004; 99: 271-280.
22. Sun L, Zhou S, Wang W, Li X, Wang J, Weng J. Preparation and characterization of porous biodegradable microspheres used for controlled protein delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2009; 345: 173-181.
23. Lee ES, Kwon MJ, Lee H, Kim JJ. Stabilization of protein encapsulated in polylactide-co-glycolide microspheres by novel viscous S/W/O/W method. *Int J Pharm*. 2007; 331: 27-37.
24. Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm*. 1999; 185: 129-188.
25. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000; 21: 2475-2490.
26. Degim IT, Çelebi N. Controlled delivery of peptides and proteins. *Curr Pharm Des*. 2007; 13: 99-117.
27. Vrignaud S, Benoit JP, Saulnier P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials*. 2011; 32: 8593-8604.
28. Kilpeläinen M, Mönkäre J, Vlasova MA, Riikonen J, Lehto VP, Salonen J, Järvinen K, Herzig KH. Nanostructured porous silicon microparticles enable sustained peptide (Melanotan II) delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011; 77: 20-25.
29. Rodríguez-Cruz IM, Domínguez-Delgado CL, Escobar-Chávez JJ, Leyva-Gómez G, Ganem-Quintanar A, Quintanar-Guerrero D. Nanoparticle infiltration to prepare solvent-free controlled drug delivery systems. *Int J Pharm*. 2009; 371: 177-181.
30. Slowing II, Trewyn BG, Giri S, Lin VSY. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Adv Funct Mater*. 2007; 17: 1225-1236.
31. Chien Y.W. Novel drug delivery systems. Concepts and systems design for rate-controlled drug delivery. Volume 50. 2nd Edition. Marcel Dekker. New York. 1992. p.p. 2-5.

32. Robinson J.R., Lee V.L. Controlled drug delivery, fundamentals and applications. 2nd Edition. Marcel Dekker. 5-9.
33. Randall K.P., Mersny J. Controlled drug delivery, designing technologies for the future. 1st Edition. American Chemical Society. Washington DC. 2000. p.p.2-10.
34. Sáez V, Hernáez E, Sanz-Angulo L. Sistemas de liberación controlada de medicamentos. Rev Ibero Poli. 2002; 3(3): 1-8.
35. Langer R, Vima LG, Tamado JA, Witermantel E. Future directions in biomaterials Biomaterials. 1990; 11: 738-745.
36. Dumitriu S, Dumitriu D. Polymeric biomaterials. Marcel Dekker, Inc., Nueva York. 1994: 41.
37. Chandra R, Rustgi R. Biodegradable polymers. Prog Polym Sci. 1998; 23: 1273–1335.
38. Avérous L, Pollet E. Environmental silicate nano-biocomposites. Chapter 2 Biodegradable Polymers. Springer. London. 2012. p.p. 13-40.
39. Joshi JR, Patel RP. Role of biodegradable polymers in drug delivery. Inter J Current Pharm Res. 2012; 4 (4): 74-81.
40. Shah N, Mewada RK, Shah T. Application of biodegradable Polymers in controlled drug delivery. Institute of Technology, Nirma University. Ahmedabad. 2011. p.p. 1-6.
41. Vroman I, Tighzert L. Biodegradable Polymers. Materials. 2009; 2: 307-344.
42. Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. Polymers. 2011; 3: 1377-1397.
43. Lewis DH. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin M, Langer R, editors. Biodegradable polymers as drug delivery systems. Marcel Dekker. New York. 1990. p.p.1-41.
44. Brady JM, Cutright DE, Miller RA, Battistone GC. Resorption rate, route of elimination and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat. J Biomed Mater Res. 1973; 7: 155-166.
45. Burgess JD, Hickey AJ. Microsphere technology and applications. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 3rd Edition. Informa Healthcare. New Yoork. 2006. p.p. 2328-2338.
46. Rosas JE, Pedráz JL. PLGA Microspheres: A controlled release system of molecules with immunogenic activity. Rev Colomb Cienc Quím Farm. 2007; 36: 134-153.
47. Zeng XM, Martin GP, Marriott C. The controlled delivery of drugs to the lung. J Control Release. 1995; 124: 149-164.
48. Iwata M, Tunaka T, Nakamura Y, McGinity JW. Selection of the solvent system for the preparation of polylactic-coglycolic acid microspheres containing tumor necrosis factor alpha. Int J Pharm. 1998; 160: 145-156.

49. Wei W, Yuan L, Hu G, Wang LY, Wu J, Su ZG, Ma GH. Monodisperse Chitosan microspheres with interesting structures for protein drug delivery. *Adv Mater.* 2008; 20: 2292-2296.
50. Qu H, Gong F, Ma G, Su Z. Preparation and characterization of larges porous poly(HEMA-coDEMA) microspheres with narrow size distribution by modified membrane emulsification method. *J Apl Polym Sci.* 2007; 105: 1632-1641.
51. Yang YY, Chung TS, Bai XL, Chan WK. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of briodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *J Che Eng Sci.* 2000; 55: 2223-2236.
52. Kim HK, Chung H, Park TG. Biodegradable polymeric microspheres with open/closed pores for sustained release of human growth hormone. *J Control Release.* 2006; 112: 167-174.
53. Makino K, Oshima H, kondo T. Interaction of polylactide microcapsule surface with plasma proteins: reversal of zeta potential caused by fibrinogen. *J Colloid Interface Sci.* 1987; 115: 65-72.
54. Brian HK. Particle-size characterization. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* 3rd Edition. Pharmaceu Tech, Inc. New York. 1997. p.p. 2582-2594.
55. Fan TM, Guang HM, Wei Q, Zhi GS. W /O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *J Control Release.* 2003; 91: 407–416.
56. Arshady R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polyactides and related polyesters. *J Control Release.* 1991; 17: 1–21.
57. Fong JW. Microencapsulation by solvent evaporation and organic phase separation process. *Controlled release systems: fabrication technology*, Vol. 1. CRC Press. Boca Raton, Florida. 1988. p.p. 81-108.
58. Chaisri W, Hennink WE, Okonogi S. Preparation and characterization of cephalixin loaded PLGA microspheres. *Curr Drug Deliv.* 2009; 6: 69–75.
59. O'Donnell P, McGinity JW. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Del Rew.* 1997; 28: 25-42.
60. Viswanathan NB, Thomas PA, Pandit JK, Kulkarni MG, Mashelkar RA. Preparation of non-porous microspheres with high entrapment efficiency of proteins by a (water-in-oil)-in-oil emulsion technique. *J Control Release.* 1999; 58: 9-20.
61. Mao S, Xu J, Cai C, Germershaus O, Schaper A, Kissel T. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres. *Int J Pharm.* 2007; 334: 137–148.
62. Kim TK, Yoon JJ, Lee DS, Park TG. Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres. *Biomaterials.* 2006; 27: 152-159.

63. Chung HJ, Park TG. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *AdvDrug Deliv Rev.* 2007; 59: 249–262.
64. Peniche C, Fernández M, Gallardo A, López-Bravo A, San Román J. Drug delivery systems based on porous chitosan/polyacrylic acid microspheres. *Macromol Biosci.* 2003; 3: 540–545.
65. Alcalá-Alcalá S, Aguilar-Rosas I, Urbán-Morlán Z, Quintanar-Guerrero D. A biodegradable polymeric system for peptide–protein delivery assembled with porous microspheres and nanoparticles, using an adsorption/infiltration process. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 2141–2151.
66. Nokhodchi A. Factors affecting the morphology of benzoyl peroxide microsponges. *Micron.* 2007; 38: 834–840.
67. Edwards DA, Hanes J, Caponetti G, Hrkach J, Ben-Jebria A, Eskew ML. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science.* 1997; 276: 1868–1871.
68. Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur J Pharm Biopharm.* 1995; 41: 2-13.
69. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine.* 2006; 2: 8–21.
70. Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Opin Solid State Mate Sci.* 2002; 6: 319–327.
71. Williams III RO, Vaughn JM. Nanoparticle engineering. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* 3rd Edition. Informa Healthcare. New York. 2006. p.p. 2384-2398.
72. Fattal E, Vauthier C. Nanoparticles as drug delivery systems. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* 3rd Edition. Informa Healthcare. New York. 2006. p.p. 1183-1200.
73. Muller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv.* 2001; 47: 3-19.
74. Blanco MD, Alonso MJ. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *Eur J Pharm Biopharm.* 1997; 43: 287–294.
75. Gref R et al. ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chainlength and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B.* 2000; 18: 301–313.
76. Redhead HM, Davis SS, Illum L. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterization and in vivo evaluation. *J Control Release.* 2001; 70: 353–63.
77. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical application. *J Control Release.* 2012; 161: 505–522.

78. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm Res.* 2009; 26 (5): 1025-1058.
79. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Hattem F, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998; 24(12): 113-1128.
80. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog Polym Sci.* 2011; 36: 887–913.
81. Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification–diffusion technique. *Int J Pharm.* 1996; 143: 133–141.
82. Reichert JM, Paquette C. Therapeutic recombinant proteins: trends in US approvals 1982-2002. *Curr Opin Mol Ther.* 2003; 5: 139–147.
83. Tandon S, Sharma S, Rajput R, Semwal B, Yadav PK, Singh K. Biotech drugs: the next boom in pharmaceutical market. *J Pharm Res Opin.* 2011; 1(3): 76–79.
84. Reichert JM. Biopharmaceutical approvals in the US. *Reg Affairs J Pharma.* 2004; 15: 491–497.
85. Dobson CM. Chemical space and biology. *Nature.* 2004; 432: 824–828.
86. Prausnitz MR. Microneedles for transdermal drug delivery. *Adv Drug Del Rev.* 2004; 56: 581-587.
87. Pillai O, Nair V, Panchagnula R. Transdermal iontophoresis of insulin: IV. Influence of chemical enhancers. *Int J Pharm.* 2004; 269: 109-120.
88. Machay M. Delivery of recombinant peptide and protein drugs. *Biotech Gen Eng Rev.* 1990; 8: 251-278.
89. Hermelin, S, Crommelin DJA, Schellekenes H, Jiskoot W. Structure–immunogenicity relationship of therapeutic proteins. *Pharm Res.* 2004; 21: 897–903.
90. Crommelin DJ. Formulation of biotech products, including biopharmaceutical considerations. In *Pharmaceutical Biotechnology*. London, UK. 1997. p.p. 67–94.
91. Salmaso S, Bersani S, Semenzato A, Caliceti PJ. Nanotechnologies in protein delivery. *J Nanosci Nanotechol.* 2006; 6: 1–18.
92. Bysell H, Månsson R, Hansson P, Malmsten M. Microgels and microcapsules in peptide and protein drug delivery. *Adv Drug Delivery Rev.* 2011; 63: 1172–1185.
93. Cleland JL, Powell MF, Shire SJ. The development of stable protein formulations: A close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1993; 10: 307-377.
94. Chuanyun Dai C, Wang B, Zhao H. Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005; 41: 117–120.

95. Fields G, Alonso D. Theory for the aggregation of proteins and copolymers. *J Phys Chem B*. 1992; 96: 3674–3981.
96. Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in non-native protein aggregation. *Pharm Res*. 2003; 20: 1325–1336.
97. Andrade JD. Principles of protein adsorption. In *surface and interfacial aspects of biomedical polymers*. Ed. Plenum. New York. 1985. 2: p.p. 1–80.
98. Bangs LB. New developments in particle-based immunoassays: introduction. *Pure Appl Chem*. 1996; 68(10): 1873–1879.
99. Kim JH, Yoon JY. Protein adsorption on polymer particles. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. Marcel Dekker. New York. 2002. p.p. 4373-4381.
100. Nakanishi K, Sakiyama T, Imaura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng*. 2001; 91(3): 233-244.
101. Hayens CH, Norde W. Structures and stabilities of adsorbed proteins. *J Colloid Interface Sci*. 1995; 169(2):313-328.
102. Kleijn JM, Norde M. The adsorption of proteins from aqueous solution on solid surfaces. *Hetero Chem Rev*. 1995; 2: 157-172.
103. Wahlgren M, Thomas Arnebrant T. Protein adsorption to solid surfaces. *Trends Biotechnol*. 1991; 9(1): 201-208.
104. van der Veen M, Stuart MC, Norde W. Spreading of proteins and its effect on adsorption and desorption kinetics. *Colloid Surf B Biointerfaces*. 2007; 54(2): 136-142.
105. Norde W, MacRitchie F, Nowicka G, Lyklema J. Protein adsorption at solid-liquid interfaces: Reversibility and conformation aspects. *J Colloid Interface Sci*. 1986; 112 (2): 447-456.
106. Yoon JY, Kim JH, Kim WS. Interpretation of protein adsorption phenomena onto functional microspheres. *Colloid Surf B Biointerfaces*. 1998; 12 (1):15–22.
107. Park YJ, Yoon JY, Park HY, Kim JH, Kim WS. Synthesis of model microspheres and adsorption study of bovine albumin. *J Biomed Eng Res*. 1993; 14(3): 209–219.
108. Okada H. One and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprolin acetate. *Adv Drug Del Rev*. 1997; 28: 43-70.
109. Eligard® Product Monograph. Leuprolide acetate for injection. Sanofi-aventis Canada Inc. (2009). 24.
110. Singh S, Singh J. Phase-sensitive polymer-based controlled delivery systems of leuprolide acetate: in vitro release, biocompatibility, and in vivo absorption in rabbits. *Int J Pharm*. 2007; 328: 42-48.

111. Powers ME, Adjei A, Lu MG, Maning M. Solution behavior of leuprolide acetate, an LHRH agonist, as determined by circular dichroism spectroscopy. *Int J Pharm.* 1994; 108: 49-55.
112. Hall SC, Tan MM, Leonard JJ, Stevenson SL. Characterization and comparison of leuprolide degradation profiles in water and dimethyl sulfoxide. *J Peptide Res.* 1999; 53: 432-441.
113. Periti P, Mazzei T, Mini E. Clinical pharmacokinetics of depot leuprolide. *Clin Pharmacokinet.* 2002; 41: 485-504.
114. Sennello LT, Finley RA, Chu SY, Jagst C, Max D, Rollins DE. Single-dose pharmacokinetics of leuprolide in humans following intravenous and subcutaneous administration. *J Pharm Sci.* 1986; 75: 158-160.
115. Monografía α -Amylase from *Aspergillus oryzae*. Hoja técnica Sigma-Aldrich. Versión 3.6. 2012.
116. Reddy NS, Nimmagadda A, Sambasiva Rao KRS. An overview of the microbial α -amylase family, Minireview. *African J Biotechnol.* 2003; 2(12): 645-648.
117. Ying Foo A, Bais R. Amylase measurement with 2-chloro-4-nitrophenyl maltotrioxide as substrate. *Clin Chim Act.* 1998; 272: 137–147.
118. Gella FJ, Gubern G, Vidal R, Canalías F. Determination of total and pancreatic α -amylase in human serum with 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotrioxide as substrate. *Clin Chim Acta.* 1997; 259:147-160.
119. Sugahara M, Takehira M, Yutani K. Effect of heavy atoms on the thermal stability of α -amylase from *Aspergillus oryzae*. *PLoS One.* 2013; 8(2): 1-7.
120. Öngen G, Yilmaz G, Jongboom ROJ, Feil H. Encapsulation of α -amylase in a starch matrix. *Carbohydr polym.* 2002; 50: 1-5.
121. van der Maarel MJEC, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J Biotechnol.* 2002; 94: 137–155.
122. Brunauer S, Emmett P H & Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc.* 1938; 60: 309-19.
123. Rouquerol J, Rouquerol F, Sing K. Adsorption by powders and porous solids. Academic Press. San Diego, USA.1999. p.p. 131-202.
124. Costa P, Sousa-Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci.* 2001; 13: 123-133.
125. Bae SE, Son JS, Park K, Han DK. Fabrication of covered porous PLGA microspheres using hydrogen peroxide for controlled drug delivery and regenerative medicine. *J Control Release.* 2009; 133(1): 37-43.

126. Wang CY, Liao HF, Sheu DC. Enhancement of recombinant human macrophage colony-stimulating factor production using culture systems with porous polymeric microspheres. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 2010; 41(2): 203–208.
127. Saralidze K, Aldenhoff YB, Knetsch ML, Koole LH. Injectable polymeric microspheres with X-ray visibility. Preparation, properties, and potential utility as new traceable bulking agents. *Biomacromolecules.* 2003; 4(3): 793-798.
128. Quintanar-Guerrero D, Zambrano-Zaragoza ML, Gutiérrez-Cortez E, Mendoza-Muñoz N. Impact of the emulsification-diffusion method on the development of pharmaceutical nanoparticles. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2012; 6: 184-194.
129. Hideki Murakami, Masao Kobayashi, Hirofumi Takeuchi, Yoshiaki Kawashima. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int J Pharm.* 1999; 187: 143–152.
130. Kwon HY, Lee JY, Choi SW, Jang Y, Kim JH. Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2001; 182(1): 123-130.
131. Bautista LF, Martinez M, Aracil J. Adsorption equilibrium of α -amylase in aqueous solutions. *AIChE J.* 1999; 45(4): 761-768.
132. Kondo A, Urabe T, Yoshinaga K. Adsorption activity and conformation of α -amylase on various ultrafine silica particles modified with polymer silane coupling agents. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 1996; 109: 129-136.
133. Li W, Li S. A study on the adsorption of bovine serum albumin onto electrostatic microspheres: Role of surface groups. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2007; 295: 159–164.
134. Luan X, Bodmeier R. Influence of the polylactide-co-glycolide type on the leuprolide release from in situ forming microparticle systems. *J Control Release.* 2006; 110: 266-272.
135. Meyer JD, Manning MC, Vander-Velde DG. Characterization of the solution conformations of leuprolide acetate. *J Pept Res.* 2002; 60: 159-168.
136. Bouissou C, Rouse JJ, Price R, van der Walle CF. The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm Res.* 2006; 23 (6): 1295-1305.
137. Matsuo K, Yonehara R, Gekko K. Improved estimation of the secondary structures of proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. *J Biochem.* 2005; 138: 79–88.

XI. ANEXOS

Anexo 11.1 Clasificación y ejemplos de los polímeros biodegradables.

Polímeros Biodegradables		
Derivados de los recursos del petróleo	Derivados de recursos renovables (agropolímeros)	Mezclas
Sintéticos con columnas hidrolizables: a) Poliésteres <ul style="list-style-type: none"> • Alifáticos: Poliglicólico (PGA) Poliláctico (PLA) Poliláctico-co-glicólico (PLGA) Policaprolactona (PCL) Polibutilensuccinato (PBS) Poli-pdioxanona (PPDO) Politrimetilencarbonato (PTMC) <ul style="list-style-type: none"> • Aromáticos Polibutilenadipato-co-tereftalato (PBAT) b) Poliéster-amidas c) Poliuretanos d) Poliureas e) Polianhídridos	Naturales: a) Proteínas <ul style="list-style-type: none"> • Origen animal: Colágeno Gelatina • Origen vegetal: Gluten de trigo Proteína de soya Caseína b) Polisacáridos <ul style="list-style-type: none"> • Origen marino: Quitina Quitosán <ul style="list-style-type: none"> • Origen vegetal Almidón Celulosa Alginato Ácido hialúronico Condroitina	Basados en almidón: Almidón-Polietilen-co-vinil alcohol (EVOH) Almidón-PLA Almidón-PCL Almidón-PBS Almidón-PHB Otros: Ácido Poliaspártico-co-láctico (PAL)
Sintéticos con columnas carbonadas Vinil polímeros: Polivinil alcohol (PVAL) Polienol-cetona Polipropilénfumarato	Bacteriales: Poli- β -hidroxialcaonatos (PHA) Polihidroxibutirato (PHB)	



Anexo 11.2 Tablas de ANOVA de los análisis estadísticos realizados.

Tabla 5. Análisis de varianza de la talla promedio de tres lotes de microesferas porosas. No existen diferencias significativas en la talla promedio ($p=0.64$).

RESUMEN						
Grupos	Promedio (Talla μm)		Promedio General (μm)	Desviación estándar (μm)		
Lote 1	102.18		103.9	6.28		
Lote 2	106.98					
Lote 3	102.42					
TABLA DE ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	43.897056	2	21.948528	0.485167469	0.63781218	5.14325285
Dentro de los grupos	271.434456	6	45.239076			
Total	315.331512	8				

Tabla 6. Análisis de varianza de la talla promedio de tres lotes de nanopartículas poliméricas. No existen diferencias significativas en la talla promedio ($p=0.24$).

RESUMEN						
Grupos	Promedio (Talla nm)		Promedio General (nm)	Desviación Estándar (nm)		
Lote 1	263.83		257.0	12.38		
Lote 2	247.13					
Lote 3	260.17					
TABLA DE ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	462.202222	2	231.10111	1.8127947	0.24219867	5.14325285
Dentro de los grupos	764.9	6	127.48333			
Total	1227.10222	8				

Tabla 7. Análisis de varianza del potencial ζ para muestras de nanopartículas de PLGA 4A (con grupo carboxílico terminal) con diferentes cantidades adsorbidas de acetato de leuprolide. Existen diferencias estadísticamente significativas en el potencial ζ ($p=0.001$).

RESUMEN						
Grupos	Promedio (Potencial Z, mV)					
Blanco	-23.6					
10	-19.8					
20	-17.1					
30	-15.6					
40	-10.6					
TABLA DE ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	281.256	4	70.314	19.3855684	0.00010559	3.47804969
Dentro de los grupos	36.271312	10	3.6271312			
Total	317.527312	14				

Tabla 8. Análisis de varianza del potencial ζ para muestras de nanopartículas de PLGA 4A (con grupo carboxílico terminal) con diferentes cantidades adsorbidas de α -amilasa. Existen diferencias estadísticamente significativas en el potencial ζ ($p=3.8 \times 10^{-11}$).

RESUMEN						
Grupos	Promedio (Potencial Z, mV)					
Blanco	-6.08					
10	-4.38					
20	-3.15					
30	-2.46					
40	-1.87					
TABLA DE ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	33.67510667	4	8.41877667	430.114612	3.8481E-11	3.47804969
Dentro de los grupos	0.195733333	10	0.01957333			
Total	33.87084	14				

Tabla 9. Análisis de varianza del potencial ζ para muestras de nanopartículas de PLGA 5E (con grupo éster terminal) con diferentes cantidades adsorbidas de acetato de leuprolide. No existen diferencias estadísticamente significativas en el potencial ζ ($p=0.82$).

RESUMEN						
Grupos	Promedio (Potencial Z, mV)					
Blanco	-8.5					
10	-7.5					
20	-8.8					
30	-9.1					
40	-8.6					
TABLA DE ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4.38	4	1.095	0.37541656	0.82114054	3.47804969
Dentro de los grupos	29.1676	10	2.91676			
Total	33.5476	14				

Tabla 10. Análisis de varianza de la actividad enzimática de amilasa liberada a partir de los sistemas ensamblados en comparación con una muestra control de α -amilasa libre. No existen diferencias estadísticamente significativas de la actividad enzimática entre los sistemas ($p=0.057$).
 Notas: S1 = sistema ensamblado sin infiltración de NP's, S2, S3, S4 y S5 = sistemas con infiltración de suspensión de NP's a 25, 50, 75 y 100 mg/mL, respectivamente. NP's = nanopartículas.

RESUMEN		Promedio (Actividad Enzimática UI/L)				α -
Tiempos:	12 h	6.62				
	24 h	5.53				
	48 h	5.60				
Sistemas:	Enzima libre	6.67				
	S1	6.00				
	S2	5.60				
	S3	5.77				
	S4	5.63				
	S5	5.83				
TABLA DE ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tiempo	4.42333333	2	2.21166667	14.9101124	0.00099881	4.10282102
Sistemas	2.33833333	5	0.46766667	3.15280899	0.05764262	3.32583453
Error	1.48333333	10	0.14833333			
Total	8.245	17				

- Primer Congreso de Innovación Biotecnológica en México INBIO. Universidad de Sinaloa (2012)

11.3.2 Congresos internacionales.

- Presentación de trabajo libre en Congreso Internacional: 3rd Conference on Innovation in Drug Delivery: Advances in Local Drug Delivery, Italia. Association de Pharmacie Galénique Industrielle, APGI (2013).

11.3.3 Artículos escritos.

Artículo de investigación 1

- “A biodegradable polymeric system for peptide–protein delivery assembled with porous microspheres and nanoparticles, using an adsorption/infiltration process”. *International Journal of Nanomedicine*, 2013;8 2141–2151. Impact Factor 3.130. *Int J Nanomedicine*. ISSN: 1178-2013.



Artículo de investigación 2

- “A new solvent free approach to encapsulate proteins by adsorbed-infiltrated nanoparticles into porous microspheres; obtaining, characterization and protein integrity studies”. Sometido a evaluación para ser publicado. (Mayo de 2014).



Anexo 11.4 Publicaciones.

International Journal of Nanomedicine

Dovepress

open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

A biodegradable polymeric system for peptide–protein delivery assembled with porous microspheres and nanoparticles, using an adsorption/infiltration process

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of Nanomedicine
8 June 2013
[Number of times this article has been viewed](#)

Sergio Alcalá-Alcalá
Zaida Urbán-Morlán
Irene Aguilar-Rosas
David Quintanar-Guerrero

Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México

Abstract: A biodegradable polymeric system is proposed for formulating peptides and proteins. The systems were assembled through the adsorption of biodegradable polymeric nanoparticles onto porous, biodegradable microspheres by an adsorption/infiltration process with the use of an immersion method. The peptide drug is not involved in the manufacturing of the nanoparticles or in obtaining the microspheres; thus, contact with the organic solvent, interfaces, and shear forces required for the process are prevented during drug loading. Leuprolide acetate was used as the model peptide, and poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) was used as the biodegradable polymer. Leuprolide was adsorbed onto different amounts of PLGA nanoparticles (25 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL, and 100 mg/mL) in a first stage; then, these were infiltrated into porous PLGA microspheres (100 mg) by dipping the structures into a microsphere suspension. In this way, the leuprolide was adsorbed onto both surfaces (ie, nanoparticles and microspheres). Scanning electron microscopy studies revealed the formation of a nanoparticle film on the porous microsphere surface that becomes more continuous as the amount of infiltrated nanoparticles increases. The adsorption efficiency and release rate are dependent on the amount of adsorbed nanoparticles. As expected, a greater adsorption efficiency (~95%) and a slower release rate were seen (~20% of released leuprolide in 12 hours) when a larger amount of nanoparticles was adsorbed (100 mg/mL of nanoparticles). Leuprolide acetate begins to be released immediately when there are no infiltrated nanoparticles, and 90% of the peptide is released in the first 12 hours. In contrast, the systems assembled in this study released less than 44% of the loaded drug during the same period of time. The observed release profiles denoted a Fickian diffusion that fit Higuchi's model ($t^{1/2}$). The manufacturing process presented here may be useful as a potential alternative for formulating injectable depots for sensitive hydrophilic drugs such as peptides and proteins, among others.

Keywords: adsorption, biodegradable polymers, controlled release, nanoparticles, porous microspheres, peptide delivery

Correspondence: Sergio Alcalá-Alcalá
Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida 1^o de Mayo s/n, Campo 1, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, CP 54743, México
Tel +52 555 623 2065
Fax +52 555 893 8675
Email sekyaa@gmail.com

David Quintanar-Guerrero
Email quintana@servidor.unam.mx

Introduction

Nanotechnology is the science that makes use of the new, modified, and unique properties of materials on a nanometric scale. As their size decreases, the new physical and chemical properties of the materials gain importance because of an increase in surface area, such that the quantum effects, surface properties, and large surface area-to-volume ratio all acquire dominance. Nanotechnology has been successfully applied in pharmaceutical technology to deal with a variety of challenges, such as low bioavailability, instability and low solubility of drugs, undesirable side effects,

submit your manuscript | www.dovepress.com
Dovepress
<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S44482>

International Journal of Nanomedicine 2013:8 2141–2151
© 2013 Alcalá-Alcalá et al, publisher and licensee Dove Medical Press Ltd. This is an Open Access article which permits unrestricted noncommercial use, provided the original work is properly cited.

2141

nontargeted delivery, low therapeutic effectiveness, inconstant blood levels, and frequent dosing.^{1,2}

Over the past three decades, biomolecules like peptides, proteins, and deoxyribonucleic acid (DNA) analogs have been studied and proposed as therapeutic agents, owing to their high selectivity in the treatment of such diseases as cancer and enzymatic or genetic deficiencies. Advances in biotechnology have made possible the large-scale and efficient production of these molecules in quantities that are sufficient for research and the development of pharmaceutical products.^{3,4} However, peptides and proteins present some limitations in their usefulness as drugs. With respect to administration, they show instability in bodily fluids due to enzymatic susceptibility (proteolytic enzymes in the saliva, gastric juice, gut, skin, and lungs), whereas their large size and hydrophilicity impede access to target cells. Also, their rapid elimination from the body produces low therapeutic performance because of their short half-life and low bioavailability along the oral, transdermal, and pulmonary routes. This means that the parenteral route (muscular or intravenous injection) is the most suitable one for administration.^{5,6} In addition, the formulation techniques proposed, based on microencapsulation or freeze-drying, involve the use of organic solvents and interfaces that can provoke protein denaturation during microcarrier preparation.⁷ For these reasons, routes that present a minimum of biological and technological drawbacks for these molecules have been suggested.⁴

Technologies such as the PEGylation process, nanocarriers, and biodegradable polymeric micro- and nanoparticles have been proposed for peptide–protein delivery. In the case of the PEGylation process, the PEGylated proteins can generate anti-PEG antibodies that limit residence time in the bloodstream and the cross-linking may compromise peptide–protein stability.⁸ Previous studies have shown that the use of nanocarriers, such as polymeric nanoparticles and liposomes, provides *in vivo* stability, prolonged circulation time, improved solubility, targeted release, and fewer side effects to peptide–protein drugs compared with conventional formulations.^{3,6,9,10} Microspheres manufactured with natural and synthetic polymers have been studied as carriers for peptide–protein drugs because they protect the molecule during administration, regulate the blood levels, and exhibit a modified release that reduces repeated dosing.^{5,11–13} Finally, large, porous, biodegradable microspheres have been used as implant scaffolds in tissue engineering.¹⁴ However, the methods used to prepare the nanocarriers generally include polymerization processes, emulsification of natural or preformed polymers, and the subsequent elimination of the

solvent,¹⁰ all of which contribute to creating an unfavorable environment for these drugs, whereas protein-loaded microspheres are commonly prepared by using a method called “double emulsion-solvent evaporation.”^{15,16}

Despite the advantages of using polymeric micro- and nanocarriers for peptide–protein delivery, there is an inherent instability in these molecules at each step of the manufacturing process. First, peptide–protein loading involves the use of organic solvents that generate changes in the physicochemical properties of the peptide–protein, while the interfaces in the emulsification stage may cause unfolding and aggregation through interfacial adsorption. Second, it has been shown that the high ionic strengths, shear forces, and interfaces involved in micro- and nanocarrier formation lead to biomolecule denaturation due to stress, since it is necessary to create a new emulsion by adding a nonsolvent for the polymer (eg, water) and, later, the organic solvent must be evaporated by stirring, reduced pressure, vacuum, or distillation. Finally, a drying step like lyophilization is required to remove the residual solvent, and observations have shown that peptide–protein degradation and aggregation are common events during this step.^{7,17} Various attempts have been made to prevent degradation during biomolecule formulation, such as by adding sugars, polyols, or other proteins (like albumin) to reduce the interface-protein ratio, using a nonaqueous process to avoid water/organic interfaces, reduce the homogenization time, and incorporate lyoprotectants.¹⁷

The main objective of this paper, then, is to propose and characterize a new carrier system for peptide–protein drugs; one that uses a simple immersion technique and an assembly method based on the infiltration of biodegradable polymeric nanoparticles into biodegradable porous microspheres obtained in separate stages;¹⁸ that is, without the peptide drug in these steps. Thus, it is suggested that the assembly process using adsorption protects the drug, since the peptide is not involved in the earlier procedures. The biodegradable polymer chosen was poly(lactide-co-glycolide acid) (PLGA) (see Figure 1), because it is a material widely used in the development of injectable and biocompatible drug delivery systems. Its properties, such as molecular weight, lactide/glycolide ratio, and functional end groups, all affect drug release.¹⁹ The model peptide was leuprolide acetate, whose primary structure is 5-oxo-Pro-His-Trp-Ser-Tyr-Leu-Leu-Arg-Pro-NH-C₂H₅ (see Figure 2). This is a synthetic nonapeptide that is used as a luteinizing hormone-releasing hormone agonist in the treatment of hormone-dependent tumors, as in the cases of prostate and breast cancer, endometriosis, and adenomyosis. It is usually administered by the parenteral

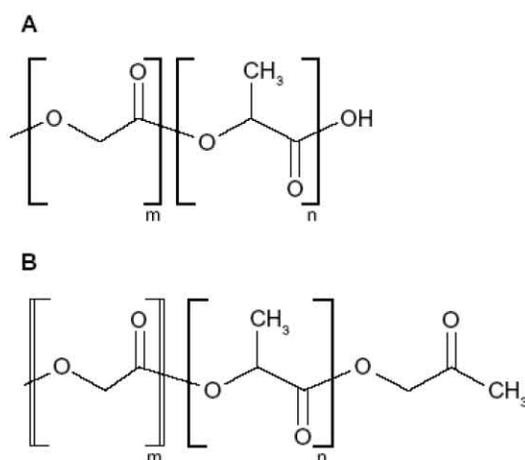


Figure 1 Structure of poly(D,L-lactide-co-glycolide).

Notes: (A) Uncapped PLGA. (B) Capped PLGA.

Abbreviations: PLGA, poly(D,L-lactide-co-glycolide); m, lactide acid residue; n, glycolide acid residue.

route owing to its poor oral bioavailability, short half-life, and instability in bodily fluids.²⁰

Materials and methods

Materials

Poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) (PLGA 50:50, DLG 4A, molecular weight 38,000), was obtained from Lakeshore Biomaterials (Birmingham, AL, USA). Poly(vinyl alcohol)

(PVAL), Mowiol® 4–88 (molecular weight 58,000) was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Leuprolide acetate EP4, product PAADL01, batch SE-37733, was generously supplied by Probiomed® (Miguel Hidalgo, DF, Mexico). The dialysis tubing cellulose membrane, flat width of 10 mm, was purchased from Sigma-Aldrich. Methylene chloride, ethyl acetate, acetonitrile, and methanol high-pressure liquid chromatography (HPLC) grade, phosphoric acid and mannitol were provided by J.T.Baker® Chemicals (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA). Ammonium carbonate, monobasic potassium phosphate, and sodium hydroxide were all supplied by Productos Quimicos Monterrey, SA (Monterrey, NL, Mexico). Triethylamine 99% was acquired from Sigma-Aldrich. Distilled water was obtained from a RiOs™ distiller (EMD Millipore, Billerica, MA, USA).

Preparation of polymeric nanoparticles

Nanoparticles were prepared using the emulsification–solvent diffusion method described by Quintanar-Guerrero et al.¹⁰ First, a mixture of ethyl acetate and distilled water was saturated by manual agitation in a separatory funnel to achieve thermodynamic equilibrium; after 20 minutes, the phases were separated. Then, 400 mg of PLGA 50:50 was dissolved in 20 mL of the organic phase (saturated ethyl acetate). The aqueous phase (saturated distilled water) was used to prepare a 5% w/v solution of PVAL. The organic phase was emulsified with 40 mL of the aqueous phase by stirring with a homogenizer (ULTRA-TURRAX®; IKA® Works, Inc, Wilmington, NC, USA) at 11,000 rpm for 10 minutes. Afterward, 160 mL of distilled water without saturation was added to the emulsion to generate the diffusion of the organic solvent into the aqueous phase so that polymer aggregation would produce nanoparticles in suspension. In the next step, the organic solvent was removed under reduced pressure at 90 rpm and 30°C. The recovery of nanoparticles was carried out by centrifugation (Optima® LE-80 K; Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA) at 20,000 rpm for 20 minutes. The nanoparticles were then resuspended in 3 mL of distilled water and washed three times. Finally, they were frozen and lyophilized (FreeZone 6; Labconco®, Kansas City, MO, USA) at 50×10^{-3} mbar and -40°C for 24 hours, with mannitol added as a cryoprotectant.

Preparation of porous microspheres

An adaptation of the modified “double emulsion ($W_1/O/W_2$)-solvent evaporation” method proposed by Kim et al²¹ was performed to obtain porous microspheres sized $\leq 150 \mu\text{m}$. The organic phase (O) was prepared by dissolving 500 mg of

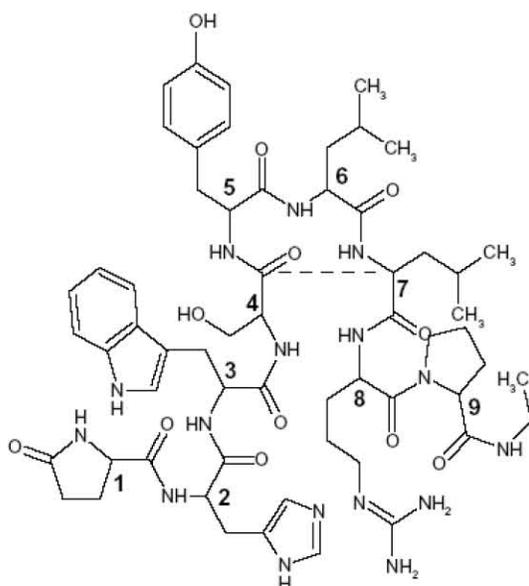


Figure 2 Structure of leuprolide acetate.

PLGA 50:50 in 8 mL of methylene chloride. After that, 50 mg of NH_4HCO_3 (an agent that produces interconnected pores in the microspheres through gas generation) was placed in 5 mL of distilled water (W_1). The first emulsion was prepared with 2.5 mL of the W_1 phase and 8 mL of the O phase, and stirred with a homogenizer (ULTRA-TURRAX®; IKA® Works, Inc) at 11,000 rpm for 1 minute. This emulsion was then poured dropwise into 300 mL of a PVAL 0.5% w/v aqueous solution (W_2) to be reemulsified with a variable-speed agitator (Caframo™ Limited, Warton, Ontario NOH 2T0, Canada) at 250 rpm for 4 hours in order to obtain porous polymeric microspheres and evaporate the organic solvent. Once the solvent had evaporated, the microspheres were recovered by filtration and rinsed three times with distilled water. Finally, they were frozen and then lyophilized (FreeZone 6; Labconco®) at 50×10^{-3} mbar and -40°C for 24 hours, adding mannitol as a cryoprotectant.

Characterization of polymeric nanoparticles

To evaluate nanoparticle morphology, a few drops of an aqueous nanoparticle suspension were spread on a coverslip and dried at room temperature. Samples were mounted on a metal stub and coated with a thin gold film of about 20 nm in a vacuum chamber (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100; JEOL, Tokyo, Japan) for 3 minutes at 1.2 kV, 10 mA, and 0.15 torr of pressure. The samples were then observed under scanning electron microscopy (SEM) (JSM-25 S II microscope; JEOL).

The laser light-scattering technique was used to determine the average size and polydispersity index of the nanoparticles using a submicron particle counter (N4 Plus; Beckman Coulter, Inc). Samples of the nanoparticle suspension were diluted with distilled water to achieve the light-scattering signal that fits the instrument's sensitivity (ie, particle counts per second). Measurements were performed at a 90° fixed angle for 60 seconds at a temperature of 20°C ; the laser light wavelength was 678 nm (He/Ne 10 mW). The batches were analyzed in triplicate ($n = 3$).

Characterization of porous microspheres

Dried microspheres were resuspended in distilled water and placed on a coverslip in the same way as described in the preceding section to analyze their morphology by SEM (JSM-25 S II microscope; JEOL). Shape, surface, and internal interconnected pores were characterized in terms of their size, porosity, and surface pore diameter by using image analysis. To measure surface pore diameter, 100 microspheres were analyzed in five different fields of view ($n = 3$). The image scale was used to measure mean pore diameter. With the

use of a microsphere suspension in distilled water, the mean diameter, particle size distribution, and specific surface area of the microspheres were measured in three different batches, using a laser diffraction particle size analyzer (Mastersizer® 2000; Malvern Instruments, Malvern, UK).

Adsorption studies of leuprolide onto microspheres and nanoparticles

To evaluate the best leuprolide/microsphere ratio, several different amounts of peptide were adsorbed onto the surface of the microspheres. First, 10 mg of dried microspheres was suspended in 1 mL of a 0.02 M potassium phosphate buffer (pH 7.2). Subsequently, 0.5 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, and 4 mg of leuprolide acetate was added to the aforementioned microsphere suspension, and the resulting samples were labeled as A, B, C, D, and E, respectively. In this way, leuprolide/microsphere ratios of 5%, 10%, 20%, 30%, and 50% w/w were reached. Afterward, each sample was gently stirred for 12 hours. The microspheres, with the adsorbed peptide, were recovered by filtration. The amount of leuprolide acetate was determined in the supernatant by HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), under the following chromatography conditions: P210 pump, 400 autosampler, 320 ultraviolet-visible detector (at 220 nm), and C8 column (250×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$ particle size, Microsorb-MV, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Finally, the mobile phase consisted of triethylamine solution (pH 3.0)-methanol-acetonitrile (70:5:25). The adsorption efficiency (%AE) was calculated by the difference between total and free peptide concentrations. All determinations were carried out in triplicate ($n = 3$).

To study the adsorption effect of leuprolide on the nanoparticles, the ζ -potential of the nanoparticles adsorbed with increasing amounts of the peptide was determined, as follows: 100 mg of dried nanoparticles were resuspended in 10 mL of a 0.02 M potassium phosphate buffer solution, at pH 7.2 (10 mg/mL); then 2.5 mg, 5.0 mg, 7.5 mg, and 10 mg of leuprolide was added to 1 mL of the previous suspension and subsequently stirred for 1 hour. The nanoparticle suspension with no peptide was set as the blank. The ζ -potential of the dispersions was measured by dynamic light scattering using a Zetasizer® (Malvern Instruments) after appropriate dilution with the same buffer solution. Three replicates per concentration were analyzed ($n = 3$).

Assembly of the systems by the adsorption/infiltration of nanoparticles into microspheres and peptide loading

The process was carried out as follows: five systems, labeled 1, 2, 3, 4, and 5, were prepared in triplicate. System 1 was

assembled without nanoparticle adsorption, while systems 2, 3, 4, and 5 were prepared by adding nanoparticle suspensions of 25 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL, and 100 mg/mL, respectively. The nanoparticles were placed in a glass vial and resuspended in 1 mL of a 0.02 M potassium phosphate buffer solution at pH 7.2 for 12 hours by magnetic agitation (Multistirrer; VELP Scientifica, Usmate, Italy). Afterward, 10 mg of leuprolide were added simultaneously to each suspension. Agitation was continued for 1 hour more (systems 2, 3, 4, and 5). In brief, 100 mg of porous biodegradable microspheres was dipped into each one of the systems and then placed under mechanical agitation for 1 additional hour (Water Bath Shaker; Reichert Technologies, Depew, NY, USA). For system 1, under the same conditions, only porous microspheres were immersed in 1 mL of the buffer solution for just 1 hour, where 10 mg of leuprolide had been dissolved previously. All the systems were recovered by filtration and dried at room temperature. Figure 3 shows a general outline of the assembly process. The loading amount of leuprolide adsorbed into the systems was quantified by HPLC, as indicated above. Finally, the adsorption efficiency (%AE) was calculated by using the following equation:

$$\%AE = W_{AL}/W_{IL} \times 100, \quad (1)$$

where %AE is the adsorption efficiency; W_{AL} and W_{IL} represent the amount adsorbed and the initial amount of

leuprolide acetate, respectively. Finally, the supernatant was lyophilized, and the efficiency of the nanoparticles loaded into the microspheres was calculated by weight difference.

Characterization of the assembled systems

To examine the surface morphology of the systems obtained, samples were spread over a coverslip and treated as described above for SEM analysis (JSM-25 S II microscope; JEOL). All systems were characterized by differential scanning calorimetry (DSCQ10 calorimeter; TA Instruments, New Castle, DE, USA) to evaluate the interactions of their components. Calorimetric tests were performed on all the assembled systems (1–5), as well as on the individual components, including leuprolide acetate and PLGA polymer. Dried 2 mg to 4 mg samples were placed on aluminum pans and sealed hermetically. Scanning was carried out at temperatures between 5°C and 200°C with a 10°C/minute heating rate, under ultrapure nitrogen flux (50 mL/minute).

In vitro peptide release

Leuprolide release profiles were obtained for all the assembled systems (1–5): 60 mg of each system was weighed directly in a prehydrated sack of dialysis cellulose membrane, whose length was 5 cm. The leuprolide acetate in solution immediately crossed the cellulose membrane,

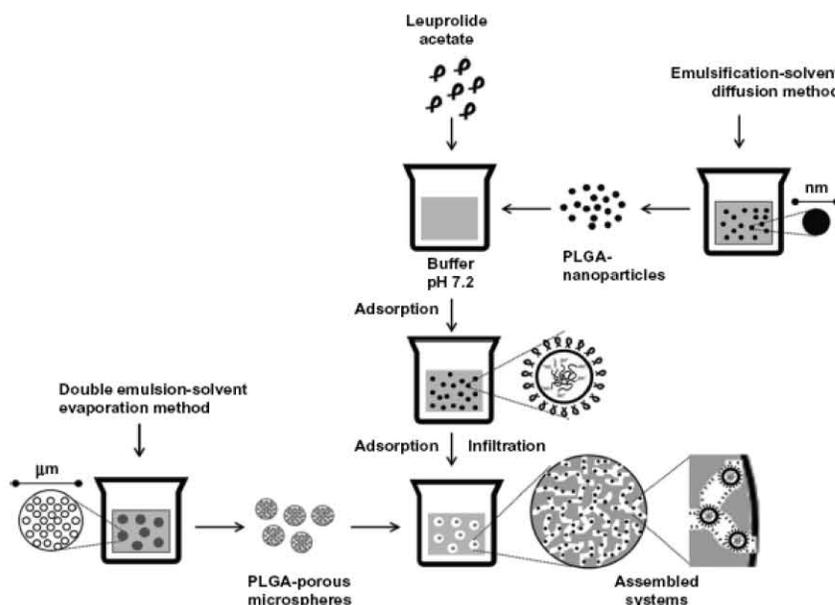


Figure 3 Manufacturing process of the assembled systems by adsorption/infiltration of polymeric nanoparticles into porous biodegradable microspheres. Abbreviation: PLGA, poly(D,L-lactide-co-glycolide).

showing that the membrane does not limit or control peptide release. The sacks were dipped in 10 mL of a 0.02 M potassium phosphate buffer at pH 7.2 in a glass vial under “sink” conditions during the study (leuprolide concentration ≤ 250 mg/mL), and transferred immediately to a thermostated bath at 37°C, where they were shaken under the same agitation conditions as indicated in the description of the assembly of the systems. At predetermined intervals, 500 μ L was withdrawn from the release medium, and 500 μ L of fresh medium was added to the test vials. The amount of released leuprolide at each time point was determined by HPLC-ultraviolet at 220 nm. All experiments were performed in triplicate ($n = 3$).

Results and discussion

Acquisition and characterization of polymeric micro- and nanoparticles

The well known emulsification–solvent diffusion method was used to prepare polymeric nanoparticles.¹⁰ SEM showed solid, compacted, and spherical submicronic particles (see Figure 4). As expected, this method made it possible to obtain nanoparticles with a 267 ± 3.8 nm mean size distribution and a polydispersity index of 0.07 ± 0.01 . Nonstatistically significant differences were found in more than three prepared batches (analysis of variance [ANOVA] $P > 0.05$). These properties were suitable for carrying out the peptide adsorption procedure and the subsequent nanoparticle infiltration into porous microspheres. With respect to the microspheres, we produced porous structures by adapting the modified double emulsion-solvent evaporation technique proposed by Kim et al.²¹ The stirring velocity time, stabilizer (PVAL), and porogen concentration (NH_4HCO_3) were all controlled in order to generate microparticles with properties adequate for the assembly process. As shown in Figure 5A, spherical porous microspheres with high porosity,

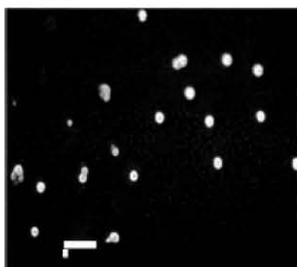


Figure 4 Scanning electron micrograph of polymeric nanoparticles of PLGA 50:50. **Note:** Bar = 1 μ m. **Abbreviation:** PLGA, poly(D,L-lactide-co-glycolide).

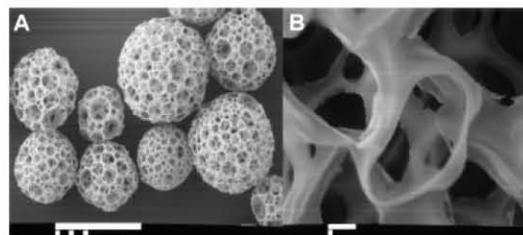


Figure 5 Scanning electron micrograph of porous microspheres of PLGA 50:50. **Notes:** (A) Microsphere structure, bar = 100 μ m. (B) Pores in the internal matrix, bar = 1 μ m. **Abbreviation:** PLGA, poly(D,L-lactide-co-glycolide).

interconnecting pores, and a large surface were prepared. Their average size was found to be 78 ± 32.9 μ m, with a specific surface area of 6.67 ± 0.13 m^2/g in five batches with no significant differences among them (ANOVA $P > 0.05$). This finding was confirmed by SEM. Regarding the size obtained, it is possible to inject microspheres by using conventional syringes (size ≤ 150 μ m).^{22,23} Size is one of the parameters in microsphere manufacturing that can be controlled by varying the PVAL concentration in the continuous aqueous phase (W_2), or the agitation time and speed during manufacture. Pores are connected inside the internal matrix of the microspheres, providing a large surface area for adsorption (see Figure 5B). With the use of image analysis, the diameter of the exposed pores was determined, counting 100 pores in five fields of view. The mean diameter was approximately 8.1 ± 4.1 μ m, which is wide enough for the infiltration of nanoparticles ≤ 300 nm in size. No differences in the mean diameter of the exposed pores were found in the three batches (ANOVA $P > 0.05$).

Characterization of the adsorption process of leuprolide onto micro- and nanoparticles

With the use of an aqueous immersion method, various amounts of leuprolide acetate were adsorbed onto porous microspheres in order to determine the leuprolide/microsphere ratio that showed the greatest adsorption efficiency. Ratios of leuprolide/microspheres of 5%, 10%, 20%, 30%, and 40% w/w were evaluated and the amount of adsorbed leuprolide was quantified. The results presented in Table 1 clearly show that there is a dependency on the leuprolide concentration in the adsorption process such that, as it increases, the amount of leuprolide adsorbed into the microspheres also increases; however, the adsorption efficiency reached a maximum when the 10% w/w leuprolide concentration was added (sample B). This finding could be

Table 1 Adsorption of leuprolide onto microspheres and NPs

Sample	%AE onto microspheres		ζ-potential of NPs adsorbed with leuprolide	
	Adsorbed leuprolide (mg)	%AE	Peptide (mg)	mV
A	0.141 ± 0.001	27.9 ± 0.28	Blank ^a	-23.6 ± 0.84
B	0.561 ± 0.037	54.3 ± 3.56	2.5	-19.8 ± 1.23
C	0.612 ± 0.072	31.3 ± 2.94	5.0	-17.1 ± 2.20
D	0.698 ± 0.053	23.1 ± 1.39	7.5	-15.6 ± 2.34
E	1.458 ± 0.149	36.3 ± 2.59	10.0	-10.6 ± 2.51

Notes: The results are shown as mean ± standard deviation. ^aBlank represents the ζ-potential of the polymeric nanoparticles without peptide adsorption.

Abbreviations: NP, nanoparticle; %AE, adsorption efficiency.

related to surface saturation and the onset of the formation of adsorption layers. Similar results have been reported when serum albumin is adsorbed onto PLGA microspheres.¹⁶ Adsorption involves electrostatic and hydrophobic interactions, so physicochemical properties like pH, ionic strength, and temperature play an important role in peptide–protein adsorption.^{24,25} A pH of 7.2 in the dipping solution creates an environment in which charged species exist; consequently, electrostatic interactions among the components are present in the adsorption process.^{20,26} The PLGA used in the present study has a free carboxylic end group, uncapped PLGA (Figure 1A), with a pK_a of ~3.8, which is in the anionic form in the dissolution medium; whereas the basic amino acids of leuprolide, histidine (His-2), and arginine (Arg-8) acquire a cationic form, because they have isoelectric points of ~7.8 and ~10.7, respectively. These basic amino acids are exposed in the type 2 β-turn peptide conformation that is stabilized by residues Ser-4 and Leu-7 in an aqueous phase (see Figure 2).²⁷

The ζ-potential was measured on polymeric nanoparticles of PLGA adsorbed with increasing amounts of leuprolide to test the electrostatic attraction in the adsorption process. Note in Table 1 that, as the amount of peptide increases, the ζ-potential becomes more positive, suggesting that an electrostatic interaction is taking place. Luan and Bodmeier²⁸ reported this interaction between leuprolide acetate and uncapped PLGA when they come into contact. In contrast, when PLGA with an esterified end group was used, capped PLGA (Figure 1B), there were no significant differences in the ζ-potential (-8.5 ± 1.1 mV for nanoparticles in suspension and -9.1 ± 1.4 mV for nanoparticles with leuprolide acetate). The characteristics observed in these adsorption studies were achieved by adsorbing leuprolide acetate into microspheres and polymeric nanoparticles separately.

Acquisition and characterization of the assembled systems by adsorption/infiltration

The entrapment of leuprolide acetate was carried out by using a simple aqueous immersion method. Based on earlier results, a determined amount of leuprolide was used in the adsorption/infiltration process (ratio of 10% w/w leuprolide/microsphere). The effect of different nanoparticle concentrations on adsorption efficiency was evaluated during the assembly process. Table 2 summarizes the drug loading, the adsorption efficiencies, and the nanoparticles loaded for all the assembled systems. System 1 represents the adsorption process with no infiltration of nanoparticles. Dependence between nanoparticle concentration and drug loading can also be seen, such that when there are more nanoparticles in suspension, the adsorbed amount of leuprolide and the load of nanoparticles within the assembled systems increase. This may be related to the large surface area and its availability for the adsorption process. The high shear forces, interfaces, and organic solvents commonly used in conventional microencapsulation are avoided during drug loading, so denaturation, aggregation, or degradation of the peptide is prevented, thus ensuring that the peptide is protected throughout the assembly process.

Nanoparticles can adsorb the peptide onto their surfaces as a first step, but they also infiltrate into microspheres in the same leuprolide solution, so microspheres are in contact with nanoparticles and the free peptide; hence, higher adsorption efficiency is found in systems with a larger number of adsorbed nanoparticles. The peptide can be adsorbed onto micro- and nanoparticle surfaces (see Figure 3). Since the nanoparticles and microspheres have the same chemical nature, leuprolide is loaded onto both surfaces. Nanoparticle adsorption was evidenced by SEM studies in which the images showed the formation of a nanoparticle film on

Table 2 %AE of the assembled systems and their parameters for Higuchi's model (t^{0.5})

System	Adsorbed leuprolide (mg)	%AE	NPs loaded (mg)	CC ^a	K _H (minute ⁻¹) ^b
1	1.9 ± 0.18	18.9 ± 1.7	- ^c	0.984	0.042
2	2.6 ± 0.44	25.3 ± 4.1	9.3 ± 3.7	0.980	0.021
3	5.1 ± 0.40	47.1 ± 1.6	22.3 ± 4.4	0.994	0.015
4	9.6 ± 0.46	94.6 ± 3.4	58.1 ± 5.2	0.987	0.014
5	9.6 ± 0.45	94.9 ± 4.5	67.4 ± 3.1	0.988	0.014

Notes: The results are shown as mean ± standard deviation. ^aCC = correlation coefficient (r²); ^bK_H = release rate constant, according to Higuchi's model; ^cwithout nanoparticle infiltration.

Abbreviations: %AE, adsorption efficiency; NP, nanoparticle.

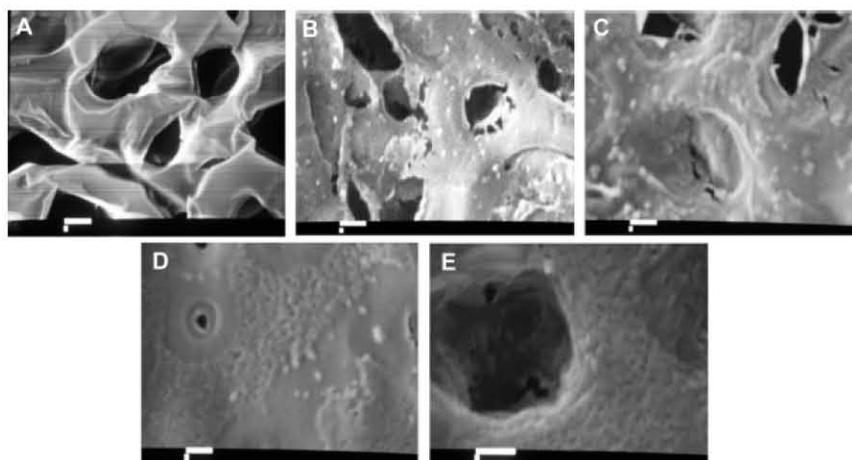


Figure 6 Scanning electron micrographs of the assembled systems with and without infiltration of polymeric nanoparticles.
Notes: (A) System 1: without nanoparticle infiltration. (B) System 2: with 25 mg/mL NPs. (C) System 3: with 50 mg/mL NPs. (D) System 4: with 75 mg/mL NPs. (E) System 5: with 100 mg/mL NPs. Bar = 1 μ m.
Abbreviation: NPs, nanoparticles.

the microsphere surface as the adsorbed amount of nanoparticles increased (see Figure 6). As expected, the nanoparticle film was seen to cover the microsphere surface and to be more continuous in systems 4 (75 mg/mL of nanoparticles) and 5 (100 mg/mL of nanoparticles), which had larger amounts of loaded nanoparticles (see Table 2 and Figure 6D and E, respectively). A similar behavior was noted by Rodríguez-Cruz et al¹⁸ using porous membranes and carbamazepine (a nonwater-soluble drug model). It is suggested that this nanoparticle film can act as a physical barrier for the release of the peptide, such that a continuous film could reduce the release rate more efficaciously than a discontinuous one.

In order to identify peptide distribution in the carrier, the physical state of the components, and any interactions between the peptide and the polymer (PLGA), calorimetric studies were performed for all systems. Figure 7 shows the differential scanning calorimetry thermograms of the assembled systems (1–5), pure PLGA (50:50), and pure leuprolide. Endothermic characteristic peaks are observed in the thermograms of pure leuprolide and pure PLGA polymer at $\sim 162^{\circ}\text{C}$ and $\sim 46^{\circ}\text{C}$, which correspond to leuprolide's melting point and the glass transition temperature (T_g) of PLGA, respectively. As shown in Figure 7, the endothermic peak of T_g PLGA (44°C – 46°C) can be identified in all systems, from 1 to 5. However, the characteristic peak in the leuprolide thermogram is not visible in the thermograms that correspond to systems 1–5, which suggests a molecular dispersion of the peptide throughout the assembled systems.

In vitro release kinetics

During the assembly process, five systems were prepared with different nanoparticle concentrations; their release profiles are shown in Figure 8. We found a burst effect within the first 30 minutes for all systems that was below 25% of the loaded

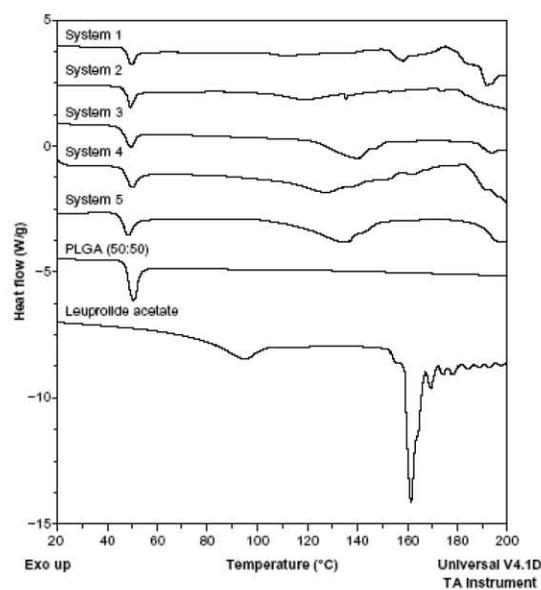


Figure 7 DSC thermograms, from top to bottom: systems 1–5, pure PLGA (50:50) and pure leuprolide acetate.
Abbreviations: DSC, differential scanning calorimetry; PLGA, poly(D,L-lactide-co-glycolide).

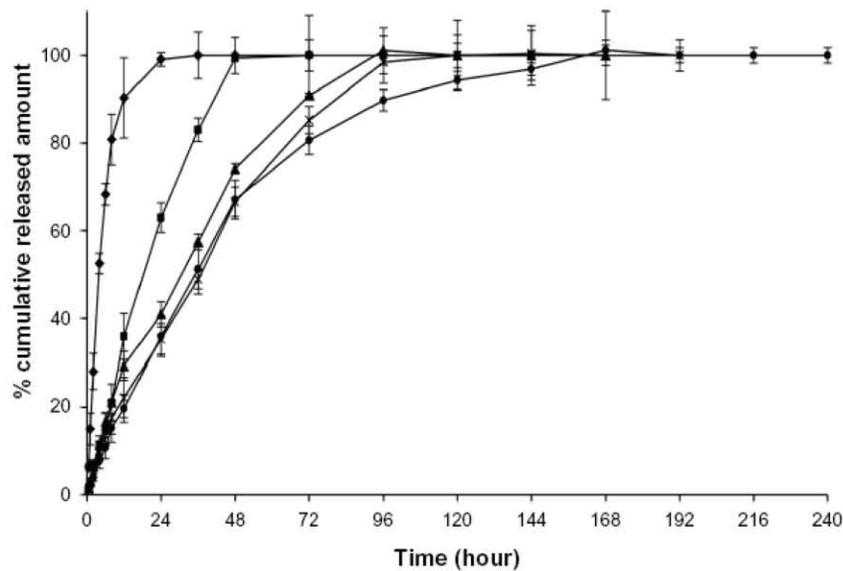


Figure 8 Release profiles of leuprolide acetate from the assembled systems.

Notes: (○) System 1: without nanoparticle infiltration. (■) System 2: with 25 mg/mL NPs. (▲) System 3: with 50 mg/mL NPs. (*) System 4: with 75 mg/mL NPs. (●) System 5: with 100 mg/mL NPs.

Abbreviation: NPs, nanoparticles.

peptide. This finding can be associated with the leuprolide that was adsorbed onto the more superficial zone of the porous structure, since it is in immediate contact with the dissolution medium and thus enables the desorption process.^{16,21,29} Therefore, porosity and surface area play an important role in peptide release. However, at close to 12 hours, system 1 (without adsorbed nanoparticles) had released $90.3\% \pm 9.1\%$ of the peptide, whereas systems 2, 3, 4, and 5 (with adsorbed nanoparticles) had released only $36.1\% \pm 5.2\%$, $29.4\% \pm 3.2\%$, $22.2\% \pm 4.6\%$, and $19.8\% \pm 3.2\%$, respectively (see Figure 8). A higher release rate was found in the systems that contained a more discontinuous nanoparticle film on the microsphere surfaces, which may be due to the nanoparticle-leuprolide-microsphere interactions generated during the assembly process, and to the continuity in the nanoparticle film, which appears to create a diffusion barrier and induce changes in the release rate. Thus, a controlled release is achieved when nanoparticles are adsorbed onto the porous microsphere surface (systems 2–5). Consequently, if the amount of nanoparticles increases, the release rate slows; this phenomenon could be explained by leuprolide entrapment between the surfaces and the nanoparticle film.

Based on the release profile models proposed,³⁰ all the systems present a dominant Fickian diffusion mechanism because they are dependent on the square root of time ($t^{0.5}$)

(see Table 2 for the parameters). The release profiles fit Higuchi's model,³⁰ as can be observed in Figure 9. This finding is explained by the porosity in the microsphere structure, which enables the diffusion process, since the pores allow water to penetrate into the system, forcing the peptide to diffuse out into the dissolution medium. According to these findings, diffusion of leuprolide throughout the matrix system was achieved.

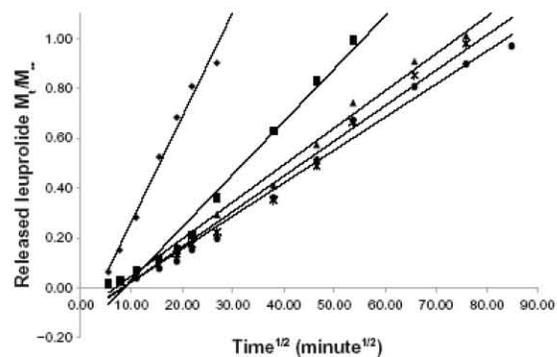


Figure 9 Higuchi's model for released leuprolide acetate from the assembled systems.

Notes: (○) System 1: without nanoparticle infiltration. (■) System 2: with 25 mg/mL NPs. (▲) System 3: with 50 mg/mL NPs. (*) System 4: with 75 mg/mL NPs. (●) System 5: with 100 mg/mL NPs. M_t/M_∞ = amount released at time t /amount total released.

Abbreviation: NPs, nanoparticles.

Conclusion

This work proposes a novel drug delivery system that was developed by adsorbing nanoparticles onto porous biodegradable microspheres by an infiltration process using an immersion method. Porous, biodegradable microspheres and polymeric, biodegradable nanoparticles were prepared by the double emulsion-solvent evaporation method and the emulsification-solvent diffusion method, respectively. They were obtained separately with no peptide interaction. The systems were assembled in short times by using an aqueous immersion method that prevented any contact between the peptide and the organic solvents, interfaces, and shear forces during drug loading to ensure the integrity of the peptide. Leuprolide acetate was entrapped in the polymeric matrix between the surfaces by the electrostatic interactions in the adsorption process. Its adsorption efficiency and release profiles showed a dependence on the amount of nanoparticles that infiltrated into the porous microspheres, such that a larger number of adsorbed nanoparticles led to a higher amount of loaded peptide and a slower release rate. The adsorbed nanoparticles created a film on the microsphere surface that appeared to act as a diffusion barrier, so the *in vitro* peptide release indicated that the systems assembled by nanoparticle infiltration reduced the burst effect, modified the release rate, and allowed a controlled release because of the formation of the film. The release rate slowed when the nanoparticle film was more continuous, thus prolonging the release period. Future work will need to consider determinations of conformational changes before and after adsorption in order to evidence peptide or protein integrity. The approach proposed in the present study can be used as an alternative in the formulation of peptide-protein drugs. These systems can be administered by different routes, including the parenteral route, as injectable depots, even for other biomolecules, such as proteins, enzymes, or DNA.

Acknowledgments

Sergio Alcalá thanks CONACyT for the grant he received (223443). The authors are grateful to Rodolfo Robles for his collaboration in the Scanning Electron Microscope studies and to DGAPA (project PAPIIT IN222411-3) for financial support of this work.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Majumder DD, Banerjee R, Ulrichs CH, Mewis I, Goswami A. Nanomaterials: science of bottom-up and top-down. *IETE Technical Review*. 2007;24(1):9-25.
- Williams D. The relationship between biomaterials and nanotechnology. *Biomaterials*. 2008;29(12):1737-1738.
- Martins S, Sarmento B, Ferreira DC, Souto EB. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery - liposomes versus lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(4):595-607.
- Saez V, Hernández JR, Peniche C. Microspheres as delivery systems for the controlled release of peptides and proteins. *Biotechnol Appl*. 2007;24:98-107.
- Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release*. 2003;90(3):261-280.
- Solaro R, Chiellini F, Battisti A. Targeted delivery of protein drugs by nanocarriers. *Materials*. 2010;3(3):1928-1980.
- Lee ES, Kwon MJ, Lee H, Kim JJ. Stabilization of protein encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres by novel viscous S/W/O/W method. *Int J Pharm*. 2007;331(1):27-37.
- Jain A, Jain SK. PEGylation: an approach for drug delivery. A review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2008;25(5):403-447.
- Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*. 2001;70(1-2):1-20.
- Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm*. 1996;143(2):133-141.
- Ito F, Honnami H, Kawakami H, Kanamura K, Makino K. Preparation and properties of PLGA microspheres containing hydrophilic drugs by the SPG (shirasu porous glass) membrane emulsification technique. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008;67(1):20-25.
- Hiroaki O, Masaki Y, Toshiro H, et al. Drug delivery using biodegradable microspheres. *J Control Release*. 1994;28(1-3):121-129.
- Wei W, Yuan L, Hu G, et al. Monodisperse chitosan microspheres with interesting structures for protein drug delivery. *Adv Mater*. 2008;20(12):2292-2296.
- Shi X, Sun L, Jiang J, Zhang X, Ding W, Gan Z. Biodegradable polymeric microcarriers with controllable porous structure for tissue engineering. *Macromol Biosci*. 2009;9(12):1211-1218.
- Rosca ID, Watari F, Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J Control Release*. 2004;99(2):271-280.
- Sun L, Zhou S, Wang W, Li X, Wang J, Weng J. Preparation and characterization of porous biodegradable microspheres used for controlled protein delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2009;345(1-3):173-181.
- van de Weert M, Hennink WE, Jiskoot W. Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles. *Pharm Res*. 2000;17(10):1159-1167.
- Rodríguez-Cruz IM, Domínguez-Delgado CL, Escobar-Chávez JJ, Leyva-Gómez G, Ganem-Quintanar A, Quintanar-Guerrero D. Nanoparticle infiltration to prepare solvent-free controlled drug delivery systems. *Int J Pharm*. 2009;371(1-2):177-181.
- Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2475-2490.
- Okada H. One- and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprorelin acetate. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997;28(1):43-70.
- Kim TK, Yoon JJ, Lee DS, Park TG. Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres. *Biomaterials*. 2006;27(2):152-159.
- GeYB, Chen DW, Xie LP, Zhang RQ. Optimized preparation of daidzein-loaded chitosan microspheres and *in vivo* evaluation after intramuscular injection in rats. *Int J Pharm*. 2007;338(1-2):142-151.
- O'Hagan DT, Jeffery H, Davis SS. Long-term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microparticles. *Vaccine*. 1993;11(9):965-969.
- Li W, Li S. A study on the adsorption of bovine serum albumin onto electrostatic microspheres: role of surface groups. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2007;295(1-3):159-164.

25. Tsai T, Mehta RC, Deluca PP. Adsorption of peptides to poly(D,L-lactide-co-glycolide): 2. Effect of solution properties on the adsorption. *Int J Pharm.* 1996;127(1):43–52.
26. Mansour HM, Sohn M, Al-Ghananeem A, Deluca PP. Materials for pharmaceutical dosage forms: molecular pharmaceutics and controlled release drug delivery aspects. *Int J Mol Sci.* 2010;11(9):3298–3322.
27. Meyer JD, Manning MC, Vander Velde DG. Characterization of the solution conformations of leuprolide acetate. *J Pept Res.* 2002;60(3):159–168.
28. Luan X, Bodmeier R. Influence of the poly(lactide-co-glycolide) type on the leuprolide release from in situ forming microparticle systems. *J Control Release.* 2006;110(2):266–272.
29. Singh S, Singh J. Phase-sensitive polymer-based controlled delivery systems of leuprolide acetate: in vitro release, biocompatibility, and in vivo absorption in rabbits. *Int J Pharm.* 2007;328(1):42–48.
30. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci.* 2001;13(2):123–133.

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

A new solvent free approach to encapsulate proteins by adsorbed-infiltrated nanoparticles into porous microspheres; obtaining, characterization and protein integrity studies

Alcalá-Alcalá Sergio¹, Benítez-Cardoza Claudia G², Lima-Muñoz Enrique J³, Quintanar-Guerrero

David¹

¹Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida 1° de Mayo s/n, Campo 1, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, CP. 54743. México. Tel. (152)55 56232065. Fax. (152)55 58938675. quintana@servidor.unam.mx, sekvaa@gmail.com.

²Laboratorio de Investigación Bioquímica, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. ENMyH-Instituto Politécnico Nacional, Guillermo Massieu Helguera No. 239, La Escalera Ticomán, 07320, D.F., México.

³Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito exterior s/n, Cd. Universitaria, Del. Coyoacán, CP 04510, D.F., México.

Abstract

This work describes the use and evaluation of the adsorption/infiltration process to formulate an active model protein, α -amylase, in an assembled biodegradable polymeric system, free of organic solvent and made of PolyD,L-lactide-co-glycolide acid (PLGA). By this approach the physicochemical stress is avoided and the integrity of the protein is unaltered because the systems are assembled in a friendly aqueous medium using a simple immersing method. The first property of the assembled systems is that they can load therapeutic amounts of the drug due to the protein is adsorbed in the great area offered by polymeric nanoparticles; second, the subsequent infiltration of adsorbed nanoparticles into porous polymeric microspheres gives a controlled release of the protein during several days and; third, the protein preserves its structural conformation and activity after being released. The system was prepared adsorbing and infiltrating increasing amounts of nanoparticles. The infiltrated nanoparticles saturate the available surface area in the porous structure at different levels and modify the release rate of the protein from the assembled system; these findings were confirmed by BET technique (N_2 isotherms) and *in vitro* release studies. During the adsorption process, pH of the medium plays an important role because it creates an environment where electrostatic attractions are favored between surfaces of the micro- and nanostructures and the protein. Finally, assays of α -amylase activities, using 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotriose (CNP-G3) as substrate, and circular dichroism technique confirmed that no conformational changes were observed in the protein when is formulated by this new method.

1. Introduction

Protein formulation has been a big challenge for the pharmaceutical scientist due to therapeutic activity of these drugs is quite related to their conformational structure and integrity and because they have to deal with their physical and chemical instabilities. Recent advances in biotechnological techniques like fermentation and cloning process have made it possible for the production of large quantities of biologics (biotherapeutic proteins) for pharmaceutical applications whose benefits represent an opportunity of improving the current treatments for disorders such as cancer, genetic and enzymatic deficiencies, autoimmune diseases and infections like HIV [1]. More than 324 biomacromolecules are under clinical trials and most of them are proteins. A general trend is to use drugs produced by DNA recombinant techniques because it is expected that biologics could be more predictable regarding its behavior *in vivo* and less toxic [2]. However, factors such as pH, temperature, high shear forces, interfaces, storing, handling, formulation and administration of proteins create desirable conditions that lead them to physical and chemical instability, which refers to denaturation, deamidation,

aggregation, oxidation, peptide bond hydrolysis, thiol disulfide exchange, crosslinking, intramolecular conformational scrambling and precipitation processes that finally provoke changes in their activity [3,4,5]. Thus, the success in formulate proteins depends on knowledge and understanding of their physical, chemical and biological properties, as well as the use of adequate materials and carriers [4].

To facilitate the administration of biologics and to maintain protein integrity during formulation and storage, different drug delivery systems have been proposed. Polymeric and lipid-base nanoparticles (e.g. liposomes), nanocapsules, hydrogels, injectable implants, microemulsions and microspheres are common examples of systems developed to improve delivery of proteins. Most of these systems are based on entrapment and microencapsulation principles, whose stages basically include processes of emulsification and posterior solvent evaporation. Unfortunately, these common manufacturing methods generate a microenvironment that can compromise the protein integrity, since molecules are exposed to organic solvents, aqueous/organic interfaces, elevated

temperatures, vigorous agitation, hydrophobic surfaces and detergents, so that, proteins are exposed to stress during the entire life of the drug delivery system; including formulation, storage and protein release in vivo [6,7,8,9].

Acquisition of knowledge about protein instability has increased since 1989. Several alternatives such as stabilization by ligand binding to the native state (surfactants, polymers, cyclodextrins, metal ions, anion binding, etc), colloidal and interfacial stability, drying, chemical modifications, site-directed mutagenesis and development of novel drug delivery systems have been described to protect the integrity of proteins across their cycle of life [4,5,10]. Research in protein pharmaceutical technology is focused on propose strategies to prevent protein damage during formulation, so that various experiments have been conducted to understand critical steps in the obtaining of drug delivery systems, instability and mechanisms of degradation [5]. Polymeric nanoparticles and injectable parenteral depots designed with biodegradable materials like PLGA (polylactide-co-glycolide acid) carrying peptides and proteins have an important place in this field because the products accepted by FDA are based on polymeric microspheres; even some of them are already in commercial production [6,8,11,12].

On the other hand, adsorption of hydrophilic drugs is another strategy that has been used for avoiding high-energy processes in drug entrapment; in fact, this approach has successfully been applied to adsorb biomacromolecules onto nanoparticle surfaces [13]. Many papers have discussed the use PLGA to adsorb proteins onto micro- and nanoparticles in order to avoid the risk of protein degradation that is caused by the interaction with organic solvents, interfaces and homogenization-drying steps [7]. Adsorption as alternative takes into account the interaction between surface of polymeric structures and proteins by establishing and controlling some variables such as pH, temperature, protein and polymer properties (e.g. isoelectric point, pKa, end functional group, etc.) in an aqueous medium. Recently, the use of porous microspheres with large pore surface area and interconnecting pores has drawn attention for loading therapeutic drugs by adsorption in an immersing method, including peptides and proteins [7,14,15]. The adsorption process and the large surface area of porous microspheres and nanoparticles were the base of the strategy proposed in a previous research [16], in which a peptide was formulated using the named adsorption/infiltration process. From this technique we obtain assembled systems that load sensitive drugs to physicochemical stress with high adsorption efficiencies and a controlled release that are dependent of the continuity of a nanoparticle film formed on the microsphere surface. The aim of this work was to formulate a globular molecule, a protein

(enzyme α -amylase), by adsorption/infiltration process, using biodegradable micro- and nanoparticles of PLGA to obtain an injectable assembled system. Additionally, the assembled system was characterized and the integrity of the protein after being released was evaluated in order to demonstrate the efficacy of the novel drug delivery system.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Poly(D,L-lactide-co-glycolide) acid (PLGA 50:50, DLG 4A, molecular weight 38,000), was obtained from Lakeshore Biomaterials (Birmingham, AL, USA). α -Amylase from *Aspergillus oryzae* (10065-50G), Poly(vinyl alcohol) (PVAL: Mowiol® 4-88, molecular weight 58,000), Bicinchoninic acid kit for protein determination (BCA1) and 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotriose (93834 CNP-G3) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Methylene chloride, ethyl acetate, acetonitrile, sodium chloride, calcium chloride, potassium thiocyanate and mannitol were provided by J.T.Baker® Chemicals (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA). Ammonium carbonate, monobasic potassium phosphate, sodium citrate, citric acid, acetic acid, sodium acetate and sodium hydroxide were all supplied by Productos Quimicos Monterrey, SA (Monterrey, NL, Mexico). Distilled water was obtained from a RiOs™ distiller (EMD Millipore, Billerica, MA, USA).

2.2 Preparation of the components of the assembled systems, polymeric nanoparticles y porous microspheres of PLGA

Nanoparticles and porous microspheres were obtained using well-known and reproducible methods. The emulsification-solvent diffusion method was used to manufacture polymeric nanoparticles [17]. Two phases were prepared after saturation between distilled water (phase W) and ethyl acetate (phase O). A solution of 5% w/v of polyvinyl alcohol (PVAL) in phase W was obtained. 400 mg of PLGA were dissolved in 20 mL of phase O and then were emulsified with 40 mL of PVAL solution by using a homogenizator (ULTRA-TURRAX®; IKA® Works, Inc, Wilmington, NC, USA) at 11,000 rpm for 10 minutes. Afterwards, 160 mL of water without saturation was added to the emulsion in order to allow the diffusion of the organic solvent. After diffusion the nanoparticles remain in suspension and the solvent was evaporated under reduced pressure at 90 rpm and 30°C. Nanoparticles were recovered by centrifugation (Optima® LE-80 K; Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA) at 25,000 rpm for 20 min and washed three times. Finally, they were frozen and lyophilized at 50×10^{-3} mbar and -40°C for 24 h (FreeZone 6; Labconco®, Kansas City, MO, USA).

Porous microspheres were prepared using a modified double emulsion-solvent evaporation method proposed by Kim et al (2006) [18]. The first emulsion was carried out by stirring with a homogenizer (ULTRA-TURRAX®) at 11,000 rpm for 2 minutes mixing 8 mL of methylene chloride (where 500 mg of PLGA were dissolved) and 2.5 mL of a 1% w/v solution of NH_4HCO_3 (porogen agent). Then, this emulsion was poured to 300 mL of a 1 % w/v solution of PVAL and stirred at 250 rpm during 4 h, using a mechanical stirrer (Caframo™ Limited, Warton, Ontario N0H 2T0, Canada). The porous microspheres were recovered by filtration, using a stainless steel mesh with aperture of 10 μm , and dried at room temperature.

The mean diameter and particle size distribution for micro- and nanostructures were analyzed using dynamic light scattering (Zetasizer® and Mastersizer®, Malvern Instruments, UK). Finally, morphology of polymeric nanoparticles and porous biodegradable microspheres was analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) (JSM-25 S II microscope, JEOL, Japan).

2.3 Adsorption studies of α -amylase

To evaluate protein adsorption behavior, increasing amounts of α -amylase were adsorbed onto porous polymeric microspheres at different pH's. Thus, 25 mg of dried microspheres were immersed into 1 mL of several solutions of the protein. Five concentrations in the solutions were tested, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 y 12.5 mg/mL, using sodium acetate buffer solution at pH 4.0 and potassium phosphates buffer solution at pH 7.2. The samples were labeled as SA, SB, SC, SD and SE, respectively. Afterwards all samples were gently agitated during 1 h (Water Bath Shaker™, American Optical, USA). The microspheres adsorbed with α -amylase were recovered by filtration and the concentration of protein in supernatant was determined using the spectrophotometric bicinchoninic acid assay for determination of total proteins at 562 nm using a spectrophotometer (Varian Cary 50 Conc, Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). The adsorbed amount of protein and the adsorption efficiency (%EA) were calculated by weight differences between initial and final concentration. Three replicates were performed.

The evaluation of the protein adsorption onto polymeric nanoparticles was made measuring the zeta-potential (ζ) when different amounts of protein were adsorbed. In this study, 100 mg of nanoparticles were resuspended in 10 mL of sodium acetate buffer at pH 4.0. Afterwards, 10, 20, 30 y 40 mg of protein were added to suspensions and led to magnetic stirring during 1 h. A nanoparticle suspension with no protein was set as the blank. The zeta-potential (ζ) of the dispersions was measured using a Zetasizer® (Malvern Instruments, UK) after appropriate dilution with the same buffer solution (n=3).

2.4 Obtaining of the protein delivery system assembled by adsorption/infiltration

Briefly, 25 mg of dried porous microspheres were weighted and placed in an eppendorf tube. Simultaneously, polymeric nanoparticles were resuspended by magnetic stirring (Multistirrer®, Velt Cientifica, USA) in sodium citrate buffer pH 4.0 during 12 h; nanoparticle suspensions were of 25, 50, 75 and 100 mg/mL. Then, 12.5 mg of α -amylase were added to each nanoparticle suspension, maintaining the agitation by 1 h more. 1 mL of each before mentioned suspensions were poured to eppendorf tube in order to infiltrate the adsorbed protein nanoparticles into porous microspheres, and then they were taken to agitation for a one additional hour (Water Bath Shaker™, American Optical, USA). The systems were recovered by filtration with stainless steel mesh (10 μm) and dried at room temperature. Protein content in remaining suspension was quantified using bicinchoninic acid assay and the adsorption efficiency (%AE) was calculated by differences between initial and final concentration. These systems were labeled as S2, S3, S4 and S5. System S1 was prepared using the same conditions but without nanoparticle infiltration. Three replicates were made for each concentration (n=3).

Finally, to determine the load of nanoparticles into assembled systems the remaining suspension was frozen and lyophilized at 50×10^{-3} mbar and -40°C for 24 h (FreeZone 6; Labconco®, Kansas City, MO, USA); the loading efficiency was calculated by weight differences.

2.5 Measurement of N_2 isotherms

The nitrogen adsorption-desorption isotherms were determined on free microspheres, polymeric nanoparticles and all the assembled systems (from S1 to S5), using a Bel-Japan Minisorp II equipment, applying a multipoint technique. Specific surface area was calculated with the Brunauer-Emmet-Teller (BET) equation [19,20] from N_2 adsorption at -196°C . Pore size distribution was obtained by the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) [20] method in the desorption stage. Because of the low glass transition temperature of the samples, previous to nitrogen adsorption they were outgassed at 30°C .

2.6 Characterization of the assembled systems by thermal analysis

Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric (TGA) techniques were used to carry out a physical characterization of the assembled systems. To DSC studies, 2-4 mg of dried assembled system, PLGA pure and α -amylase pure were placed on aluminum pans and then sealed hermetically. The tests were carried out in a range of temperature from 30 to 280°C with a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ heating rate, under ultrapure nitrogen flux (50 mL/min) (DSCQ10 calorimeter, TA Instruments, USA). Finally, TGA was

performed in order to monitor the mass of the system during heating, under the same conditions described above for DSC studies, but using pans of platinum (TGA Q5000IR, TA Instruments, USA).

2.7 *In vitro* protein release

Potassium phosphate buffer at pH 7.2 was used as dissolution medium. The release profiles for all the assembled systems (S1 to S5) were obtained. Briefly, 25 mg of each system were weighed in a piece of stainless steel mesh of 5 cm (10 μ m of aperture) and dipped in 10 mL of dissolution medium previously poured in a glass vial. The vials were transferred to a thermostated bath at 37 °C under magnetic agitation. Afterwards, 100 μ L were withdrawn at different times and replaced with fresh medium. "Sink conditions" were maintained during entire study. The amount released of α -amylase at each time was determined by bicinchoninic acid assay (n=3).

2.8 Evaluation of the enzymatic activity of the released α -amylase

The enzymatic activity of α -amylase was evaluated after being released from the all assembled systems; free α -amylase dissolved in the same conditions was used as a control (buffer pH 7.2 and 37 °C). 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotriose (CNP-G3) was the substrate to measure amylase activity. In the enzymatic reaction a yellow product is generated, 2-chloro-4-nitrophenol [21]. The assay reagent was prepared using sodium citrate buffer solution at pH 6.2, CNP-G3 (2.25 mM), sodium chloride (300 mM), calcium chloride (5 mM) and potassium thiocyanate (900 mM). Samples of 75 μ L were withdrawn during *in vitro* release studies at 12h. Every sample was placed in assay tubes with 3 mL of the reagent assay previously incubated at 37 °C in a bath water. Once tubes were agitated by vortex, they were placed back to the incubation bath. A tube without sample was set as a blank. Then, absorbance was measured at 405 nm every minute during 2 minutes. The α -amylase activity (International Units per liter, U/L) of each sample and control was calculated using the following formula:

$$\alpha\text{-amylase (U/L)} = \frac{(\Delta A/\text{min}_s - \Delta A/\text{min}_b) \cdot TV \cdot 1000}{\epsilon \cdot SV \cdot d}$$

where $\Delta A/\text{min}_s$ = change in the absorbance per minute for the sample or control, $\Delta A/\text{min}_b$ = change in the absorbance per minute for the blank, TV = total volume of the assay (3.075 mL), 1000 = conversion from U/mL to U/L, ϵ = millimolar extinction coefficient of 2-chloro-4-nitrophenol at 405 nm (12.9), SV = sample volume (0.075 mL) and d = light path (1 cm).

2.9 Evaluation of conformational structure of α -amylase by Circular Dichroism Spectroscopy (CD)

Every assembled system (from S1 to S5) was placed in 10 mL of phosphate buffer pH 7.2 during 12 h at 37

°C in order to release the α -amylase from the systems. Subsequently, 500 μ L of sample were withdrawn and centrifuged at 25,000 rpm for 20 min. The samples were diluted with the same buffer solution until a concentration of 100-400 μ g/mL was achieved. CD measurements were performed in a JASCO J-815 spectropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD), equipped with a PFD-425S Peltier-type cell holder for temperature control and magnetic stirring. CD spectra were recorded from 200 to 250 nm, using 1 cm path-length cells. Ellipticities are reported as millidegrees. A CD measurement of free amylase was determined for use as a control.

3. Results

3.1 Obtaining of the components of the systems

The components of the system, porous microspheres and polymeric nanoparticles of PLGA were prepared using the methodology described above. Nanoparticles were solid structures with a main size of 251 ± 2.9 nm, a polydispersity index of 0.08 and specific surface area of 6.25 m²/g. Regarding microspheres we obtained porous structures with a main size of 104 ± 2.7 μ m, a uniformity index of 0.61, specific surface area of 4.40 m²/g and pore volume of 0.013 m³/g. The morphology of solid nanoparticles and porous microspheres are shown in figure 1. These characteristics are adequate for carrying out the assembly process by adsorption/infiltration of nanoparticles into porous microspheres.

3.2 Studies of adsorption onto micro- and nanoparticles

To select the best pH of the aqueous medium for the adsorption process and the amount of protein to be added to the systems (protein/microsphere ratio), adsorption studies were performed using two pH values (4.0 y 7.2). Results are presented in table 1 and figure 2. As observed, a better adsorption efficiency and larger amount of protein adsorbed onto microspheres at pH 4.0. Based on this finding we have chosen pH 4.0 to prepare the assembled systems.

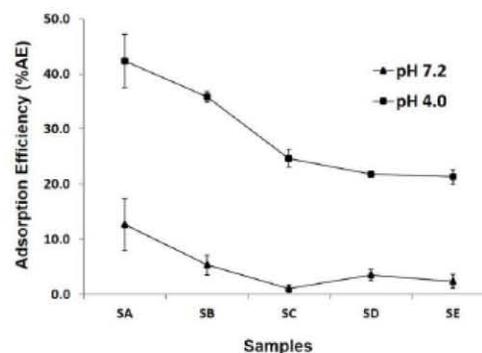


Figure 2. Adsorption efficiency of α -amylase in porous microspheres at different pH's. SA, SB, SC, SD and SE: samples immersed in a solution of 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 and 12.5 mg/mL of protein, respectively.

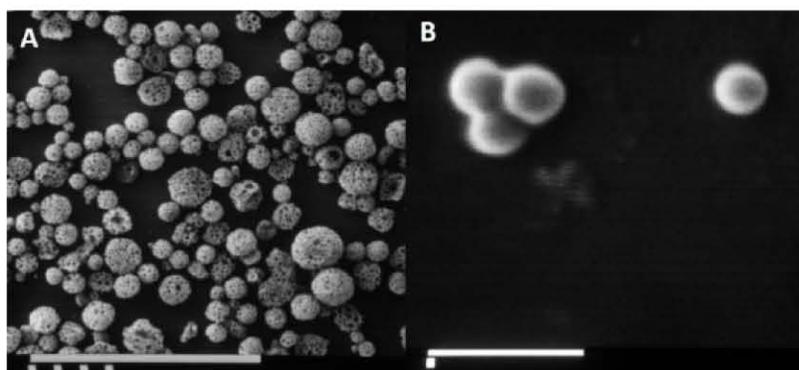


Figure 1. Scanning electron micrograph of A) porous polymeric microspheres of PLGA 50:50 (scale bar = 1000 µm) and B: polymeric nanoparticles of PLGA 50:50 (scale bar = 1 µm).

Zeta-potential (ζ) of free nanoparticles and with increasing amounts of the protein was determined, at pH 4.0, in order to corroborate the influence of the electrostatic forces involved in the adsorption process, using an electrophoretic light scattering method. As expected, data showed that zeta-potential becomes more positive when the amount of protein adsorbed increases, see Table 1. Changes in zeta-potential could be explained by neutralization of charges during the adsorption process (see discussion).

3.2 Obtaining and characterization of the assembled systems

Drug delivery systems assembled by adsorption and infiltration of polymeric nanoparticles into porous biodegradable microspheres were prepared using several concentrations of nanoparticles. Table 2 shows the results of the amount of protein loaded, adsorption efficiency, and the amount of nanoparticles infiltrated, as well as specific surface area and pore volume for all the assembled systems. S1 represents a system without infiltration of nanoparticles, just protein adsorption on microspheres. It can be seen that as the amount of adsorbed nanoparticles increases, the protein in the system also augments. Can be observed how the amount of nanoparticles infiltrated increases when a large amount of nanoparticles is in suspension; however this amount seems to achieve a maximum that is possibly related to a saturation of microsphere surface. Figure 3 shows a porous microsphere saturated with infiltrated nanoparticles in comparison to a free microsphere.

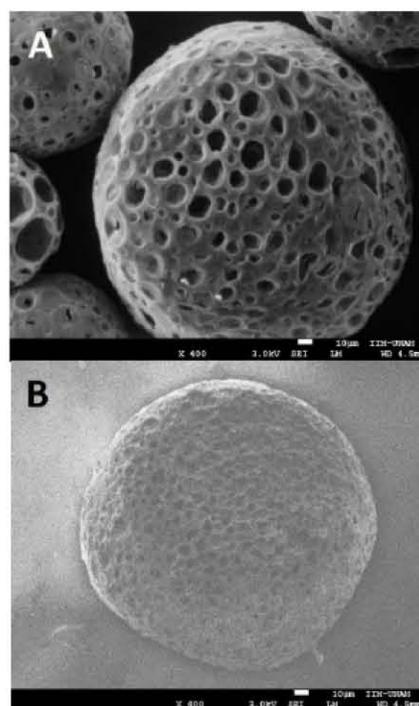


Figure 3. Scanning electron micrograph of polymeric microspheres of PLGA (50:50). A: free microspheres and B: microspheres with nanoparticles infiltrated. (Scale Bar = 10 µm).

Table 1. Adsorption studies of α -amylase onto micro- and nanostructures of PLGA

Sample	Adsorbed protein onto porous microspheres (mg)		ζ -potential of NP's adsorbed with protein (pH 4.0)	
	pH 4.0	pH 7.2	mg added of protein	(mV)
SA	1.1 ± 0.12	0.3 ± 0.12	*Blank	-6.08 ± 0.10
SB	1.8 ± 0.05	0.3 ± 0.09	10	-4.38 ± 0.09
SC	1.9 ± 0.12	0.1 ± 0.05	20	-3.15 ± 0.22
SD	2.2 ± 0.02	0.4 ± 0.10	30	-2.46 ± 0.17
SE	2.7 ± 0.17	0.3 ± 0.15	40	-1.87 ± 0.08

The results are shown as mean ± standard deviation. *Blank represents the ζ -potential of the polymeric nanoparticles without protein adsorption.

Table 2. Characterization of the assembled systems

System	α -Amylase adsorbed (mg)	%AE	Nanoparticles Loaded (mg)	Specific surface area, $a_{s,BET}$ (m^2/g)	Pore Volume V_p (cm^3/g)
S1	2.7 ± 0.29	27.2 ± 2.9	0*	4.25	0.014
S2	3.8 ± 0.06	25.2 ± 1.61	8.1 ± 2.2	2.23	0.022
S3	2.5 ± 0.16	37.7 ± 0.61	16.5 ± 1.3	1.94	0.023
S4	4.8 ± 0.15	47.4 ± 1.8	32.4 ± 2.4	0.45	0.014
S5	5.1 ± 0.12	50.7 ± 1.19	57.9 ± 2.6	----	----

The results are shown as mean \pm standard deviation. S1: system assembled without nanoparticle infiltration; S2, S3, S4 and S5: systems with infiltration of nanoparticle suspension of 25, 50, 75 and 100 mg/mL, respectively. NP's = polymeric nanoparticles. *System with no nanoparticle infiltration.

Figure 4 exhibits the isotherms of N_2 for all assembled systems. According to BET theory the specific surface area is represented by the slope [19,20], such that a slope steeper represents less surface area. Thus, as can be observed, the slope is higher in S2, S3 and S4 (systems with increasing amounts of nanoparticles infiltrated) compared to S1 (system with no nanoparticle infiltration) and free microspheres. Reduction on surface and saturation when the amount of nanoparticles infiltrated increases.

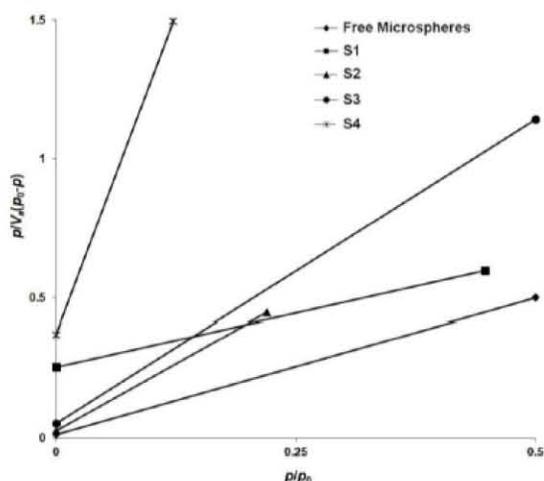


Figure 4. N_2 isotherms: from top to down; (♦) free microspheres of PLGA (50:50); (■) S1: system without nanoparticles infiltration; (▲) S2: system with 25 mg/mL of NP's; (●) S3: system with 50 mg/mL of NP's and (★) S4: system with 75 mg/mL. NP's = polymeric nanoparticles.

On the other hand, if the protein is first dissolved and then adsorbed in both surfaces (micro- and nanoparticles), the interaction between the biomolecule and surfaces is given to a molecular level. Thermal studies (DSC and TGA) were performed for understanding the interaction of the components in the system. DSC thermograms are shown in figure 5 and TGA thermograms in figure 6; for PLGA (50:50) pure, α -amylase pure and all the assembled systems (from S1 to S5).

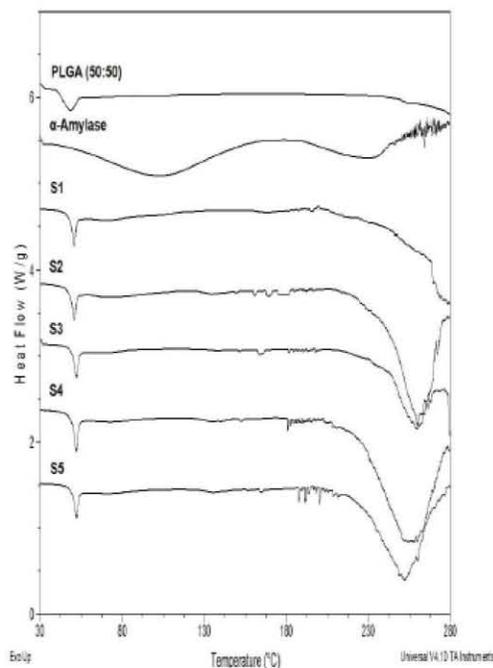


Figure 5. Differential scanning calorimetric studies. DSC thermograms: from top to down; PLGA (50:50) pure; α -amylase pure; S1: system assembled without nanoparticle infiltration; S2, S3, S4 and S5: systems with infiltration of nanoparticle suspension of 25, 50, 75 and 100 mg/mL, respectively. NP's = polymeric nanoparticles.

Thermal events in DSC thermograms indicate the presence of a characteristic endothermic peak at 47-52 °C, which corresponds to glass transition temperature (T_g) of the polymeric material (PLGA); however the dehydration event, at ~ 100 °C, seen in α -amylase thermogram disappeared in all the assembled systems, which suggests protein is dispersed on the polymeric matrix. Above 200 °C, degradation processes in all DSC thermograms were detected, being more evident in the assembled systems. Degradation events were followed in TGA thermograms, see figure 6, where it is noticed the weight loss is faster in the assembled systems (from S1-S5) in comparison to the pure components.

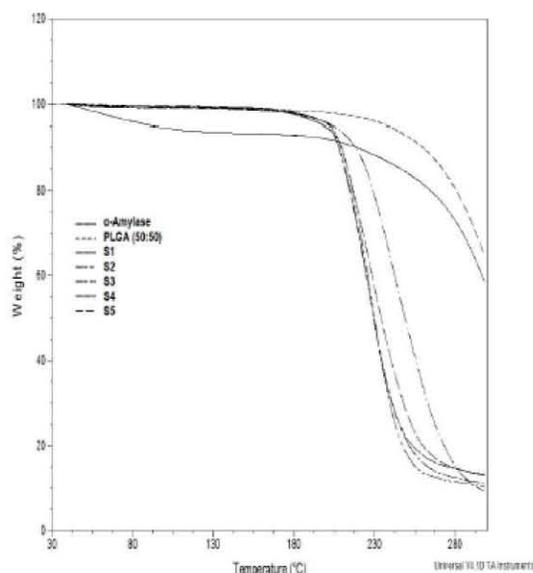


Figure 6. Thermogravimetric analysis. TGA thermograms: from top to down; α -amylase pure; PLGA (50:50) pure; S1: system assembled without nanoparticle infiltration; S2, S3, S4 and S5: systems with infiltration of nanoparticle suspension of 25, 50, 75 and 100 mg/mL, respectively. NP's = polymeric nanoparticles.

3.3 In vitro protein release

Protein release studies from assembled systems were carried out in buffer phosphates pH 7.2 as dissolution medium. Release profiles for all systems (S1 to S5) are shown in figure 7. Can be noticed in S1 (system without nanoparticles infiltration) that α -amylase is completely released at 24 h; similar behavior is observed in S2 (system prepared with 25 mg/mL of nanoparticles). Nevertheless, S3, S4 and S5 have only delivered 73, 45 and 38% of the loaded protein at the same time respectively. It is suggested that depending on saturation degree, the infiltrated nanoparticles create a physical barrier that reduces the release rate.

3.4 Enzymatic activity of the released α -amylase and evaluation of its structural integrity

Assembled systems (S1 to S5) were placed in buffer phosphates solution pH 7.2, at 37 °C, during 12 h in order to release the enzyme. Samples of free α -amylase were treated in the same conditions for being used as a control. Enzymatic activity (UI/L) for all systems can be observed in figure 8, where no significant statistical differences were found in comparison with free α -amylase ($p > 0.05$).

Structural integrity of released α -amylase was evaluated by circular dichroism; in figure 9 the far-UV CD spectra of α -amylase with different treatments are shown. As we can appreciate, all the CD spectra are very similar, indicating that there are no appreciable changes on the secondary structure of amylase when it is released from the assembled systems, as judged from the CD signal.

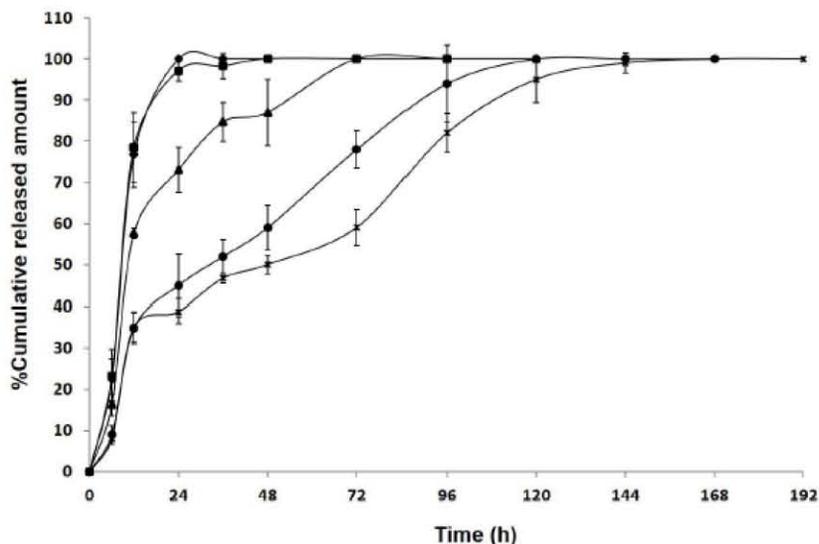


Figure 7. Release profiles of α -amylase from all assembled systems. Studies performed in phosphates buffer (pH 7.2) at 37 °C. (♦) S1: system without nanoparticles infiltration; (■) S2: system with 25 mg/mL of NP's; (▲) S3: system with 50 mg/mL of NP's; (●) S4: system with 75 mg/mL of NP's and (*) S5: system with 100 mg/mL of NP's. NP's = polymeric nanoparticles.

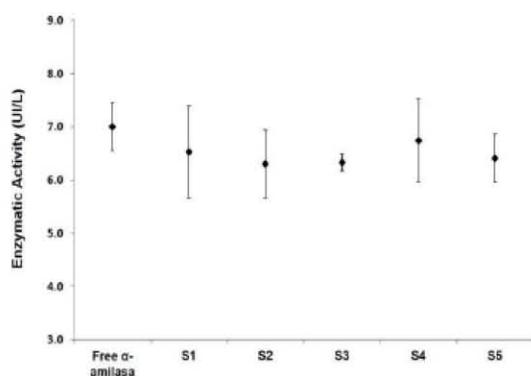


Figure 8. Enzymatic activity of α -amylase. Assays were performed in citrates buffer (pH 6.2), at 37 °C, using CNP-G3 as substrate. S1: system assembled without nanoparticle infiltration; S2, S3, S4 and S5: systems with infiltration of nanoparticle suspension of 25, 50, 75 and 100 mg/mL, respectively. NP's = polymeric nanoparticles.

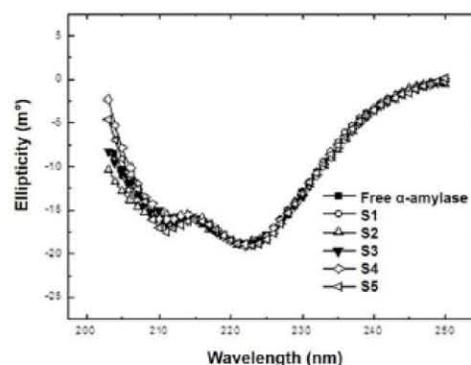


Figure 9. Far-UV CD spectra of α -amylase after different treatments. Spectra were recorded in 20 mM, phosphates buffer (pH 7.2), at 37 °C. S1: system assembled without nanoparticle infiltration; S2, S3, S4 and S5: systems with infiltration of nanoparticle suspension of 25, 50, 75 and 100 mg/mL, respectively. NP's = polymeric nanoparticles.

4. Discussion

4.1 Protein adsorption onto the components of the system (micro- and nanoparticles)

From results, it is noticed that pH and protein concentration have influence on the adsorption process onto surface of PLGA microparticles. The isoelectric point of α -amylase is 4.2 [22], meanwhile the pKa of PLGA is 3.8 when the polymer has an end carboxylic group (polymer used in this work, PLGA 4A, has an acid terminal group). Two pH's were tested, a pH 4.0 where α -amylase is charged positively and carboxylic groups in PLGA are ionized and pH 7.2 where both are charged negatively. More molecules are adsorbed when the medium has an acid pH (4.0) where opposed charges exist. This behavior can be explained due to the changes in the properties of surface of microspheres and charges generated in the protein at each pH. Due to the process was carried out in an aqueous medium, the adsorption process is favored. When pH is higher than the isoelectric point, 7.2, the hydrophobic interactions become more important and the adsorption capacity reduces because the microsphere surface presents the same charge than the enzyme; Kondo et al (1996) and Bautista et al (1999) described this behavior and the influence of pH when α -amylase is adsorbed onto hydrophobic surface [22,23], and Li et al (2007) reported this effect and the role of surface groups when bovine serum albumin is adsorbed onto polymeric microspheres of PLGA [24]. Meanwhile, when protein concentration is high the molecules adsorb close to each other, yielding a higher adsorbed amount that increases when surface area increases and less conformational changes [25].

The observed changes in zeta-potential confirm the cancelation of charges between the molecules, making evident that electrostatic attractions occur in the aqueous medium at pH 4.0. The charged surface brings nearer the charged proteins toward itself and concentrates them there by an attraction phenomenon. Similar effects have been seen when siRNA is adsorbed onto chitosan-coated-PIBCA nanoparticles [26]. Therefore, electrostatic interactions must be considered to obtain better adsorption efficiencies and a large amount of drug on the surface. Low adsorption efficiencies have been reported when organic solvents and other structures like silicon microparticles are used to adsorb peptides, where no electric attractions are presented [14].

4.2 Assembled systems by adsorption/infiltration

With the use of the adsorption/infiltration method, assembled systems can be prepared at different levels of saturation where exist a clear dependence between the amount of infiltrated nanoparticles and the amount of adsorbed protein. This finding is related to the fact that protein is adsorbed on both surfaces (micro- and nanoparticles) since the structures or components of the system are immersed in the same solution where the protein is dissolved, moreover there is more available surface area when there is a larger amount of nanoparticles in suspension. Due to the amount of microspheres is constant during the assembly, the surface area offered by the nanoparticles is the main factor for obtaining better adsorption efficiencies because the area increase when the concentration of nanoparticles increases. Similar results were achieved in a previous work where a peptide (Leuprolide acetate), a small molecule, was used as drug model [16].

The saturation process is explained by the reduction of the specific surface area in the assembled systems, see figure 4. It is possible to see in the same figure how the surface area of the system S1 (with no infiltration of nanoparticles) and free microspheres are not so different, so it is suggested that the reduction of the surface area is mainly due to the adsorption and formation nanoparticle film on the surface of the porous microsphere.

Thermic analysis showed the molecular interaction of the protein with polymer in the assembled systems because the characteristic peaks in protein thermograms are not present in the system thermograms; this can be related to a molecular dispersion of the protein on all the polymeric matrix. However, small movements in Tg of PLGA in systems thermograms can be detected in comparison to PLGA pure; that could be associated to rearrangements and interfacial segregation of the polymer after manufacturing processes of micro- and nanostructures [27]. TGA studies evidence how the loss of weight for the assembled systems begins at approximately at 190 °C and is more pronounced than pure components, indicating that molecular interactions occur between protein and PLGA as well as a rearrangement of the polymer during the adsorption/infiltration assembly process.

4.3 Protein release

The dominant mechanism of protein release from the assembled system is passive diffusion associated to a concentration gradient. The porous structure made water penetrate into the polymeric matrix from dissolution medium dissolving the adsorbed protein and bringing back to the medium. The profiles shown in figure 7 fit Higuchi's model, indicating a release mechanism associated to a Fickian diffusion, which could be related to water pass through pore channels (data no shown). Mao et al (2007) described the influence of surface porosity and internal morphology of PLGA microspheres in the release behavior of hydrophilic molecules and reported that the initial release phase is mainly characterized by pore diffusion [28]. The "burst effect" observed in all release profiles could be associated to the protein that was adsorbed in more external surfaces; Sun et al (2009) and Kilpeläinen et al (2011) found the same effect when human serum albumin (protein model) and melotan II (peptide model) are adsorbed onto polymeric and silicone surfaces, respectively [7,14]. Finally, can be observed in figure 7 how the release rate is clearly modified after 24 h; thus, the increasing amount of nanoparticles inside porous microspheres causes a decline in the release rate. The infiltrated nanoparticles tend to form a film onto microsphere surface that becomes more continuous when the amount of nanoparticles inside microsphere is large, acting as physical barrier and modifying the release rate [16].

4.4 Protein integrity studies

Assay of α -amylase is used to the diagnosis of acute pancreatitis. There are several methods for the measurement of the activity of this enzyme that employ some nitrophenylated oligosaccharides as substrate, which release a chromophore such as 4-nitrophenol. Example of them is the substrate 2-chloro-4-nitrophenyl maltotriose (CNP-G3), which is hydrolyzed by α -amylase in presence of high thiocyanate concentration with no lag phase. The enzymatic reaction produces a yellow compound (2-chloro-4nitrophenyl) that can be monitored spectrophotometrically at 405 nm. The method is sensitive, precise and free of interferences [21].

No significant differences were found between free α -amylase and the one that was released from the assembled systems. It has been described that the affinity of α -amylase for solid surfaces at high pH (release at 7.2 and activity assay at 6.2) reduces the extent of conformational changes and increases its relative activity [23], meanwhile certain enzymes acquire its native form, in a reversible way, after desorption process when they are in contact with their substrates, or even a reversible process can be seen when proteins were adsorbed onto a surface with an opposite electric charge and at high concentrations, favoring surface crystallization with more packed arrangement [25].

The CD spectra obtained for α -amylase are similar to those reported by Matsuo et al, who studied the secondary structure of several proteins, including this enzyme [29]. As there were no changes in the secondary structure of α -amylase or in its conformation, it can be inferred that its activity will not be affected.

These findings show that assembly process by adsorption/infiltration is a useful tool to formulate sensitive drugs, like proteins, because no damage in their secondary structure is found after being adsorbed and then released.

5. Conclusions

An adsorption/infiltration process was used for obtaining an injectable protein delivery system using α -amylase as protein model. This method allows loading proteins under a friendly environment for this kind of molecules because during formulation the common physicochemical stress in process like microencapsulation is avoided. Therapeutic dose can be load since the protein is adsorbed first on nanoparticles and then on microsphere surface. Additionally, the nanoparticles inside microsphere saturate the surface of the system in different levels. That grade of saturation modifies the release velocity as amount of nanoparticles increases; therefore depending on required frequency dose we can prepare a specific system. Properties of the α -amylase such as

primary structure and isoelectric point, properties of surfaces and pH in the aqueous medium and protein concentration play an important role in the adsorption efficiency, therefore the influence of these factors on the integrity of the molecule during formulation should be considered. In order to evaluate the efficacy of this novel drug delivery system the enzymatic activity of α -amylase was determined for all assembled systems finding no significant changes in comparison with a sample of free enzyme. Finally, conformational studies by circular dichroism basically evidenced no important changes in the secondary structure once the protein is adsorbed and then released. This work makes emphasis on the potential use of this approach to formulate sensitive drugs like biomolecules as a feasible alternative that faces the inconvenient of preparing protein delivery systems by conventional process that compromise the molecule stability in every manufacturing step.

6. Acknowledgements

Financial support from DGAPA (project PAPIIT IT201914) is gratefully acknowledged. Sergio Alcalá is grateful to CONACYT for the student grant (223443) and to UNAM for doctoral studies. The authors thank to QFB Damaris Cabrero for her assistance in TGA tests.

7. Disclosure

The authors agree in no conflicts of interest in this work.

References

1. Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat rev* 2005;4:298-306
2. Pavlou AK, Reichert JM. Recombinant protein therapeutics-success rates, market trends and values to 2010. *Nat biotechnol* 2004;22(12):1513-151
3. Krishnamurthy R, Manning MC. The stability factor: importance in formulation development. *Curr Pharm Biotechnol* 2002;3(4):361-371
4. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. *Pharm Res* 2010;27(4):544-575
5. Fu k, Klibanov AM, Langer R. Protein stability in controlled-release systems. *Nat biotechnol* 2000;18:24-25
6. Degim IT, Çelebi N. Controlled delivery of peptides and proteins. *Curr Pharm Des* 2007;13:99-117
7. Sun L, Zhou S, Wang W, et al. Preparation and characterization of porous biodegradable microspheres used for controlled protein delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2009;345:173-181
8. Dai C, Wang B, Zhao H. Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;41:117-120
9. Tan ML, Choong PFM, Dass CR. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides* 2010;31:184-193
10. Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 1999;185:129-188
11. Putney SD. Encapsulation of proteins for improved delivery. *Curr Opin Chem Biol* 1998;2(4):548-52
12. Spada G, Gavini E, Giunchedi P. Protein delivery from polymeric nanoparticles. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 2011;52:245-249
13. Vrignaud S, Benoit JP, Saulnier P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based Nanoparticles. *Biomaterials* 2011;32:8593-8604.
14. Kipeläinen M, Mönkäre J, Vlasova MA, et al. Nanostructured porous silicon microparticles enable sustained peptide (Melanotan II) delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;77:20-25
15. Rodríguez-Cruz IM, Domínguez-Delgado CL, Escobar-Chávez JJ, et al. Nanoparticle infiltration to prepare solvent-free controlled drug delivery systems. *Int J Pharm* 2009;371:177-181
16. Alcalá-Alcalá S, Urbán-Morlán Z, Aguilar-Rosas I, Quintanar-Guerrero D. A biodegradable polymeric system for peptide-protein delivery assembled with porous microspheres and nanoparticles, using an adsorption/infiltration process. *Int J Nanomedicine* 2013;8:2141-2151
17. Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allémann E, Doelker E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm* 1996;143:133-141
18. Kim TK, Yoon JJ, Lee DS, Park TG. Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres. *Biomaterials* 2006;27:152-159
19. Brunauer S, Emmett P H & Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc* 1938;60:309-19
20. Rouquerol J, Rouquerol F, Sing K. *Adsorption by Powders and Porous Solids*. USA: Academic Press, San Diego, 1999
21. Foo AY, Bais R. Amylase measurement with 2-chloro-4-nitrophenyl maltotrioxide as substrate. *Clin Chim Acta* 1998;272:137-14
22. Bautista LF, Martínez M, Aracil J. Adsorption Equilibrium of α -amylase in aqueous solutions. *AIChE J* 1999;45(4):761-768
23. Kondo A, Urabe T, Yoshinaga K. Adsorption activity and conformation of α -amylase on various ultrafine silica particles modified with polymer silane coupling agents. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 1996;109:129-136
24. Li W, Li S. A study on the adsorption of bovine serum albumin onto electrostatic microspheres: Role of surface groups. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2007;295:159-164
25. Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng* 2001; 91(3):233-244
26. Martimprey H, Bertrand JR, Malvy C, Couvreur P, Vauthier C. New Core-Shell Nanoparticles for the Intravenous Delivery of siRNA to Experimental Thyroid Papillary Carcinoma. *Pharm Res* 2010;27(3):498-509
27. Bouissou C, Rouse JJ, Price R, van der Walle CF. The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm Res* 2006;23(6):1295-1305
28. Mao S, Xu J, Cai C, et al. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres. *Int J Pharm* 2007;334:137-148
29. Matsuo K, Yonehara R, Gekko K. Improved estimation of the secondary structures of proteins by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. *J Biochem* 2005; 138:79-88

Anexo 11.5 Otros productos.

- **Patente del proceso y sistema desarrollados.**

Título: "Método para la obtención de microesferas de liberación controlada de activos sensibles, preparadas por ensamblaje de microesferas porosas y nanopartículas".

Tramite realizado a través el CID de la UNAM.

Etapa: solicitud de patente al Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI). Expediente MX/a/2014/01910 y solicitud MX/E/2014/011986.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Uso exclusivo (delegaciones y subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI)

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección: Divisional de Patentes

Soporte Usual
Credencial: 05/4/2014/001910
Fecha: 10/11/2014 Hora: 12:20:13
Código: 05/2/2014/011986 415728

Solicitud de Patente
Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especificar cuál:
 Modelo Dibujo Industrial

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverse

DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
2) Nacionalidad (es): MEXICANA.
3) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: 0° PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA SIN, CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN, C.P. 04510.
4) Teléfono (día): 56 22 63 29 AL 31 5) Fax (día): 56 65 46 44

DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s): EDUARDO GUERRERO GUERRERO Y SERGIO ALCALÁ ALCALÁ.
7) Nacionalidad (es): MEXICANA Y MEXICANA.
8) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: BOHEMA 14-79 BOSQUES DEL LAGO, C.P. 54766.
9) Teléfono (día): 10) Fax (día):

DATOS DEL (DE LOS) APODERADO (S)

11) Nombre (s): LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ R/G P. DDAJ-14782
12) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO "B" 3er. PISO, ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN, C.P. 04510.
14) Teléfono (día): 56 22 63 29 AL 31 15) Fax (día): 56 65 46 44
16) Personas Autorizadas para dar y recibir notificaciones: LIC. LAURA CORTÉS SÁNCHEZ, LIC. YESICA MARIBEL CORONEL RIVERA, LIC. ROCÍO ADRIÁN VÁZQUEZ y el C. MIGUEL ÁNGEL NEVES MARTÍNEZ.

17) Designación o Título de la invención: "MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE MICROESFERAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE ACTIVOS SENSIBLES PREPARADAS POR ENSAMBLAJE DE MICROESFERAS POROSAS Y NANOPARTÍCULAS".

18) Fecha de divulgación previa
Día Mes Año
20) División de la solicitud

19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI
21) Fecha de presentación
Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada:
Número Figura jurídica
Día Mes Año No. de serie
País

Lista de verificación (uso interno)

No.	Folios	No. Hojas
X	1	Comprobante de pago de la tarifa
X	2	Descripción y reivindicación (es) de la invención
X	6	Dibujo (s) en su caso
X	1	Resumen de la descripción de la invención
X	1	Documento que acredite la personalidad del apoderado
		Documento de cesión de derechos
		Constancia de depósito de material biológico
		Documento (s) complementario(s) de divulgación previa
		Documento (s) de prioridad
		Traducción
		TOTAL DE HOJAS

Observaciones:
Ejemplo de decir verdad: Declaro que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.
LIC. MARTHA FIGUEROA PÉREZ CD. UNIVERSITARIA, D.F. A 17 DE FEBRERO DE 2014.
Número y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha

Página 1 de 2

- **1er lugar del premio CANIFARMA 2013 a la Innovación en Tecnología Farmacéutica.** Diciembre de 2013.

