



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Microencapsulación de péptidos sintéticos en co-polímeros de poli(láctico-co-glicólico) (PLGA): Efecto de la hidrofobicidad del péptido

María Laura Pabón Ardila

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN)

Bogotá, Colombia

2021

Microencapsulación de péptidos sintéticos en co-polímeros poli(láctico-co-glicólico) (PLGA): Efecto de la hidrofobicidad del péptido

María Laura Pabón Ardila

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título
Magister en Ciencias- Microbiología

Directora:

PhD Biotecnología, Magnolia Vanegas Murcia
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia

Codirector:

PhD Ciencias Farmacéuticas, Jaiver Eduardo Rosas Pérez
Departamento de Farmacia – Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Bioprocesos y bioprospección

Grupo de Investigación:

Grupo Funcional de Síntesis Química – Fundación Instituto de Inmunología de Colombia
–FIDIC

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN)

Bogotá, Colombia

2021

Lokah Samastah Sukhino Bhavantu

*“May all beings be happy and free,
and may the thoughts, words, and actions of
my own life contribute in some way
to that happiness and freedom for all”*

Agradecimientos

A Dios, por la vida y todas las bendiciones que me ha permitido.

A la Universidad Nacional de Colombia, en donde me forme académicamente en mis estudios de pregrado y ahora me ha dado la oportunidad de seguir avanzando en mi formación académica en el posgrado en Ciencias – Microbiología, y a quien doy gracias por la oportunidad de pertenecer a su programa.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC por darme la oportunidad de comenzar mi carrera profesional y por ser un lugar en donde además de permitirme ahondar día a día en nuevo conocimiento he podido conocer y trabajar con grandes personas y científicos.

A mis directores Magnolia Vanegas Murcia y Jaiver Eduardo Rosas por todo su apoyo y guía en este proceso de formación. Porque gracias a su ayuda, dedicación y motivación pude adentrarme en un tema tan lindo e interesante como el que envuelve este trabajo. Gracias por todo, fue muy valioso todo el conocimiento aprendido.

A mi papá, a quien admiro con todo mi corazón, quien día a día me sigue guiando en este camino y quien es mi motivación para seguir alcanzando nuevos sueños; me siento muy feliz por tenerte como padre. A mi hermana quien es mi modelo a seguir, gracias por las aventuras, enseñanzas y consejos; y por mis sobrinos a quienes amo con todo mi corazón. A mi Lucca quien siempre me ha acompañado y porque su presencia alegra mi vida y mi corazón. Y mi mamá porque, aunque no estés junto a mí yo vivo por ti; un gracias se queda chiquito por todo lo que hiciste y sigues haciendo por mí, solo espero algún día poder ser tan perfecta como tú.

A Jorge, gracias por traer tanta alegría a mi corazón, por ser mi apoyo incondicional, y por ser la persona que siempre me ha podido sacar una sonrisa, sin importar el momento.

También te agradezco por aguantarme cuando estoy en modo lorito. Gracias, porque tú me inspiras a ser mejor persona.

A mis amigos y compañeros Jorge, Yahson, Luisa Tabares, Cesar, Adriana Bermúdez, Patricia Alba, Ana Maria, Erika, Natalia M, Laura H a quienes molesté tanto pidiéndoles una ayuda urgente y con quienes siempre pude contar ya que siempre me brindaron su colaboración y me ayudaron a ver el lado positivo de las cosas, a no desanimarme y a seguir adelante, gracias porque su apoyo y colaboración fueron inconmensurables.

A Socorro Prieto, por su carisma, dedicación y por todo su apoyo incondicional ya que siempre me permitió contar con ella y fue una persona de la cual me alegro y agradezco por haber conocido.

Microencapsulación de péptidos sintéticos en co-polímeros de poli(láctico-co-glicólico) (PLGA): Efecto de la hidrofobicidad del péptido

Resumen

En el presente estudio se evaluó el efecto de la hidrofobicidad de péptidos sintéticos durante su microencapsulación en sistemas microparticulares elaborados con PLGA. De la base de datos de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), fueron preseleccionadas 280 secuencias peptídicas diseñadas y evaluadas como potenciales candidatos en la búsqueda de una vacuna sintética contra la malaria, y se clasificaron en tres grupos, según su índice de hidropaticidad (hidrofílico, neutro e hidrofóbico). De estas, seis secuencias (dos por cada grupo) fueron seleccionadas y sintetizadas por síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) mediante la estrategia t-Boc/Bzl y fueron adecuadamente caracterizadas y purificadas. Posteriormente, estos péptidos se encapsularon en micropartículas elaboradas con el co-polímero PLGA 50:50 por la técnica de doble emulsión-evaporación del disolvente (*W/O/W*). Los sistemas microparticulares fueron evaluados en su tamaño, forma, carga, eficiencia de encapsulación y el perfil de liberación *in vitro*. Los resultados de este trabajo indicaron que independientemente del índice de hidropatía de las secuencias, fue posible obtener estos péptidos con alto grado de pureza mediante la metodología SPPS estrategia t-Boc/Bzl. Además, que el carácter hidrofóbico del péptido encapsulado afectó en mayor o menor proporción en cada una de las variables evaluadas en los sistemas microparticulares, siendo más relevante en la carga, eficiencia de encapsulación y en el perfil de liberación.

X Microencapsulación de péptidos sintéticos en co-polímeros de poli(láctico-co-glicólico) (PLGA): Efecto de la hidrofobicidad del péptido

Palabras clave: Microencapsulación, PLGA, doble emulsión-evaporación del disolvente, hidrofobicidad, SPPS, péptidos sintéticos.

Microencapsulation of synthetic peptides in poly (lactic-co-glycolic) copolymers (PLGA): Effect of peptide hydrophobicity

Abstract

In the present study the effect of the hydrophobicity of synthetic peptides during microencapsulation in microparticulate systems based on PLGA was evaluated. From the database of the Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) were preselected 280 peptide sequences designed and evaluated as potential candidates in the search for a synthetic vaccine against malaria and were classified into three groups, according to their hydropathic index (hydrophilic, neutral, and hydrophobic). Of these, six sequences (two for each group) were selected and synthesized by solid phase peptide synthesis (SPPS) using the t-Boc/Bzl strategy and were adequately characterized and purified. These peptides were subsequently encapsulated in microparticles prepared with the PLGA 50:50 copolymer by the double emulsion-solvent evaporation technique (*W/O/W*). The microparticulate systems were evaluated for size, shape, charge, encapsulation efficiency, and *in vitro* release profile. The results of this work indicated that regardless of the hydropathic index of the sequence it was possible to obtain these peptides with a high degree of purity by the SPPS methodology t-Boc/Bzl strategy. Furthermore, the hydrophobic character of the encapsulated peptides affected to a greater or lesser extent each of the variables evaluated in the microparticulate systems, being more relevant in the charge, encapsulation efficiency and in the release profile.

Keywords: Microencapsulation, PLGA, double emulsion-solvent evaporation, hydrophobicity, SPPS, synthetic peptides

Contenido

	PÁG.
RESUMEN	IX
ABSTRACT	XI
CONTENIDO.....	XII
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE <i>TABLAS</i>	XVII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XVIII
INTRODUCCIÓN	1
1. SISTEMAS DE ENTREGA PARA PÉPTIDOS SINTÉTICOS	5
1.1 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS.....	5
1.1.1 <i>Índice de GRAVY</i>	8
1.2 MICROENCAPSULACIÓN.....	10
1.2.1 <i>El polímero</i>	12
1.2.2 <i>Micropartículas de PLGA</i>	14
1.3 CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS MICROPARTICULARES	16
2. METODOLOGÍA	19
2.1 SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS	19
2.2 SÍNTESIS DE LAS SECUENCIAS PEPTÍDICAS	21
2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS	27
2.3.1 <i>Cromatografía líquida de alta eficiencia</i>	27
2.3.2 <i>Espectrometría de masas MALDI-tof</i>	27

2.3.3	<i>Purificación de péptidos</i>	28
2.4	MICROENCAPSULACIÓN DE LOS PÉPTIDOS SELECCIONADOS	28
2.4.1	<i>Estrategia Total</i>	30
2.4.2	<i>Estrategia Fracción Soluble</i>	31
2.4.3	<i>Estrategia Sólido</i>	31
2.5	CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS MICROPARTICULARES	32
2.5.1	<i>Tamaño</i>	32
2.5.2	<i>Forma</i>	32
2.5.3	<i>Carga y eficiencia de encapsulación</i>	32
2.5.4	<i>Potencial Z</i>	33
2.5.5	<i>Liberación in vitro de los péptidos microencapsulados</i>	34
2.5.6	<i>Integridad de los péptidos</i>	34
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1	SELECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS PEPTÍDICAS SEGÚN SU ÍNDICE DE HIDROPATICIDAD	35
3.2	SÍNTESIS DE LAS SECUENCIAS PEPTÍDICAS	39
3.3	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS PÉPTIDOS CRUDOS Y PUROS	43
3.4	MICROENCAPSULACIÓN DE LOS PÉPTIDOS.....	53
3.5	CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS MICROPARTICULARES	57
3.5.1	<i>Tamaño</i>	57
3.5.2	<i>Forma</i>	61
3.5.3	<i>Carga y eficiencia de encapsulación</i>	64
3.5.4	<i>Potencial Z</i>	70
3.5.5	<i>Liberación in vitro de los péptidos</i>	73
3.5.6	<i>Integridad de los péptidos</i>	78
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	83
4.1	CONCLUSIONES	83
4.2	RECOMENDACIONES	84
	BIBLIOGRAFÍA	85
	ANEXOS	93

Lista de figuras

	PÁG.
Figura 1-1. Esquema general de la SPPS.	6
Figura 1-2. Representación esquemática de los reactores empleados en la síntesis.	7
Figura 1-3. Escala de hidropaticidad y representación de la cadena lateral de los 20 aminoácidos naturales [18].....	9
Figura 1-4. Síntesis a partir de los dímeros cíclicos y degradación del co-polímero de PLGA [42].....	13
Figura 1-5. Mecanismo general de degradación y erosión de una micropartícula de PLGA durante la liberación del IFA.	15
Figura 2-1. Gráfica de distribución del índice de GRAVY para las secuencias peptídicas preseleccionadas.	20
Figura 2-2. Esquema del proceso de síntesis, desanclaje y extracción para la obtención de un péptido sintético por la estrategia t-Boc/Bzl.....	22
Figura 2-3. Estrategias de activación del grupo carboxilo para la reacción de acople. ...	23
Figura 2-4. Esquema del sistema de condensación de HF para la remoción de grupos protectores de cadenas laterales.	25
Figura 2-5. Esquema del sistema de condensación de HF para el desanclaje del péptido de la resina.....	26
Figura 2-6. Esquema general del proceso de obtención de microesferas por la técnica de doble emulsión-evaporación del disolvente.	29
Figura 3-1. Distribución de los péptidos seleccionados según su índice de hidropaticidad.	36
Figura 3-2. Perfiles sintéticos de los péptidos a microencapsular.....	40
Figura 3-3. Caracterización del péptido hidrofílico 1756	46
Figura 3-4. Caracterización del péptido hidrofílico 1776	47
Figura 3-5. Caracterización del péptido neutro 23681	48

Figura 3-6. Caracterización del péptido neutro 24229	49
Figura 3-7. Caracterización del péptido hidrofóbico 40318	51
Figura 3-8. Caracterización del péptido hidrofóbico 35425	52
Figura 3-9. Caracterización del péptido control SPf66 , el análisis de cromatografía se muestra a la izquierda y el espectro de masas a la derecha.....	53
Figura 3-10. Propiedades fisicoquímicas de los sistemas microparticulares obtenidos. A: Tamaño promedio de partícula e índice de polidispersidad. B: Distribución del tamaño promedio por estrategia de microencapsulación y C: Distribución del Pdl promedio por estrategia de microencapsulación.....	58
Figura 3-11. Micrografías de las microesferas de PLGA cargadas con los péptidos sintéticos tomadas a 10 kV x 15,000 aumentos.	62
Figura 3-12. Efecto de la hidrofobicidad del péptido en la carga y eficiencia de encapsulación. A: Q péptidos por estrategia de encapsulación, B: promedio Q por péptido, C: EE péptidos por estrategia de encapsulación y D: promedio EE por péptido.	67
Figura 3-13. Propiedades fisicoquímicas de los sistemas microparticulares obtenidos. A: Valores de potencial Z determinados y B: Distribución del Potencial Z de los sistemas microparticulares desarrollados por estrategia de microencapsulación empleada.	72
Figura 3-14. Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de los péptidos microencapsulados.....	74
Figura 3-15. Determinación mediante espectrometría de masas MALDI-tof de la integridad del péptido extraído de cada uno de los sistemas microparticulares desarrollados.....	79

Lista de *Tablas*

	PÁG.
Tabla 1-1. Técnicas más empleadas para la microencapsulación de IFAs en co-polímeros de PLGA.....	10
Tabla 3-1. Clasificación de las secuencias según su índice de GRAVY.	37
Tabla 3-2. Consolidado del rendimiento del proceso de síntesis y de purificación por péptido y especificaciones de los péptidos puros.....	44
Tabla 3-3. Código de identificación y composición de los sistemas microparticulares elaborados.	54
Tabla 3-4. Cuantificación del péptido cargado en microesferas de PLGA y EE (media \pm desviación estándar, n = 3).	66

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
ACN	Acetonitrilo
BCA	Ácido bicinconínico
Da	Dalton, unidad de masa
DCM	Diclorometano
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DIEA	N,N-di-isopropiletilamina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMS	Dimetilsulfuro
DNP	Dinitrofenilo
EE	Eficiencia de carga
EM	Espectroscopia de masas
FDA	Food and Drug Administration
FIDIC	Fundación Instituto de Inmunología de Colombia
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
FS	Estrategia de microencapsulación denominada Fracción Soluble
GRAVY	Grand Average of Hidropathy
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
HF	Fluoruro de hidrógeno
HOBT	N-hidroxibenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography o cromatografía líquida de alta eficiencia
IG	Índice de GRAVY
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
IPA	Isopropanol

Abreviatura Término

MALDI-tof	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight o desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
MBHA	Metil-bencidrilamina
NMP	N-metil-2-pirrolidona
PBS	Buffer fosfato salino
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PM	Peso molecular
PVA	Alcohol polivinílico
Q	Carga
Qt	Carga teórica
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
S	Estrategia de microencapsulación denominada Sólido
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis o síntesis de péptidos en fase sólida
T	Estrategia de microencapsulación denominada Total
t-Boc	terc-butiloxicarbonilo
TA	Disolución de 0,1 % TFA en AGUA:ACN. 2:1
TBTU	Tetrafluoroborato de O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
TFA	Ácido trifluoroacético
T _g	Temperatura de transición vítrea
t _R	Tiempo de retención
UV	Ultra-violeta

Introducción

Actualmente biomoléculas de carácter proteico, peptídico, hormonas y ácidos nucleicos, entre otros, se han empleado en el diseño y desarrollo de novedosos ingredientes farmacéuticos activos (IFAs) para el tratamiento de diferentes patologías. Sin embargo, la naturaleza fisicoquímica y bioquímica de estas moléculas presentan algunos retos para su administración, debido a diferentes factores como son cortos tiempos de vida media, reacciones de degradación o desnaturalización de estas moléculas en el organismo e inestabilidad durante su biodistribución [1]. Por esta razón se ha profundizado en la investigación de sistemas de entrega que permitan superar estas limitaciones y así administrar de manera eficiente estos IFAs, ya que estos sistemas cuentan con grandes ventajas como son proteger estas moléculas de procesos de degradación química o enzimática, modular su liberación y dirigirla a las células blanco.

Los péptidos como IFAs se pueden obtener de manera natural o sintética y estos mismos son esenciales en la investigación y en el desarrollo de nuevos productos de uso terapéutico y de diagnóstico; ya que participan en procesos de señalización, regulación o en una gran variedad de procesos fisiológicos de defensa, inmunidad, crecimiento, homeóstasis y reproductivos [2].

En la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia - FIDIC los péptidos sintéticos se han constituido como una alternativa para el desarrollo de métodos inmunoprolácticos y para esto específicamente se han diseñado y evaluado diferentes péptidos sintéticos como potenciales candidatos en la búsqueda de una vacuna sintética contra la malaria. Actualmente la FIDIC ha venido desarrollando un nuevo concepto de vacunas químicamente sintetizadas, y hasta la fecha en el Instituto se han sintetizado cerca de 43,000 péptidos derivados de secuencias proteicas propias de microorganismos infecciosos. La principal investigación está enfocada en secuencias peptídicas derivadas de proteínas de *Plasmodium falciparum* (Pf) que han sido identificadas como potenciales candidatas en el desarrollo de una vacuna sintética contra la malaria. En 1988 la FIDIC

sintetizó un péptido quimérico de 45 residuos derivado de tres fragmentos de proteínas de merozoíto y un motivo de unión de una proteína del estadio de esporozoíto mediante SPPS [3,4] que se denominó **SPf66** y este fue el primer enfoque de una vacuna sintética multiepitope y multiestadio contra la malaria.

Posteriormente, con el propósito de desarrollar un sistema que permitiera la administración eficiente del péptido **SPf66** se realizaron diferentes estudios basados en el proceso de encapsulación en micropartículas elaboradas con polímeros biodegradables. Esta molécula fue estudiada en diferentes sistemas de liberación elaborados con co-polímeros de PLGA con proporciones de 50:50 y 75:25. A estos sistemas se les determinó tamaño de partícula, morfología, eficiencia de encapsulación, cinética de liberación y actividad biológica, encontrando que las microesferas obtenidas presentaron un tamaño promedio de partícula de 1 μm , apropiado para la captación por macrófagos y la integridad de la molécula encapsulada se mantuvo después del proceso de microencapsulación. Además, la respuesta inmune obtenida al evaluar este sistema de entrega, se aumentó en comparación con la obtenida cuando se administró con hidróxido de aluminio y fue comparable a cuando se emulsificó la **SPf66** con adyuvante de Freund en los estudios de inmunogenicidad realizados en un modelo murino [5]. En otros estudios preclínicos de este sistema de entrega se evaluaron diferentes vías de administración como la intradérmica, subcutánea, oral e intranasal [6]. Así como también se evaluó en un modelo murino y primate no humano la administración en una única dosis de una mezcla de dos formulaciones de microesferas de PLGA obteniendo altos y duraderos títulos de anticuerpos antipéptido [7].

Considerando la eficiente encapsulación y liberación de la **SPf66** [5] y teniendo en cuenta que la nueva vacuna sintética que se está desarrollando en FIDIC está compuesta por diferentes péptidos sintéticos, se han considerado las micropartículas de PLGA como un sistema de administración prometedor para esta vacuna. Adicionalmente, este sistema de entrega se presenta como un producto liofilizado estable a condiciones normales de humedad y temperatura; evitando así las cadenas de frío que requieren las vacunas convencionales y que hacen dispendioso su transporte a zonas endémicas y/o de difícil acceso. De esta forma se permite un fácil manejo de la formulación ya que lo único que se requiere hacer es reconstituir las microesferas liofilizadas en solución salina isotónica justo antes de ser administradas.

Actualmente, la candidata a vacuna sintética contra la malaria que está siendo desarrollada en FIDIC se compone de diferentes péptidos que tienen entre 18 y 20 residuos de aminoácidos. Sin embargo, las secuencias de interés presentan diferencias en sus perfiles anfipáticos ya que entre estas hay péptidos hidrofóbicos, neutros e hidrofílicos; siendo esta diversidad la que se constituye en una dificultad para su formulación final y por lo cual se planteó la siguiente pregunta de investigación: ***¿Es el carácter hidrofóbico de un péptido sintético, un parámetro fundamental que afecta la técnica de microencapsulación en un sistema microparticulado elaborado con un co-polímero de PLGA?*** Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el presente trabajo busca establecer una relación entre la hidrofobicidad de los péptidos sintéticos y el proceso de microencapsulación basado en la formación de una doble emulsión y posterior evaporación del disolvente (W/O/W) en donde no se vea afectada la integridad de las moléculas peptídicas.

Con el propósito de sugerir una solución a la pregunta planteada se enunció la siguiente hipótesis: ***“El proceso de encapsulación de un péptido sintético, en un sistema microparticulado elaborado con un co-polímero de PLGA es afectado por el carácter hidrofóbico de la molécula peptídica”***. Para comprobar dicha hipótesis se planteó el siguiente objetivo general: ***Determinar el efecto de la hidrofobicidad de péptidos sintéticos en el proceso de microencapsulación en sistemas microparticulados elaborados a base de co-polímero de PLGA.***

Los resultados derivados de este trabajo permitieron comprobar el efecto del carácter hidrofóbico del péptido encapsulado en los atributos de las micropartículas, así como el efecto de las variaciones realizadas al proceso de encapsulación sobre el sistema microparticulado obtenido. Este estudio profundizó en el conocimiento para el desarrollo de un sistema de liberación elaborado con un co-polímero de PLGA que permita la administración de los péptidos sintéticos como IFAs de la vacuna en desarrollo.

1. Sistemas de entrega para péptidos sintéticos

1.1 Síntesis de péptidos

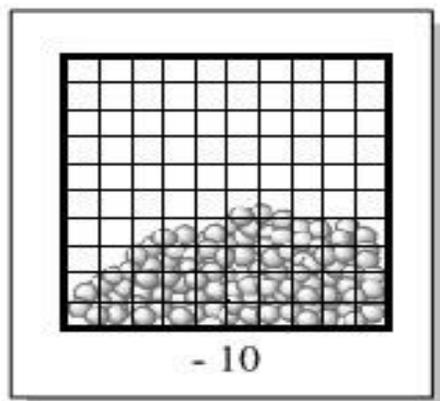
La síntesis de péptidos ha sido un área de gran desarrollo en el ámbito químico permitiendo obtener moléculas de interés biológico y en la actualidad sigue siendo un campo ampliamente estudiado. La SPPS fue propuesta en 1963 por Bruce Merrifield y por este desarrollo se le otorgó el premio Nobel de Química en 1984 [8]. Lo novedoso de esta estrategia de síntesis es que a un soporte sólido o resina insoluble e inerte químicamente se anclan covalentemente uno a uno los aminoácidos de la secuencia peptídica de interés. Por otra parte, permite hacer una rápida filtración y lavados de los subproductos solubles de las reacciones involucradas en el proceso de síntesis del péptido.

Las ventajas de emplear este soporte en SPPS a diferencia de la síntesis en solución es que permite un control apropiado del sistema resina-péptido durante la elongación de la cadena peptídica, evitando así los pasos de purificación en cada reacción de acople que afectan significativamente el rendimiento del proceso sintético y es por lo cual la SPPS permite obtener mayores rendimientos globales en la síntesis de péptidos.

A pesar de las ventajas que ofrece la SPPS esta metodología presenta algunas desventajas debido al gran número de reacciones químicas involucradas en los pasos de síntesis, durante la remoción de los grupos protectores de cadenas laterales de algunos aminoácidos y al desanclar el péptido del soporte sólido. Además, se presentan dificultades sintéticas causadas por la complejidad inherente de algunas secuencias peptídicas como son la longitud del péptido, impedimentos estéricos o fenómenos de agregación. Por lo cual el desarrollo de nuevas resinas, activadores y grupos protectores de cadenas laterales es campo de investigación activo para solventar los fenómenos de ineficiencias sintéticas.

En la síntesis de péptidos se deben seguir una serie de pasos como se muestran en la figura 1-1 donde se esquematiza la metodología general de la SPPS, la cual se lleva a cabo desde el extremo carboxilo al extremo amino de la secuencia de interés. Se parte de

Figura 1-2. Representación esquemática de los reactores empleados en la síntesis.



resina o soporte sólido se dispone dentro de un reactor fabricado con una malla de polipropileno análogo a una bolsa de té, como se muestra en la figura 1-2. Esta técnica permite realizar los lavados y filtraciones del sistema resina-péptido de una manera eficiente.

Otro desarrollo importante en la SPPS ha sido en los brazos o linkers que funcionalizan el soporte sólido. Estos son considerados de gran importancia, ya que determinan la

función química resultante en el extremo carboxilo del péptido una vez finalizado el proceso sintético.

Los péptidos se pueden sintetizar usando las estrategias t-Boc/Bzl o Fmoc/tBu y el esquema general de síntesis mostrado anteriormente en la figura 1-1 aplica para las dos estrategias. Ambas estrategias requieren de pasos sucesivos de acople, desprotección del grupo alfa-amino, posterior remoción de grupos protectores de las cadenas laterales y finalmente el desanclaje del péptido sintetizado; diferenciándose las dos técnicas en el uso de reactivos específicos en cada paso. La estrategia t-Boc/Bzl corresponde a una química ácida, donde se emplea ácido trifluoroacético (TFA) para desproteger el grupo alfa-amino y el desanclaje del péptido se realiza en dos pasos. En el primer paso se utiliza baja concentración de fluoruro de hidrógeno (HF) para la remoción de los grupos protectores de algunas cadenas laterales [10] y en el segundo paso se utiliza alta concentración de HF para liberar la cadena peptídica de la resina.

Por el contrario, en la estrategia Fmoc/tBu la remoción del grupo protector del alfa-amino se realiza con una solución de piperidina en N,N-dimetilformamida mientras que la desprotección de grupos protectores de cadenas laterales y el desanclaje final del péptido se lleva a cabo en un solo paso, empleando en la mayoría de los casos un coctel de TFA, agua, triisopropilsilano y etanoditiol. Los péptidos seleccionados para este estudio se sintetizaron siguiendo la estrategia t-Boc/Bzl y más adelante en el apartado de metodología serán explicadas al detalle las condiciones empleadas durante el proceso de síntesis.

El péptido modelo **SPf66** empleado en este estudio corresponde a la primera vacuna sintética desarrollada contra la malaria y fue sintetizado siguiendo la estrategia t-Boc/Bzl. Este antígeno está compuesto de 45 residuos de aminoácidos derivados de proteínas de los estadios merozoíto y esporozoíto del *P. falciparum*, la cual contiene epítopes de una proteína de membrana del estadio de merozoíto (MSP1) correspondiente al fragmento de 83 kDa y dos fragmentos de la proteína RESA de 55 y 35 kDa, además del motivo de unión PNANP de la proteína de circumsporozoíto (CS) empleada como espaciador entre los fragmentos mencionados [11]. La primera aproximación de esta vacuna sintética contra la malaria **SPf66** y que fue sintetizada en FIDIC se adsorbió en Alhydrogel y al ser probada en humanos mostró una eficacia del 39 % en Colombia, 55 % en Venezuela y 66 % en Ecuador. Cabe mencionar que la eficacia fue menor al realizarse los estudios clínicos en países de África (Tanzania 31 % y Gambia 8 %) y de Asia (Tailandia -9 %) [12–17], esto pudo deberse a que en estos estudios emplearon una SPf66 sintetizada y polimerizada con metodologías diferentes a las empleadas con la molécula obtenida en la FIDIC.

1.1.1 Índice de GRAVY

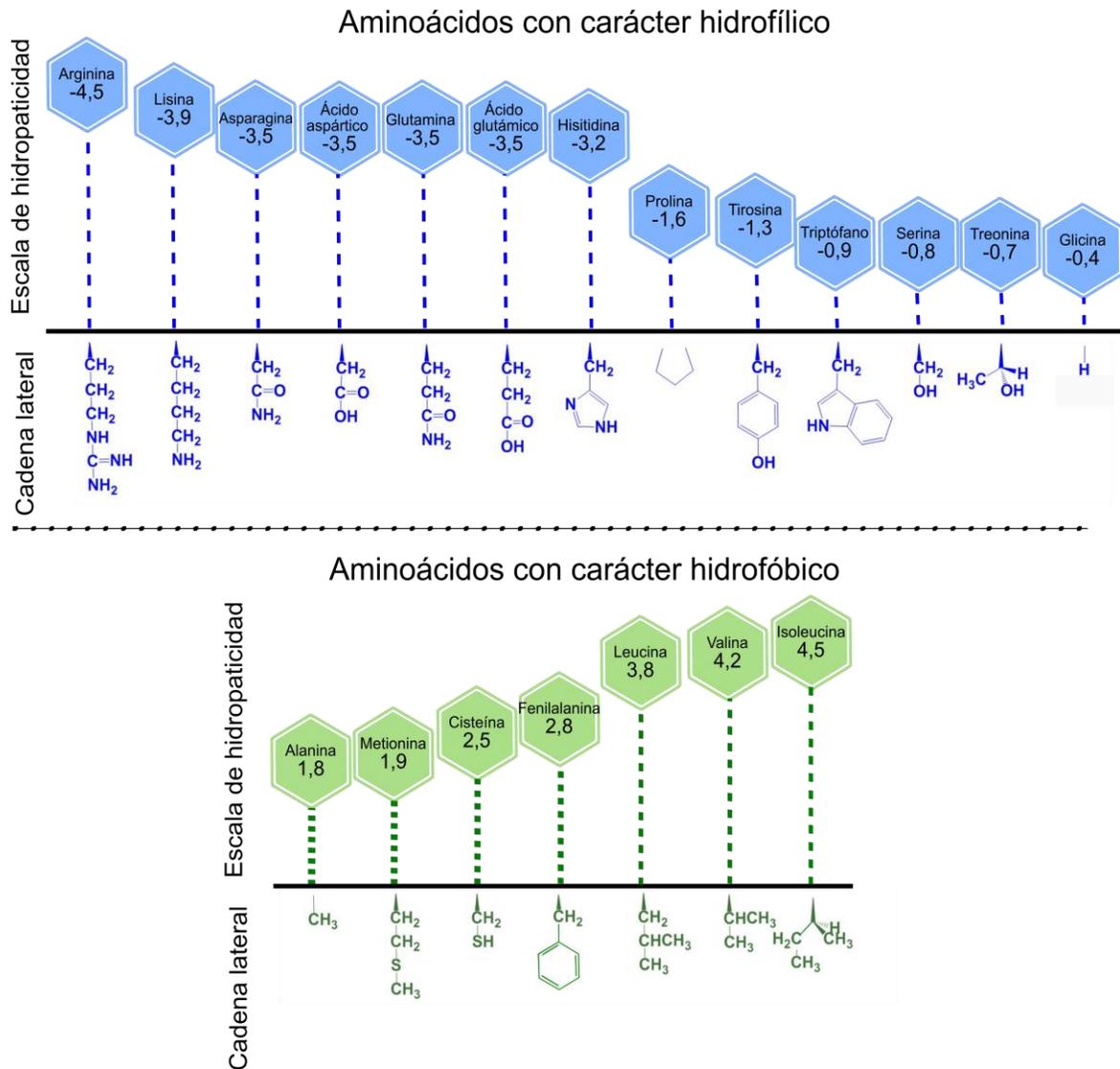
Con el fin de analizar cómo se distribuyen los péptidos sintetizados en términos de su hidropaticidad se determinó el índice de GRAVY (IG) para diferentes secuencias peptídicas considerando que este índice está determinado por la secuencia y su composición de aminoácidos y que a su vez podría tener un efecto en el proceso de microencapsulación.

El índice de GRAVY se determina a partir de una escala de hidropatía en la que a cada aminoácido se le atribuye un valor que refleja su hidrofiliidad e hidrofobicidad relativa según el algoritmo de Kyte y Doolittle. Los valores de la escala para los 20 aminoácidos oscilan entre -4,5 a 4,5 donde estos valores se obtuvieron determinando la energía libre asociada a la transferencia de un residuo desde un disolvente acuoso a otro que imita las características del interior de una membrana citoplasmática. El valor del índice se calculó a partir de la sumatoria de los valores de hidropatía asignados a cada uno de los aminoácidos dividido entre el número de residuos de la secuencia [18].

En la figura 1-3 se muestra la escala de hidropaticidad y los valores asignados a cada uno de los aminoácidos naturales. Valores negativos en la escala indican que esos aminoácidos presentan un carácter hidrofílico y están representados en color azul, aquellos en color verde presentan valores positivos e indican un carácter hidrofóbico.

Como se puede observar en la representación de las cadenas laterales, los aminoácidos hidrofóbicos generalmente presentan una cadena lateral alifática, mientras que la mayoría de los hidrofílicos presentan grupos funcionales ionizables en sus cadenas laterales.

Figura 1-3. Escala de hidropaticidad y representación de la cadena lateral de los 20 aminoácidos naturales [18].



En cuanto al significado del índice de GRAVY, un valor negativo indica que la secuencia evaluada tiene propiedades hidrofílicas similares al de una proteína globular, mientras que un valor positivo indica que la secuencia evaluada tiene propiedades hidrofóbicas y es análoga a una proteína transmembranal.

1.2 Microencapsulación

Existen diferentes técnicas para la elaboración de sistemas a base de PLGA entre las cuales están las de emulsión-evaporación, las de formación *in situ* de micropartículas, separación de fases, técnicas de fusión, fluidos supercríticos y secado por pulverización, entre otras [19]. En la tabla 1-1 se muestran las técnicas más empleadas para la obtención de estos sistemas de las cuales hay dos metodologías que se destacan en la elaboración de sistemas microparticulares, una es la de separación de fases y la otra es la de evaporación/extracción del disolvente.

Tabla 1-1. Técnicas más empleadas para la microencapsulación de IFAs en co-polímeros de PLGA.

Técnica	Especificaciones y ventajas <i>Características del IFA.</i>	Desventajas	Ref
Emulsión-evaporación del disolvente	Emulsión sencilla (O/W) Controlar tamaño de partícula final <i>Soluble en la fase orgánica</i> <i>Moléculas insolubles en agua</i>	Baja eficiencia de carga Liberación incompleta	[20,21]
	Doble emulsión (W/O/W) Controlar tamaño de partícula final con métodos de homogenización <i>Se incorpora en la primera fase acuosa</i> <i>Péptidos o moléculas pequeñas</i>	Proceso de emulsificación puede afectar la integridad de la molécula Baja eficiencia de carga debido a solubilidad en la fase externa Liberación incompleta	[5,22]
	Dispersión (S/O/W) <i>Dispersión en la disolución del polímero</i>	Pérdida del IFA por solubilidad en la fase acuosa	[23,24]
Separación de fases	Inducida por adición de un no-solvente o cambio de temperatura Moderada eficiencia de encapsulación <i>IFA se disuelve o suspende en la fase</i>	Trazas del no-solvente en el producto final Fenómenos de agregación de partículas	[25,26]
Secado por atomización	Atomización de la disolución o dispersión del IFA a contracorriente de un flujo de gas caliente Fácilmente escalable, proceso sencillo <i>Estable térmicamente</i>	Degradación del IFA por temperatura de secado Aglomeración del sistema obtenido Equipo especializado	[27,28]

La metodología de separación de fases o coacervación es un método donde se disuelve el polímero en un solvente orgánico y la molécula de interés es disuelta en agua para formar una emulsión; seguidamente se induce la separación de fases al adicionar un no-solvente a esta mezcla. Este agente no-solvente propicia la formación de un coacervado que es una fase con alto contenido del polímero. Sin embargo, las gotículas de coacervado son muy blandas en esta etapa, razón por la cual se adiciona un agente precipitante con el fin de obtener un sistema microparticulado de mayor consistencia. El agente coacervante y el precipitante deben ser miscibles con el disolvente del polímero y al mismo tiempo inmiscibles en agua.

En cuanto al método de evaporación/extracción del disolvente hay diferentes técnicas de microencapsulación. La elección de la técnica a emplear depende de las características fisicoquímicas del IFA y del polímero. Entre estas técnicas está el método de emulsión simple *O/W*, en donde la fase orgánica que contiene el polímero junto con el IFA es emulsificada en una fase acuosa externa que contiene un agente emulsificante. Finalizado el proceso de emulsificación se favorece el endurecimiento de las micropartículas por la eliminación del solvente orgánico. Hay múltiples variaciones a esta técnica como la emulsión *O/O*, en donde se emulsifican dos fases de naturaleza oleosa u orgánica completamente inmiscibles; la *S/O* en donde el IFA en estado sólido es dispersado en la fase oleosa, la cual después es emulsificada con una fase acuosa.

Además de las técnicas mencionadas anteriormente están los métodos de emulsión múltiple; entre estos se destaca el método de la emulsión agua/aceite/agua (*W/O/W*) que proporciona la ventaja de encapsular IFAs hidrofílicos e hidrofóbicos, entre los cuales se ha logrado encapsular eficientemente varios péptidos y proteínas [29]. El principio activo se disuelve en agua mientras que el polímero se disuelve en una fase orgánica y con ellas se prepara una primera emulsión (*W/O*) que actúa como contenedor interno del IFA, protegiéndolo de degradaciones enzimáticas u otras reacciones que afecten su integridad. Luego esta primera emulsión es homogenizada una vez más con una fase acuosa externa que contiene el agente emulsificante formando un sistema *W/O/W*. Posterior a la formación de la doble emulsión se debe favorecer la insolubilidad del polímero por evaporación del solvente orgánico y formando las micropartículas que contienen el IFA encapsulado [30,31].

Los sistemas microparticulares de PLGA obtenidos por esta metodología presentan liberaciones sostenidas en el tiempo. Hasta hace poco la encapsulación estaba restringida a moléculas pequeñas, sin embargo, el desarrollo de nuevos polímeros y nuevas metodologías de microencapsulación han generado que diferentes grupos de investigación se interesen en este campo, particularmente en la microencapsulación de péptidos sintéticos y proteínas utilizados como antígenos [32,33].

1.2.1 El polímero

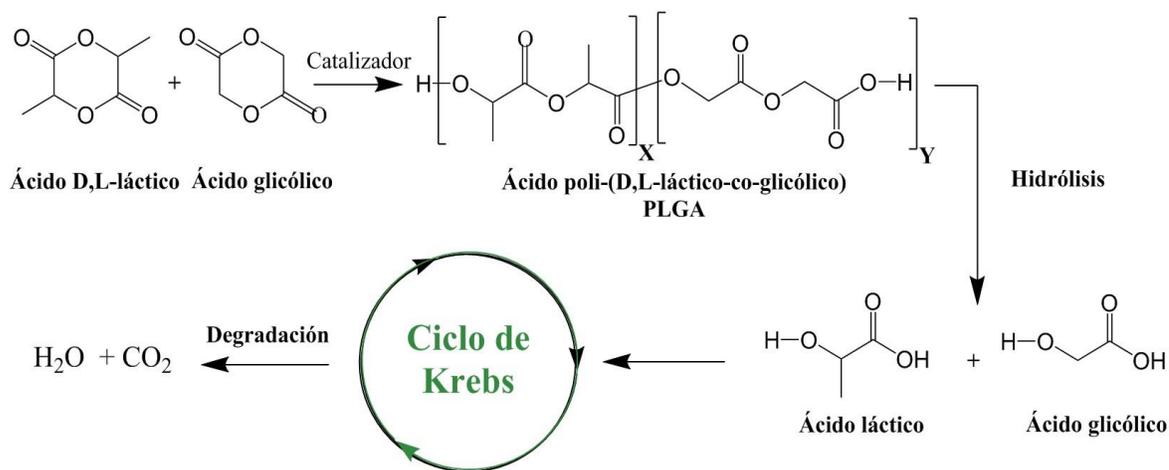
El polímero poli(láctico-co-glicólico) o PLGA es un co-polímero biodegradable, biocompatible que actualmente está siendo ampliamente estudiado para la elaboración de medicamentos [34,35]. La primera aplicación que se le dio al PLGA fue como material de sutura clínica gracias a su completa biodegradación *in vivo* y desde ahí investigadores alrededor del mundo han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de emplearlo en implantes, prótesis o en sistemas de liberación de IFAs [36]. Siendo objeto de estudio en las áreas de investigación clínica y de ciencia básica que buscan desarrollar continuamente nuevas aplicaciones para este material en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, cáncer, en el campo de la ingeniería de tejidos y durante las últimas dos décadas ha sido estudiado en el área de sistemas de entrega de vacunas [37], razón por la cual se seleccionó este polímero como material base para la elaboración de micropartículas cargadas con péptidos sintéticos.

El PLGA es un polímero sintético tipo poliéster que se puede obtener por diferentes rutas sintéticas entre las que se destacan la de policondensación lineal de los hidroxácidos, la cual genera co-polímeros con pesos moleculares inferiores a 10,000 Da. Y la que se da por medio de la apertura del anillo de las lactonas correspondientes a los dímeros cíclicos en presencia de catalizadores a condiciones controladas de temperatura y presión con la que se obtienen PLGA de altos pesos moleculares [38,39]. Además, se debe tener en cuenta que la secuencia de los monómeros que conforman el co-polímero está directamente relacionada con el hinchamiento y la erosión del mismo [40].

La figura 1-4 muestra de manera general el proceso de síntesis y degradación completa de este biomaterial. El proceso de degradación se da por la ruptura hidrolítica generada por el contacto con fluidos acuosos; durante la hidrólisis del enlace éster el polímero se degrada hasta sus unidades monoméricas generando ácido láctico y glicólico. Que

posteriormente son metabolizados por el organismo vía ciclo de Krebs donde son degradados hasta dióxido de carbono y agua [41], razón por la cual este biomaterial no presenta toxicidad en el organismo y ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en humanos [34].

Figura 1-4. Síntesis a partir de los dímeros cíclicos y degradación del co-polímero de PLGA [42].



Existe una gran diversidad en los tipos de PLGA disponibles comercialmente que se diferencian en la relación de los monómeros que lo componen, se denota en primer lugar la proporción de ácido láctico seguido por el valor correspondiente al contenido de ácido glicólico. Los co-polímeros más empleados en investigación son de proporción 50:50 y 75:25, sin embargo, se pueden encontrar en el mercado diferentes proporciones para fines más específicos. De estos ejemplos, el primero tiene la misma proporción de ácido láctico y glicólico, y el segundo tiene mayor proporción de ácido láctico. Así mismo, el polímero se puede seleccionar en función de su peso molecular y según la funcionalización del grupo terminal que puede ser de tipo ácido o éster. Todos estos parámetros determinan la velocidad de degradación del material y por tanto se deben escoger adecuadamente según el tipo de liberación que se requiera. Es necesario tener en cuenta que a mayor proporción de ácido láctico o a mayor peso molecular se requerirá más tiempo para la degradación de este material [42].

De acuerdo con lo anterior, entre los dos tipos de PLGA más empleados el 50:50 se degrada a una mayor velocidad que su contraparte el PLGA 75:25, que contiene mayor proporción de ácido láctico. Otra propiedad de este material para tener en cuenta es la temperatura de transición vítrea (T_g) la cual está directamente relacionada con el peso

molecular y es determinada por la cantidad de ácido láctico, donde a mayor proporción de este monómero el valor de Tg incrementa y generalmente el valor de Tg para estos copolímeros es superior al de la temperatura corporal [34,42]. En cuanto a su solubilidad, estos polímeros son solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua, aunque son degradados por la acción hidrolítica sobre el enlace éster.

En resumen, las propiedades del PLGA de ser biodegradable, biocompatible, diferentes proporciones, variedad de pesos moleculares y funcionalidad química determinan la cinética de degradación han hecho que este material sea ampliamente estudiado y utilizado en el desarrollo de sistemas de entrega de liberación controlada de numerosos IFAs.

1.2.2 Micropartículas de PLGA

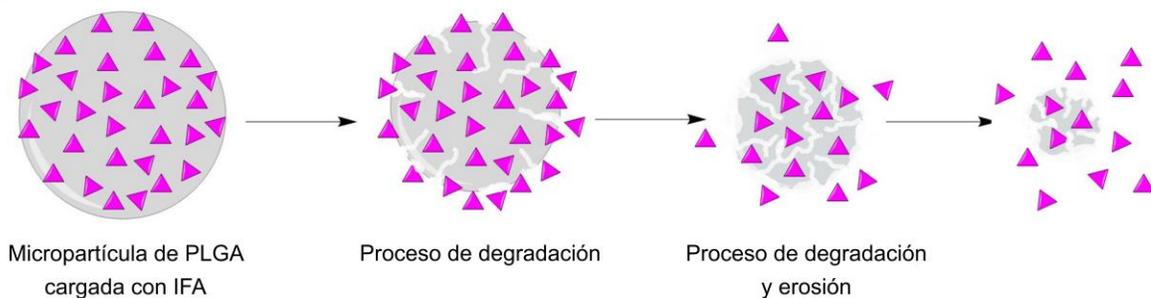
Existen diferentes tipos de sistemas de entrega que se usan como vehículos para administrar gran variedad de IFAs y dependiendo de la distribución del principio activo en el biomaterial se obtiene un sistema matricial o de reservorio. Para el primer caso, el componente activo se encuentra distribuido a lo largo de la matriz y en el segundo la molécula de interés está en el centro rodeado por una capa de biomaterial.

Entre el gran repertorio de tipos de sistemas de entrega están los liposomas, virosomas, ISCOMs (Immune stimulating complexes), VLPs (Virus-like particles) o de tipo particulado ya sea de materiales poliméricos de origen natural o sintético, entre otros [43–47]. Entre estos, los más estudiados para la administración de vacunas o inmunoterapia son las microesferas y los liposomas [48]. Los sistemas liposomales son vesículas formadas por una bicapa fosfolipídica que además cuenta con un núcleo acuoso. El principio activo se puede distribuir en la superficie, intercalarse en la bicapa o puede estar atrapado en el núcleo, sin embargo, este sistema presenta recurrentes problemas de estabilidad.

En cuanto a las microesferas como un sistema matricial estas pueden ser elaboradas a partir de materiales naturales (albumina, quitosano, alginato, entre otros) o sintéticos (Poliacrilamida, policaprolactona, poli láctico-co-glicólico, etc.) para la liberación de un gran número de IFAs [49,50]. Para estos sistemas microparticulados la liberación del componente activo se da mediante procesos de degradación y/o erosión del material.

Con respecto a las microesferas como sistemas microparticulares a base de PLGA, estas han sido ampliamente estudiadas en el desarrollo de sistemas de liberación de una gran variedad de componentes activos como moléculas de DNA, RNA, factores de crecimiento, péptidos, proteínas y moléculas convencionales [32,33,51–55]. La principal ventaja de este biomaterial es que además de que se puede realizar una administración local o dirigida el sistema protege la integridad de las moléculas encapsuladas evitando su degradación enzimática, permitiendo una liberación controlada del componente activo y en algunos casos permite direccionar la entrega del contenido del sistema a una célula en específico [56].

Figura 1-5. Mecanismo general de degradación y erosión de una micropartícula de PLGA durante la liberación del IFA.



La liberación del IFA de un sistema microparticulado a base de PLGA se muestra en la figura 1-5 y ocurre cuando se da el fenómeno físico de erosión de la micropartícula, que a su vez propicia un fenómeno químico de degradación del polímero [44]. El proceso de degradación tiene lugar cuando la partícula entra en contacto con fluidos acuosos, donde la difusión de agua hacia el interior de la micropartícula genera la hidrólisis del enlace éster, favoreciendo la formación de los monómeros de los ácidos correspondientes. En este caso, el principio activo que está adsorbido sobre la superficie del sistema es liberado a medida que se da el mecanismo de degradación.

En esta etapa de degradación el ambiente ácido generado dentro del sistema favorece la autocatálisis del polímero durante la erosión de la partícula. En este punto se genera una matriz altamente porosa que permite la difusión de los oligómeros hacia el exterior a través de los canales de la micropartícula, generando una pérdida en la masa del PLGA y liberando el IFA por difusión a través de los poros hasta que se da la completa degradación del polímero [57].

1.3 Caracterización de sistemas microparticulares

Con el fin de determinar si los sistemas microparticulares obtenidos por el método de doble emulsión- evaporación del disolvente pueden ser empleados como sistema de liberación se deben evaluar varios parámetros que permitan caracterizar los sistemas en referencia a su tamaño, forma, carga y eficiencia de encapsulación, perfil de liberación *in vitro* e integridad de la molécula encapsulada. Y así determinar si el sistema elaborado cumple con los requerimientos planteados en la investigación para ser empleado como un sistema de liberación prolongado de vacunas basadas en péptidos sintéticos.

La caracterización del tamaño de partícula de las microesferas de PLGA se realiza en la mayoría de los casos por la técnica de dispersión de luz y difracción de luz láser (DLS por sus siglas en inglés). Esta técnica permite determinar el tamaño promedio e índice de polidispersidad de la muestra analizada. Estos dos parámetros están determinados principalmente por el tiempo y por la intensidad de homogenización durante el proceso de preparación. Sin embargo, la concentración del emulsificante se debe tener en cuenta ya que a mayor concentración hay una disminución del tamaño debido a que se evita la coalescencia entre las gotículas [55].

Teniendo en cuenta que el tamaño de partícula es un factor importante en el proceso de captación por endocitosis, en el desarrollo de un sistema de entrega para esta vacuna es muy importante asegurar que la captación del sistema sea por fagocitosis, por lo que se debe asegurar que las partículas presenten un rango de tamaño entre 0,5 μm a 10 μm [58]. Además, se debe asegurar que el tamaño de las partículas sea menor a 150 μm para que pueda ser administrado vía parenteral usando jeringas convencionales.

El potencial Z se determina por la técnica de microelectroforesis y se realiza para analizar la carga superficial de las micropartículas. Estudios en el desarrollo de vacunas han demostrado que las micropartículas de PLGA con carga superficial positiva son captadas en mayor proporción por macrófagos, debido a que hay una mayor afinidad con la membrana celular cargada negativamente favoreciendo así la captación por células dendríticas [59].

Los estudios morfológicos se realizan por microscopía electrónica de barrido (MEB) ya que este análisis da información acerca de la forma y la integridad superficial de las micropartículas permitiendo determinar si hay aglomeración entre ellas. En los estudios

morfológicos se evalúa la forma final de las partículas donde la geometría adoptada por el sistema determina el tipo de internalización celular que se va a dar. Partículas alargadas favorecen la unión a células fagocíticas pero son fagocitadas en menor proporción que las que tienen una forma esférica [60], que a su vez permiten una degradación y liberación más homogénea.

El análisis de la integridad superficial de las micropartículas permite determinar si la superficie es lisa, rugosa o porosa; características que influyen en la liberación del IFA encapsulado. En la mayoría de los casos las características morfológicas están determinadas por el proceso de microencapsulación empleado, donde los solventes y condiciones experimentales tienen un efecto directo sobre este parámetro. Estudios realizados indican que el diclorometano (DCM) al ser empleado como fase orgánica permite tener microesferas con superficies lisas, diferente de lo que ocurre cuando se emplea acetato de etilo como solvente orgánico [22].

La determinación de carga y de la eficiencia de encapsulación indican la viabilidad del sistema de entrega. Estos parámetros están expresados en porcentaje donde la eficiencia de encapsulación (EE) se refiere a la relación entre la cantidad de IFA encapsulada y la cantidad inicial del mismo. Debido a lo importantes que son los péptidos en cuanto a costos y al largo proceso de obtención, se busca que los sistemas de entrega tengan una alta EE para así no perder este activo en el proceso de elaboración del sistema de liberación. En relación con la carga (Q), esta se refiere a la cantidad de péptido adsorbido y atrapado en el interior, donde la suma de estas dos hace referencia al péptido encapsulado y está relacionada con la cantidad de activo que será administrada; por lo que al tener una alta carga la cantidad de sistema microparticulado que debe ser administrado para alcanzar una dosis efectiva deberá ser menor.

Para la determinación de estos parámetros (Q y EE) hay varias metodologías. Una de ellas requiere hacer una digestión de las micropartículas en una disolución de NaOH diluida [61,62], y están las del método de extracción, donde en primer lugar se ponen en contacto las partículas ya sea en DCM [63,64], DMSO [65] u otro solvente orgánico en el cual el PLGA sea soluble y luego se extrae la molécula encapsulada en un medio acuoso para ser cuantificada. La determinación del IFA se puede hacer mediante técnicas colorimétricas para determinación de proteínas y péptidos como el ensayo de micro BCA debido a su alta sensibilidad, versatilidad y rapidez.

Adicionalmente, es muy importante determinar el perfil de liberación *in vitro* del IFA a partir del sistema microparticulado. Debido a que este indica la manera en cómo se va a dar la liberación de la molécula y dependiendo del tipo de liberación se podrá definir si el sistema cumple con la dosificación para la cual fue diseñado. Los sistemas de entrega a base de PLGA exhiben un patrón de liberación por pasos que puede estar representado por un perfil bifásico o trifásico. En el primer caso, se da una rápida liberación inicial seguida de una liberación continua, en tanto que el perfil trifásico presenta una liberación pulsátil.

El mecanismo de liberación de las moléculas cargadas está determinado por fenómenos de difusión y erosión [66]. Durante este proceso se debe considerar que las propiedades del polímero y del péptido van a afectar la liberación, así como las posibles interacciones entre ellos y las condiciones de microencapsulación.

La liberación del IFA se da una vez inicia el proceso de degradación de la micropartícula. Este proceso se determina por el péptido que está adsorbido en la superficie y la rápida difusión de aquel que se encuentra en los poros superficiales de la micropartícula. A medida que comienza la degradación del PLGA la liberación esta mediada por procesos de erosión. La degradación del polímero ocurre por la hidrólisis del enlace éster produciendo como subproductos monómeros y oligómeros de ácido láctico-glicólico, los cuales suelen generar un microambiente ácido al interior de la partícula y puede llegar a afectar la naturaleza de la molécula encapsulada [67,68].

Por esta razón se debe caracterizar la integridad del IFA encapsulado a fin de garantizar que el sistema de entrega o el proceso de microencapsulación no afecte ninguna de las propiedades fisicoquímicas de la molécula encapsulada; razón por la cual se debe evaluar la integridad de la molécula antes de ser encapsulada y después de liberada.

2. Metodología

La metodología aquí descrita permitió cumplir con los objetivos específicos planteados que se citan a continuación:

- 1) Seleccionar y clasificar las secuencias peptídicas según su índice de hidrofobicidad.
- 2) Microencapsular cada uno de los péptidos seleccionados usando la técnica de doble emulsión- evaporación del disolvente.
- 3) Caracterizar fisicoquímicamente los sistemas microparticulados obtenidos.

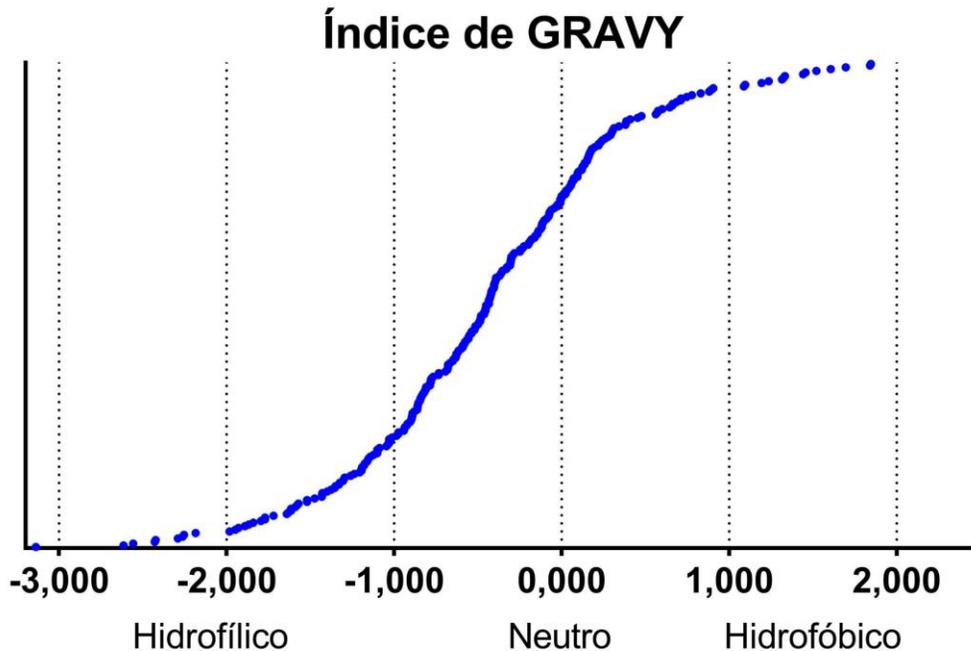
2.1 Selección y clasificación de secuencias peptídicas

La selección de las secuencias peptídicas candidatas a microencapsular se realizó a partir del Gran Promedio de Hidropatía o índice de GRAVY determinado a partir del algoritmo de Kyte & Doolittle. Se recurrió a una herramienta bioinformática que permitió categorizar los péptidos en hidrofílicos, neutros e hidrofóbicos basándose en un puntaje de índice de hidropatía asignado para cada uno de los aminoácidos.

Se analizaron 280 secuencias peptídicas tomadas de la base de datos de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia – FIDIC, representadas con un código numérico que corresponde a una serie consecutiva de cada uno de los péptidos sintetizados. Las secuencias se analizaron con la herramienta bioinformática **ProtParam** del servidor ExPaSy (<https://web.expasy.org/protparam/>, octubre de 2016).

Según el valor del índice de GRAVY determinado las secuencias se clasificaron en tres grupos: las moléculas que presentaron un IG positivo se clasificaron como hidrofóbicas, aquellas con valores negativos se clasificaron como hidrofílicas y las secuencias peptídicas cuyo valor de índice de hidropatía fue de cero se clasificaron como neutras. Lo anterior fue llevado a cabo siguiendo las pautas de clasificación según el algoritmo mencionado previamente.

Figura 2-1. Gráfica de distribución del índice de GRAVY para las secuencias peptídicas preseleccionadas.



Se realizó una distribución del valor de hidropaticidad de las 280 moléculas analizadas (figura 2-1), de las cuales 202 secuencias fueron hidrofílicas, 76 hidrofóbicas y dos neutras; que en porcentaje equivalen al 72,14 %, 27,14 % y el 0,72 % respectivamente. En primer lugar, se seleccionaron las moléculas representantes del grupo hidrofóbico debido a que están en menor proporción que las hidrofílicas. De las 76 secuencias se identificaron las más hidrofóbicas, es decir aquellas cuyos valores de IG oscilaban entre 1,520 y 1,845. De las secuencias que estaban dentro de este rango se seleccionaron 2 péptidos identificados como **40318** y **35425** ya que la predicción indicó que eran altamente hidrofóbicos con valores de IG de 1,605 y 1,845 respectivamente.

Para la selección de las secuencias hidrofílicas se eligieron dos péptidos que estuvieran dentro del mismo rango, pero de valor opuesto al de los hidrofóbicos. De los péptidos predichos como hidrofílicos dentro del intervalo establecido se seleccionaron los péptidos identificados como **1756** y **1776** con valores de índice de hidropaticidad de -1,890 y -1,770 respectivamente. Con estos cuatro péptidos seleccionados se logró tener secuencias de los dos grupos que estuvieran equidistantes entre sí, de tal manera que se pueda evaluar de manera efectiva la contribución del carácter hidrofóbico del IFA durante el proceso de encapsulación.

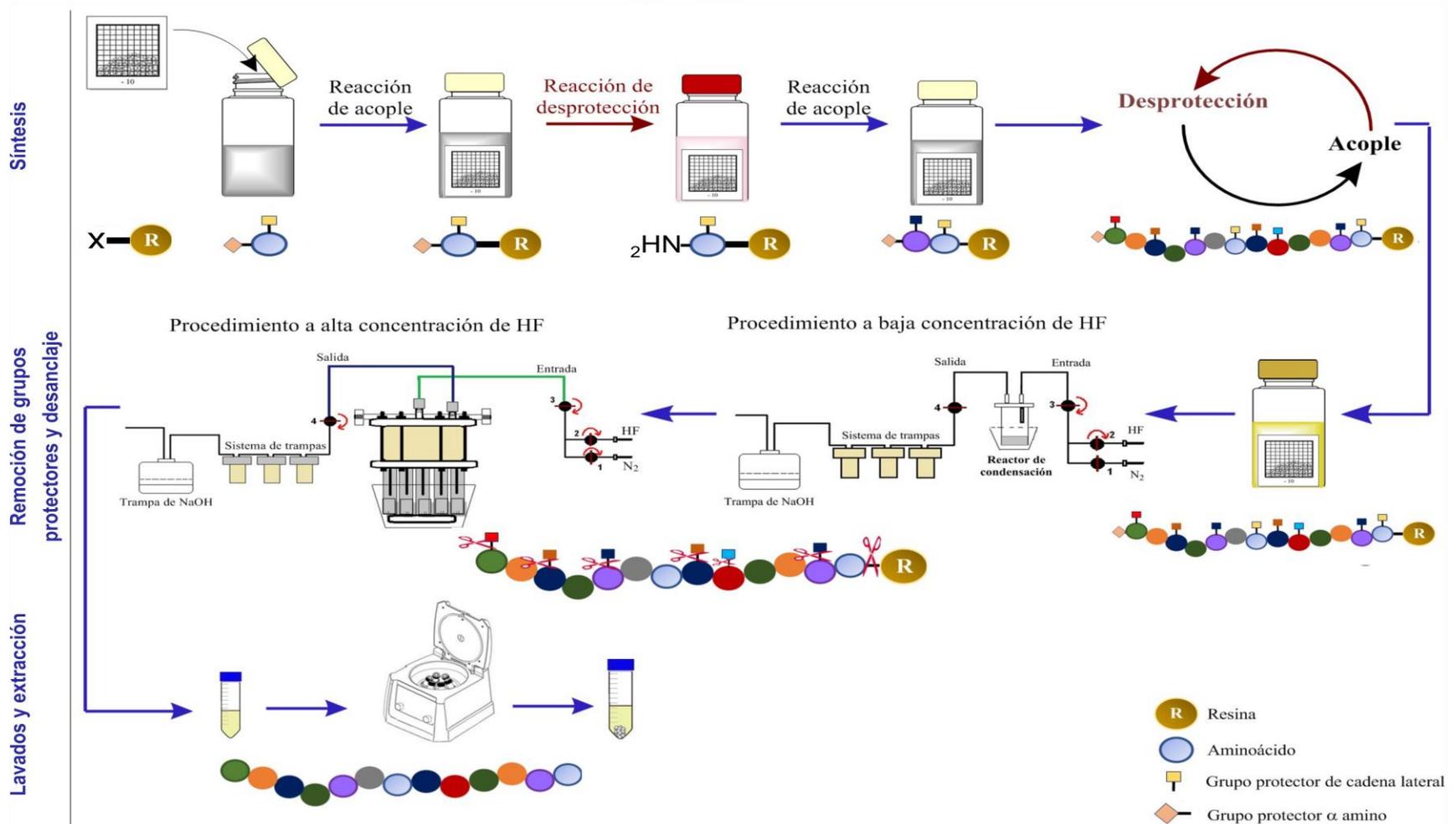
De todas las secuencias analizadas solo los péptidos **24229** y **23681** presentaron valores de 0,000 por lo cual fueron seleccionados como moléculas representantes de un tercer grupo denominado como neutro. Este último grupo refuerza el objetivo de este trabajo ya que permitió evaluar el efecto de péptidos anfipáticos además de los altamente hidrofílicos e hidrofóbicos. Adicionalmente a los 6 péptidos seleccionados se incluyó la molécula **SPf66** como péptido control del proceso de microencapsulación considerando que este péptido ya había sido encapsulado eficientemente en este tipo de sistemas de entrega.

2.2 Síntesis de las secuencias peptídicas

Los péptidos seleccionados se sintetizaron siguiendo la estrategia de síntesis de péptidos en fase sólida descrita por Merrifield [8] y modificada por Houghten [9] donde la síntesis se llevó a cabo en sentido carboxilo a amino terminal. El esquema de la figura 2-2 muestra los pasos involucrados en cada una de las etapas del proceso para obtener los péptidos sintéticos donde en la parte lateral izquierda de la figura se muestran las etapas involucradas durante la síntesis por la estrategia t-Boc/Bzl. Una vez sintetizada la secuencia de interés se removieron los grupos protectores de cadenas laterales y se desancló el péptido de la resina siguiendo los procedimientos a baja y alta concentración de HF. Finalmente se realizó la extracción del péptido y los lavados para remover los subproductos sintéticos.

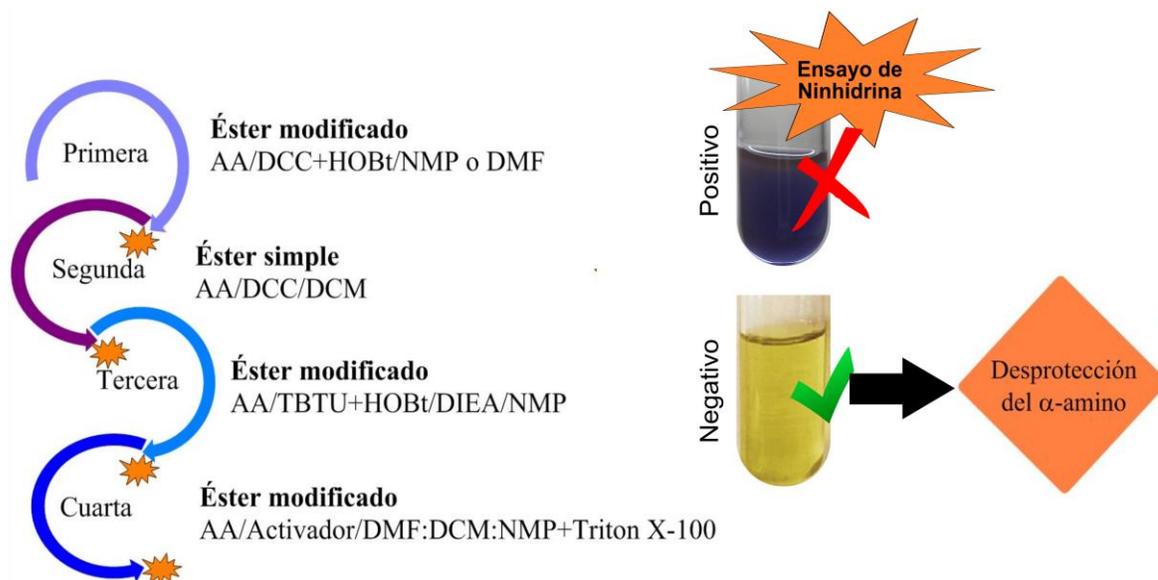
Para la síntesis de los seis péptidos seleccionados se empleó una resina MBHA de 0,53 mEq/g como soporte polimérico para la cadena peptídica en crecimiento. Los solventes orgánicos empleados para la síntesis fueron: N-metil-2-pirrolidona (NMP), N,N-dimetilformamida (DMF), isopropanol (IPA) y DCM. Los aminoácidos usados fueron L-Boc-aminoácidos protegidos en el alfa-amino con el grupo t-Boc y un grupo protector adicional en la cadena lateral para aquellos que presentan grupos funcionales que pueden reaccionar durante el proceso de síntesis como en el caso del ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln), arginina (Arg), cisteína (Cys), histidina (His), lisina (Lys), serina (Ser), triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y treonina (Thr).

Figura 2-2. Esquema del proceso de síntesis, desanclaje y extracción para la obtención de un péptido sintético por la estrategia t-Boc/Bzl.



Como reactivos activadores del grupo carboxilo se emplearon N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N-hidroxybenzotriazol (HOBt) y tetrafluoroborato de O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU).

Figura 2-3. Estrategias de activación del grupo carboxilo para la reacción de acople.



Los protocolos de síntesis de péptidos por SPPS estandarizados por el Grupo Funcional de Síntesis Química de la FIDIC plantean cuatro estrategias diferentes para la activación del grupo carboxilo del aminoácido a acoplar y se representan en la figura 2-3, en donde cada una tanto el activador del grupo carboxilo como el solvente son diferentes. La eficiencia del acople se monitoreó cualitativamente con el ensayo de ninhidrina [69] donde una coloración azul (positivo) indicó que el ciclo de acople no fue eficiente, por lo que se realizó un nuevo ciclo variando la estrategia de activación del grupo carboxilo, siguiendo el esquema planteado en la figura hasta alcanzar una coloración amarilla (negativo), la cual indicó que el acople del aminoácido alcanzó el 100 %. Posteriormente se procedió a desproteger y neutralizar el alfa-amino del aminoácido acoplado y de esta manera generar la elongación de la cadena peptídica por la formación de un enlace amida con el siguiente aminoácido de la secuencia.

Durante la síntesis se usaron 5 excesos de los reactivos correspondientes y se dejó la reacción de acople durante 1 hora independiente de la estrategia empleada y en el caso de las reacciones durante la noche (O.N. por sus siglas en inglés) el grupo carboxilo se activó usando la primera estrategia. La remoción del grupo t-Boc del alfa-aminoácido acoplado se realizó con una solución de TFA al 40 % / anisol al 0,01 % en DCM durante

30 minutos. Finalizado el tiempo de reacción, se realizaron los lavados respectivos para eliminar los residuos del reactivo de desprotección y se procedió a la neutralización del alfa-amino con una solución de N,N-diisopropiletilamina (DIEA) al 5 % en DCM.

De manera general, el proceso de síntesis de las moléculas se realizó de la siguiente manera: se hinchó la resina (0,3 g) con DCM durante 1 hora, luego se neutralizó la resina con 4 lavados de 15 minutos cada uno con una solución de DIEA al 5 %. Posteriormente, se activó el grupo carboxilo del aminoácido a acoplar siguiendo la activación descrita para la primera estrategia y se verificó la eficiencia del acople mediante el ensayo de ninhidrina. Con un resultado positivo en el ensayo se procedió a realizar un segundo ciclo de acople del aminoácido como se mencionó previamente hasta que la eficiencia del acople fue del 100 %. Según los procedimientos estándar de la FIDIC cuando en dos residuos consecutivos el ensayo de ninhidrina dio positivo después de la primera estrategia de activación del carboxilo (figura 2-3), en los acoples posteriores se procedió a aplicar las dos primeras estrategias de activación del ácido carboxílico de manera consecutiva sin realizar el ensayo de ninhidrinas entre estos.

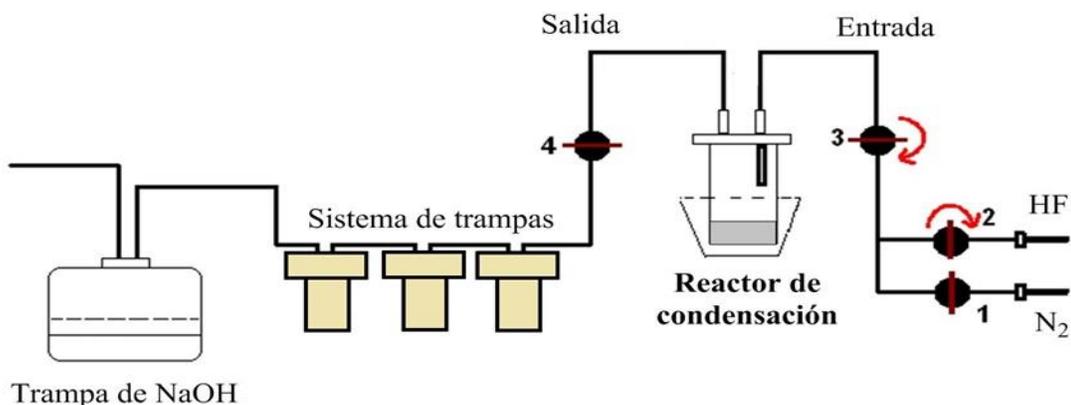
Una vez el aminoácido se acopló en su totalidad se desprotegió su grupo alfa-amino, se realizó el proceso de neutralización y se procedió a acoplar el siguiente aminoácido. Cada uno de los pasos de desprotección, neutralización y acople se realizaron de manera repetitiva de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de cada uno de los péptidos.

Finalizado el proceso sintético se seleccionó el péptido que contenía histidina en su secuencia y se sometió a un proceso adicional para hacer la remoción del grupo dinitrofenilo (DNP) de la cadena lateral de este aminoácido. Para ello se adicionó una solución de tiofenol al 20 % en DCM:DMF (1:1). La remoción de este grupo protector se siguió por el cambio en la coloración de la solución de tiofenol la cual se torna de color amarillo intenso al entrar en contacto con el grupo DNP. La solución de tiólisis se cambió cada hora hasta que la coloración de la solución permaneció traslúcida indicando que el grupo DNP fue removido. Finalizado este proceso se realizaron una serie de lavados a la resina-péptido cada uno por un minuto así: 5 veces con DCM, seguido por lavados alternados con IPA y DCM cinco con cada solvente, 10 lavados alternados entre DMF e IPA, y por último diez lavados con DCM.

Tanto el proceso de desanclaje del péptido de la resina como el de remoción de grupos protectores de cadenas laterales requirieron del uso de un sistema de condensación de

HF especializado para manipular este ácido de alta peligrosidad. Para el proceso de remoción de los grupos protectores de cadenas laterales de los aminoácidos (figura 2-4) se desprotegió el grupo alfa-amino del último aminoácido con TFA al 40 % / anisol al 0,01 % en DCM y se preparó la solución de desprotección de baja concentración de HF, constituida por dimetilsulfuro (DMS), HF y p-Cresol (65:25:10) teniendo presente la proporción de 35 mL de solución por cada 0,9 g de resina-péptido. Primero se adicionó el volumen correspondiente de DMS en el reactor de condensación, se tapó el recipiente y se conectó al sistema, se purgó la línea con nitrógeno gaseoso, abriendo la llave 1 y se verificó que no hubiera obstrucción ni fugas en la línea. Seguidamente, se procedió a abrir las llaves 2 y 3 y se mantuvo la llave 4 cerrada para asegurar que el HF condensara en el reactor que estaba sumergido en un baño de IPA/hielo seco a $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 2-4. Esquema del sistema de condensación de HF para la remoción de grupos protectores de cadenas laterales.

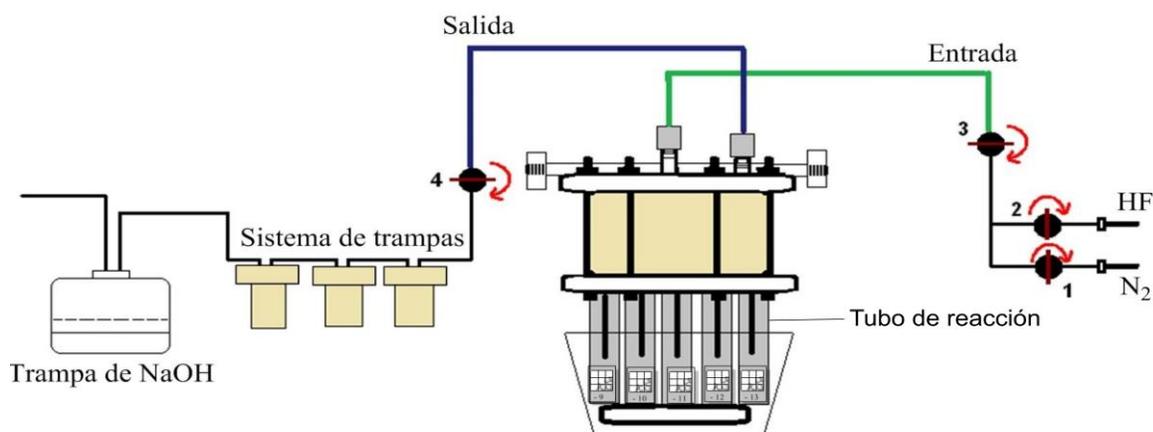


Una vez el nivel de HF alcanzó el aforo se retiró el reactor del sistema y se transfirió la solución a otro reactor que contenía las bolsas con los péptidos sintetizados donde se dejó reaccionar durante dos horas a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación constante. Una vez finalizada la reacción de remoción de grupos protectores de las cadenas laterales se desechó esta solución y se lavaron las bolsas de la siguiente manera: cinco lavados con DCM frío cada uno por un minuto, cinco lavados con IPA alternados con DCM cada uno por un minuto, cinco lavados con DMF y se finalizó el proceso realizando diez lavados con DCM cada uno por un minuto.

Para el desanclaje del péptido de la resina se empleó un sistema de condensación de HF como el que se muestra en la figura 2-5. Este sistema dispone simultáneamente de varios tubos de reacción o reactores y en cada uno de ellos se lleva a cabo el desanclaje de un

péptido. En cada reactor se introdujo una bolsa de resina-péptido y se adicionaron 120 μL de p-Cresol por cada 300 mg de resina-péptido, se ajustaron los reactores al tambor y se colocó en un baño de IPA/hielo seco a $-75\text{ }^\circ\text{C}$, se verificó que el sistema no presentara obstrucciones ni fugas en las líneas y se abrieron las llaves 2 y 3, manteniendo cerrada la llave 4 durante el proceso de condensación de HF hasta que el nivel de la solución estuvo por encima del de las bolsas.

Figura 2-5. Esquema del sistema de condensación de HF para el desanclaje del péptido de la resina.



La reacción de desanclaje se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 30 minutos a una temperatura de $-15\text{ }^\circ\text{C}$ en un baño de hielo seco e isopropanol, luego se cambió el baño por uno a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se dejó en reacción por una hora. Finalizado este tiempo se evaporó por completo el HF y para esto se abrieron las llaves 1, 3 y 4 y se inició un flujo de nitrógeno gaseoso a 40 psi. Posterior a esto, se realizó la extracción del péptido así: se adicionaron 5 mL de éter etílico frío a cada uno de los reactores, se agitó vigorosamente y la mezcla resultante se transfirió a un tubo cónico para centrifuga de 50 mL, se centrifugó a 4500 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos tratamientos a cada uno de los reactores de 2 min cada uno con 2 mL de TFA al 100 % agitando fuertemente, centrifugando y transfiriendo el sobrenadante al tubo de centrifugación. Posteriormente, se repitió el procedimiento con éter etílico frío recolectando nuevamente el sobrenadante en el tubo de centrifugación, se completó a 45 mL con éter etílico frío y se dejó a $0\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min. Finalizado este tiempo se centrifugó a 4500 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 15 mL de éter etílico, se agitó por un minuto y se centrifugó por 5 min a 4500 rpm descartando el sobrenadante. Se repitió este

último procedimiento lavando con acetato de etilo frío y agitando por 30 segundos, el precipitado se lavó dos veces más con 15 mL de éter etílico frío en cada lavado, se agitó por 2 minutos y se centrifugó a 4500 rpm entre lavados, se secó el precipitado final y se procedió a realizar la caracterización.

2.3 Caracterización de los péptidos sintéticos

La caracterización de los péptidos sintéticos antes y después de purificados se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC por sus siglas en inglés) y por espectrometría de masas Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-tof).

2.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia

Los péptidos se analizaron por RP-HPLC con el fin de determinar su grado de pureza. Para esto se empleó un cromatógrafo analítico Merck-Hitachi equipado con una columna VYDAC PROTEIN & PEPTIDE C-18 (125 x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 μ m). Los solventes de la fase móvil fueron A: agua + 0.05 % TFA y B: acetonitrilo (ACN) + 0.05 % TFA. El programa de elución convencional fue de 0-70 % de B en 45 minutos a un flujo de 1 mL/min con detección UV a 210 nm. Para el análisis, se inyectaron 80 μ L de una solución de un 1 mg/mL de cada uno de los péptidos y el análisis cromatográfico se realizó a temperatura ambiente. Los péptidos hidrofóbicos se eluyeron con un programa de 0 a 85 % de B en 55 minutos manteniendo las mismas condiciones de detección, flujo y volumen de inyección que los empleados en el sistema de elución convencional.

2.3.2 Espectrometría de masas MALDI-tof

Los análisis de espectrometría de masas de los péptidos sintetizados se realizaron por la técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz- con tiempo de vuelo (MALDI-tof por sus siglas en inglés) en un espectrómetro de masas serie microflex LRF BRUKER DALTONICS®. Para la preparación de la muestra se tomó 2,5 μ L de la solución del péptido de concentración de 1 mg/mL y se mezcló con 20 μ L de una dispersión de la matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 0.1 % TFA en AGUA:ACN 2:1 (TA). Se colocó en la placa de lectura 2,5 μ L de la muestra preparada y se realizó el análisis respectivo. Para la ionización

de la muestra se empleó un láser de nitrógeno (λ de 337 nm) a una potencia de 13,5 kV en modo reflectron.

2.3.3 Purificación de péptidos

Los péptidos se purificaron por cromatografía líquida semipreparativa de alta eficiencia en fase reversa en un cromatógrafo Merck-Hitachi L-6200A, con detector UV-VIS L-4250 y una columna RP-18 de 250 x 10 mm con tamaño de partícula de 10 μ m y detección a 210 nm. Los solventes de la fase móvil fueron A: agua + 0.05 % TFA y B: acetonitrilo + 0.05 % TFA. Para cada uno de los péptidos se elaboró un programa de elución a partir del tiempo de retención del cromatograma analítico con el que se calculó el porcentaje de ACN al cual eluyó cada péptido. Se inyectó en el equipo 1 mL de una solución del péptido de 15 mg/mL, se recolectaron fracciones durante la elución y se analizaron por espectrometría de masas MALDI-tof; seleccionando aquellas que contenían únicamente la especie de interés. Se liofilizaron y el péptido purificado fue caracterizado nuevamente como se describió en el numeral 2.3.1 y 2.3.2 de este documento.

2.4 Microencapsulación de los péptidos seleccionados

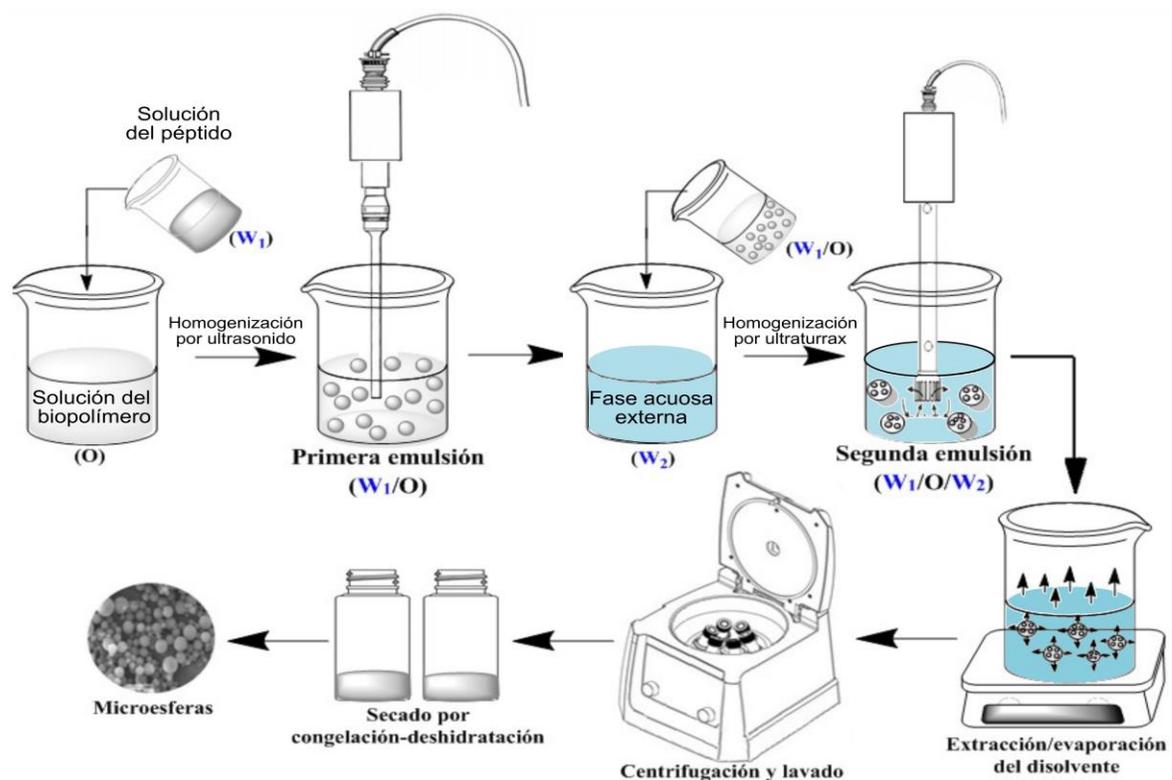
Los seis péptidos seleccionados se encapsularon siguiendo la técnica de doble emulsión- evaporación del disolvente y se incluyó la **SPf66** como molécula control para evaluar el proceso de microencapsulación. Por lo que se tomaron sus condiciones del proceso de encapsulación como protocolo estándar para el desarrollo de esta investigación, considerando que esta molécula ya había sido microencapsulada satisfactoriamente en PLGA [5,70].

La técnica de formación de una doble emulsión con posterior evaporación del solvente orgánico y las diferentes etapas involucradas en este proceso se muestra en la figura 2-6 y se describen a continuación. Primero se prepararon dos disoluciones, una de polímero y otra del péptido. Para la disolución del polímero denominada la fase orgánica (O), se disolvió el PLGA en DCM y se mantuvo en un baño a 0 °C y para la fase acuosa interna (W_1) se disolvió el péptido en agua desionizada. Se tomó la disolución del péptido con una micropipeta, se colocó dentro de la fase orgánica y se homogenizó por ultrasonido

formando la primera emulsión (W_1/O). Todo este proceso se realizó dentro de un baño de agua-hielo para mantener la temperatura del sistema a 0 °C.

Posteriormente, se introdujo la primera emulsión dentro de una fase acuosa al 8 % de alcohol polivinílico (PVA) denominada fase acuosa externa (W_2) y se homogenizó con un Ultraturrax hasta que se formó la doble emulsión ($W_1/O/W_2$). Esta nueva emulsión se dejó en agitación mecánica y se le adicionó gota a gota una solución de isopropanol al 2 % en agua con el fin de favorecer la extracción-evaporación del disolvente orgánico y la consecuente insolubilización de las micropartículas. Transcurrida esta etapa, las micropartículas se recolectaron realizando una serie de procesos alternos de centrifugación y lavados con agua desionizada, luego se llevó a un proceso de secado por congelación-deshidratación (liofilización) y se obtuvieron las microesferas en estado sólido.

Figura 2-6. Esquema general del proceso de obtención de microesferas por la técnica de doble emulsión-evaporación del disolvente.



Teniendo en cuenta las diferencias en el carácter hidrofóbico de los péptidos a microencapsular y con el propósito de evaluar este efecto en el proceso de microencapsulación además de las características de los sistemas obtenidos, se decidió

realizar el proceso de microencapsulación mediante tres estrategias diferentes para los péptidos **1756** y **1776** (Grupo Hidrofilico), **24229** y **23681** (Grupo Neutro), **35425** y **40318** (Grupo Hidrofóbico) y de la **SPf66** (Molécula control del proceso de microencapsulación).

La primera metodología fue la técnica de doble emulsión-evaporación del disolvente bajo las condiciones establecidas para microencapsular la **SPf66**, esta primera metodología se denominó **Total (T)**. Para esto se trabajó con la totalidad de la fase interna acuosa (W_1) independiente de la solubilidad del péptido en el agua desionizada. Para formar la primera emulsión se incluyó la disolución del péptido y/o la dispersión del péptido en los casos de solubilidad parcial. La segunda metodología fue una modificación de la primera estrategia, la cual se denominó **Fracción Soluble (FS)** y en la cual se siguieron las mismas condiciones usadas que en la metodología Total, pero se trabajó únicamente con la Fracción Soluble del péptido como fase interna acuosa (W_1) para formar la primera emulsión. La tercera metodología fue la estrategia que se denominó **Sólido (S)** en donde no se trabajó con una fase interna acuosa (W_1), es decir no se formó una primera emulsión, sino que se llevó a cabo una dispersión del péptido sólido en la fase orgánica.

2.4.1 Estrategia Total

La obtención de los sistemas microparticulados por la estrategia **Total (T)** siguió el procedimiento adaptado por Rosas *et al* [5]. Para cada uno de los péptidos se elaboraron dos lotes de micropartículas los cuales se prepararon de la siguiente manera: Para la formación de la primera emulsión (W_1/O) se pesó aproximadamente 62,5 mg de PLGA 50:50 (viscosidad inherente: 0,58 dL/g con terminación éster), se disolvieron en 1,3 mL de DCM y se mantuvo esta disolución en un baño a 0 °C. Aparte, se pesaron 6,25 mg del péptido y se disolvieron en 123 μ L de agua destilada, desionizada y filtrada manteniendo una relación péptido:PLGA de 1:10. Esta disolución se agitó vigorosamente por 5 minutos, se dispersó en la fase orgánica que estaba a 0 °C y se aplicó un pulso de ultrasonido (Sonic Dismembrator Fischer Scientific) durante 1 minuto a 55 % de amplitud. La emulsión formada (W_1/O) se dispersó en 6,5 mL de disolución acuosa de PVA al 8 % (W_2) y se homogeneizó durante 5 minutos a 10,000 rpm usando un homogeneizador (Ultraturrax T-18) para formar la doble emulsión ($W_1/O/W_2$). A este sistema se le adicionaron gota a gota 6,5 mL de una solución acuosa de IPA al 2 % y se dejó en agitación por 1 hora para inducir la insolubilización del material polimérico que forma las micropartículas. La suspensión

resultante se centrifugó y se lavó tres veces con 5 mL de agua destilada, desionizada y filtrada. Finalmente, las micropartículas se resuspendieron en 2 mL de agua, se congeló el sistema y se sometió al proceso de liofilización (Labconco Corporation). Adicionalmente, se elaboraron microesferas vacías utilizando el mismo procedimiento en donde la disolución del péptido fue reemplazada por agua destilada.

2.4.2 Estrategia Fracción Soluble

La modificación realizada al protocolo del cual surge la metodología denominada **Fracción Soluble (FS)** consistió en realizar un procedimiento previo con la disolución y/o dispersión del péptido en agua. Para ello en un tubo eppendorf de peso conocido exactamente se pesó la cantidad de péptido correspondiente y se disolvió en la cantidad indicada de agua destilada, desionizada y filtrada. Se agitó mediante vortex por 20 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. Finalizado este proceso se transfirió todo el sobrenadante a otro tubo eppendorf de peso conocido exactamente. Estas muestras fueron rotuladas como Fracción Soluble y los tubos eppendorfs que contenían el pellet como fracción insoluble de cada péptido. Todas las fracciones obtenidas se liofilizaron para determinar por peso la cantidad de péptido soluble e insoluble que fue incluido en el proceso de microencapsulación.

Para el proceso de microencapsulación por la metodología **FS** se tomó el péptido-FS y se disolvió en el volumen indicado de agua destilada, desionizada y filtrada para constituir la fase W_1 y se siguió exactamente el procedimiento utilizado para la estrategia **Total**.

2.4.3 Estrategia Sólido

Para esta estrategia **sólido (S)**, se tomó la cantidad pesada del péptido (6,25 mg) y se adicionó directamente a la cantidad correspondiente de disolución de PLGA en DCM, generando para este caso una dispersión de tipo sólido en una fase orgánica (S/O) a diferencia de la emulsión primaria (W_1/O) de las estrategias **Total y Fracción Soluble**. La dispersión se mantuvo a 0 °C y se homogenizó por ultrasonido siguiendo las especificaciones descritas en el numeral 2.4.1. Este sistema (S/O) se dispersó en 6,5 mL de una disolución acuosa de PVA al 8 % (W), se homogenizó durante 5 min a 10,000 rpm usando un homogeneizador (Ultraturrax, T-18) formando la dispersión del sólido en una

emulsión (S/O/W). A partir de este momento, se siguió exactamente el procedimiento utilizado para las estrategias **Total y Fracción Soluble**.

2.5 Caracterización de los sistemas microparticulares

2.5.1 Tamaño

La determinación de la distribución del tamaño se realizó en un equipo Nano-Zetasizer (Malvern) del grupo SILICOMOBA del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. De forma breve, se pesó 1,5 mg de micropartículas de cada uno de los sistemas obtenidos y se resuspendieron en 100 μ L de agua destilada y filtrada. En la celda de medición se adicionó 1 mL de agua destilada y se adicionaron 10 μ L de la dispersión de micropartículas en suspensión, se aplicó un pulso de ultrasonido por diez segundos al 30 % de la amplitud y se determinó la distribución del tamaño y el índice de polidispersidad de la muestra a 25 °C. Cada medición se realizó por triplicado.

2.5.2 Forma

El aspecto superficial de los 42 sistemas microparticulares se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) en el Centro de Microscopía de la Universidad de los Andes. De forma breve, se tomó 1,5 mg de cada sistema microparticulado y se resuspendió en 150 μ L de agua destilada, se aplicó 10 μ L de la suspensión en un portamuestra que se secó al vacío y se recubrió con oro usando un equipo Metalizador Dentom Vacuum Desk IV. Luego de este proceso se analizó cada una de las muestras en el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6490LV. Para una visión más detallada de la superficie cada micrografía se tomó a 10 kV x 15,000 aumentos.

2.5.3 Carga y eficiencia de encapsulación

El péptido encapsulado se determinó como la suma de la cantidad de péptido adsorbido sobre la superficie de las micropartículas o de rápida liberación y la cantidad del péptido atrapado en el interior de la micropartícula. Para esto se pesaron 2,9 mg de micropartículas que se redispersaron en 1 mL de PBS (pH 7,2) y se dejó en agitación durante 1 día.

Trascurrido este tiempo la muestra se centrifugó (12,000 rpm, por 5 min), se retiraron 800 μ L del sobrenadante y se le determinó la concentración del péptido adsorbido o de liberación rápida por el método del ácido bicinónico usando el kit para la determinación de proteínas microBCA (Pierce, EE.UU.) [5]. Para cuantificar el péptido atrapado en el interior de las micropartículas se tomó el pellet o sedimento al cual se le adicionó 700 μ L de una disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,2 M, se agitó vigorosamente la muestra hasta completa digestión de las micropartículas, se neutralizó la solución con 100 μ L de HCl 1 M y se determinó la cantidad de péptido usando el mismo método colorimétrico.

La carga (Q) expresada en porcentaje se calculó a partir de la relación entre la cantidad determinada del péptido encapsulado y la cantidad de micropartículas (Ecuación 1). La carga teórica (Qt) también expresada en porcentaje se definió como la cantidad teórica de péptido a microencapsular dividida entre la cantidad teórica del polímero y del péptido (Ecuación 2). La eficiencia de encapsulación (EE) expresada en porcentaje se calculó como la relación entre la cantidad de péptido encapsulado sobre la cantidad péptido teórico (Ecuación 3).

$$Q = \frac{\text{Cantidad del péptido encapsulado}}{\text{Cantidad de micropartículas}} * 100 \% \quad \text{Ecuación 1}$$

$$Qt = \frac{\text{Cantidad inicial de péptido}}{\text{Cantidad inicial (PLGA+péptido)}} * 100 \% \quad \text{Ecuación 2}$$

$$EE = \frac{Q}{Qt} * 100 \% \quad \text{Ecuación 3}$$

2.5.4 Potencial Z

El potencial Z para cada una de las muestras obtenidas se determinó mediante la técnica de microelectroforesis utilizando el mismo equipo Nano-Zetasizer pero usando una celda DTS1060. De forma breve, se dispersaron 1,5 mg de micropartículas en 1 mL de agua destilada, se aplicó un pulso de ultrasonido por diez segundos al 30 % de la amplitud, se tomó la muestra con una jeringa de 1 mL y cuidadosamente se introdujo la muestra en la celda evitando la formación de burbujas dentro de la misma. Se determinó el potencial Z a 25 °C y cada medición se realizó por triplicado.

2.5.5 Liberación *in vitro* de los péptidos microencapsulados

Para este estudio se pesaron 7,5 mg de cada una de las micropartículas a evaluar y se dispersaron en 1,5 mL de medio de liberación (PBS pH 7,2 + 0,01 % azida de sodio). Las muestras se dejaron durante todo el estudio en incubación a 37 °C en un agitador orbital (Benchmark, Incu-Shaker 10 L). A intervalos de tiempo establecidos se centrifugó la muestra durante 20 minutos a 12,000 rpm en una microcentrifuga (IEC MicroMax), se recolectó la mitad del volumen del sobrenadante y se reemplazó con 750 µL de medio fresco. En el sobrenadante recolectado se determinó la cantidad de péptido liberado mediante el ensayo colorimétrico, empleando el kit de microBCA.

2.5.6 Integridad de los péptidos

La integridad de los péptidos se evaluó por comparación entre el análisis de control de calidad por EM-MALDI-tof realizados a cada uno de los péptidos antes y después del proceso de microencapsulación. Con el propósito de analizar el péptido después del proceso de encapsulación se tomaron 5 mg de cada sistema microparticular y se adicionó 1,0 mL de DCM, se dejó en agitación por 24 horas hasta disolución completa del material polimérico. Para realizar la extracción del péptido del sistema se adicionó 1,0 mL de agua y se dejó en agitación constante durante 24 h. La muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 minutos y se retiró la fase acuosa. Se repitió el paso de extracción una vez más y se analizó la presencia e integridad del péptido por EM MALDI-tof como se mencionó en el numeral 2.3.2.

3. Resultados y discusión

3.1 Selección y clasificación de las secuencias peptídicas según su índice de hidropaticidad

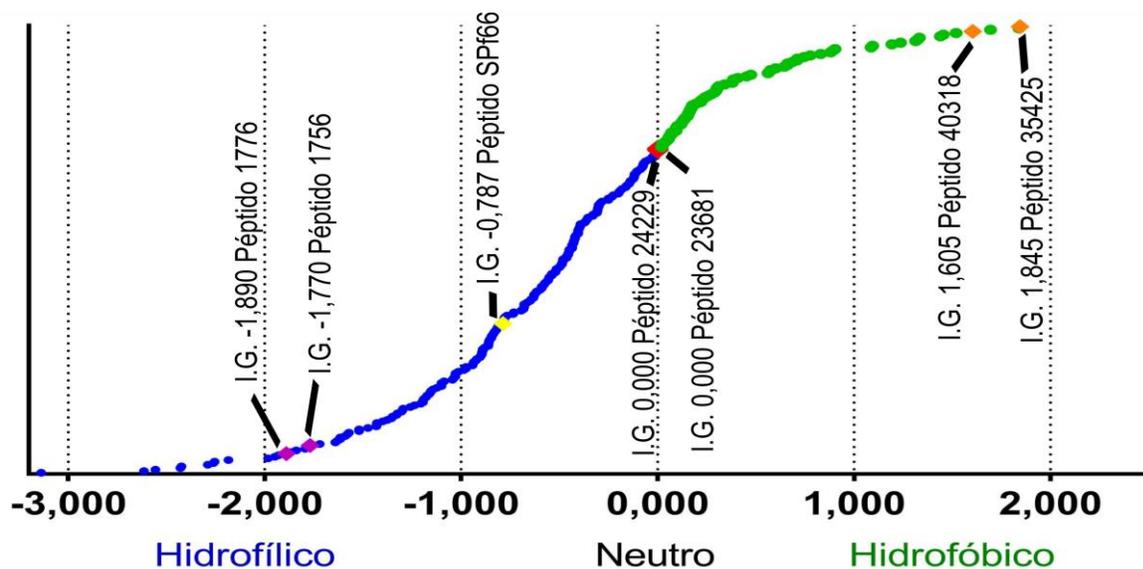
De la base de datos de secuencias peptídicas de la FIDIC se preseleccionaron 280 secuencias derivadas de proteínas relevantes de *P. falciparum* que contenían entre 18 y 20 residuos de aminoácidos. A este grupo de secuencias se le determinó el índice de GRAVY con el fin de evaluar la distribución de acuerdo con su valor de hidropaticidad. De las secuencias analizadas el 72,14 % fueron de carácter hidrofílico, el 27,14 % correspondieron a secuencias hidrofóbicas y tan solo el 0,72 % fueron neutras. A partir de esta primera aproximación y teniendo en cuenta la distribución de los péptidos según su índice de hidropaticidad se establecieron tres grupos. En el grupo hidrofílico se clasificaron todos aquellos péptidos que tuvieran un valor negativo en el índice de GRAVY, el neutro incluyó los dos péptidos cuyo valor de IG fue 0,000 y el grupo hidrofóbico se estableció con todas las secuencias con valores positivos.

Derivado de esta clasificación y teniendo en cuenta el criterio de selección que se mencionó en el numeral 2.1 y considerando que este trabajo se planteó como un estudio base para buscar la relación entre el carácter hidrofóbico de los péptidos sobre el proceso de microencapsulación en sistemas de PLGA, se seleccionaron además del péptido control que se utilizó como referente en el proceso de microencapsulación dos secuencias representativas de cada grupo. Se consideró que con la selección de 2 secuencias por grupo se obtendrían importantes y suficientes resultados ya que por cada péptido se elaborarían 6 sistemas siendo 12 por cada uno de los grupos establecidos. Además, la cantidad de sistemas elaborados junto con las diferentes estrategias de encapsulación empleadas darían una importante cantidad de información para desarrollar el objetivo general de este trabajo. En cuanto a la selección de los péptidos de cada grupo se

consideró adecuada ya que en primer lugar estas secuencias estaban en puntos estratégicos de la escala de hidrofobicidad que reflejaban los índices de hidropaticidad más opuestos y permitirían ver un efecto marcado de la hidrofobicidad del péptido en el proceso de microencapsulación.

En la gráfica de distribución del índice de GRAVY se reportan los 7 péptidos base de este estudio (figura 3-1) donde hacia el extremo más positivo de la escala y resaltados en naranja están los péptidos **40318** y **35425** clasificados como hidrofóbicos y seleccionados como representantes de este grupo. Para el grupo hidrofílico se seleccionaron los péptidos **1756** y **1776** resaltados en morado y que presentaron un índice de GRAVY con valores opuestos al de los hidrofóbicos en la zona negativa de la escala. De esta manera los representantes de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos están lo más equidistantes posible a un punto neutro, que es el valor determinante para el siguiente y último grupo de clasificación. Los péptidos **24229** y **23681** señalados en rojo se seleccionaron como los representantes del grupo neutro ya que presentaron un valor de IG de 0,000. Debido a la composición de aminoácidos de estas secuencias y a los parámetros contemplados por el algoritmo en el que se basa la herramienta bioinformática utilizada, estos péptidos no presentan un carácter hidropático determinado y se puede considerar que tienen un comportamiento neutro en comparación con los otros dos grupos establecidos. Finalmente, en esta misma figura esta resaltada en amarillo la distribución del péptido control **SPf66** que se clasificó como un péptido hidrofílico ya que se le determinó un IG de -0,787.

Figura 3-1. Distribución de los péptidos seleccionados según su índice de hidropaticidad.



En la **Tabla 3-1** se muestra la información correspondiente a cada uno de los péptidos seleccionados. Los datos consolidados en esta tabla indican la clasificación asignada a cada péptido según el índice de GRAVY, el código numérico que identifica a cada una de las secuencias y la proteína de *P. falciparum* de la cual se derivan. Además, muestra la secuencia de cada molécula en la cual los aminoácidos en negrilla y resaltados en gris, son los que contribuyen a incrementar el índice hidrofóbico de la secuencia al tener valores positivos en la escala de hidropaticidad de Kyte and Doolittle, también se reporta el valor del índice de GRAVY determinado por la herramienta bioinformática Protparam y el peso molecular (PM) teórico de cada una de las secuencias.

Tabla 3-1. Clasificación de las secuencias según su índice de GRAVY.

Hidrofílico	Péptido	1756	Proteína	Pf EBA 175
	Secuencia	K F N E L D K K K Y G N V Q K T D K K I	PM teórico (Da)	2425,0
	Índice GRAVY	-1,770	Proteína	Pf EBA 175
	Péptido	1776	PM teórico (Da)	2390,0
Neutro	Secuencia	G N D N T I K E K R E H I D L D D Y S K	Proteína	Pf MSP 1
	Índice GRAVY	-1,890	PM teórico (Da)	2329,4
	Péptido	23681	Proteína	Pf HRP2
	Secuencia	L I K N F L K G K K V R K F G Y I Y I	PM teórico (Da)	2135,8
Hidrofóbico	Índice GRAVY	0,000	Proteína	Pf ETRAMP 2
	Péptido	24229	PM teórico (Da)	2286,8
	Secuencia	S A F D D N L T A A N A M G L L I L N K R	Proteína	Pf S23
	Índice GRAVY	0,000	PM teórico (Da)	2405,4
Control	Péptido	40318	Proteína	Pf 35K
	Secuencia	M K L S K I L Y F F A A L L A L N F I A	PM teórico (Da)	4851,0
	Péptido	35425	Proteína	Pf 35K
	Secuencia	V F F T I I F T I L I L T I Y N L M K T	PM teórico (Da)	4851,0
Control	Índice GRAVY	1,845	Proteína	Pf 35K
	Péptido	SPf66	PM teórico (Da)	4851,0
	Secuencia	C G D E L E A E T Q N V Y A A P N A N P Y S L F Q K E K M V L P N A N P P A N K K N A G C		
	Índice GRAVY	-0,787		

En esta tabla se pueden observar que las secuencias clasificadas como hidrofílicas a partir del índice de GRAVY tienen muy pocos residuos de carácter hidrofóbico; para la secuencia del péptido **1756** solo un 20 % de los aminoácidos fueron de carácter apolar y para **1776** fueron apenas del 15 %. También se muestra como a medida que se asciende en la escala de índice de hidropaticidad para las otras secuencias seleccionadas el número de aminoácidos hidrofóbicos incrementa. Donde los péptidos neutros **23681** y **24229**

presentaron un 42 % y 50 % respectivamente de aminoácidos hidrofóbicos. De igual manera, el incremento en el índice de hidrofobicidad es aún mayor para los péptidos **40318** y **35425** clasificados como hidrofóbicos, donde la proporción de aminoácidos de carácter apolar es del 70 % y 65 % respectivamente. En cuanto al péptido **SPf66** empleado como control del proceso de microencapsulación el porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos fue del 35 % situándolo en un punto intermedio en la escala entre los péptidos hidrofílicos y los neutros, siendo este valor congruente con un índice de GRAVY hidrofílico de -0,787. Estos resultados ratificaron que la herramienta bioinformática utilizada permitió una adecuada clasificación de los péptidos donde las secuencias con carácter hidrofóbico presentaron una mayor cantidad de aminoácidos con valores positivos en la escala de hidropaticidad.

La clasificación predicha de los péptidos se pudo verificar mediante cromatografía analítica RP-HPLC, en donde además de usar este análisis para determinar el grado de pureza de las moléculas sintetizadas, se utilizó para determinar el porcentaje de acetonitrilo al cual fueron eluidos cada uno de los péptidos analizados. Se encontró que los péptidos hidrofílicos eluyeron a los menores porcentajes de acetonitrilo, donde el péptido **1756** eluyó al 23,16 % y el **1776** al 23,88 %. Como era de esperarse los péptidos neutros eluyeron a porcentajes mayores de ACN que el de los dos péptidos anteriores, ya que tenían una mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos en su secuencia, siendo del 38,34 % para el péptido **24229** y del 31,45 % para su homólogo el péptido **23681**. Los péptidos hidrofóbicos a su vez fueron eluidos a los más altos porcentajes de ACN siendo del 65,63 % para el péptido **40318** y del 83,43 % para el **35425**. Con respecto al péptido **SPf66** este eluyó con un porcentaje del 36,91 % de ACN, indicando que esta molécula es de carácter hidrofílica al presentar porcentajes de elución entre los observados para los péptidos hidrofílicos y los neutros. Estos resultados están de acuerdo con los fundamentos de la técnica de análisis RP-HPLC, donde la elución se da en función de la hidrofobicidad del analito: a menor polaridad del analito hay mayor afinidad por la fase estacionaria y mayores tiempos de retención que requieren mayores porcentajes del solvente orgánico para eluir dicho analito [71].

Por lo tanto, estos resultados cromatográficos obtenidos en donde los péptidos hidrofílicos eluyeron a bajos porcentajes de ACN, los neutros presentaron valores intermedios y por último las secuencias hidrofóbicas eluyeron a mayores porcentajes de ACN, están en concordancia con la clasificación realizada por la herramienta bioinformática empleada. Lo

que demostró que en lo referente a la hidrofobicidad de los péptidos el programa Protparam es una herramienta útil, rápida y eficaz para predecir el índice de hidropaticidad.

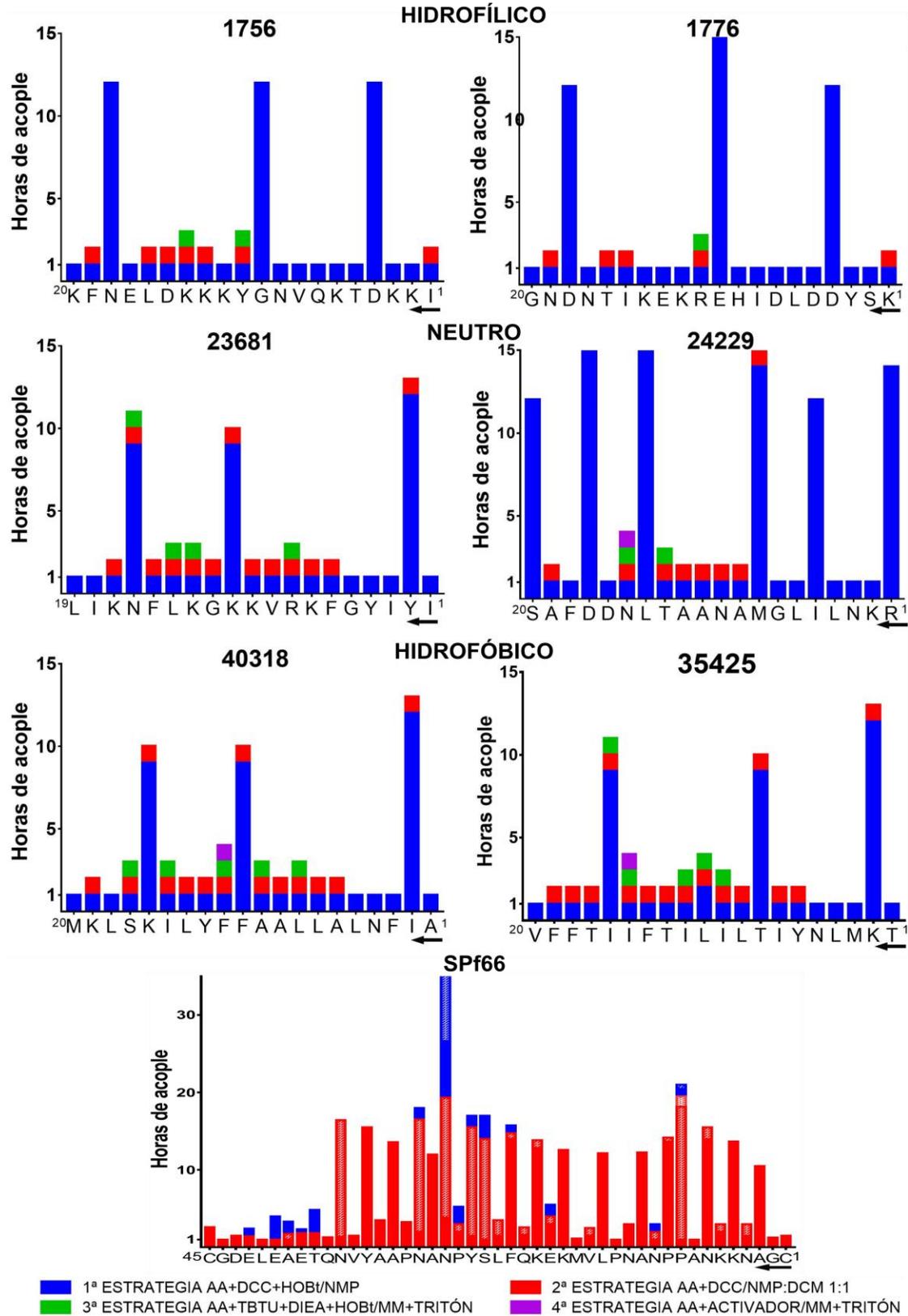
3.2 Síntesis de las secuencias peptídicas

Las secuencias seleccionadas se sintetizaron por SPPS siguiendo la estrategia t-Boc/Bzl. Los perfiles sintéticos de cada uno de los siete péptidos se muestran en la figura 3-2 donde el sentido de la síntesis de extremo carboxilo al extremo amino está representado con una flecha, siendo el aminoácido de la derecha el primero en ser acoplado y el de la izquierda el último.

Los perfiles sintéticos de los péptidos hidrofílicos (**1756** y **1776**) son similares entre ellos, en cuanto a que la mayoría de los aminoácidos acoplaron en el primer ciclo de acople donde se usó la estrategia de activación del grupo carboxilo como éster modificado (barra azul). Entre un 20-30 % de los aminoácidos requirieron de un segundo ciclo de acople, para lo cual el grupo carboxilo se activó como éster simple (barra roja) y entre el 5 al 10 % de los residuos de aminoácidos requirieron de un tercer ciclo de acople en donde se activó el grupo carboxilo con sales de uronio (barra verde) para alcanzar el 100 % de acople del aminoácido. Los perfiles sintéticos de estos dos péptidos indicaron que no se presentaron mayores dificultades sintéticas y es posible observar que no se requirió de incrementos significativos en cuanto al número de ciclos de acople ni aumento en los tiempos de reacción.

Ambos perfiles muestran el comportamiento estándar que se presenta en la SPPS donde normalmente después del décimo residuo se requieren de dos a tres ciclos de acople para alcanzar el 100 % de la reacción, sin que esto sea señal de dificultades sintéticas propias e inherentes a algunas secuencias de difícil síntesis. Al presentarse secuencias difíciles, se requiere de alternativas como son incremento en el número de excesos estequiométricos, mayores tiempos de reacción, cambios de activadores clásicos del grupo carboxilo como es el uso de sales de fosfonio o formación de anhídridos simétricos, entre otros. En general los resultados sintéticos de estas moléculas concuerdan con la información reportada que indica que hay disminución en la eficiencia del acople a medida que aumenta el número de los residuos de aminoácidos en la cadena peptídica [72].

Figura 3-2. Perfiles sintéticos de los péptidos a microencapsular.



Durante la SPPS es normal observar que cuando se presentan varios residuos del mismo aminoácido seguidos independiente del tamaño o carga se presenten dificultades en el acople. Si bien la secuencia del péptido hidrofílico **1756** presentó 3 residuos seguidos del mismo aminoácido de gran volumen ($^{14}\text{KKK}^{12}$) la síntesis de este péptido no presentó mayor dificultad para acoplar estos residuos.

Los tiempos de reacción se manejaron de acuerdo con los protocolos estándar de SPPS, 1 hora para cada ciclo y para las reacciones O.N. permitidas se usó la primera estrategia de activación del grupo carboxilo a fin de evitar favorecer reacciones colaterales debido a los prolongados tiempos de reacción.

Los perfiles sintéticos correspondientes a los dos péptidos neutros muestran que para el péptido **24229** un 60 % de los residuos acoplaron con la primera estrategia de activación del grupo carboxilo y el 40 % restante requirió de ciclos adicionales de acople en los cuales se varió la estrategia de activación siguiendo los protocolos sintéticos. La síntesis de este péptido presentó dos residuos de difícil acople, el primero en el residuo de metionina donde a pesar de que este aminoácido se dejó en reacción O.N., este tiempo de reacción no fue suficiente para alcanzar el 100 % del acople y por lo tanto requirió de un segundo ciclo. El segundo fue en el residuo 15 (Asn-15) que requirió de cuatro ciclos de reacción para completar el acople de este aminoácido. Aparte de estos dos casos el perfil sintético indicó que no se presentaron mayores dificultades sintéticas.

El perfil sintético del segundo péptido neutro fue muy similar al de su homólogo ya que este también requirió aplicar estrategias de acople adicionales en los residuos que se dejaron en reacción durante la noche y en donde en cuatro residuos se requirió de un tercer ciclo de acople. Sin embargo, independiente de esto en cada perfil se identificó una región que requirió de mínimo dos ciclos de acople la cual se presentó entre los residuos 8 al 15 para **24229** y entre los residuos 6 al 17 para **23681**. Esto teniendo en cuenta los protocolos estandarizados de SPPS por el grupo funcional de síntesis química de la FIDIC que indican que una vez dos residuos consecutivos requieran de dos o más ciclos de acople se debe aplicar inmediatamente un segundo ciclo, sin realizar prueba de ninhidrina entre ellos; esta estrategia se ve claramente en los perfiles sintéticos cuando se observa un mínimo de dos ciclos de acople en varios residuos de aminoácidos seguidos.

Esta misma tendencia se observó para los péptidos hidrofóbicos donde se recurrió a aplicar dobles acoples sin hacer el ensayo de ninhidrinas entre ciclos entre los residuos 6 al 19

para el péptido **35425** y entre 6 al 17 para **40318**. Para estos dos péptidos la estrategia de dobles acoples comenzó en la región altamente hidrofóbica que presentan estas secuencias y adicionalmente cada péptido requirió en 5 de sus residuos tres ciclos de acople, los cuales en su mayoría fueron en aminoácidos de carácter hidrofóbicos. Sin embargo, es importante recalcar que a pesar de que estos péptidos presentan unas regiones altamente hidrofóbicas determinadas por la alta composición de aminoácidos con valores positivos en la escala de hidropaticidad estas no afectaron significativamente la síntesis de los péptidos, ya que no todos los aminoácidos hidrofóbicos requirieron de mayores tiempos y ciclos de acoples.

Lo anterior permite deducir que los ciclos adicionales se deben principalmente a una característica comúnmente observada durante la SPPS, donde las eficiencias de acople disminuyen en la medida en la que la cadena peptídica va en crecimiento. Estas ineficiencias pueden deberse a varios factores entre los cuales está la secuencia, por lo que la síntesis de péptidos es secuencia dependiente, tener varios residuos del mismo aminoácido seguidos, por impedimentos estéricos de grupos protectores voluminosos que impiden la reacción entre el grupo amino de la cadena peptídica en crecimiento con el carboxilo activado del aminoácido entrante. Finalmente, debido a la formación de agregados entre cadenas adyacentes las cuales disminuyen la solvatación de la cadena peptídica dificultando la eficiencia del acople durante la síntesis.

Además de la estrategia ya mencionada de dobles acoples para solventar las ineficiencias mencionadas durante el proceso de síntesis se recurrió a otras técnicas como es el incremento estequiométrico a 5 o más excesos de los reactivos involucrados en cada estrategia de activación del grupo carboxilo, para de esta manera aumentar la concentración del aminoácido a acoplar y así favorecer la reacción con el alfa-amino del último residuo acoplado, variar la reactividad del grupo carboxilo entrante en forma de éster modificado, éster simple o usando sales de uronio y en algunos casos se adicionó al medio de acople un aditivo como el Tritón X-100, el cual es capaz de romper las interacciones débiles que permiten la formación de agregados [73]. Todo esto de acuerdo con los protocolos estándares de síntesis del grupo funcional de síntesis química de la FIDIC.

De manera general los resultados de los péptidos hidrofílicos **1756** y **1776** indicaron que la síntesis no presentó mayores inconvenientes, ya que los tiempos de acoples fueron los normales en una síntesis de péptidos y la mayoría de los aminoácidos se acoplaron con la

primera estrategia de activación del grupo carboxilo como éster modificado. En cuanto a los péptidos clasificados en el grupo de neutros **23681** y **24229**, los perfiles sintéticos mostraron algunos puntos de ineficiencia comparado con los dos péptidos anteriores, ya que un mayor número de residuos requirieron de hasta tres estrategias diferentes de activación, pero los tiempos de acople se mantuvieron dentro de lo esperado. Y con respecto a los dos péptidos hidrofóbicos **35425** y **40318**, la cantidad de residuos que requirieron de hasta tres ciclos de acople fue mayor que para los otros dos grupos establecidos de síntesis.

Por último, en la figura 3-2 se muestra el perfil sintético del péptido control **SPf66** que tiene 45 residuos de aminoácidos. Una característica importante de esta molécula es que contiene residuos de cisteína en sus extremos carboxilo y amino los cuales se usaron para polimerizar el péptido vía puentes disulfuro después de sintetizado, desanclado y purificado. La molécula resultante de este proceso de oxidación fue la que se empleó en este estudio como molécula control del sistema de microencapsulación. Cabe mencionar que este péptido fue sintetizado y polimerizado previo a este estudio siguiendo un protocolo especialmente estandarizado para esta molécula, la cual fue evaluada en años anteriores en varios estudios preclínicos y clínicos como candidata a una vacuna contra la malaria [74,75].

Cabe resaltar que este perfil sintético permitió confirmar como en la SPPS a medida que se da la elongación de la cadena peptídica se van acumulando las dificultades sintéticas propias de la SPPS. Esto se observa claramente en el perfil sintético de la **SPf66** en el caso de las regiones repetidas (PNANP) donde se observó que independientemente que sean la misma secuencia cada residuo de aminoácido requirió diferentes tiempos de reacción y estrategias de activación del grupo carboxilo, siendo la segunda región (³⁰PNANP²⁶) la que requirió más ciclos de acople comparada con la primera región (¹⁴PNANP¹⁰).

3.3 Caracterización fisicoquímica de los péptidos crudos y puros

De aquí en adelante se reporta el péptido antes de purificar como péptido **crudo** y como péptido **puro** a aquel que ha sido sometido a un proceso de purificación por RP-HPLC.

Todos los péptidos crudos y puros involucrados en este estudio fueron caracterizados por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa RP-HPLC y por espectrometría de masas MALDI-tof. En todos los análisis se evidenció una señal cromatográfica mayoritaria que al ser analizada por la técnica complementaria de espectrometría de masas correspondió al peso molecular de cada secuencia.

Inicialmente los péptidos crudos se caracterizaron con el fin de determinar la integridad y pureza de las moléculas sintetizadas. Posteriormente, los péptidos se purificaron por cromatografía semi-preparativa en fase reversa, con el fin de garantizar que las características de los sistemas microparticulares se deban al efecto del péptido *per se* y no a alguna impureza que este contenga.

Tabla 3-2. Consolidado del rendimiento del proceso de síntesis y de purificación por péptido y especificaciones de los péptidos puros.

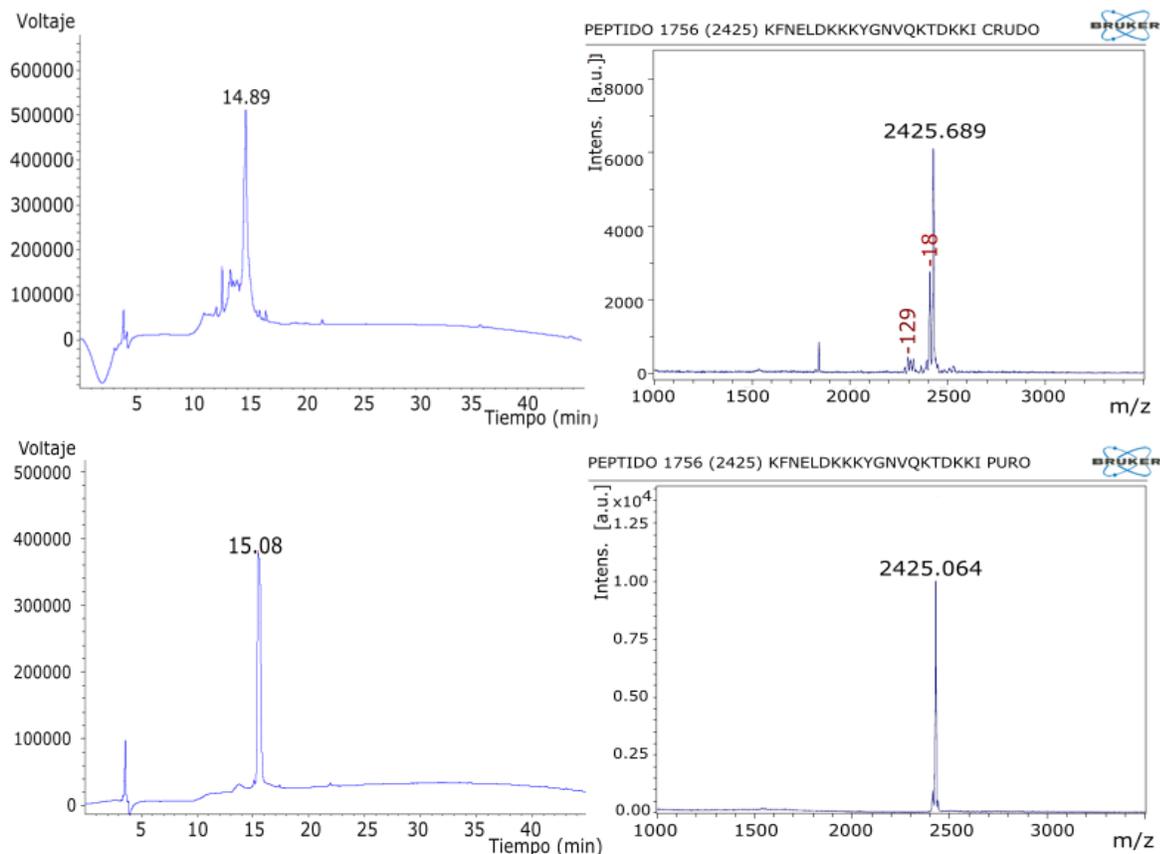
	Péptido	Rendimiento síntesis (%)	Rendimiento Purificación (%)	Tiempo de retención (min)	Peso molecular experimental (Da)
Hidrofílico	1756	44,35	21,26	15,08	2425,064
	1776	45,39	17,24	15,46	2390,759
Neutro	24229	38,44	10,99	24,60	2135,203
	23681	42,94	15,17	20,19	2329,550
Hidrofóbico	40318	24,76	10,21	42,16	2286,777
	35425	31,77	11,67	53,81	2405,033
Control	SPf66	N.D.	16,43	21,84	4851,003

Los rendimientos del proceso sintético para cada péptido están reportados en la tabla 3-2. Estos rendimientos de síntesis de los péptidos estuvieron dentro de los valores esperados para la sustitución de la resina empleada (0,53 mEq/g). Además, estos valores indicaron que ninguno de los seis péptidos correspondió a una secuencia con dificultades sintéticas a pesar de que los valores determinados para los péptidos hidrofóbicos fueron ligeramente menores a los obtenidos en los otros dos grupos. Adicionalmente, en esta tabla se consolidan los valores de tiempo de retención y el peso molecular experimental de los péptidos puros expresada en Daltons (Da). Donde los tiempos de retención de los péptidos

hidrofílicos fueron menores que los de los péptidos neutros y estos a su vez fueron menores que los de los péptidos hidrofóbicos, lo que a su vez se correlaciona con un incremento en los porcentajes del solvente orgánico al cual fue eluido cada péptido a medida que aumentó su hidrofobicidad. La pureza determinada por el área bajo la curva por RP-HPLC de los péptidos purificados fue superior al 95 % y con respecto a los valores de los pesos moleculares experimentales, correspondieron a los esperados para cada secuencia. De esta manera, se determinó la integridad de los péptidos sintetizados y purificados para ser evaluados en el posterior proceso de encapsulación.

En las figuras 3-3 a 3-8 se muestran los resultados de la caracterización de los péptidos crudos (parte superior) y de los péptidos puros (parte inferior), específicamente en el lado izquierdo se reportan los perfiles cromatográficos y al lado derecho se muestra el espectro de masas correspondiente. Los análisis obtenidos para el péptido hidrofílico **1756** se muestran en la figura 3-3. En el cromatograma del crudo se observa una especie principal con un tiempo de retención de 14,89 minutos (correspondiente a la señal de 2425,689 Da en el espectro de masas del crudo). Sin embargo, las señales con pesos moleculares inferiores se deben a reacciones colaterales presentadas durante la síntesis del péptido donde la señal marcada con (-18 Da), generalmente se atribuyen a reacciones de deshidratación de la amida (Q o N) a su nitrilo correspondiente por la deshidratación de la carboxamida durante la activación del aminoácido, siendo esta la reacción colateral principal que se puede presentar en los residuos de Asn y Gln [76].

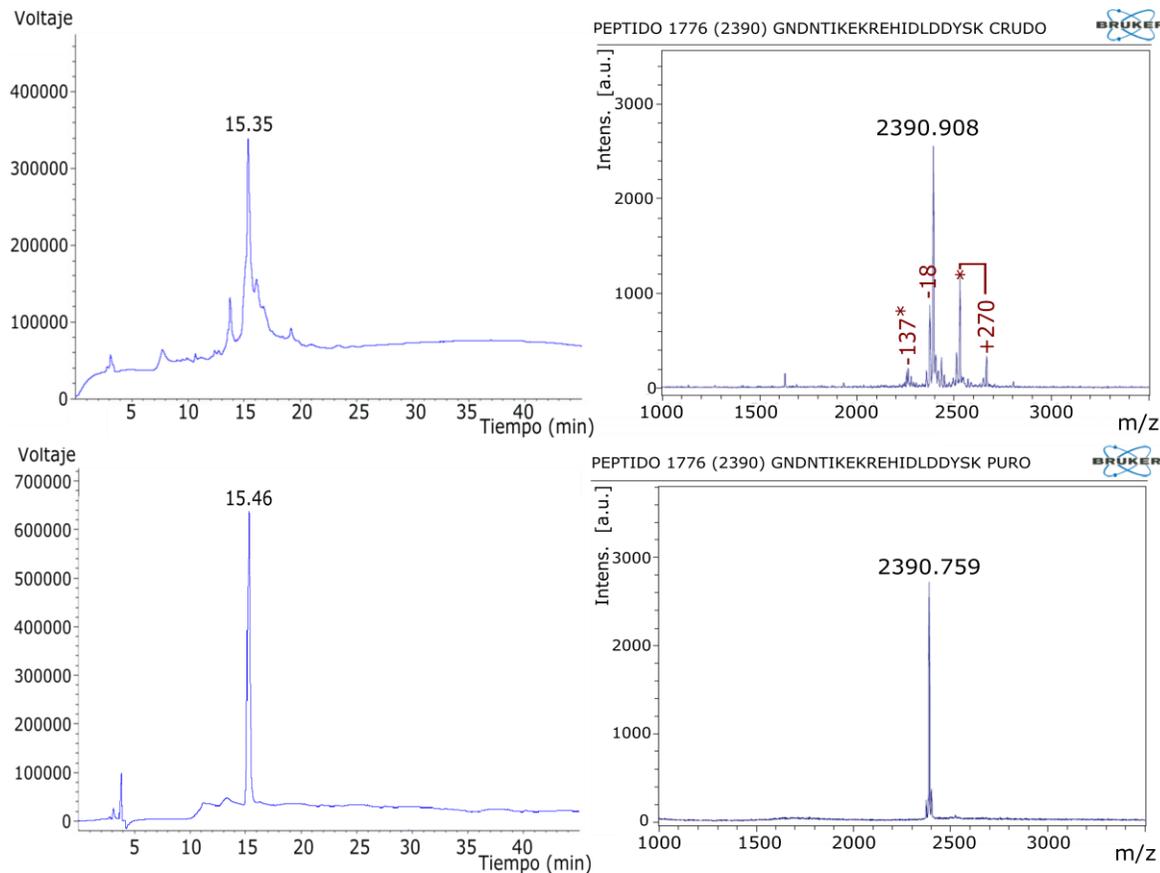
La otra señal corresponde a las señales cromatográficas que eluyeron a porcentajes menores de ACN que la del péptido de interés y que corresponde al péptido deleciónado posiblemente en un ácido glutámico o lisina o glutamina (-129 Da), sin embargo, al correlacionar el perfil sintético de este péptido esta señal se puede atribuir probablemente a una deleción de lisina debido a que estas requirieron más ciclos de acople que los otros dos posibles aminoácidos, además es importante recalcar que estas cadenas delecionadas se pudieron presentar debido a que en algunos casos quedaron muy pocos aminos libres que no fueron de fácil acceso para reaccionar con el aminoácido, y en un porcentaje tan bajo que no fue detectable por el ensayo de ninhidrina cualitativas. El péptido fue purificado como se mencionó en el numeral 2.3.3 donde su perfil cromatográfico presentó una única señal por RP-HPLC a los 15,08 min y tenía el peso molecular de la secuencia de interés 2425.064 Da como se registra en la tabla 3-2.

Figura 3-3. Caracterización del péptido hidrofílico **1756**.

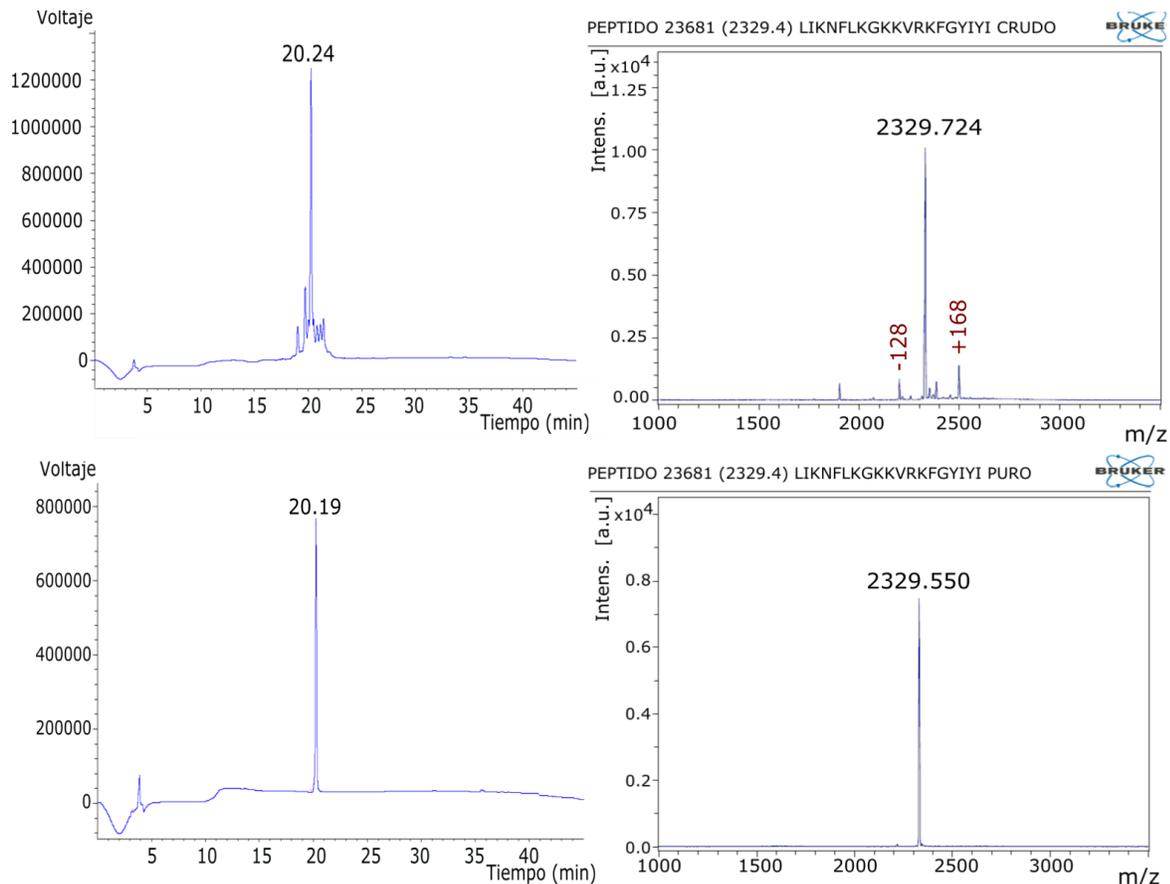
En la caracterización del péptido crudo **1776** (figura 3-4) la señal cromatográfica principal de 15,35 min corresponde con el peso molecular de la secuencia de dicho péptido. También en el espectro se pudieron evidenciar ineficiencias sintéticas como la correspondiente a la señal de -137 Da, que se pudo deber a una cadena delecionada en una histidina y además se presentó la formación de nitrilos que como ya se mencionó previamente se dio por deshidratación de su amida que es la señal marcada como -18 Da. Adicionalmente, en este cromatograma se observó hacia la parte posterior de la señal principal un solapamiento con señales correspondientes a especies formadas probablemente durante el desanclaje del péptido, que a su vez corresponden a las señales de peso molecular mayor a 2390,908 Da y que están señaladas en el espectro. Donde la señal (+ 270 Da) corresponde a reacciones de acilación o alquilación [77] entre tres grupos bencilo y los grupos reactivos de las cadenas laterales ya desprotegidas del péptido de interés, y la señal marcada con un * corresponde a las cadenas delecionadas en la histidina y que presentó la reacción colateral previamente mencionada. Independiente de estas pocas ineficiencias sintéticas el proceso de purificación permitió obtener el péptido con las especificaciones de pureza deseadas, donde el péptido presentó una única señal en

cromatografía con un t_R de 15,46 min y una única señal por EM de 2390,759 Da con un rendimiento de purificación del 17,24 %.

Figura 3-4. Caracterización del péptido hidrofílico **1776**.



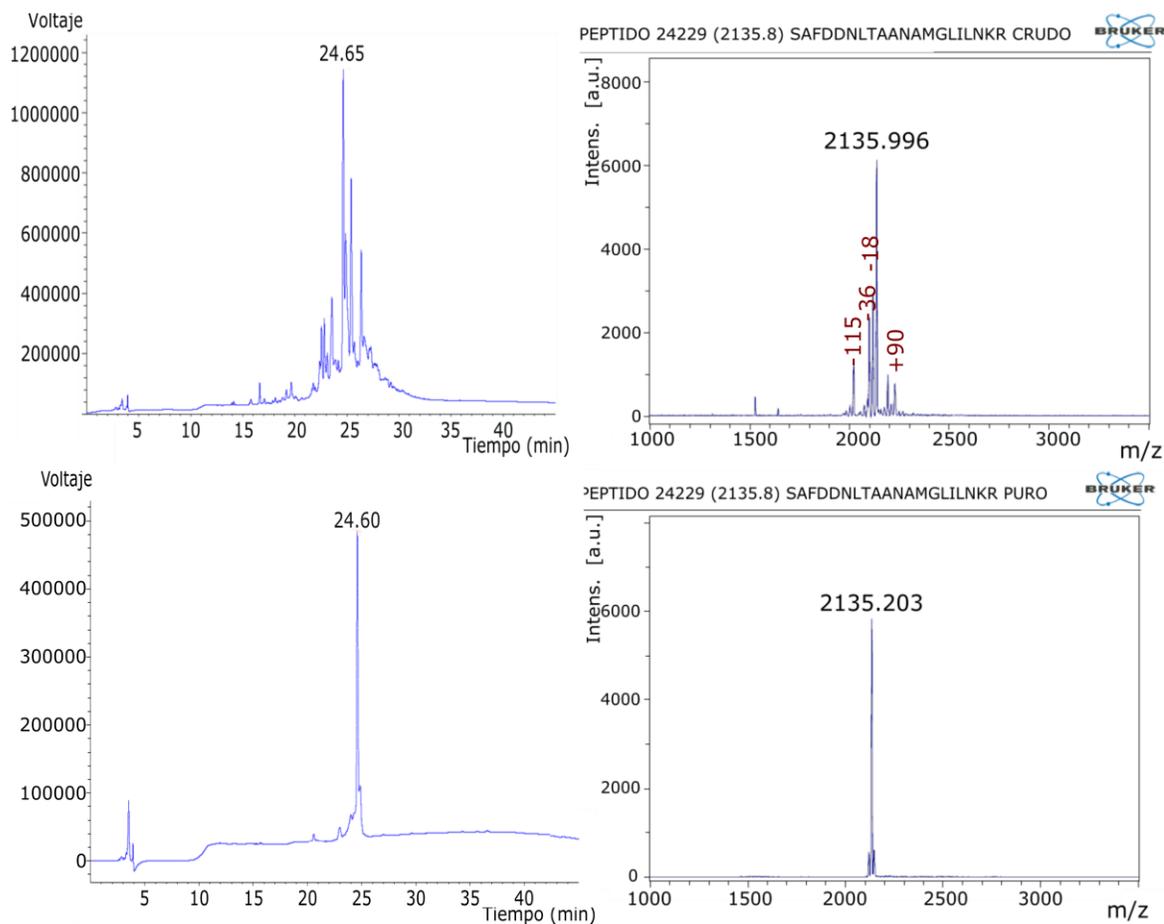
Con respecto al péptido **23681** (figura 3-5) el cromatograma del péptido crudo presentó una señal principal con un tiempo de retención de 20,24 min y la cual era correspondiente al peso molecular de esta secuencia peptídica. Al considerar el análisis cromatográfico del péptido este es bastante limpio ya que no se observan especies de subproductos durante la síntesis, lo cual se correlaciona con su perfil sintético que no presentó mayor complejidad sintética y el cual presentó un rendimiento de síntesis del 42,94 %. A partir de su espectro de masas se pudo identificar una delección en una lisina (señal de -128 Da) la cual pudo haberse presentado durante el acople de alguna de las cinco lisinas que contiene su secuencia, además se presentó una señal de PM+168 Da que indicó que probablemente se formaron aductos durante el desanclaje del péptido. El rendimiento de la purificación para este péptido fue del 15,17 % y los análisis realizados al péptido puro presentaron una única especie por cromatografía (t_R 20,19 min) cuyo PM fue de 2329,550 Da.

Figura 3-5. Caracterización del péptido neutro **23681**.

Con respecto al otro péptido neutro **24229** (figura 3-6) el cromatograma del crudo refleja varios puntos de ineficiencias durante la síntesis las cuales corresponden a las especies que eluyeron a porcentajes de ACN menores que la de la señal principal. La señal marcada como -115 Da indicó que el péptido presentó una delección probablemente de ácido aspártico o de asparagina que pudo haberse originado en la región ¹⁷DDN¹⁵, además se debe tener en cuenta que la Asn-15 requirió de 4 ciclos de acople y a pesar de que la reacción se monitoreó por el ensayo cualitativo de ninhidrina, un porcentaje muy bajo de grupos aminos libres quedaron inaccesibles para reaccionar con el aminoácido a acoplar y al ser un porcentaje tan bajo no fueron detectados por el ensayo de ninhidrinas y como consecuencia unas cadenas quedaron delecionadas. Sin embargo, en este caso no es posible identificar plenamente cuál de estos dos aminoácidos fue el delecionado ya que casualmente estos dos aminoácidos tienen un peso molecular muy similar.

A partir de las otras señales se deduce que el péptido presentó una deshidratación (-18 Da) la cual debió haberse presentado en una de las primeras asparaginas (Asn-3 y/o Asn-10) y hasta una doble reacción de deshidratación (-36 Da) de las asparaginas la cual pudieron haberse originado en la Asn-15 que como ya se mencionó presentó dificultad durante su acople y al ser la última de las asparaginas acoplada tiene la probabilidad de que una cadena que ya presentaba deshidratación volviera a presentar esta reacción colateral en este punto.

Figura 3-6. Caracterización del péptido neutro **24229**.

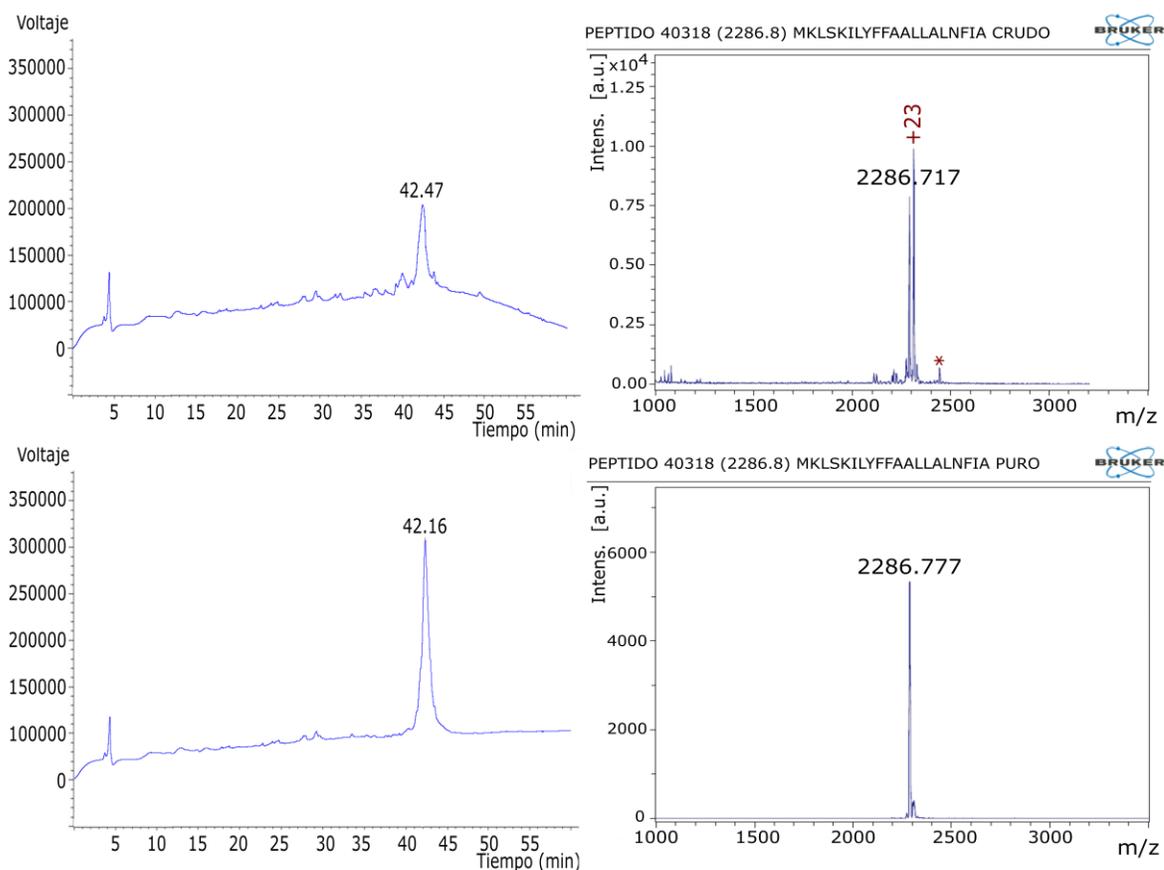


Además, en este perfil cromatográfico también se observan especies que corresponden a reacciones colaterales que formaron aductos y son las señales de pesos moleculares superiores al del peso molecular del péptido (+ 90 Da) corresponden al aducto formado entre el grupo bencilo con el péptido de interés y esta reacción colateral de alquilación se dio durante la etapa de remoción de grupos protectores de cadenas laterales y el desanclaje del péptido. A pesar de los subproductos observados en los análisis del péptido

crudo la purificación de **24229** permitió obtener una única especie como se observa en el cromatograma del péptido puro, la cual al ser analizada por espectrometría de masas corresponde a una única señal de 2135,203 Da correspondiente al PM del péptido deseado (figura 3-6 parte inferior). El rendimiento del proceso de purificación para este péptido fue del 10,99 % donde este valor está de acuerdo con el perfil cromatográfico del péptido crudo, el cual presentó un péptido con bastantes especies correspondiente a diferentes subproductos y por lo cual el porcentaje del péptido íntegro en el crudo es mucho menor a la de los perfiles cromatográficos de los otros péptidos viéndose reflejado en el rendimiento final en la etapa de purificación.

Con respecto a la caracterización de las moléculas hidrofóbicas por cromatografía analítica fue necesario modificar el programa de elución debido a que al analizar las muestras usando el programa convencional (0-70 % de ACN en 45 min) solo se pudo obtener el cromatograma del péptido **40318** y el péptido **35425** no pudo ser caracterizado bajo ese sistema cromatográfico siendo la alta hidrofobicidad del péptido la responsable de este resultado. Por esta razón se volvieron a analizar los dos péptidos en un nuevo programa el cual fue de 0-85 % de B en 55 minutos en donde se aumentó tanto el tiempo de elución como el porcentaje de ACN y se encontró que este fue adecuado para realizar los análisis de los dos péptidos hidrofóbicos.

Con respecto a la intensidad de la señal cromatográfica en comparación con la de los otros 5 péptidos evaluados fue ancha y poco intensa lo cual se debió a que al ser muestras altamente hidrofóbicas son insolubles en agua y por lo tanto se espera que la cantidad de analito inyectado sea mucho menor. Es importante considerar que el ensanchamiento del pico se debe a que al estar el analito más retenido en la fase estacionaria va a requerir un mayor volumen de elución debido a que se diluye a medida que avanza a través del sistema cromatográfico, lo cual está relacionado con que la concentración del analito es directamente proporcional al área que genera y además se ha establecido que a mayores tiempos de retención hay un ensanchamiento del pico, que conlleva a una disminución de la altura de la señal cromatográfica por el fenómeno recientemente mencionado [71]. Sin embargo, estas son observaciones realizadas en cuanto al perfil cromatográfico de la muestra y por lo tanto para discutir más afondo la relación acerca de la cantidad del péptido se debe hacer un cálculo de la concentración de analito por alguno de los métodos reportados en la literatura.

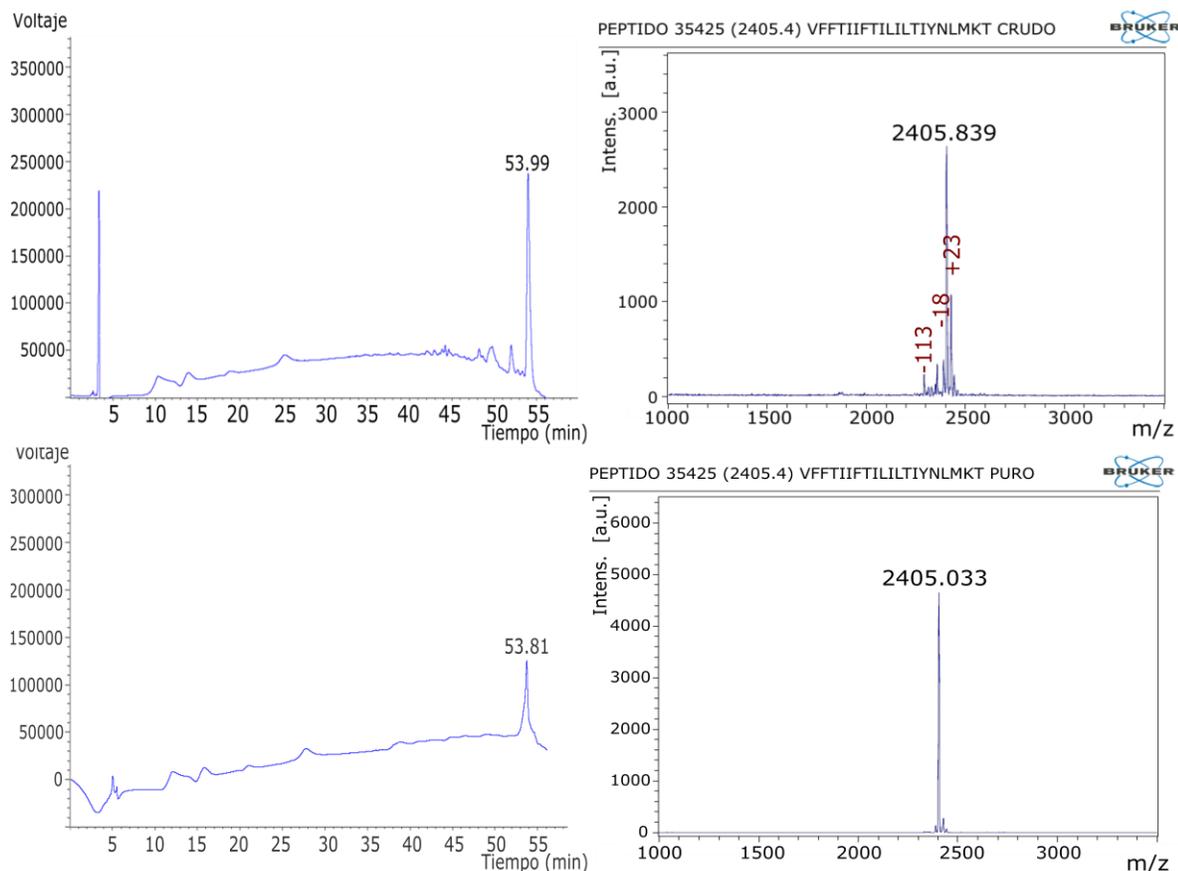
Figura 3-7. Caracterización del péptido hidrofóbico **40318**.

En la figura 3-7 se muestran los análisis del péptido **40318** el cual presentó una señal a los 42,47 minutos que al ser analizada por espectrometría de masas se identificó con el peso molecular de la secuencia de interés (2286,717 Da). Además, el espectro de masas presentó dos señales de peso superior al del péptido de interés, una de ellas marcada con (*) que indicó que se presentaron algunas reacciones colaterales durante el desanclaje del péptido y la señal más predominante que correspondió al PM del péptido más el ion sodio (+ 23 Da). Posterior a la etapa de purificación que presentó un rendimiento del 10,21 %, valor que en parte se debió a la baja solubilidad en agua, los análisis mostraron que se obtuvo una molécula limpia de subproductos que eluyó con un tiempo de retención de 42,16 min y presentó un peso molecular de 2286,777 Da.

De igual forma, el espectro de masas del péptido **35425** (figura 3-8) indicó que la secuencia sintetizada correspondía a la del péptido de interés. Se presentaron algunos subproductos durante la síntesis, las cuales corresponden a las señales de pesos moleculares menores al esperado y corresponden a las débiles señales observadas a tiempos menores a 53,99

min, entre las que se observó una reacción de deshidratación de la amida (-18 Da) y una cadena delecionada (-113 Da) probablemente en algún residuo de isoleucina o leucina, los cuales están en una alta proporción en la secuencia, y son unos de los residuos que le confieren el alto carácter hidrofóbico a este péptido. El proceso de purificación presentó un rendimiento del 11,67 % el cual permitió obtener una especie limpia la cual presentó por RP-HPLC una señal a los t_R 53,81 minutos que pesó 2405,033 Da determinado por espectrometría de masas.

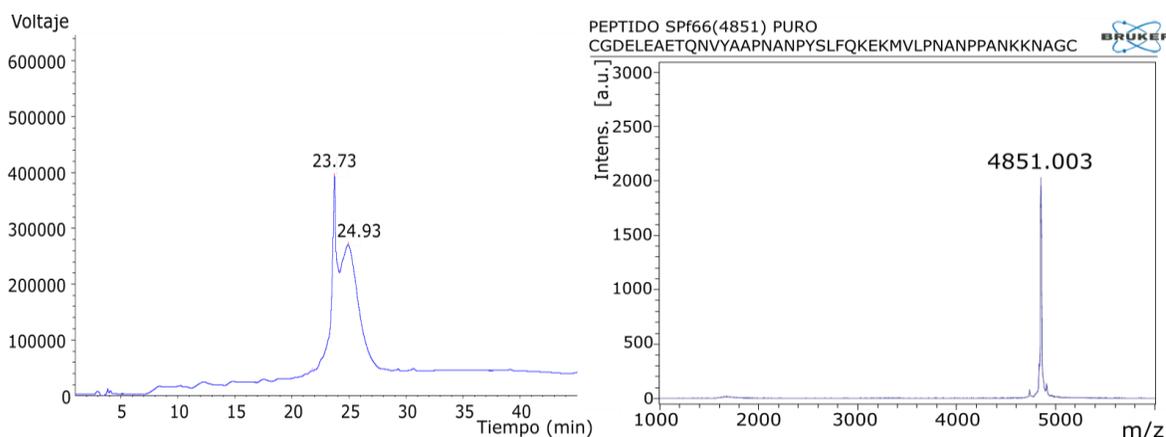
Figura 3-8. Caracterización del péptido hidrofóbico **35425**.



El péptido control **SPf66** que previamente había sido sintetizado y polimerizado fue caracterizado y sus análisis se muestran en la figura 3-9. El RP-HPLC mostró un perfil cromatográfico característico de péptidos que contienen cisteínas donde las señales cromatográficas con t_R de 23,73 y 24,93 minutos correspondieron a la distribución de los diferentes productos de la polimerización vía cisteínas: monómeros, dímeros, trímeros o tetrameros. Al analizar las dos señales por EM se encontró que las dos correspondían al PM del péptido de interés. Estos resultados están de acuerdo con los reportados para la

caracterización de este péptido, en donde se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC-SEC por sus siglas en inglés), que el péptido polimerizado presentaba varias especies siendo la monomérica la que se encontraba en mayor proporción, seguida por los dímeros y una última especie que podía atribuirse a trímeros o tetrámeros del péptido [78].

Figura 3-9. Caracterización del péptido control **SPf66**, el análisis de cromatografía se muestra a la izquierda y el espectro de masas a la derecha.



De manera general en cada cromatograma de los péptidos puros se ve una única señal por cromatografía analítica, la cual al coleccionar el pico y analizarlo por espectrometría de masas correspondió con el peso molecular de la secuencia sintetizada. Con respecto a la clasificación de las secuencias (hidrofílicas, neutras e hidrofóbicas) realizada mediante la determinación del índice de GRAVY, los perfiles cromatográficos de los péptidos puros se relacionan de manera correcta con la clasificación realizada según se mencionó en el numeral 3.1 de este documento.

3.4 Microencapsulación de los péptidos

Los siete péptidos seleccionados se microencapsularon usando la técnica de doble emulsión-evaporación del disolvente. Cada péptido se microencapsuló siguiendo una de las tres metodologías (Total, Fracción Soluble y Sólido) y se realizaron dos lotes por cada una. En la tabla 3-3 se muestra el código de identificación y la composición de cada uno de los 42 sistemas elaborados. De acuerdo con cada uno de los sistemas desarrollados, la cantidad de agua en la que se disolvió el péptido, de fase orgánica, de disolución de

PVA al 8 % y de IPA al 2 % se mantuvieron constantes y están especificadas en el numeral 2.4 de este documento.

Tabla 3-3. Código de identificación y composición de los sistemas microparticulares elaborados.

	Código	PLGA (mg)	Péptido (mg)	MP (mg)	Rendimiento proceso (%)
Hidrofílico	1756-T1	62,52	6,28	50,48	73,37
	1756-T2	62,50	6,28	50,77	73,82
	1756-FS1	62,53	5,89	53,77	78,59
	1756-FS2	62,80	5,89	52,03	75,75
	1756-S1	62,64	6,30	56,00	81,23
	1756-S2	62,67	6,32	49,51	71,76
	1776-T1	62,48	6,30	51,16	74,38
	1776-T2	62,64	6,29	50,50	73,26
	1776-FS1	62,67	5,55	57,08	83,67
	1776-FS2	62,78	5,55	48,23	70,58
	1776-S1	62,61	6,26	52,23	75,84
	1776-S2	62,62	6,39	48,87	70,82
Neutro	24229-T1	62,46	6,28	58,65	85,32
	24229-T2	62,60	6,28	54,31	78,85
	24229-FS1	62,70	2,67	51,58	78,90
	24229-FS2	62,88	2,67	53,95	82,30
	24229-S1	62,55	6,31	48,07	69,81
	24229-S2	62,53	6,27	53,24	77,38
	23681-T1	62,64	6,28	42,46	61,61
	23681-T2	62,51	6,26	43,60	63,40
	23681-FS1	62,78	4,03	68,10	101,93
	23681-FS2	62,62	4,03	46,01	69,03
	23681-S1	62,49	6,57	51,82	75,04
	23681-S2	62,60	6,26	53,31	77,42
Hidrofóbico	40318-T1	62,51	6,28	49,30	71,67
	40318-T2	62,51	6,28	50,54	73,47
	40318-FS1	62,80	0,85	53,41	83,91
	40318-FS2	62,49	0,85	53,11	83,85
	40318-S1	62,61	6,30	53,24	77,26
	40318-S2	62,68	6,36	54,22	78,53
	35425-T1	62,47	6,29	53,46	77,75
	35425-T2	62,87	6,28	51,01	73,77
	35425-FS1	62,89	0,45	59,30	93,62
	35425-FS2	62,57	0,45	47,51	75,39
	35425-S1	62,62	6,27	56,47	81,97
	35425-S2	62,54	6,25	56,92	82,74
Control	SPf66-T1	62,57	6,58	52,25	75,56
	SPf66-T2	62,52	6,28	49,94	72,59
	SPf66-FS1	62,83	5,78	51,23	74,67
	SPf66-FS2	62,63	5,78	51,57	75,38
	SPf66-S1	62,67	6,33	40,99	59,41
	SPf66-S2	62,52	6,29	50,78	73,80

La codificación asignada a cada sistema indica en primer lugar el péptido empleado, seguido por la metodología usada en cada caso (**T**: total, **FS**: Fracción Soluble y **S**: sólido) y un número que indica el lote o número de veces que se elaboró dicho sistema (1 o 2). Así mismo, en esta tabla se reporta la cantidad de micropartículas obtenidas en cada

sistema y el rendimiento del proceso de microencapsulación se determinó siguiendo la siguiente expresión matemática:

$$\text{Rendimiento del proceso (\%)} = \frac{MPs}{\text{Peso del sistema inicial}} \times 100 \% \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde, MPs se refiere a la cantidad de micropartículas obtenidas, el Peso del sistema inicial corresponde a la sumatoria de la cantidad de PLGA y péptido empleado en cada caso.

De manera general, los 42 sistemas elaborados presentaron rendimientos del proceso de microencapsulación entre el 59 % y 101 %. Evaluando el rendimiento del proceso por péptido, se tiene que el péptido **1756** presentó en promedio entre los dos lotes un rendimiento del proceso del 75,8 %, muy similar al obtenido para el otro péptido hidrofílico **1776** que fue del 74,8 %. Para el caso de los dos péptidos neutros el promedio de rendimiento del proceso estuvo en 78,7 % para el péptido **24229** y fue del 74,7 % para **23681**. Con respecto a los péptidos hidrofóbicos estudiados, el promedio del rendimiento del proceso de los dos lotes fue del 78,1 % para **40318** y del 80,9 % para **35425**. Finalmente, el promedio de rendimiento del proceso para el péptido control **SPf66** fue del 71,9 %. Estos resultados indicaron de manera general que el rendimiento del proceso de encapsulación de los péptidos sintetizados es relativamente alto, y que durante el proceso de microencapsulación se presentó alguna pérdida, las cuales seguramente se deben a transferencias incompletas de las emulsiones o también se pudieron haber originado durante el proceso de lavado y centrifugación, previo a la recolección de los sistemas microparticulares.

Con el fin de evaluar si una metodología en particular presentaba menor rendimiento durante el proceso, se comparó este parámetro por péptido y por cada metodología empleada. Sin embargo, no se encontró una tendencia que permitiera concluir que una metodología de microencapsulación presentara un efecto marcado sobre el rendimiento del proceso.

Para el péptido hidrofílico **1756** se obtuvo en promedio un rendimiento del proceso del $73,59 \pm 0,31$ %, $77,17 \pm 2,01$ % y $76,50 \pm 6,69$ % al ser microencapsulados por las estrategias Total, Fracción Soluble y Sólido, respectivamente. En el caso del péptido **1776** fue de $73,82 \pm 0,79$ % (T), $77,13 \pm 9,25$ % (FS) y $73,33 \pm 3,55$ % (S). Los rendimientos del péptido neutro **24229** fueron de $82,08 \pm 4,58$ % por la estrategia Total, $80,60 \pm 2,40$ % por

Fracción Soluble y $73,60 \pm 5,36$ % para Sólido. Con respecto al péptido **23681** se obtuvieron $62,50 \pm 1,27$ % (T), $76,23 \pm 1,68$ % (S) y $85,48 \pm 23,26$ % (FS), cabe mencionar que el rendimiento de 23681-FS1 estuvo por fuera del esperado ($>$ al 100 %) y una posible explicación es que el proceso de lavado luego de la segunda emulsión e insolubilización de las partículas no fue completo y probablemente quedo un remanente de PVA, que generó un incremento en el valor de la cantidad de micropartículas liofilizadas obtenidas.

El rendimiento del proceso para el péptido hidrofóbico **40318** fue del $72,57 \pm 1,27$ % para la estrategia T, $83,88 \pm 0,04$ % para FS y $77,90 \pm 0,90$ % por S. Para el péptido **35425** fue de $75,76 \pm 2,82$ % para Total y para la Sólido fue de $82,36 \pm 0,55$ %. En el caso de Fracción Soluble uno de los lotes presentó menor rendimiento ($75,39$ %) con respecto al otro ($93,62$ %). Las diferencias en estos rendimientos del proceso se pudieron deber básicamente a la falta de un control completo durante los lavados, quedando un remanente de algún componente que generó un incremento en el rendimiento del proceso. O, por otra parte, que durante la centrifugación se hubiese descartado parte del sistema disperso generando una pérdida de peso.

La molécula control del proceso **SPf66** también se microencapsuló 6 veces, dos por cada estrategia descrita en este estudio. Los rendimientos del proceso fueron muy similares entre los 6 sistemas salvo por una réplica de la estrategia Sólido donde se obtuvo un bajo rendimiento del proceso, el cual como ya se ha mencionado puede haberse debido a pérdidas de micropartículas durante la recolección por centrifugación o debido a un incompleto transvasado de una de las emulsiones. Sin embargo, evaluando el rendimiento promedio determinado para cada péptido y por cada estrategia se infiere que independiente de la naturaleza del péptido en todos los casos se obtiene aproximadamente la misma cantidad de sistema microparticulado y por lo cual se deben caracterizar los diferentes parámetros de los sistemas con el fin de determinar cuales se ven directamente afectados por la hidrofobicidad del péptido encapsulado.

3.5 Caracterización de los sistemas microparticulares

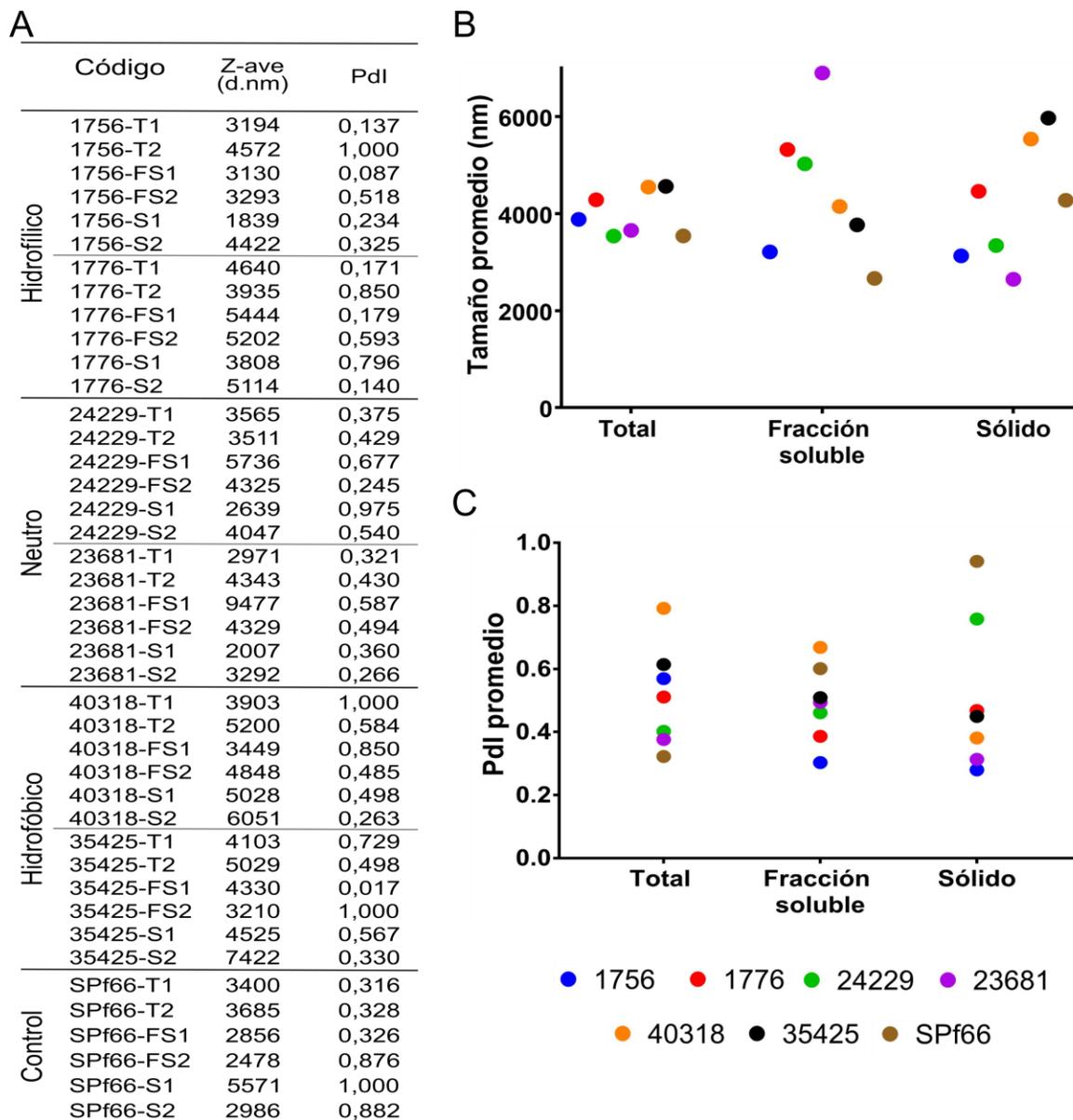
3.5.1 Tamaño

Los resultados de tamaño promedio (Z-ave) e índice de polidispersidad (Pdl) de los sistemas obtenidos permitieron determinar si estos cumplieron con las especificaciones deseadas para ser considerados como un posible sistema de entrega de la vacuna que está siendo desarrollada en la FIDIC. En cuanto al tamaño, este debe estar entre un rango de 0,5 a 10 micrómetros (μm) para que así el sistema sea fagocitado y además se busca que las partículas presenten una mínima dispersión de tamaño, por lo cual para verificar esto se determinó el índice de polidispersidad de los sistemas microparticulares. Los valores determinados para los 42 sistemas en cuanto al tamaño (Z-ave) e índice de polidispersidad (Pdl) se reportan en la figura 3-10 A.

Con el fin de tener una referencia de los sistemas microparticulares obtenidos se hizo un lote de microesferas vacías por la metodología Total, el cual presentó un tamaño promedio de 2124 nm con un alto índice de polidispersidad (Pdl 1,000). Al evaluar el tamaño promedio de los diferentes sistemas se encontró que las 42 muestras presentaron tamaños que estuvieron dentro del rango esperado, en donde el sistema que presentó un menor tamaño promedio fue 1756-S1 con 1839 nm, y el que presentó el mayor tamaño promedio fue 23681-FS1 con 9477 nm. Con respecto al caso particular del sistema que presentó el mayor tamaño de partícula de los sistemas elaborados, este a su vez fue el que presentó el mayor rendimiento del proceso (tabla 3-3) ya que se obtuvo mayor cantidad de microesferas que las esperadas. Estos resultados se pueden relacionar en cuanto a que se pudo haber determinado un mayor diámetro hidrodinámico, debido a que hubo una adsorción de PVA o del péptido sobre la superficie de la partícula lo cual se vio reflejado en un mayor tamaño promedio de partícula y a su vez en mayor cantidad de microesferas obtenidas.

En cuanto a la influencia de la hidrofobicidad del péptido en el tamaño de los sistemas microparticulares desarrollados, estos no estuvieron directamente relacionados, ya que como se vio en la parte B de la figura 3-10, no hubo sistemas con un grupo de péptidos (hidrofílico, neutro o hidrofóbico) que presentara en todos los casos partículas de mayor o menor tamaño.

Figura 3-10. Propiedades fisicoquímicas de los sistemas microparticulares obtenidos. A: Tamaño promedio de partícula e índice de polidispersidad. B: Distribución del tamaño promedio por estrategia de microencapsulación y C: Distribución del Pdl promedio por estrategia de microencapsulación.



Lo mencionado anteriormente se puede evidenciar al comparar el promedio del tamaño de los lotes obtenidos para cada péptido versus la estrategia de microencapsulación empleada. Para esto se debe tener en cuenta la clasificación realizada previamente de los péptidos en cuanto a su índice de hidropaticidad en hidrofílicos: **1756**, **1176** y **SPf66**;

neutros: **23681** y **24229** e hidrofóbicos: **35425** y **40318** que al organizarlos de menor a mayor tamaño según la estrategia empleada se representan de la siguiente manera:

- Total: **24229 < SPf66 < 23681 < 1756 < 1776 < 40318 < 35425.**
- Fracción Soluble: **SPf66 < 1756 < 35425 < 40318 < 24229 < 1776 < 23681.**
- Sólido: **23681 < 1756 < 24229 < SPf66 < 1776 < 40318 < 35425.**

Esta escala representó la distribución de la figura 3-10 B, que permitió evidenciar que el tamaño promedio de los sistemas no dependió de la naturaleza hidrofóbica del péptido encapsulado. Esto se corroboró al comparar los sistemas que presentaron menor tamaño de partícula, a manera de ejemplo, en el caso de la estrategia Total fue el sistema con el péptido neutro **24229**, mientras que para los sistemas FS fue el sistema con el péptido control **SPf66**. Es decir, no se vio una tendencia clara en cuanto a que péptidos con cierta característica generaran partículas de mayor o menor tamaño, por el contrario, estos se ubicaron indistintamente en cada escala. Y en cuanto al tamaño de partícula promedio de estos sistemas, tampoco se presentó ninguna relación con la naturaleza hidrofóbica del péptido, en donde fue de 3343 nm para los sistemas con el péptido neutro y de 2267 nm para el péptido control.

Además, cuando se evaluaron los 6 sistemas particulares obtenidos para cada péptido, estos también presentaron diferentes tamaños según la estrategia de encapsulación empleada. Retomando el caso del péptido **24229** el menor tamaño de partícula se obtuvo al utilizar la estrategia Sólido, seguido por los sistemas obtenidos por la estrategia Total y donde las partículas de mayor tamaño fueron obtenidas por la técnica de Fracción Soluble. Los resultados obtenidos mostraron que cada péptido se comportó diferente independiente que estuvieran clasificados en el mismo grupo, además que en ninguna de las tres estrategias se puede hacer una asociación entre el tamaño de partícula y el carácter hidrofóbico del péptido.

Sin embargo, al evaluar el promedio de los lotes de los sistemas obtenidos por las estrategias **T** y **FS** cargados con los péptidos **1756**, **40318**, **35425** y **SPf66** se observó una relación entre el tamaño promedio de las partículas y la cantidad de péptido en la fase acuosa interna, donde a mayor cantidad de péptido inicial (los sistemas elaborados por la estrategia T) presentaron un mayor tamaño promedio de partículas que los elaborados por la otra estrategia (FS). Esto probablemente se debió a que al haber más péptido en la fase

interna, la densidad de esta fase fue mayor y por lo tanto la viscosidad de la emulsión (W_1/O), lo cual generó mayores tamaños de partícula [79]. Otro factor que influyó directamente en el tamaño de partícula es una elevada velocidad de evaporación del solvente orgánico, la cual induce la rápida insolubilización del PLGA generando micropartículas de mayor tamaño y con presencia de poros en la superficie. Sin embargo, para saber si este fenómeno fue el responsable de las partículas de mayor tamaño, se debe evaluar los resultados del análisis de forma de los diferentes sistemas.

El índice de polidispersidad de los sistemas microparticulares presenta un efecto directo durante la liberación del IFA, debido a que las partículas de diferentes tamaños en un mismo sistema se degradarán a diferentes velocidades y afectará la velocidad de liberación del péptido. En cuanto al valor del índice de polidispersidad el sistema es más disperso entre más cercano a 1,000 y entre más cercano al cero este es más homogéneo, sin embargo, por definición un sistema particulado se considera como monodisperso cuando este presenta un valor de Pdl $< 0,070$ [80]. Por lo cual, de los 42 sistemas elaborados solo el sistema 35425-FS1 fue monodisperso y por lo tanto los otros sistemas obtenidos se deben considerar como sistemas polidispersos. Para los 7 péptidos, la estrategia Sólido fue la que en general presentó menor grado de polidispersidad con respecto a las otras dos estrategias, lo cual posiblemente se debió a que como el sistema carece de fase acuosa interna, no se generaron espacios acuosos en la matriz polimérica, sino que el péptido sólido se dispersó uniformemente en la fase orgánica. Considerando estos resultados se sugiere un mayor control en las condiciones de intensidad y tiempos de homogenización durante la formación de las emulsiones para minimizar el Pdl de los sistemas, con el fin de tener sistemas microparticulares con tamaños similares entre sí.

Los resultados globales de tamaño promedio de los sistemas microparticulares indicaron que ni el carácter hidrofóbico del péptido ni la metodología de microencapsulación determinan este parámetro. Lo que permite confirmar que el tamaño de las micropartículas está influenciado por variables del proceso de microencapsulación, que según lo reportado en otras investigaciones están más relacionados con la velocidad y tiempo de homogenización aplicadas durante la preparación de las emulsiones, la viscosidad de las emulsiones o con la concentración del PLGA en la fase orgánica [61,81–83]. Como se ve claramente en la figura 3-10 C, en cuanto al índice de polidispersidad varios de los sistemas presentaron relativamente un alto índice de polidispersidad, por lo cual para minimizar este efecto se debe ejercer un mejor control en los parámetros y condiciones del

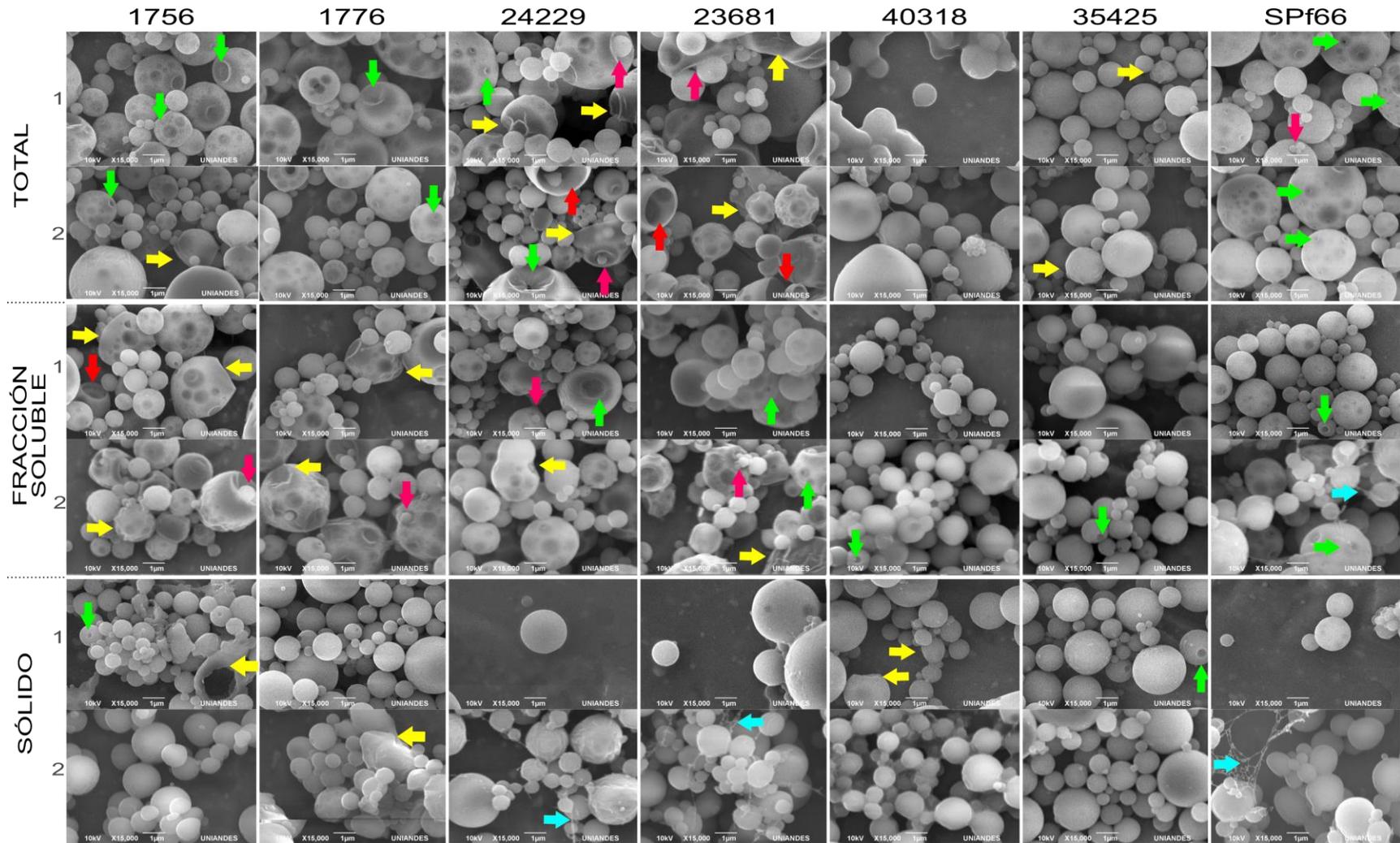
proceso de homogenización y hacer un tamizaje por tamaño durante la colección de las micropartículas.

3.5.2 Forma

Las características morfológicas de todos los sistemas microparticulares se evaluaron con el fin de determinar si la hidrofobicidad del péptido o la técnica de microencapsulación influían en las propiedades morfológicas. A continuación, en la figura 3-11 se muestran las micrografías de los sistemas obtenidos por las tres técnicas empleadas en este estudio, para cada péptido y según el lote elaborado. En la figura están señaladas con flechas de diferentes colores algunas deformaciones observadas en las partículas, donde las flechas de color fucsia muestran deformaciones causadas por asociaciones entre partículas, las de color amarillo indican partículas fracturadas, el azul claro señala una red, las verdes indican poros superficiales y por último las rojas indican esferas huecas.

En todas las micrografías se observó que las micropartículas en su mayoría presentaron geometría esférica de diferentes tamaños, lo que corroboró los resultados reportados en la figura 3-10 en cuanto a que se obtuvieron sistemas polidispersos, atribuido probablemente a variaciones en las condiciones durante las etapas de formación de las emulsiones involucradas en el proceso de elaboración de los sistemas microparticulares.

En la figura 3-11 fue posible visualizar parte de la estructura interna en las micrografías correspondientes a las micropartículas elaboradas por las estrategias Total y Fracción Soluble para los péptidos hidrofílicos, los neutros y con el péptido control. Probablemente debido al espacio ocupado por las gotículas de agua de la fase acuosa interna (W_i) dispersa en la fase orgánica (O), que luego del proceso de liofilización generó una estructura interna porosa y con presencia de canales [84]. Este fenómeno está de acuerdo con la metodología de encapsulación empleada, ya que en estas dos estrategias (T y FS) el péptido fue disuelto en agua, la cual constituyó la fase acuosa interna de la doble emulsión. Contrario a esto, en los sistemas elaborados por la estrategia Sólido (S) no se observó este fenómeno debido a que estos sistemas no tuvieron fase acuosa interna. Para estos casos se preparó un sistema tipo $S/O/W$ el cual probablemente generó una alta presión osmótica entre la fase acuosa externa y la fase orgánica, razón por lo cual estos sistemas presentaron unas superficies lisas y más densas [85].

Figura 3-11. Micrografías de las microesferas de PLGA cargadas con los péptidos sintéticos tomadas a 10 kV x 15,000 aumentos.

Debido a que en estos sistemas el péptido fue dispersado en la fase orgánica, por lo tanto, no se debieron presentar cavidades internas en estas partículas y por esta razón no fue evidente esa estructura interna porosa.

Con respecto a las deformaciones observadas en los diferentes sistemas, en la figura se señalan con una flecha fucsia las imperfecciones atribuidas a las asociaciones entre partículas. Donde una partícula de menor tamaño deformó la superficie de una microsfera más grande y quedó adherida a ella, este fenómeno se observó claramente en los sistemas 1756-FS2, 1776-FS2, 24229-T, 24229-FS1, 23681-T1, 23681-FS2 y SPf66-T1.

Por otro lado, el fenómeno que se observó en mayor proporción en los sistemas obtenidos está señalado con una flecha de color verde, la cual muestra un hundimiento superficial el cual podría deberse a los canales o poros que se formaron durante el proceso de difusión/evaporación del disolvente (O) [86] y de sublimación del agua (W_1) durante el proceso de secado por liofilización. En cuanto al tamaño del poro, este se vio relacionado con la relación de la fase acuosa interna, donde a mayor volumen de esta fase hay una mayor microestructura interna porosa [87,88] la cual podría estar directamente relacionada con el perfil de liberación del péptido [89].

De igual manera en las micrografías también se observaron ciertas partículas que no fueron completamente esféricas y estas están señaladas con una flecha de color amarillo. Aunque esta deformación está en baja proporción, en algunos sistemas se vio reflejado como partículas que presentaron poca esfericidad, en donde este fenómeno probablemente se debió a una rápida evaporación del solvente orgánico, la cual no permitió que se diera una evaporación homogénea alrededor de la superficie de la partícula a medida que se insolubilizaba el PLGA [55], esta condición a su vez también pudo haber sido la responsable de tener partículas de mayores tamaños. En los sistemas 1756-T1, 1756-S1 y 1776-S-2 se observaron formas no esféricas que podrían deberse a aglomerados del polímero.

Por otro lado, señalado con una flecha de color azul, en los sistemas 24229-S2, 23681-S2, SPf66-T2 y SPf66-S2 se muestra una estructura análoga a una red que se sugiere pueda deberse a algo de PVA que no se removió completamente en el proceso de lavado y quedó remanente en los sistemas liofilizados. Finalmente, la última deformación observada señala con una flecha roja unas partículas “huecas”, las cuales probablemente se formaron debido a que la capa superficial de estas partículas era muy delgada y no resistió

las fuerzas de la presión osmótica generadas entre el interior y la fase acuosa externa, que se rompió durante la evaporación del disolvente y sublimación del agua dejando una partícula de esta característica [90].

Una particularidad que se presentó al momento de realizar el análisis fue que al incidir el haz de electrones sobre la muestra 40318-T1 las partículas se fundieron generando el efecto que se observa en esas micrografías. Un resultado importante que se puede extraer de las microfotografías de los sistemas hidrofóbicos es que estos son los que presentan micropartículas más esféricas con una superficie compacta y lisa, independiente de la estrategia de microencapsulación empleada. Esto pudo deberse a que el alto carácter hidrofóbico de los péptidos contribuyó a que se generara un eflujo de agua desde la fase interna (W_i) hacia el exterior generando así partículas más densas.

De manera general, los sistemas con péptidos neutros presentaron más deformaciones morfológicas, seguido por los sistemas con los péptidos hidrofílicos y donde los sistemas cargados con los péptidos hidrofóbicos fueron los que presentaron la estructura superficial más regular e íntegra. Esto permitiría suponer que estas diferencias se deban a la naturaleza del péptido encapsulado, de igual forma se debe tener en cuenta que los sistemas no son homogéneos ya que en un mismo lote se pueden observar partículas morfológicamente distintas, las cuales muy probablemente vayan a influir en la liberación del péptido. Sin embargo, para poder concluir más acerca del efecto de la hidrofobicidad del péptido en los sistemas microparticulares es necesario continuar con la caracterización de los sistemas.

3.5.3 Carga y eficiencia de encapsulación

Considerando los resultados anteriores de caracterización de las micropartículas en cuanto al tamaño e índice de polidispersidad, no se encontró un efecto determinante entre la naturaleza del péptido y estos parámetros. Seguidamente, se reporta el efecto del carácter hidrofóbico del péptido a microencapsular en cuanto a la carga (Q) y a la eficiencia de encapsulación (EE). Para esto se determinó la cantidad de péptido encapsulado (péptido adsorbido más péptido atrapado en la matriz polimérica), ya que es importante tener muy presente esta relación en el sistema de entrega desarrollado. En el caso de un sistema de liberación para una vacuna, se busca que el péptido adsorbido o de rápida liberación simule la primera dosis y que una vez comience el proceso de degradación del polímero

se libere el péptido equivalente a la segunda dosis, correspondiente al péptido atrapado en la matriz polimérica.

Por esta razón y para evaluar el efecto de la hidrofobicidad de la molécula en los diferentes sistemas microparticulares, la cuantificación de los péptidos se realizó mediante el kit de Micro BCA y la concentración de cada péptido se determinó por interpolación en la curva de calibración elaborada con el péptido **1756**, tomado como referencia. Por consiguiente, la determinación de carga de cada uno de los sistemas obtenidos se realizó con respecto a la misma curva de calibración, en el rango de trabajo lineal entre 1 – 25 µg/mL. En cuanto a los resultados de carga y eficiencia de encapsulación, estos se obtuvieron usando las ecuaciones 1-3 mencionadas en el numeral 2.5.3 y los resultados para los 42 sistemas elaborados se reportan en la tabla 3-4.

En primer lugar se evaluó el péptido **SPf66** para determinar si los parámetros de la técnica de microencapsulación eran adecuados, ya que en este trabajo se adaptó la metodología que había sido establecida en los estudios anteriores [91]. Los valores de EE obtenidos para los sistemas SPf66-T indicaron que la adaptación realizada de los parámetros del proceso de microencapsulación fue apropiada, donde en promedio se obtuvo una EE del 83,4 % al cuantificar usando la curva de calibración del péptido **1756**. Este resultado dio vía libre a usar esta curva de calibración para hacer las determinaciones relativas del péptido encapsulado en todos los sistemas elaborados, ya que los valores obtenidos para el péptido control fueron muy similares a los reportados en los estudios previos (EE= 84,0 ± 6,1 %), en donde cuantificaron usando una curva de calibración con el mismo péptido **SPf66** [70].

Según los datos reportados en la tabla 3-4 con respecto a la carga (Q), se puede afirmar que este parámetro está relacionado con la estrategia de microencapsulación empleada y con la cantidad de péptido inicial (anexo 8). Los resultados que se muestran en la parte A de la figura 3-12 indicaron que para un mismo péptido los valores obtenidos de Q para los sistemas T, FS o S fueron diferentes, en donde para todos los péptidos excepto en el caso del **1756** la estrategia Total dio valores de Q más altos entre las diferentes estrategias empleadas, y en casi todos los casos los sistemas elaborados por la estrategia Sólido presentaron los menores valores determinados para este parámetro.

Tabla 3-4. Cuantificación del péptido cargado en microesferas de PLGA y EE (media \pm desviación estándar, n = 3).

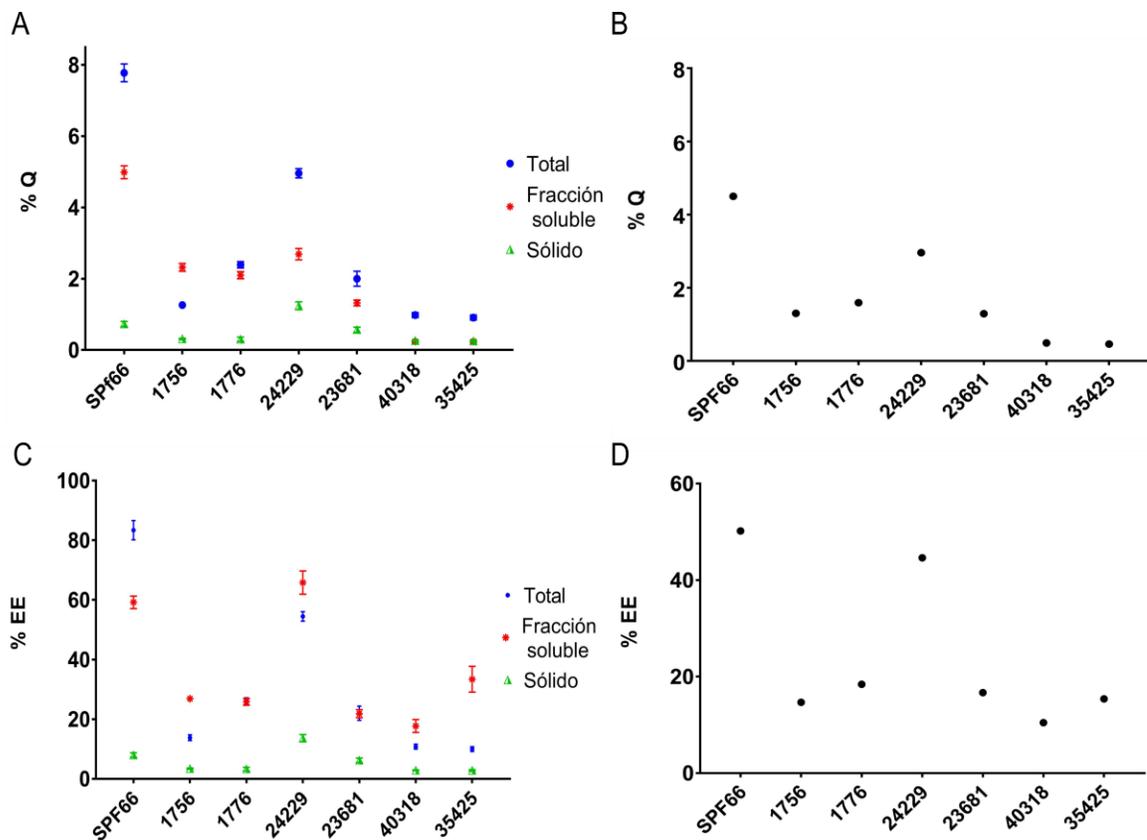
	Código	%Q	%EE	% Adsorbido	% Atrapado
Hidrofilico	1756-T1	1,54 \pm 0,05	16,85 \pm 0,73	56,00 \pm 3,15	44,00 \pm 3,00
	1756-T2	0,98 \pm 0,02	10,74 \pm 0,58	57,41 \pm 5,04	42,59 \pm 2,00
	1756-FS1	1,93 \pm 0,07	22,34 \pm 0,83	41,04 \pm 3,02	58,96 \pm 2,18
	1756-FS2	2,71 \pm 0,08	31,35 \pm 0,94	37,34 \pm 0,78	62,66 \pm 2,88
	1756-S1	0,37 \pm 0,01	4,00 \pm 0,16	23,70 \pm 3,60	76,30 \pm 1,80
	1756-S2	0,26 \pm 0,01	2,82 \pm 0,13	26,41 \pm 3,62	73,59 \pm 2,56
	1776-T1	2,14 \pm 0,02	23,45 \pm 0,28	65,07 \pm 0,86	34,93 \pm 0,86
	1776-T2	2,63 \pm 0,08	28,84 \pm 0,96	59,70 \pm 1,06	40,30 \pm 3,17
	1776-FS1	2,07 \pm 0,04	25,54 \pm 0,55	50,73 \pm 1,66	49,27 \pm 1,40
	1776-FS2	2,13 \pm 0,09	26,12 \pm 1,04	42,16 \pm 3,05	57,84 \pm 2,58
	1776-S1	0,35 \pm 0,05	3,89 \pm 0,54	63,82 \pm 11,14	36,18 \pm 8,44
	1776-S2	0,24 \pm 0,02	2,64 \pm 0,26	63,31 \pm 7,92	36,69 \pm 5,81
Neutro	24229-T1	4,47 \pm 0,10	49,06 \pm 1,26	62,77 \pm 1,23	37,23 \pm 2,26
	24229-T2	5,46 \pm 0,07	59,85 \pm 0,96	65,02 \pm 0,83	34,98 \pm 1,36
	24229-FS1	2,74 \pm 0,04	66,99 \pm 1,10	35,52 \pm 1,16	64,48 \pm 1,16
	24229-FS2	2,64 \pm 0,15	64,61 \pm 3,73	26,34 \pm 0,74	73,66 \pm 5,73
	24229-S1	1,31 \pm 0,11	14,30 \pm 1,16	51,42 \pm 6,70	48,58 \pm 4,58
	24229-S2	1,18 \pm 0,03	12,94 \pm 0,33	57,74 \pm 1,14	42,26 \pm 2,27
	23681-T1	2,28 \pm 0,17	25,08 \pm 1,94	52,58 \pm 0,93	47,42 \pm 7,68
	23681-T2	1,71 \pm 0,12	18,90 \pm 1,34	57,25 \pm 2,29	42,75 \pm 6,71
	23681-FS1	1,12 \pm 0,05	18,54 \pm 0,83	30,14 \pm 1,23	69,86 \pm 4,30
	23681-FS2	1,52 \pm 0,06	25,10 \pm 1,07	49,29 \pm 3,83	52,07 \pm 1,91
	23681-S1	0,62 \pm 0,06	6,81 \pm 0,62	34,57 \pm 3,78	65,43 \pm 8,23
	23681-S2	0,51 \pm 0,04	5,63 \pm 0,41	47,57 \pm 5,71	52,43 \pm 4,54
Hidrofóbico	40318-T1	0,97 \pm 0,05	10,59 \pm 0,59	24,72 \pm 1,56	75,28 \pm 5,32
	40318-T2	1,00 \pm 0,05	10,98 \pm 0,58	9,88 \pm 0,93	90,12 \pm 5,24
	40318-FS1	0,22 \pm 0,02	16,65 \pm 1,75	25,82 \pm 7,08	74,18 \pm 7,78
	40318-FS2	0,25 \pm 0,02	18,82 \pm 1,25	23,17 \pm 0,62	76,83 \pm 6,61
	40318-S1	0,28 \pm 0,01	3,04 \pm 0,12	42,05 \pm 4,04	57,95 \pm 2,06
	40318-S2	0,25 \pm 0,01	2,68 \pm 0,07	35,88 \pm 2,32	64,12 \pm 1,06
	35425-T1	1,01 \pm 0,05	11,03 \pm 0,54	4,48 \pm 0,47	95,52 \pm 4,84
	35425-T2	0,81 \pm 0,06	8,92 \pm 0,62	6,59 \pm 0,18	93,41 \pm 6,96
	35425-FS1	0,24 \pm 0,02	33,71 \pm 3,26	21,49 \pm 6,97	78,51 \pm 6,72
	35425-FS2	0,24 \pm 0,02	33,09 \pm 2,84	10,48 \pm 4,45	89,52 \pm 7,32
	35425-S1	0,28 \pm 0,02	3,10 \pm 0,25	44,08 \pm 7,23	55,92 \pm 3,52
	35425-S2	0,22 \pm 0,01	2,50 \pm 0,09	39,99 \pm 1,53	60,01 \pm 3,06
Control	SPf66-T1	8,05 \pm 0,15	84,60 \pm 2,01	41,91 \pm 1,53	58,09 \pm 1,81
	SPf66-T2	7,50 \pm 0,21	82,19 \pm 2,52	13,60 \pm 1,36	86,40 \pm 2,75
	SPf66-FS1	4,83 \pm 0,17	57,29 \pm 1,95	27,07 \pm 1,54	72,93 \pm 3,05
	SPf66-FS2	5,16 \pm 0,06	61,09 \pm 0,71	24,87 \pm 0,20	75,13 \pm 1,14
	SPf66-S1	0,73 \pm 0,04	7,92 \pm 0,47	23,48 \pm 4,63	76,52 \pm 3,63
	SPf66-S2	0,74 \pm 0,06	8,05 \pm 0,61	21,42 \pm 2,92	78,58 \pm 6,95

Según los datos reportados en la tabla 3-4 con respecto a la carga (Q), se puede afirmar que este parámetro está relacionado con la estrategia de microencapsulación empleada y con la cantidad de péptido inicial (anexo 8). Los resultados que se muestran en la parte A de la figura 3-12 indicaron que para un mismo péptido los valores obtenidos de Q para los

sistemas T, FS o S fueron diferentes, en donde para todos los péptidos excepto en el caso del **1756** la estrategia Total dio valores de Q más altos entre las diferentes estrategias empleadas, y en casi todos los casos los sistemas elaborados por la estrategia Sólido presentaron los menores valores determinados para este parámetro.

Al analizar el promedio de Q de los dos lotes de los péptidos hidrofóbicos se encontró que estos fueron muy similares entre las estrategias FS y S, que considerando lo expresado en la ecuación 1, indicó que la cantidad de péptido encapsulado fue casi la misma por estas dos estrategias. Lo que a su vez reveló que mediante la estrategia Sólido se encapsuló muy poca cantidad del péptido, en referencia con la Fracción Soluble de los péptidos hidrofóbicos, tal cual como se reportó en la tabla 3-3.

Figura 3-12. Efecto de la hidrofobicidad del péptido en la carga y eficiencia de encapsulación. A: Q péptidos por estrategia de encapsulación, B: promedio Q por péptido, C: EE péptidos por estrategia de encapsulación y D: promedio EE por péptido.



Para ver el efecto de la hidrofobicidad del péptido en este parámetro se determinó el promedio de Q de los seis sistemas elaborados por cada uno de ellos, y con estos valores

se elaboró la siguiente escala que permitió organizarlos de mayor a menor promedio de carga así: **SPf66** (4,50 %) > **22429** (2,96 %) > **1776** (1,59 %) > **1756** (1,30 %) > **23681** (1,29 %) > **40318** (0,49 %) > **35425** (0,46 %) como se muestra en la figura 3-12 B. Esta escala permitió ver que, en cuanto a Q, los dos péptidos hidrofílicos se comportaron de manera similar al igual que los dos péptidos hidrofóbicos, que fueron los que presentaron los menores porcentajes de carga de los tres grupos evaluados. Mientras que los péptidos neutros si difirieron en cuanto a este parámetro, por lo cual se podría deducir que al tener un carácter neutro se puede favorecer su encapsulación como en el caso del péptido **24229** o presentar el comportamiento similar al de un péptido altamente hidrofílico como se vio para los sistemas elaborados con el otro péptido neutro **23681**.

En cuanto a la distribución del péptido en la matriz polimérica (tabla 3-4) sólo un 31% de los sistemas microparticulares elaborados presentaron un alto contenido de péptido adsorbido o en la periferia de la micropartícula (>50 %), el 7 % de los sistemas presentó un porcentaje del péptido adsorbido menor al 10 % y para los sistemas restantes la cantidad del IFA adsorbido estuvo entre el 10-50 %, la cual probablemente permitiría administrar satisfactoriamente la cantidad necesaria para simular la primera dosis. Por lo tanto, el péptido determinado como % atrapado y reportado en esta misma tabla sería el que simularía la segunda dosis. La tendencia general observada fue que los péptidos con carácter hidrofóbico presentaron los mayores porcentajes del péptido atrapado en la matriz polimérica que los péptidos de los grupos restantes.

Relacionado con los resultados de carga en la tabla 3-4 también se reporta la eficiencia de encapsulación (EE). Los resultados muestran cómo no solo la naturaleza del péptido en cuanto su índice de hidropaticidad determina la carga, sino como la estrategia de microencapsulación empleada también es determinante en este parámetro. Como se observa en la figura 3-12 C, la tendencia general de los sistemas elaborados por la estrategia Fracción Soluble presentaron las mayores eficiencias de encapsulación, seguido por los sistemas Total y finalmente, los sistemas elaborados por la técnica Sólido presentaron las menores EE de las tres estrategias empleadas. De igual forma se determinó el promedio de los seis sistemas elaborados por cada péptido y estos resultados se muestran en la parte D de la figura 3-12, en esta se ve claramente como los sistemas **SPf66** y los del péptido **24229** presentaron valores superiores de EE, del 50,19 % y del 44,62 % respectivamente, mientras que para los otros péptidos este valor fue menor al

20%, siendo del 18,41 % para **1776**, 16,68 % para **23681**, 15,39 % para **35425**, del 14,68 % para **1756** y del 10,46 % para **40318**.

Los péptidos **1756** y **1776** presentaron menores rendimientos de eficiencia de encapsulación comparados con la molécula control **SPf66** a pesar de que estaban clasificados en el mismo grupo de péptidos hidrofílicos. Esto pudo deberse a que según el índice de GRAVY, la molécula control era menos hidrofílica ya que presentó un valor de IG de -0,787 y para los otros dos péptidos los valores de este índice fueron de -1,770 y de -1,890 respectivamente. Las bajas EE pueden deberse a que al presentar valores más negativos en la escala de hidropaticidad así mismo presentaron mayor afinidad por la fase acuosa externa y por lo tanto durante el proceso de evaporación del disolvente orgánico se presentó una rápida difusión del péptido desde la fase orgánica a la fase externa, lo que generó la pérdida del péptido, redujo la eficiencia de encapsulación y posiblemente incrementó la liberación inicial. Varios estudios confirman este fenómeno, ya que es el principal responsable de las bajas EE al microencapsular IFAs hidrofílicos, por lo cual sigue siendo un reto elaborar sistemas de entrega a base de PLGA con este tipo de moléculas con altas eficiencias de encapsulación [86,92], razón por la cual algunos autores recomiendan formar la base libre del IFA para disminuir la alta solubilidad de la molécula en el medio acuoso y aumentar la eficiencia de encapsulación [93].

De igual manera los dos péptidos hidrofóbicos fueron los que presentaron las menores EE de todas las moléculas de este estudio. En principal medida esto probablemente se deba a que la técnica de doble emulsión evaporación del disolvente esta principalmente diseñada para moléculas hidrofílicas, lo cual esta soportado por los resultados obtenidos, en donde estos dos péptidos siempre dieron los menores valores de eficiencia de encapsulación por las diferentes estrategias. Sin embargo, en este trabajo se incluyó la estrategia denominada Sólido considerando que esta iba a permitir sobrepasar las dificultades de microencapsular un IFA altamente hidrofóbico por la técnica $W_1/O/W_2$. Ya que se esperaba que al no tener la fase acuosa interna los péptidos hidrofóbicos formaran una suspensión dentro de la fase orgánica, y al adicionar la fase acuosa externa los péptidos **40318** o **35425** quedarán atrapados en el interior de la micropartícula, al no haber afinidad entre el péptido por este solvente. Por lo cual, los resultados de EE para estos dos péptidos fueron inesperados ya que la estrategia (S/O/W) no mejoró la eficiencia de encapsulación de este tipo de moléculas. Esto pudo deberse a que el péptido dispersado se aglomeró en la superficie y durante la etapa de evaporación del solvente se presentó

un reparto del IFA hacia la fase externa debido a la presencia del agente emulsificante. Por lo cual se deberá recurrir a otras alternativas para incrementar la encapsulación de moléculas altamente hidrofóbicas como la de incrementar la concentración del PLGA, emplear la técnica de emulsión simple o modificar la concentración del agente emulsificante [55,94].

A pesar de que para los 6 péptidos seleccionados la estrategia de Fracción Soluble fue la que presentó mayores porcentajes de eficiencias de encapsulación, estos valores fueron relativamente bajos por lo que se deben buscar diferentes estrategias para incrementar la EE de cada péptido. También se puede inferir a partir de estos resultados que independiente de que dos moléculas presenten características similares en cuanto su carácter hidrofóbico no implica que se vayan a encapsular con la misma eficiencia. Esto se corroboró con los resultados reportados en la tabla 3-4, en donde las EE de un péptido en una estrategia fue diferente al determinado para su homólogo en la misma estrategia. Un ejemplo de esto se vio al comparar los resultados de 24229-FS y 23681-FS donde la EE en el primer caso fue de $65,80 \pm 3,89 \%$ y para el segundo de $21,82 \pm 1,36 \%$; este mismo comportamiento se repitió en los otros grupos evaluados. Además, también se encontró que el mismo péptido no se encapsuló de la misma manera ni con la misma eficiencia al emplear diferentes estrategias de encapsulación. Ya que el comportamiento general observado en los resultados fue que para el mismo péptido al ser microencapsulado por tres estrategias diferentes presentaron valores bastante distintos de EE, así como del % de péptido Adsorbido y % de péptido Atrapado. Todos estos resultados permitieron afirmar que tanto la hidrofobicidad del péptido como las variables en el proceso de microencapsulación influyeron en mayor o menor proporción en la carga y la eficiencia de encapsulación de los péptidos sintéticos en los sistemas desarrollados basados en micropartículas de PLGA.

3.5.4 Potencial Z

Con respecto al potencial Z, este permite predecir la estabilidad física de las partículas en suspensión, donde algunos autores sugieren que se requiere de mínimo ± 30 mV para que una suspensión sea estable únicamente por repulsión electrostática o de ± 20 mV para que se dé una estabilización electrostática y estérica [95]. Además, el valor determinado de este parámetro indica la naturaleza superficial de la partícula dependiendo de si es

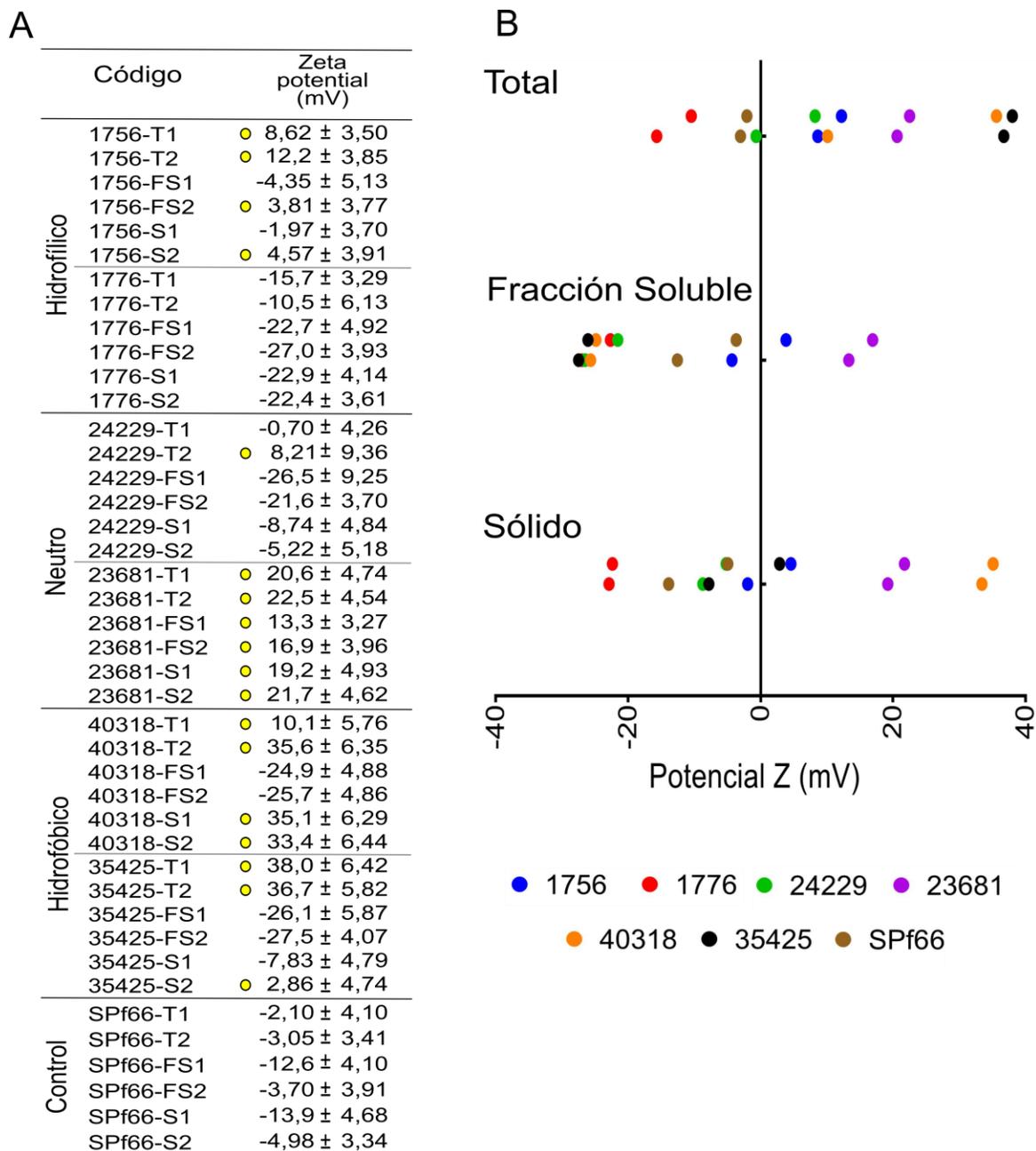
positivo o negativo, el cual favorece o no la fagocitosis [96,97]. En la figura 3-13 se muestran los resultados determinados del potencial Z para todos los sistemas elaborados, en donde aquellos con carga superficial positiva están indicados con un punto amarillo en la parte A de esta figura.

Se determinó el potencial Z del agua desionizada, destilada y filtrada en la que fueron dispersadas todas las muestras de micropartículas para ser analizadas, y este fue de 0,028 mV. En cuanto a las microesferas vacías estas presentaron un potencial Z de $-25,4 \pm 5,99$ mV, en donde el valor obtenido estuvo determinado fundamentalmente por las características iónicas de los grupos terminales del polímero. Esto permite inferir que probablemente aquellos sistemas cargados que presentaron valores diferentes de potencial Z a los determinados en las microesferas vacías se puedan atribuir a la proporción de péptido adsorbido o asociado con la superficie de la micropartícula, o a una posible asociación del emulsificante (PVA) de la fase acuosa externa sobre la superficie de la micropartícula [98].

Así mismo el valor de potencial Z indicó la estabilidad física de las dispersiones de los sistemas microparticulares. Se encontró que 18 sistemas presentaron valores superiores a ± 20 mV sugiriendo estabilidad física mediada por efecto electrostático y estérico, mientras que los sistemas restantes podrían presentar fenómenos de sedimentación y probablemente agregación cuando se dispersen en una fase acuosa.

Finalmente, al evaluar el potencial Z o carga superficial de los sistemas microparticulados obtenidos, se encontró que para los sistemas cargados con los péptidos **1756**, **23681** y **40318** en su mayoría presentaron valores de potencial Z positivos, indicados con un punto amarillo en la figura 3-13 A. Este potencial Z positivo se presentó en los 6 sistemas elaborados con el péptido neutro **23681** y en 4 de los 6 sistemas con los otros dos péptidos **1756** y **40318**, en donde para este último (péptido hidrofóbico) los sistemas elaborados por Fracción Soluble fueron los que presentaron valores negativos de potencial Z. Caso contrario a lo observado en los sistemas elaborados con los péptidos **1776** y **SPf66**, en donde los seis sistemas de cada péptido presentaron valores de potencial Z negativos y en 5 de los 6 sistemas elaborados con el péptido **24229**. Las micropartículas obtenidas con el péptido restante **35425** no presentaron una tendencia en el parámetro del potencial Z.

Figura 3-13. Propiedades fisicoquímicas de los sistemas microparticulares obtenidos. A: Valores de potencial Z determinados y B: Distribución del Potencial Z de los sistemas microparticulares desarrollados por estrategia de microencapsulación empleada.



Estos resultados permitieron determinar que la hidrofobicidad del péptido no está implícitamente relacionada con la carga superficial de una partícula. Ya que se vio claramente como un péptido hidrofílico **1756** dio sistemas con potencial Z positivo y su homólogo, el péptido **1776** dio sistemas con potencial Z negativo. De igual manera y

siguiendo el ejemplo de estos dos péptidos, a partir de los sistemas elaborados con los péptidos hidrofílicos no se pudo determinar si una estrategia de microencapsulación en particular influyó en el potencial Z de los sistemas obtenidos, y esto también ocurrió para los otros dos grupos de péptidos.

Con el fin de determinar la relación del péptido con la carga superficial de los sistemas microparticulares se evaluaron otros parámetros fisicoquímicos computados por la herramienta bioinformática empleada inicialmente para determinar el índice de GRAVY (anexos 1-7). Se encontró una posible relación entre la carga neta del péptido y el valor del potencial Z de los sistemas microparticulares obtenidos. La tendencia general observada fue que péptidos con carga neta positiva generaron en mayor proporción sistemas con potencial Z positivo, lo cual se vio con los péptidos **1756**, **23681**, **40318** y **35425**, mientras que los dos péptidos que presentaron cargas netas negativas **1776** y **SPf66** dieron en todos los sistemas microparticulares valores de potencial Z negativos; sin embargo, en los sistemas obtenidos con el péptido **24229** que presentó una carga neta de 0 predominaron partículas con potencial Z negativo.

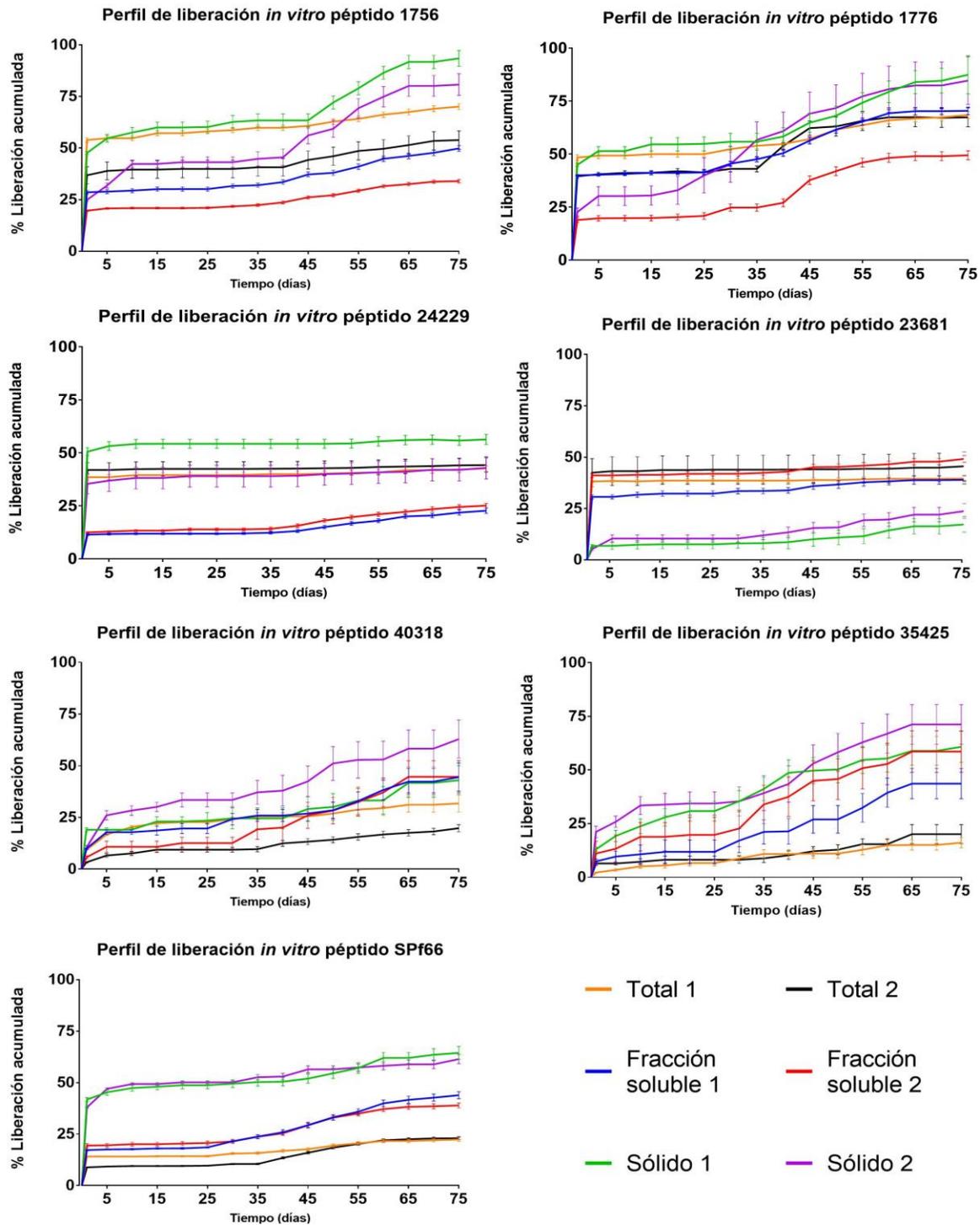
De manera general esta relación indicó que aquella carga neta presentada por el péptido es la que se refleja en el valor del potencial Z, que a su vez indica que algo del péptido quedó adsorbido o asociado en la superficie de la micropartícula.

3.5.5 Liberación *in vitro* de los péptidos

Para evaluar adecuadamente el efecto de la naturaleza del péptido en la liberación se determinó el perfil de liberación *in vitro* de cada uno de los péptidos a partir de cada uno de los sistemas microparticulares desarrollados durante un tiempo definido. El seguimiento se llevó a cabo durante 75 días, tiempo considerado suficiente para que se diera la completa degradación del polímero empleado, el cual por sus propiedades se esperaba que fuese entre 1 a 2 meses. Además, este tiempo de observación simula el esquema de vacunación establecido en la FIDIC que consta de administrar 2 dosis con un intervalo de 30 días. La liberación *in vitro* de las moléculas microencapsuladas presentó una combinación de diferentes etapas características en su perfil de liberación; la liberación inicial o primera etapa está atribuida a la liberación del péptido que está en la periferia de la partícula, es decir el péptido adsorbido; la fase latente o segunda etapa, donde hubo una mínima liberación del péptido que se mantuvo constante en el tiempo, seguida por una

tercera etapa en donde se dio una rápida liberación final. Este perfil trifásico permitiría simular una liberación pulsátil.

Figura 3-14. Perfiles de liberación *in vitro* de los péptidos microencapsulados.



En cuanto a los perfiles de los dos péptidos hidrofílicos **1756** y **1776** (figura 3-14) todos ellos presentaron un perfil trifásico. Con respecto al péptido **1756** las muestras preparadas por la estrategia Sólido presentaron la fase latente entre los días 10 hasta un poco más del día 40 y ambas presentaron una alta liberación en la tercera etapa alcanzando a liberar más del 75 % del péptido encapsulado. En cambio, en las partículas obtenidas por la estrategia de Fracción Soluble la liberación final comenzó a darse después del día 30 y se dio lentamente hasta el día 75 liberando solamente un 20 y 28 % del péptido encapsulado. Por último, los sistemas elaborados por la estrategia Total presentaron la misma tendencia que los sistemas 1756-S donde la mayor liberación del péptido se dio después del día 40. Por lo que los perfiles de este péptido están dentro de los parámetros buscados en cuanto a que la primera liberación (correspondiente a la primera dosis) estuvo entre el 20-55 % y después del día 30 se evidenció una segunda liberación que puede simular la segunda dosis.

Este comportamiento de liberación pulsátil permitió considerar que el mecanismo de liberación del péptido se da por fenómenos de erosión y de degradación del polímero. La liberación inicial está determinada por el péptido adsorbido y por el fenómeno de difusión, en donde la cantidad de poros y canales superficiales influyen en la cantidad de péptido liberado.

En cuanto al otro péptido hidrofílico los perfiles de liberación de 1776-T presentaron una fase latente hasta el día 25 (T1) y hasta el día 35 (T2) donde alcanzó una liberación máxima del 68 %. Mientras que para las otras dos estrategias la liberación final fue mayor que la anteriormente mencionada donde 1776-S en promedio liberó alrededor del 85 % del péptido encapsulado y los de Fracción Soluble dosificaron el 50 % (1776-FS1) y el 70 % (1776-FS2).

Es importante recalcar que las diferencias observadas en los perfiles de los lotes obtenidos por las mismas estrategias se deben a la cantidad inicial de péptido liberado en la primera etapa, pero el perfil es el mismo entre las dos curvas de liberación. La diferencia en la cantidad inicial de péptido liberado se puede deber a dos factores, uno está determinado por las variables del proceso de microencapsulación durante la preparación de las emulsiones, en donde existe la posibilidad que se hayan presentado diferentes velocidades de difusión del IFA hacia la fase acuosa externa pudiendo afectar tanto la cantidad de péptido adsorbido y péptido distribuido en la matriz de la partícula. Y la otra que esté

relacionada con las características morfológicas de los sistemas, ya que como se observó en las micrografías, los lotes presentaron un grado de polidispersidad que pudo influenciar la liberación del IFA al entrar en contacto con el medio de liberación.

También se puede considerar que estas diferencias entre las partículas de un mismo lote hayan generado una leve diferencia con el péptido adsorbido determinado al evaluar la carga, ya que de manera preliminar el péptido liberado durante la primera etapa está asociado con las características de las partículas como en su forma, tamaño, presencia de poros, estructura interna además de las condiciones del ensayo como temperatura, velocidad de agitación y composición del medio.

Con respecto a los perfiles de liberación de los péptidos neutros (figura 3-14) estos presentaron tendencias muy similares entre sí, sin embargo, es importante notar que en ninguno de los dos péptidos la liberación total superó el 55 %. En el caso de los sistemas 24229-T y 24229-S presentaron una liberación mínima en el tiempo ya que desde la liberación inicial el porcentaje liberado acumulado se mantuvo hasta finalizar el estudio. Este resultado probablemente se debió a posibles interacciones del péptido en estado sólido o insoluble con el polímero, que impidieron la difusión del péptido a través de la matriz polimérica. Para 24229-FS hubo un incremento después del día 35 hasta alcanzar aproximadamente un 25 % del péptido liberado.

Con respecto al péptido **23681** los sistemas microparticulares obtenidos por la metodología Sólido presentaron un lento incremento de péptido liberado, que se mantuvo constante hasta el día 30 con un porcentaje de liberación acumulado en promedio entre los lotes del 6 % y hasta alcanzar una liberación final de alrededor del 20 %. En los lotes de Fracción Soluble la liberación final solo aumentó en alrededor de un 9,5 % con respecto al liberado inicialmente, mientras que los otros dos sistemas (23681-T) presentaron una liberación sostenida como la observada en su homólogo **24229**.

En cuanto al último grupo evaluado, los perfiles de liberación de los péptidos hidrofóbicos **40318** y **35425** presentaron perfiles trifásicos (figura 3-14). En ambos péptidos los sistemas elaborados por la estrategia Total presentaron un incremento leve en la liberación final, luego de superar la fase latente que se presentó entre los días 25-35 hasta la finalización del ensayo. Los otros sistemas (FS y S) presentaron un perfil trifásico más notorio donde la liberación final fue mayor en comparación con la mantenida durante la segunda etapa.

En la figura 3-14 también se muestran los 6 sistemas elaborados con el péptido control **SPf66** también presentaron un perfil pulsátil. Los perfiles de liberación de estos sistemas fueron consistentes con el reportado en los estudios previos, en donde la liberación inicial fue del 10 %, la fase latente se mantuvo hasta el día 29 y la segunda liberación alcanzó un 43 % [5]. En los sistemas desarrollados durante este estudio los sistemas SPf66-FS presentaron una liberación inicial de alrededor del 18 %, la etapa de liberación mínima duro hasta el día 25 y liberó en promedio un 41 % del péptido en la etapa de liberación rápida. Las partículas SPf66-S también presentaron un perfil trifásico alcanzando a liberar hasta un 70 % del péptido, contrario al máximo porcentaje liberado por SPf66-T que solamente liberó el 23 %. Sin embargo, en los sistemas elaborados por la metodología Total, la cantidad final de péptido liberado fue menor que en los estudios previos, lo cual pueda atribuirse a algún tipo de asociación que se haya dado entre el péptido y el polímero, restringiendo su liberación.

Los resultados de los perfiles de liberación *in vitro* presentaron los dos tipos de perfiles, entre los cuales predominó la liberación pulsátil en tres etapas. Solo 4 sistemas de los 42 presentaron una mínima liberación y el resto presentaron las etapas características de un perfil trifásico, en donde la fase latente más rápida duró hasta el día 25 y las más largas fueron hasta el día 40.

Con relación al porcentaje de péptido liberado se puede notar como solo 4 sistemas que contenían péptidos hidrofílicos liberaron más del 75 % del péptido encapsulado. Por el contrario 9 sistemas no alcanzaron a superar una liberación total de más del 25 %, entre los cuales había sistemas cargados con péptidos neutros 24229(FS1 y FS2), 23681(S1 y S2), con péptidos hidrofóbicos 40318-T2 y 35425(T1 y T2) y dos que contenían el péptido control SPf66(T1 y T2). Debido a esto no se puede generalizar que la naturaleza del péptido sea la responsable de este fenómeno. Los otros 29 sistemas presentaron liberaciones que oscilaron entre el 25 % y el 75 % de péptido liberado.

Como se pudo observar en los perfiles de liberación de los péptidos neutros aún al encapsular el mismo péptido estos presentaron los dos perfiles (bifásico y trifásico). Esto pudo deberse probablemente a la distribución del péptido en la matriz del polímero, ya que si el IFA queda homogéneamente distribuido en el sistema particulado al degradarse este podría presentar una liberación sostenida en el tiempo; caso contrario al que se esperaría

en caso de que el IFA quedase contenido en el interior de la partícula presentando probablemente un perfil trifásico.

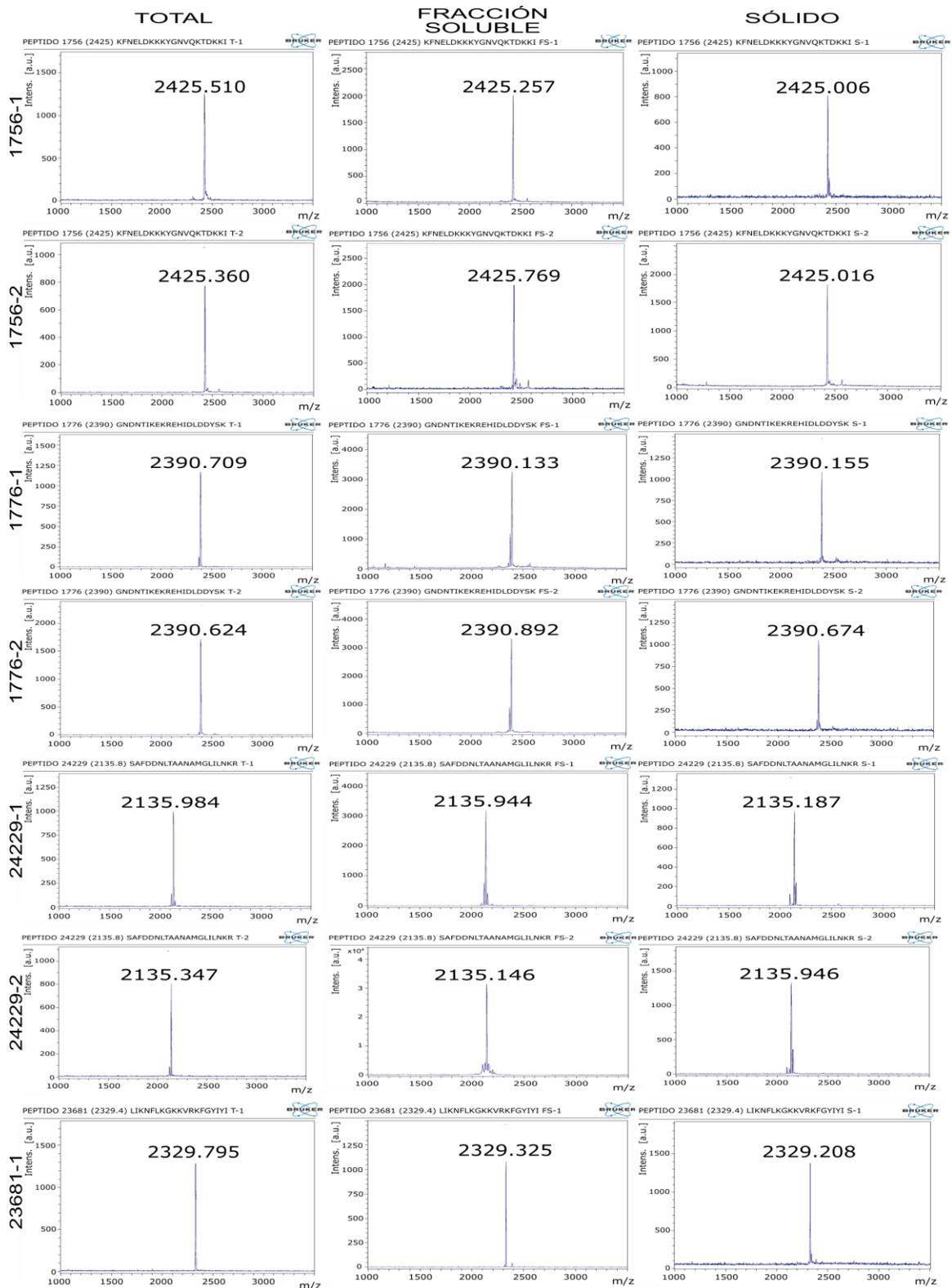
En resumen, la liberación de los sistemas que presentaron perfiles bifásicos estarían determinados principalmente por fenómenos de difusión del IFA a través de los poros y canales, mientras que en el perfil trifásico la liberación está influenciada tanto por fenómenos de difusión y erosión [99]. Se encontró que este último fue el que predominó en los tres grupos de péptidos evaluados y es el adecuado para administrar la vacuna que está siendo desarrollada en la FIDIC, ya que permite simular la administración de dos dosis espaciadas entre 25 a 40 días.

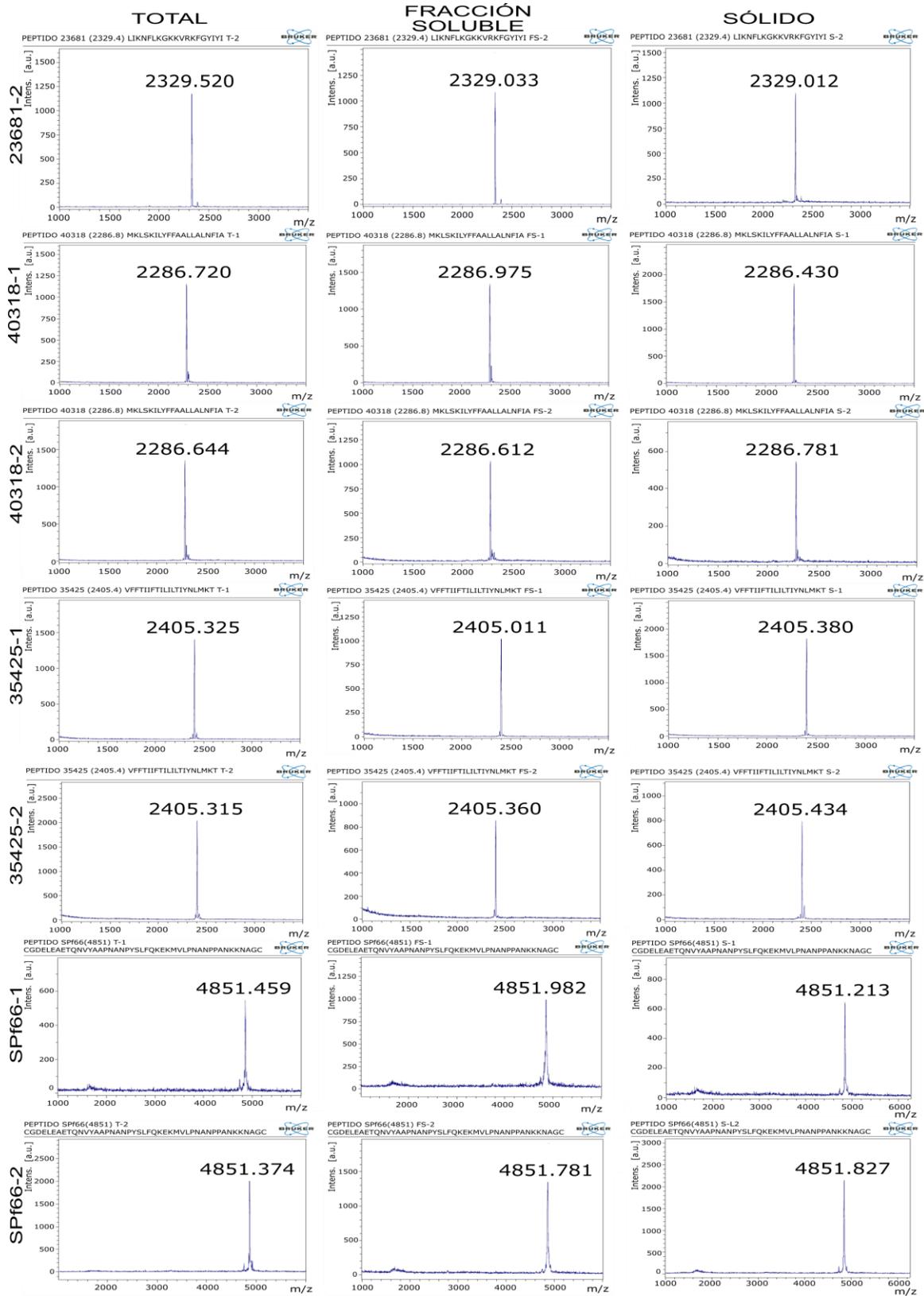
Otro resultado importante que se debe tener en cuenta es que todos los sistemas presentaron liberaciones incompletas del IFA, lo que indica que hay más factores involucrados en la liberación del péptido. En este estudio se mantuvieron constantes los parámetros del proceso independientemente de la estrategia de encapsulación empleada, donde lo que se esperaba al hacer esto era evitar la incidencia de estos parámetros en las características de los sistemas obtenidos. Por esto, se podría considerar que estas liberaciones parciales puedan estar relacionadas con que los péptidos presentaron algún tipo de interacción con el PLGA, ya que otros autores han reportado interacciones entre grupos hidroxilos de los IFAs y el PLGA. Otros estudios han encontrado que a medida que la partícula se degrada se pueden presentar adsorciones no específicas del co-polímero con el péptido, lo que restringe su liberación [63,100,101]. Por lo cual es importante seguir investigando acerca de métodos que permitan mejorar la liberación de los IFA en este tipo de sistemas de entrega, algunos autores sugieren la incorporación de aditivos como carbohidratos que reduzcan los fenómenos de agregación y adsorción ya mencionados [102–104].

3.5.6 Integridad de los péptidos

Finalmente se debe asegurar la integridad de las moléculas microencapsuladas. Como se muestra en este estudio los péptidos sintéticos son moléculas que presentan una alta dificultad en su proceso de obtención y por lo tanto son relativamente costosos de producir. Es decir, en el desarrollo de sistemas para la entrega de este tipo de IFA, es necesario garantizar la conservación de la integridad fisicoquímica del péptido y que no se vaya a ver alterada la potencial actividad biológica para la cual fue diseñado.

Figura 3-15. Determinación mediante espectrometría de masas MALDI-tof de la integridad del péptido extraído de cada uno de los sistemas microparticulares desarrollados.





En la figura 3-15 se muestran los análisis de espectrometría de masas MALDI-tof para los péptidos extraídos del sistema microparticulado según se mencionó en el numeral 2.5.6. Primero las microesferas liofilizadas se sometieron a un proceso de disolución y luego de extraído el péptido este se evaluó para saber si el proceso de microencapsulación había afectado su integridad fisicoquímica.

En este estudio, la integridad de los péptidos luego de ser microencapsulados fue determinada por espectrometría de masas MALDI-tof, debido a que esta técnica es rápida, directa y sensible y permitió analizar el péptido extraído incluso cuando los sistemas tenían muy poca cantidad del IFA encapsulado. En los resultados obtenidos por espectrometría de masas de los péptidos extraídos de los 42 sistemas se evidenció para cada uno la presencia de una única especie que correspondió al mismo PM experimental de los péptidos puros antes de microencapsular, como se encuentra reportado en la tabla 3-2, que a su vez corresponde al PM teórico de cada secuencia. Estos resultados sugieren que aparentemente ni el proceso, ni las técnicas de microencapsulación empleadas afectaron la integridad de los péptidos.

Con los resultados expuestos en la figura 3-15 se confirmó que la técnica de microencapsulación empleada de formación de la doble emulsión-evaporación del disolvente, fue adecuada para microencapsular péptidos sintéticos ya que no afectó la integridad de ninguno de los péptidos sintéticos encapsulados.

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1 Conclusiones

La presente investigación se enfocó en la evaluación del efecto de la naturaleza hidrofóbica de péptidos sintéticos en el proceso de microencapsulación en micropartículas elaboradas con PLGA. Para el desarrollo de este trabajo se abordaron las siguientes etapas: 1) selección y clasificación de las secuencias de acuerdo con su índice de hidrofobicidad, 2) síntesis de péptidos en fase sólida y caracterización de las moléculas, 3) microencapsulación de los péptidos sintetizados mediante la técnica de doble emulsión- evaporación del disolvente y 4) caracterización de los sistemas microparticulares obtenidos. Las conclusiones que se derivaron de la presente investigación se exponen a continuación:

- a) Mediante el índice de GRAVY se realizó la clasificación de las secuencias peptídicas seleccionadas para este estudio en secuencias hidrofílicas, neutras y secuencias hidrofóbicas.
- b) Los péptidos se sintetizaron por SPPS empleando la estrategia t-Boc/Bzl y se obtuvieron en las cantidades necesarias para llevar a cabo todos los ensayos planteados. El proceso de síntesis se vio afectado por hidrofobicidad de la secuencia, donde aquellas con mayor IG requirieron de más ciclos y de mayores tiempos para la reacción de acople.
- c) Las estrategias de microencapsulación planteadas: Total, Fracción Soluble y Sólido derivadas de la técnica de formación de una doble emulsión- evaporación del disolvente determinaron las características de los sistemas obtenidos al microencapsular los péptidos sintéticos.
- d) Los sistemas microparticulares elaborados presentaron tamaños de partícula apropiados para ser fagocitados y en su mayoría los sistemas obtenidos fueron

polidispersos y esféricos. La carga (Q) y la eficiencia (EE) estuvieron directamente relacionadas con la hidrofobicidad de los péptidos, mientras que el potencial Z está relacionado con la carga neta de la secuencia. Los sistemas microparticulares presentaron principalmente una liberación *in vitro* trifásica y la integridad de los péptidos sintéticos no se vio afectada por las variables del proceso de microencapsulación.

Como conclusión general de este trabajo se estableció que se obtuvieron satisfactoriamente microesferas cargadas con péptidos que presentaban diferente carácter hidrofóbico usando la metodología de doble emulsión- evaporación del disolvente, donde el efecto de la hidrofobicidad del péptido influyó directamente en la Q y EE de los sistemas. Dentro de los sistemas microparticulares desarrollados para la administración de un péptido sintético, independiente de la naturaleza hidrofóbica del péptido, es posible encontrar un sistema que reúna los requerimientos para ser considerado como sistema de entrega de la vacuna que está siendo desarrollada en FIDIC, ya que estos presentaron un tamaño y forma apropiados para ser fagocitados, conservaron la integridad de la molécula encapsulada y en su mayoría presentaron perfiles de liberación *in vitro* que simulan dos inmunizaciones acordes al esquema de vacunación planteado por el instituto.

4.2 Recomendaciones

Se recomienda evaluar el efecto de modificar algunos parámetros como lo son la proporción y cantidad de las fases, el pH y la inclusión de aditivos durante el proceso de elaboración de las microesferas, con el fin de minimizar el efecto de la hidrofobicidad del péptido e incrementar la carga y la eficiencia de encapsulación. De otra parte, se recomienda un estudio de optimización de los tiempos e intensidades de homogenización en el proceso de microencapsulación con el propósito de reducir el índice de polidispersidad de los sistemas microparticulares.

Bibliografía

- [1] Wagner AM, Gran MP, Peppas NA. Designing the new generation of intelligent biocompatible carriers for protein and peptide delivery. *Acta Pharm Sin B* 2018;8:147–64. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.013>.
- [2] Uhlig T, Kyprianou T, Martinelli FG, Oppici CA, Heiligers D, Hills D, et al. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics* 2014;4:58–69. <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.05.003>.
- [3] Rojas M, Rojas M, Amador R, Posada MA, Patarroyo ME. Desarrollo y pruebas de campo de la vacuna sintética contra la malaria SPf66. *Rev La Fac Med* 1993;41:60–9.
- [4] Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzman F, Romero P, et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 1988;332:158–61. <https://doi.org/10.1038/332158a0>.
- [5] Rosas JE, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for malaria synthetic peptide SPf66. *Vaccine* 2001;19:4445–51. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00192-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00192-X).
- [6] Carcaboso AM, Hernández RM, Igartua M, Rosas JE, Patarroyo ME, Pedraz JL. Potent, long lasting systemic antibody levels and mixed Th1/Th2 immune response after nasal immunization with malaria antigen loaded PLGA microparticles. *Vaccine* 2004;22:1423–32. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.10.020>.
- [7] Rosas JE, Pedraz JL, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Guzmán F, et al. Remarkably high antibody levels and protection against *P. falciparum* malaria in Aotus monkeys after a single immunisation of SPf66 encapsulated in PLGA microspheres. *Vaccine* 2002;20:1707–10. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00508-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00508-4).
- [8] Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 1963;85:2149–54. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>.
- [9] Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:5131–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.15.5131>.
- [10] Tam JP, Heath WF, Merrifield RB. SN 1 and SN 2 mechanisms for the deprotection of synthetic peptides by hydrogen fluoride: Studies to minimize the tyrosine alkylation side reaction. *Int J Pept Protein Res* 1983;21:57–65. <https://doi.org/10.1111/j.1399->

- 3011.1983.tb03078.x.
- [11] Moreno A, Patarroyo ME. Development of an asexual blood stage malaria vaccine. *Blood* 1989;74:537–46.
- [12] Valero M V., Amador LR, Galindo C, Figueroa J, Bello MS, Murillo LA, et al. Vaccination with SPf66, a chemically synthesised vaccine, against *Plasmodium falciparum* malaria in Colombia. *Lancet* 1993;341:705–10. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90483-W](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90483-W).
- [13] Noya G O, Berti YG, Noya BA De, Borges R, Zerpa N, Urbáez JD, et al. A population-based clinical trial with the spf66 synthetic *Plasmodium falciparum* malaria vaccine in Venezuela. *J Infect Dis* 1994;170:396–402. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.2.396>.
- [14] Sempértegui F, Estrella B, Moscoso J, Luis Piedrahita C, Hernández D, Gaybor J, et al. Safety, immunogenicity and protective effect of the SPf66 malaria synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in a randomized double-blind placebo-controlled field trial in an endemic area of Ecuador. *Vaccine* 1994;12:337–42. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)90098-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90098-1).
- [15] Beck H -P., Felger I, Huber W, Steiger S, Smith T, Weiss N, et al. Analysis of Multiple *Plasmodium falciparum* Infections in Tanzanian Children during the Phase III Trial of the Malaria Vaccine SPf66. *J Infect Dis* 1997;175:921–6. <https://doi.org/10.1086/513991>.
- [16] D'Alessandro U, Leach A, Olaleye BO, Fegan GW, Jawara M, Langerock P, et al. Efficacy trial of malaria vaccine SPf66 in Gambian infants. *Lancet* 1995. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)91321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)91321-1).
- [17] Nosten F, Luxemburger C, Kyle DE, Ballou WR, Wittes J, Wah E, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of SPf66 malaria vaccine in children in northwestern Thailand. *Lancet* 1996. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)04465-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)04465-0).
- [18] Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982;157:105–32. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0).
- [19] Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000;21:2475–90. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00115-0).
- [20] O'Donnell PB, McGinity JW. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;28:25–42. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00049-5).
- [21] Arshady R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polyactides and related polyesters. *J Control Release* 1991;17:1–21. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(91\)90126-X](https://doi.org/10.1016/0168-3659(91)90126-X).
- [22] Martín-Sabroso C, Fraguas-Sánchez AI, Aparicio-Blanco J, Cano-Abad MF, Torres-Suárez AI. Critical attributes of formulation and of elaboration process of PLGA-protein microparticles. *Int J Pharm* 2015;480:27–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.008>.
- [23] Zhang Z, Bi X, Li H, Huang G. Enhanced targeting efficiency of PLGA microspheres loaded with Lornoxicam for intra-articular administration. *Drug Deliv* 2011.

- <https://doi.org/10.3109/10717544.2011.596584>.
- [24] Andreas K, Zehbe R, Kazubek M, Grzeschik K, Sternberg N, Bäuml H, et al. Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: Investigation for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.014>.
- [25] Edelman R, Russell RG, Losonsky G, Tall BD, Tacket CO, Levine MM, et al. Immunization of rabbits with enterotoxigenic *E. coli* colonization factor antigen (CFA/I) encapsulated in biodegradable microspheres of poly (lactide-co-glycolide). *Vaccine* 1993;11:155–8. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(93\)90012-M](https://doi.org/10.1016/0264-410X(93)90012-M).
- [26] Hua FJ, Park TG, Lee DS. A facile preparation of highly interconnected macroporous poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) scaffolds by liquid-liquid phase separation of a PLGA-dioxane-water ternary system. *Polymer (Guildf)* 2003. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(03\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(03)00025-9).
- [27] Wan F, Yang M. Design of PLGA-based depot delivery systems for biopharmaceuticals prepared by spray drying. *Int J Pharm* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.025>.
- [28] Gavini E, Chetoni P, Cossu M, Alvarez MG, Saettone MF, Giunchedi P. PLGA microspheres for the ocular delivery of a peptide drug, vancomycin using emulsification/spray-drying as the preparation method: In vitro/in vivo studies. *Eur J Pharm Biopharm* 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2003.10.018>.
- [29] Park K, Skidmore S, Hadar J, Garner J, Park H, Otte A, et al. Injectable, long-acting PLGA formulations: Analyzing PLGA and understanding microparticle formation. *J Control Release* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.05.003>.
- [30] Picos D, Gómez M, Fernández D, Núñez L. Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Control* 2000.
- [31] Iqbal M, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *Int J Pharm* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.057>.
- [32] Taluja A, Youn YS, Bae YH. Novel approaches in microparticulate PLGA delivery systems encapsulating proteins. *J Mater Chem* 2007;17:4002. <https://doi.org/10.1039/b706939a>.
- [33] Alonso MJ, Gupta RK, Min C, Siber GR, Langer R. Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine* 1994;12:299–306. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90092-2).
- [34] Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)* 2011;3:1377–97. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>.
- [35] Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S. PLGA: A unique polymer for drug delivery. *Ther Deliv* 2015. <https://doi.org/10.4155/tde.14.91>.
- [36] Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.004>.
- [37] Lü JM, Wang X, Marin-Muller C, Wang H, Lin PH, Yao Q, et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9:325–41. <https://doi.org/10.1586/erm.09.15>.
- [38] D'Avila Carvalho Erbeta C. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-

- Glycolide) Copolymer. *J Biomater Nanobiotechnol* 2012. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2012.32027>.
- [39] Kricheldorf HR, Jonté JM, Berl M. Polylactones 3. Copolymerization of glycolide with L, L-lactide and other lactones. *Die Makromol Chemie* 1985;12:25–38. <https://doi.org/10.1002/macp.1985.020121985104>.
- [40] Washington MA, Swiner DJ, Bell KR, Fedorchak M V., Little SR, Meyer TY. The impact of monomer sequence and stereochemistry on the swelling and erosion of biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) matrices. *Biomaterials* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.11.037>.
- [41] Tamber H, Johansen P, Merkle HP, Gander B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:357–76. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.09.002>.
- [42] Pedraz JER y JL. Microesferas de PLGA: un sistema para la liberación controlada de moléculas con actividad inmunogénica. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* 2007;36:134–53.
- [43] Felnerova D, Viret JF, Glück R, Moser C. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Curr Opin Biotechnol* 2004;15:518–29. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.10.005>.
- [44] Pagels RF, Prud'Homme RK. Polymeric nanoparticles and microparticles for the delivery of peptides, biologics, and soluble therapeutics. *J Control Release* 2015;219:519–35. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.001>.
- [45] Powles L, Xiang SD, Selomulya C, Plebanski M. The use of synthetic carriers in malaria vaccine design. *Vaccines* 2015;3:894–929. <https://doi.org/10.3390/vaccines3040894>.
- [46] Xiang SD, Scalzo-Inguanti K, Minigo G, Park A, Hardy CL, Plebanski M. Promising particle-based vaccines in cancer therapy. *Expert Rev Vaccines* 2008. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.7.1103>.
- [47] Xiang SD, Scholzen A, Minigo G, David C, Apostolopoulos V, Mottram PL, et al. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.016>.
- [48] Bookstaver ML, Tsai SJ, Bromberg JS, Jewell CM. Improving Vaccine and Immunotherapy Design Using Biomaterials. *Trends Immunol* 2018;39:135–50. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.10.002>.
- [49] Chiellini F, Piras AM, Errico C, Chiellini E. Micro/nanostructured polymeric systems for biomedical and pharmaceutical applications. *Nanomedicine* 2008;3:367–93. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.3.367>.
- [50] Jorgensen L, Moeller EH, van de Weert M, Nielsen HM, Frokjaer S. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. *Eur J Pharm Sci* 2006;29:174–82. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.05.008>.
- [51] Johansen P, Men Y, Merkle HP, Gander B. Revisiting PLA/PLGA microspheres: An analysis of their potential in parenteral vaccination. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:129–46. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00079-5).
- [52] Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm* 1999;25:471–6. <https://doi.org/10.1081/DDC-100102197>.

- [53] Dyrberg T, Oldstone MB. Peptides as antigens. Importance of orientation. *J Exp Med* 1986;164:1344–9. <https://doi.org/10.1084/jem.164.4.1344>.
- [54] Briand JP, Muller S, Van Regenmortel MH. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J Immunol Methods* 1985;78:59–69. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(85\)90329-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(85)90329-1).
- [55] Wischke C, Schwendeman SP. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm* 2008;364:298–327. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.042>.
- [56] Ding D, Zhu Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Mater Sci Eng C* 2018;92:1041–60. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.036>.
- [57] Engineer C, Parikh J, Raval A. Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system. *Trends Biomater Artif Organs* 2011;25:79–85.
- [58] Hirota K, Ter H. Endocytosis of Particle Formulations by Macrophages and Its Application to Clinical Treatment. *Mol. Regul. Endocytosis*, 2012. <https://doi.org/10.5772/45820>.
- [59] Salvador A, Sandgren KJ, Liang F, Thompson EA, Koup RA, Pedraz JL, et al. Design and evaluation of surface and adjuvant modified PLGA microspheres for uptake by dendritic cells to improve vaccine responses. *Int J Pharm* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.037>.
- [60] Sharma G, Valenta DT, Altman Y, Harvey S, Xie H, Mitragotri S, et al. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *J Control Release* 2010;147:408–12. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.116>.
- [61] Abdelkader DH, El-Gizawy SA, Faheem AM, McCarron PA, Osman MA. Effect of process variables on formulation, in-vitro characterisation and subcutaneous delivery of insulin PLGA nanoparticles: An optimisation study. *J Drug Deliv Sci Technol* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.10.004>.
- [62] Feczko T, Tóth J, Gyenis J. Comparison of the preparation of PLGA-BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2008. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.07.011>.
- [63] Liu J, Ren H, Xu Y, Wang Y, Liu K, Zhou Y, et al. Mechanistic Evaluation of the Opposite Effects on Initial Burst Induced by Two Similar Hydrophilic Additives From Octreotide Acetate–Loaded PLGA Microspheres. *J Pharm Sci* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.02.012>.
- [64] Murty SB, Goodman J, Thanoo BC, DeLuca PP. Identification of chemically modified peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres under in vitro release conditions. *AAPS PharmSciTech* 2003. <https://doi.org/10.1208/pt040450>.
- [65] Gasmi H, Siepmann F, Hamoudi MC, Danede F, Verin J, Willart JF, et al. Towards a better understanding of the different release phases from PLGA microparticles: Dexamethasone-loaded systems. *Int J Pharm* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.032>.
- [66] Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *Int J Pharm* 2011;415:34–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>.

- [67] Lucke A, Göpferich A. Acylation of peptides by lactic acid solutions. *Eur J Pharm Biopharm* 2003. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00138-8](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00138-8).
- [68] Liu J, Xu Y, Wang Y, Ren H, Meng Z, Liu K, et al. Effect of inner pH on peptide acylation within PLGA microspheres. *Eur J Pharm Sci* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.04.017>.
- [69] Sarin VK, Kent SBH, Tam JP, Merrifield RB. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal Biochem* 1981;117:147–57. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90704-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90704-1).
- [70] Carcaboso AM, Hernández RM, Igartua M, Gascón AR, Rosas JE, Patarroyo ME, et al. Immune response after oral administration of the encapsulated malaria synthetic peptide SPf66. *Int J Pharm* 2003;260:273–82. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00266-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00266-7).
- [71] Quattrocchi, O., Laba, R. y Andrizzi S. *Introducción A La Hplc. Aplicación y Práctica*. 1st ed. Buenos Aires: 1992.
- [72] Kent SBH. Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem* 1988. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004521>.
- [73] L. Zhang, C. Goldammer, B. Henkel, G. Panhaus, F. Züohl, et al. *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis 1994: Proceedings of the 3rd International Symposium*, Oxford. In: Epton R, editor., Birmingham: Mayflower Worldwide; 1994, p. 711.
- [74] López MC, Silva Y, Thomas M a. C, Garcia A, Faus MJ, Alonso P, et al. Characterization of SPf(66)n: a chimeric molecule used as a malaria vaccine. *Vaccine* 1994. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(94\)90261-5](https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90261-5).
- [75] Amador R, Moreno A, Valero V, Murillo L, Mora AL, Rojas M, et al. The first field trials of the chemically synthesized malaria vaccine SPf66: safety, immunogenicity and protectivity. *Vaccine* 1992;10:179–84. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0264-410X\(92\)90009-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0264-410X(92)90009-9).
- [76] Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*. 1997. <https://doi.org/10.1201/9781003069225>.
- [77] Regenmortel. M.H.V. van, Briand J.P., Muller S. PS. *Synthetic Polypeptides as Antigens*, Volume 19. Elsevier Science; 1988.
- [78] Santoveña A, Oliva A, Guzman F, Patarroyo ME, Llabrés M, Fariña JB. Chromatographic characterization of synthetic peptides: SPf66 malaria vaccine. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00392-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00392-9).
- [79] Ito F, Fujimori H, Makino K. Incorporation of water-soluble drugs in PLGA microspheres. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2007. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.10.019>.
- [80] ISO 22412. *International Standard ISO22412 Particle Size Analysis - Dynamic Light Scattering*. 2017.
- [81] Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm* 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.04.013>.
- [82] Song X, Zhao Y, Hou S, Xu F, Zhao R, He J, et al. Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *Eur*

- J Pharm Biopharm 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.01.013>.
- [83] Feczko T, Tóth J, Dósa G, Gyenis J. Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles. *Chem Eng Process Process Intensif* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.05.006>.
- [84] Gaignaux A, Réeff J, Siepmann F, Siepmann J, De Vriese C, Goole J, et al. Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles. *Int J Pharm* 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.08.006>.
- [85] Liu R, Huang S-S, Wan Y-H, Ma G-H, Su Z-G. Preparation of insulin-loaded PLA/PLGA microcapsules by a novel membrane emulsification method and its release in vitro. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2006;51:30–8. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.05.014>.
- [86] Zhang C, Wu L, Tao A, Bera H, Tang X, Cun D, et al. Formulation and in vitro characterization of long-acting PLGA injectable microspheres encapsulating a peptide analog of LHRH. *J Mater Sci Technol* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.04.020>.
- [87] Yang YY, Chia HH, Chung TS. Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *J Control Release* 2000. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00291-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00291-1).
- [88] Yang YY, Chung TS, Ping Ng N. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials* 2001. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00178-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00178-2).
- [89] 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.036>.
- [90] Ding S, Serra CA, Vandamme TF, Yu W, Anton N. Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *J Control Release* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.037>.
- [91] Mata E, Igartua M, Patarroyo ME, Pedraz JL, Hernández RM. Enhancing immunogenicity to PLGA microparticulate systems by incorporation of alginate and RGD-modified alginate. *Eur J Pharm Sci.*, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.05.015>.
- [92] Liu J, Xu Y, Liu Z, Ren H, Meng Z, Liu K, et al. A modified hydrophobic ion-pairing complex strategy for long-term peptide delivery with high drug encapsulation and reduced burst release from PLGA microspheres. *Eur J Pharm Biopharm* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.09.022>.
- [93] Han FY, Thurecht KJ, Lam AL, Whittaker AK, Smith MT. Novel Polymeric Bioerodible Microparticles for Prolonged-Release Intrathecal Delivery of Analgesic Agents for Relief of Intractable Cancer-Related Pain. *J Pharm Sci* 2015;104:2334–44. <https://doi.org/10.1002/jps.24497>.
- [94] Rosca ID, Watari F, Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J Control Release* 2004;99:271–80. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.007>.
- [95] Müller 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 Rev 2001. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00118-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00118-6).
- [96] van Oss CJ, Absolom DR, Neumann AW. INTERACTION OF PHAGOCYTES WITH OTHER BLOOD CELLS AND WITH PATHOGENIC AND NONPATHOGENIC MICROBES. *Ann N Y Acad Sci* 1983. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1983.tb35197.x>.
- [97] Kim JH, Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Do HJ, et al. The use of biodegradable PLGA nanoparticles to mediate SOX9 gene delivery in human mesenchymal stem cells (hMSCs) and induce chondrogenesis. *Biomaterials* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.086>.
- [98] Andreas K, Zehbe R, Kazubek M, Grzeschik K, Sternberg N, Bäuml H, et al. Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: Investigation for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.014>.
- [99] Bhattacharjee S. Understanding the burst release phenomenon: toward designing effective nanoparticulate drug-delivery systems. *Ther Deliv* 2021. <https://doi.org/10.4155/tde-2020-0099>.
- [100] Kohno M, Andhariya J V., Wan B, Bao Q, Rothstein S, Hezel M, et al. The effect of PLGA molecular weight differences on risperidone release from microspheres. *Int J Pharm* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119339>.
- [101] Crotts G, Sah H, Park TG. Adsorption determines in-vitro protein release rate from biodegradable microspheres: Quantitative analysis of surface area during degradation. *J Control Release* 1997. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(96\)01624-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(96)01624-0).
- [102] Lu W, Park TG. Protein release from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: Protein stability problems. *PDA J Pharm Sci Technol* 1995;49:13–9.
- [103] Kim HK, Park TG. Microencapsulation of human growth hormone within biodegradable polyester microspheres: Protein aggregation stability and incomplete release mechanism. *Biotechnol Bioeng* 1999;65:659–67. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19991220\)65:6<659::AID-BIT6>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991220)65:6<659::AID-BIT6>3.0.CO;2-9).
- [104] Paillard-Giteau A, Tran VT, Thomas O, Garric X, Coudane J, Marchal S, et al. Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an S/O/W emulsion technique. *Eur J Pharm Biopharm* 2010;75:128–36. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.03.005>.

Anexos

1. Análisis 1756

[ProtParam](#)

ProtParam

User-provided sequence:

10 20
KFNELDKKKY GNVQKTDKKI

[References](#) and [documentation](#) are available.

Number of amino acids: 20

Molecular weight: 2424.83

Theoretical pI: 9.78

Amino acid composition:

Ala (A)	0	0.0%
Arg (R)	0	0.0%
Asn (N)	2	10.0%
Asp (D)	2	10.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	1	5.0%
Glu (E)	1	5.0%
Gly (G)	1	5.0%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	1	5.0%
Leu (L)	1	5.0%
Lys (K)	7	35.0%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	1	5.0%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	0	0.0%
Thr (T)	1	5.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	1	5.0%
Val (V)	1	5.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 3
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 7

Atomic composition:

Carbon	C	109
Hydrogen	H	182
Nitrogen	N	30
Oxygen	O	32
Sulfur	S	0

Formula: C₁₀₉H₁₈₂N₃₀O₃₂

Total number of atoms: 353

Extinction coefficients:

This protein does not contain any Trp residues. Experience shows that this could result in more than 10% error in the computed extinction coefficient.

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient	1490
Abs 0.1% (=1 g/l)	0.614

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is K (Lys).

The estimated half-life is: 1.3 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
3 min (yeast, in vivo).
3 min (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be -11.73
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 53.50

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -1.770

2. Análisis 1776

[ProtParam](#)

ProtParam

User-provided sequence:

10 20
GNDNTIKEKR EHIDLDYYSK

[References](#) and [documentation](#) are available.

Number of amino acids: 20

Molecular weight: 2390.55

Theoretical pI: 4.89

Amino acid composition:

[CSV format](#)

Ala (A)	0	0.0%
Arg (R)	1	5.0%
Asn (N)	2	10.0%
Asp (D)	4	20.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	0	0.0%
Glu (E)	2	10.0%
Gly (G)	1	5.0%
His (H)	1	5.0%
Ile (I)	2	10.0%
Leu (L)	1	5.0%
Lys (K)	3	15.0%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	0	0.0%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	1	5.0%
Thr (T)	1	5.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	1	5.0%
Val (V)	0	0.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B) 0 0.0%

(Z) 0 0.0%

(X) 0 0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 6

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 4

Atomic composition:

Carbon	C	100
Hydrogen	H	160
Nitrogen	N	30
Oxygen	O	38
Sulfur	S	0

Formula: C₁₀₀H₁₆₀N₃₀O₃₈

Total number of atoms: 328

Extinction coefficients:

This protein does not contain any Trp residues. Experience shows that this could result in more than 10% error in the computed extinction coefficient.

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 1490

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.623

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is G (Gly).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).

>20 hours (yeast, in vivo).

>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 31.26

This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 58.50

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -1.890

3. Análisis 23681

[ProtParam](#)

ProtParam

User-provided sequence:

10
LIKNFLKGKK VRKFGYIYI

[References](#) and [documentation](#) are available.

Number of amino acids: 19

Molecular weight: 2328.92

Theoretical pI: 10.39

Amino acid composition: [CSV format](#)

Ala (A)	0	0.0%
Arg (R)	1	5.3%
Asn (N)	1	5.3%
Asp (D)	0	0.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	0	0.0%
Glu (E)	0	0.0%
Gly (G)	2	10.5%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	3	15.8%
Leu (L)	2	10.5%
Lys (K)	5	26.3%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	2	10.5%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	0	0.0%
Thr (T)	0	0.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	2	10.5%
Val (V)	1	5.3%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 0

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 6

Atomic composition:

Carbon	C	115
Hydrogen	H	186
Nitrogen	N	28
Oxygen	O	23
Sulfur	S	0

Formula: C₁₁₅H₁₈₆N₂₈O₂₃

Total number of atoms: 352

Extinction coefficients:

This protein does not contain any Trp residues. Experience shows that this could result in more than 10% error in the computed extinction coefficient.

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient	2980
Abs 0.1% (=1 g/l)	1.280

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is L (Leu).

The estimated half-life is: 5.5 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
3 min (yeast, in vivo).
2 min (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be -25.25
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 117.89

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 0.000

4. Análisis 24229

[ProtParam](#)

ProtParam

User-provided sequence:

10 20
SAFDDNLTAA NAMGLILNKR

[References](#) and [documentation](#) are available.

Number of amino acids: 20

Molecular weight: 2135.42

Theoretical pI: 5.68

Amino acid composition:

Ala (A)	4	20.0%
Arg (R)	1	5.0%
Asn (N)	3	15.0%
Asp (D)	2	10.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	0	0.0%
Glu (E)	0	0.0%
Gly (G)	1	5.0%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	1	5.0%
Leu (L)	3	15.0%
Lys (K)	1	5.0%
Met (M)	1	5.0%
Phe (F)	1	5.0%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	1	5.0%
Thr (T)	1	5.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V)	0	0.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 2

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 2

Atomic composition:

Carbon	C	91
Hydrogen	H	151
Nitrogen	N	27
Oxygen	O	30
Sulfur	S	1

Formula: C₉₁H₁₅₁N₂₇O₃₀S₁

Total number of atoms: 300

Extinction coefficients:

As there are no Trp, Tyr or Cys in the region considered, your protein should not be visible by UV spectrophotometry.

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is S (Ser).

The estimated half-life is: 1.9 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
>20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 53.44
This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 98.00

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 0.000

5. Análisis 40318

[ProtParam](#)

ProtParam

User-provided sequence:

```
10      20  
MKLSKILYFF AALLALNFIA
```

[References](#) and [documentation](#) are available.

Number of amino acids: 20

Molecular weight: 2287.87

Theoretical pI: 9.70

Amino acid composition:

Ala (A)	4	20.0%
Arg (R)	0	0.0%
Asn (N)	1	5.0%
Asp (D)	0	0.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	0	0.0%
Glu (E)	0	0.0%
Gly (G)	0	0.0%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	2	10.0%
Leu (L)	5	25.0%
Lys (K)	2	10.0%
Met (M)	1	5.0%
Phe (F)	3	15.0%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	1	5.0%
Thr (T)	0	0.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	1	5.0%
Val (V)	0	0.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 0
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 2

Atomic composition:

Carbon	C	114
Hydrogen	H	179
Nitrogen	N	23
Oxygen	O	24
Sulfur	S	1

Formula: $C_{114}H_{179}N_{23}O_{24}S_1$

Total number of atoms: 341

Extinction coefficients:

This protein does not contain any Trp residues. Experience shows that this could result in more than 10% error in the computed extinction coefficient.

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient	1490
Abs 0.1% (=1 g/l)	0.651

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
>20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 3.13
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 156.50

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 1.605

6. Análisis 35425

[ProtParam](#)

ProtParam

User-provided sequence:

10 20
VFFTIIFITIL ILTIYNLMKT

[References](#) and [documentation](#) are available.

Number of amino acids: 20

Molecular weight: 2405.02

Theoretical pI: 8.56

Amino acid composition:

Ala (A)	0	0.0%
Arg (R)	0	0.0%
Asn (N)	1	5.0%
Asp (D)	0	0.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	0	0.0%
Glu (E)	0	0.0%
Gly (G)	0	0.0%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	5	25.0%
Leu (L)	3	15.0%
Lys (K)	1	5.0%
Met (M)	1	5.0%
Phe (F)	3	15.0%
Pro (P)	0	0.0%
Ser (S)	0	0.0%
Thr (T)	4	20.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	1	5.0%
Val (V)	1	5.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 0
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 1

Atomic composition:

Carbon	C	120
Hydrogen	H	190
Nitrogen	N	22
Oxygen	O	27
Sulfur	S	1

Formula: C₁₂₀H₁₉₀N₂₂O₂₇S₁

Total number of atoms: 360

Extinction coefficients:

This protein does not contain any Trp residues. Experience shows that this could result in more than 10% error in the computed extinction coefficient.

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient	1490
Abs 0.1% (=1 g/l)	0.620

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is V (Val).

The estimated half-life is: 100 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
>20 hours (yeast, in vivo).
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 28.76
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 170.50

Grand average of hydropathicity (GRAVY): 1.845

7. Análisis SPf66

[ProtParam](#)

ProtParam

User-provided sequence:

```

      10      20      30      40
CGDELEAETQ NVYAAPNANP YSLFQKEKMV LPNANPPANK KNAGC

```

[References](#) and [documentation](#) are available.

Number of amino acids: 45

Molecular weight: 4851.41

Theoretical pI: 5.01

Amino acid composition: [CSV format](#)

Ala (A)	7	15.6%
Arg (R)	0	0.0%
Asn (N)	7	15.6%
Asp (D)	1	2.2%
Cys (C)	2	4.4%
Gln (Q)	2	4.4%
Glu (E)	4	8.9%
Gly (G)	2	4.4%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	0	0.0%
Leu (L)	3	6.7%
Lys (K)	4	8.9%
Met (M)	1	2.2%
Phe (F)	1	2.2%
Pro (P)	5	11.1%
Ser (S)	1	2.2%
Thr (T)	1	2.2%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	2	4.4%
Val (V)	2	4.4%
Py1 (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 5

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 4

Atomic composition:

Carbon	C	209
Hydrogen	H	326
Nitrogen	N	58
Oxygen	O	69
Sulfur	S	3

Formula: C₂₀₉H₃₂₆N₅₈O₆₉S₃

Total number of atoms: 665

Extinction coefficients:

This protein does not contain any Trp residues. Experience shows that this could result in more than 10% error in the computed extinction coefficient.

Extinction coefficients are in units of M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 3105
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.640, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 2980
Abs 0.1% (=1 g/l) 0.614, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is C (Cys).

The estimated half-life is: 1.2 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
 >20 hours (yeast, in vivo).
 >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 40.04
This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 54.44

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.787

8. Resumen de resultados de los sistemas microparticulares elaborados

	Código	PLGA (mg)	Péptido (mg)	MP (mg)	Rendimiento proceso (%)	Z-ave (d.nm)	Pdl	Zeta potencial (mV)	%Q	%EE	% Adsorbido	% Atrapado
Hidrofílico	1756-T1	62,52	6,28	50,48	73,37	3194	0,137	8,62 ± 3,50	1,54±0,05	16,85±0,73	56,00±3,15	44,00±3,00
	1756-T2	62,50	6,28	50,77	73,82	4572	1,000	12,2 ± 3,85	0,98±0,02	10,74±0,58	57,41±5,04	42,59±2,00
	1756-FS1	62,53	5,89	53,77	78,59	3130	0,087	-4,35 ± 5,13	1,93±0,07	22,34±0,83	41,04±3,02	58,96±2,18
	1756-FS2	62,80	5,89	52,03	75,75	3293	0,518	3,81 ± 3,77	2,71±0,08	31,35±0,94	37,34±0,78	62,66±2,88
	1756-S1	62,64	6,30	56,00	81,23	1839	0,234	-1,97 ± 3,70	0,37±0,01	4,00±0,16	23,70±3,60	76,30±1,80
	1756-S2	62,67	6,32	49,51	71,76	4422	0,325	4,57 ± 3,91	0,26±0,01	2,82±0,13	26,41±3,62	73,59±2,56
	1776-T1	62,48	6,30	51,16	74,38	4640	0,171	-15,7 ± 3,29	2,14±0,02	23,45±0,28	65,07±0,86	34,93±0,86
	1776-T2	62,64	6,29	50,50	73,26	3935	0,850	-10,5 ± 6,13	2,63±0,08	28,84±0,96	59,70±1,06	40,30±3,17
	1776-FS1	62,67	5,55	57,08	83,67	5444	0,179	-22,7 ± 4,92	2,07±0,04	25,54±0,55	50,73±1,66	49,27±1,40
	1776-FS2	62,78	5,55	48,23	70,58	5202	0,593	-27,0 ± 3,93	2,13±0,09	26,12±1,04	42,16±3,05	57,84±2,58
	1776-S1	62,61	6,26	52,23	75,84	3808	0,796	-22,9 ± 4,14	0,35±0,05	3,89±0,54	63,82±11,14	36,18±8,44
	1776-S2	62,62	6,39	48,87	70,82	5114	0,140	-22,4 ± 3,61	0,24±0,02	2,64±0,26	63,31±7,92	36,69±5,81
Neutro	24229-T1	62,46	6,28	58,65	85,32	3565	0,375	-0,70 ± 4,26	4,47±0,10	49,06±1,26	62,77±1,23	37,23±2,26
	24229-T2	62,60	6,28	54,31	78,85	3511	0,429	8,21 ± 9,36	5,46±0,07	59,85±0,96	65,02±0,83	34,98±1,36
	24229-FS1	62,70	2,67	51,58	78,90	5736	0,677	-26,5 ± 9,25	2,74±0,04	66,99±1,10	35,52±1,16	64,48±1,16
	24229-FS2	62,88	2,67	53,95	82,30	4325	0,245	-21,6 ± 3,70	2,64±0,15	64,61±3,73	26,34±0,74	73,66±5,73
	24229-S1	62,55	6,31	48,07	69,81	2639	0,975	-8,74 ± 4,84	1,31±0,11	14,30±1,16	51,42±6,70	48,58±4,58
	24229-S2	62,53	6,27	53,24	77,38	4047	0,540	-5,22 ± 5,18	1,18±0,03	12,94±0,33	57,74±1,14	42,26±2,27
	23681-T1	62,64	6,28	42,46	61,61	2971	0,321	20,6 ± 4,74	2,28±0,17	25,08±1,94	52,58±0,93	47,42±7,68
	23681-T2	62,51	6,26	43,60	63,40	4343	0,430	22,5 ± 4,54	1,71±0,12	18,90±1,34	57,25±2,29	42,75±6,71
	23681-FS1	62,78	4,03	68,10	101,93	9477	0,587	13,3 ± 3,27	1,12±0,05	18,54±0,83	30,14±1,23	69,86±4,30
	23681-FS2	62,62	4,03	46,01	69,03	4329	0,494	16,9 ± 3,96	1,52±0,06	25,10±1,07	49,29±3,83	52,07±1,91
	23681-S1	62,49	6,57	51,82	75,04	2007	0,360	19,2 ± 4,93	0,62±0,06	6,81±0,62	34,57±3,78	65,43±8,23
	23681-S2	62,60	6,26	53,31	77,42	3292	0,266	21,7 ± 4,62	0,51±0,04	5,63±0,41	47,57±5,71	52,43±4,54
Hidrofóbico	40318-T1	62,51	6,28	49,30	71,67	3903	1,000	10,1 ± 5,76	0,97±0,05	10,59±0,59	24,72±1,56	75,28±5,32
	40318-T2	62,51	6,28	50,54	73,47	5200	0,584	35,6 ± 6,35	1,00±0,05	10,98±0,58	9,88±0,93	90,12±5,24
	40318-FS1	62,80	0,85	53,41	83,91	3449	0,850	-24,9 ± 4,88	0,22±0,02	16,65±1,75	25,82±7,08	74,18±7,28
	40318-FS2	62,49	0,85	53,11	83,85	4848	0,485	-25,7 ± 4,86	0,25±0,02	18,82±1,25	23,17±0,62	76,83±6,61
	40318-S1	62,61	6,30	53,24	77,26	5028	0,498	35,1 ± 6,29	0,28±0,01	3,04±0,12	42,05±4,04	57,95±2,06
	40318-S2	62,68	6,36	54,22	78,53	6051	0,263	33,4 ± 6,44	0,25±0,01	2,68±0,07	35,88±2,32	64,12±1,06
	35425-T1	62,47	6,29	53,46	77,75	4103	0,729	38,0 ± 6,42	1,01±0,05	11,03±0,54	4,48±0,47	95,52±4,84
	35425-T2	62,87	6,28	51,01	73,77	5029	0,498	36,7 ± 5,82	0,81±0,06	8,92±0,62	6,59±0,18	93,41±6,96
	35425-FS1	62,89	0,45	59,30	93,62	4330	0,017	-26,1 ± 5,87	0,24±0,02	33,71±3,26	21,49±6,97	78,51±6,72
	35425-FS2	62,57	0,45	47,51	75,39	3210	1,000	-27,5 ± 4,07	0,24±0,02	33,09±2,84	10,48±4,45	89,52±7,32
	35425-S1	62,62	6,27	56,47	81,97	4525	0,567	-7,83 ± 4,79	0,28±0,02	3,10±0,25	44,08±7,23	55,92±3,52
	35425-S2	62,54	6,25	56,92	82,74	7422	0,330	2,86 ± 4,74	0,22±0,01	2,50±0,09	39,99±1,53	60,01±3,06
Control	SPf66-T1	62,57	6,58	52,25	75,56	3400	0,316	-2,10 ± 4,10	8,05±0,15	84,60±2,01	41,91±1,53	58,09±1,81
	SPf66-T2	62,52	6,28	49,94	72,59	3685	0,328	-3,05 ± 3,41	7,50±0,21	82,19±2,52	13,60±1,36	86,40±2,75
	SPf66-FS1	62,83	5,78	51,23	74,67	2856	0,326	-12,6 ± 4,10	4,83±0,17	57,29±1,95	27,07±1,54	72,93±3,05
	SPf66-FS2	62,63	5,78	51,57	75,38	2478	0,876	-3,70 ± 3,91	5,16±0,06	61,09±0,71	24,87±0,20	75,13±1,14
	SPf66-S1	62,67	6,33	40,99	59,41	5571	1,000	-13,9 ± 4,68	0,73±0,04	7,92±0,47	23,48±4,63	76,52±3,63
	SPf66-S2	62,52	6,29	50,78	73,80	2986	0,882	-4,98 ± 3,34	0,74±0,06	8,05±0,61	21,42±2,92	78,58±6,95