

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Diseño y desarrollo de un sistema microparticulador lipopolimérico para la administración de un péptido sintético modelo de naturaleza hidrofílica

María Angélica Velandia Paris

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2021

Diseño y desarrollo de un sistema microparticulador lipopolimérico para la administración de un péptido sintético modelo de naturaleza hidrofílica

María Angélica Velandia Paris

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Director: Jaiver Eduardo Rosas Pérez

QF.PhD. Ciencias Farmacéuticas

Profesor asociado

Línea de Investigación:

Tecnología Farmacéutica: Sistemas micro y nano particulares

Grupo de Investigación:

Sistemas para liberación controlada de moléculas biológicamente activas (SILICOMOBA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2021

*“The cosmos is within us. We are
made of star stuff; we are a way for the
universe to know itself”*

—Carl Sagan

Agradecimientos

A mi familia y amigos por su acompañamiento, apoyo y ayuda en este proceso.

A mi director, el profesor Jaiver Rosas por impartirme sus conocimientos y brindarme su apoyo total durante el desarrollo de la investigación, le agradezco su paciencia, cada una de sus enseñanzas y consejos. Al departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y a personas como Jorge Laverde, por tenerme paciencia y darme ánimo en momentos difíciles, e Ivonne Machado quién me brindo su colaboración siempre que lo necesité.

A mis compañeras de laboratorio y grupo de investigación quienes me apoyaron en aquellos días no tan fáciles y me colaboraron con su experiencia, consejos experimentales y explicaciones.

.

Resumen

DISEÑO Y DESARROLLO DE UN SISTEMA MICROPARTICULAR LIPOPOLIMÉRICO PARA LA ADMINISTRACIÓN DE UN PÉPTIDO SINTÉTICO DE NATURALEZA HIDROFÍLICA

En los últimos años se ha despertado un gran interés por los sistemas para la entrega de fármacos (SEF) mediante liberación controlada, debido a que permiten superar ciertas limitaciones de algunos ingredientes farmacéuticos activos (IFAs). Entre estos IFAs, se destacan los péptidos que, a pesar de ser degradados rápidamente, son moléculas esenciales en la vida debido a la posibilidad que tienen de cumplir múltiples funciones en el organismo, lo que ha permitido que sean considerados como IFA de elección para tratar numerosas enfermedades.

Se ha reportado que los SEF particulados son capaces de proteger a moléculas lábiles como los péptidos de agentes externos como las enzimas, haciendo que se prolongue su tiempo de vida media y por tanto mejorando su actividad. Teniendo en cuenta esto se han diseñado diferentes SEF, entre ellos los liposomas, las partículas poliméricas y las partículas sólidas lipídicas, siendo estos sistemas los que han mostrado de manera general los mejores resultados como transportadores de IFAs. Producto de estas investigaciones, se ha mostrado un gran interés en desarrollar un SEF que permita reunir las ventajas de las partículas poliméricas y las partículas sólidas lipídicas, planteándose de esta forma el diseño y desarrollo de los sistemas híbridos lipopoliméricos.

Con el propósito de contribuir en el campo de la investigación de SEF, en el marco de este trabajo se planteó el desarrollo una metodología para la obtención de tres sistemas particulados: micropartículas poliméricas, partículas sólidas lipídicas y micropartículas lipopoliméricas, empleando como material polimérico PLGA 50:50 (Viscosidad inherente: 0,8dL/g) y como material lipídico una mezcla de mono, di y triglicéridos C₁₂-C₁₈. Todos los sistemas se obtuvieron vacíos y cargados con un péptido sintético modelo de naturaleza hidrofílica, mediante la metodología de doble emulsión – evaporación del solvente.

Todos los sistemas fueron caracterizados en cuanto a morfología, tamaño, potencial Z, eficiencia de encapsulación y perfil de liberación del péptido. Como resultado, se logró obtener partículas en su mayoría esféricas de tamaño micrométrico para los sistemas poliméricos (3,08-5,60 μm) y lipopoliméricos (3,22-3,93 μm), de tamaño nanométrico para el sistema sólido lipídico (135,8-162,9 nm) y con un potencial Z entre -18,5mV y -24,5mV para las micropartículas poliméricas, -15,5mV y -29,9mV para las partículas sólidas lipídicas, -20,0mV y -26,1mV para las micropartículas lipopoliméricas. En cuanto a la eficiencia de encapsulación se determinó que el mejor sistema fue el de las micropartículas poliméricas con una E.E. promedio del 57,42% seguido de las micropartículas lipopoliméricas cuya E.E. promedio fue de 43,15% y las partículas sólidas lipídicas con una E.E. promedio del 40,40%. En referencia al perfil de liberación, se observó que las micropartículas lipopoliméricas tienden a mostrar un comportamiento intermedio entre los observados en las micropartículas poliméricas y en las partículas lipídicas.

En conclusión, en este trabajo se desarrolló una metodología para la obtención y caracterización de un sistema microparticulado lipopolimérico que permite la encapsulación de un péptido sintético modelo de naturaleza hidrofílica con características tanto de micropartículas poliméricas (Tamaño y morfología) como de partículas sólidas lipídicas (E.E. y perfil de liberación).

Palabras clave: Sistemas particulados, polímero, lípido, péptido sintético, doble emulsión, evaporación del solvente, híbridos, lipopoliméricos

Abstract

DESIGN AND DEVELOPMENT OF A LIPOPOLYMERIC MICROPARTICULAR SYSTEM FOR THE ADMINISTRATION OF A SYNTHETIC PEPTIDE OF HYDROPHILIC NATURE

In recent years, controlled release drug delivery systems (DDS) have had great interest due they make possible to overcome certain limitations of some active pharmaceutical ingredients (APIs), between these APIs stand out peptides that despite of fast degradation, are essential molecules in life due to the possibility to accomplish multiple functions in the body, this has allowed to be considerate as choice API to treat numerous diseases.

Particulate DDS have been shown to be able to protect labile molecules such as peptides from external agents such as enzymes, prolonging their half-life and therefore improving their activity. Bearing this in mind, different DDS have been designed, including liposomes, polymeric particles, and solid lipid particles, these being the ones that in general have shown better results as APIs carriers. As product of these research a great interest has been shown in developing a DDS that allows to have advantages of polymeric particles and solid lipid particles, proposing in this way the design and development of hybrid lipopolymeric systems.

With the purpose of contribute to research field of DDS, within the framework of this work, the development of a methodology for the obtention of three particulate systems: Polymeric microparticles, solid lipid particles and lipopolymeric particles was proposed, using as polymeric material PLGA 50:50 (Inherent Viscosity 0,8 dL/g) and as lipidic material a mixture of mono, di and triglycerides C₁₂-C₁₈. All systems were obtained empty and loaded with a model synthetic peptide of hydrophilic nature using a methodology of double emulsion – solvent evaporation.

All systems obtained were characterized in terms of morphology, size, Z potential, encapsulation efficiency and release profile. As result, was achieved particles mostly spherical, of micrometrical size for polymeric systems (3,08-5,60 µm) and lipopolymeric

(3,22-3,93 μm), nanometrical size for the solid lipid system (135,8-162,9 nm), with a Z potential between -18,5mV -and -24,5mV for the polymeric particles, -15,5mV and -29,9mV for the solid lipid particles and -20,0mV and -26,1mV for the lipopolymeric particles. Regarding encapsulation efficiency, it was observed that lipopolymeric particles tend to show an intermediate behavior between the behavior observed in polymeric particles and in lipid particles.

In conclusion, in this work a method was developed to obtain and characterize a lipopolymeric microparticle system that allows the encapsulation of a model synthetic peptide of a hydrophilic nature with characteristics of both polymeric particles (size and morphology) and solid lipid particles (E.E. and release profile).

Keywords: Particulate systems, polymer, lipid, synthetic peptide, double emulsion, solvent evaporation, hybrids, lipopolymeric.

Contenido

Resumen	IX
Abstract.....	XI
Introducción	1
Objetivos.....	5
1. Aspectos teóricos	6
1.1 Sistemas de entrega para la liberación controlada de IFAs	6
1.2 Técnicas usadas para la obtención de SEF para liberación controlada	14
1.2.1 Métodos químicos.....	15
1.2.2 Métodos Físicos.....	16
1.3 SEF híbridos lipopoliméricos para liberación controlada.....	21
1.4 Métodos usados para la preparación de SEF híbridos para liberación controlada	22
1.4.1 Método de dos pasos	22
1.4.2 Método de un paso	23
1.5 Fármaco modelo: Péptido sintético de naturaleza hidrofílica	25
2. Estado del arte.....	29
3. Obtención de sistemas microparticulares poliméricos.....	33
3.1 Introducción.....	33
3.2 Materiales y métodos	37
3.2.1 Materiales y equipos	37
3.3 Metodología	37
3.3.1 Obtención de micropartículas poliméricas.....	37
3.3.2 Caracterización de micropartículas poliméricas	42
3.4 Resultados y discusión.....	45
3.4.1 Obtención de las micropartículas poliméricas	45

3.4.2	Caracterización:	47
3.5	Conclusiones	56
4.	Obtención de sistemas particulares lipídicos.....	58
4.1	Introducción	58
4.2	Materiales y métodos.....	61
4.2.1	Materiales y equipos:.....	61
4.3	Metodología	62
4.3.1	Obtención de partículas sólidas lipídicas	62
4.3.2	Caracterización de las partículas sólidas lipídicas	65
4.4	Resultados y discusión	68
4.4.1	Obtención de partículas lipídicas	68
4.4.2	Caracterización:	71
4.5	Conclusiones	82
5.	Obtención de sistemas microparticulares híbridos lipopoliméricos	83
5.1	Introducción	83
5.2	Materiales y métodos.....	87
5.2.1	Reactivos y equipos	87
5.3	Metodología.....	87
5.3.1	Obtención de micropartículas lipopoliméricas.....	87
5.3.2	Caracterización de micropartículas híbridas lipopoliméricas.....	92
5.4	Resultados y discusión	95
5.4.1	Obtención de micropartículas lipopoliméricas.....	95
5.4.2	Caracterización	96
5.5	Conclusiones	106
6.	Comparación entre los diferentes sistemas microparticulares desarrollados	108
7.	Conclusiones	113
8.	Recomendaciones	114
9.	Anexos.....	115
9.1	Anexo A: Estado del arte de los sistemas híbridos lipopoliméricos desarrollados por diferentes metodologías en los últimos años y sus aplicaciones	115
9.2	Anexo B: Aspectos evaluados en ensayos preliminares para la obtención de los SEF desarrollados.....	128
10.	Bibliografía	131

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Clasificación de los métodos para la obtención de SEF para liberación controlada.....	14
Figura 1-2: Representación esquemática del proceso de polimerización interfacial para obtener SEF, en morado y verde se esquematizan los monómeros multifuncionales reactivos	15
Figura 1-3: Representación esquemática del proceso de polimerización in situ para obtener SEF.....	16
Figura 1-4: Representación esquemática del proceso de coacervación.....	17
Figura 1-5: Representación gráfica de la técnica expansión por fluidos supercríticos RESS.....	18
Figura 1-6: Representación esquemática de la técnica secado por aspersion.	19
Figura 1-7: Representación esquemática de la técnica lecho fluidizado.....	19
Figura 1-8: Representación esquemática del método de evaporación del solvente.	20
Figura 1-9 : Representación esquemática del método de dos pasos para la obtención de SEF híbridos para liberación controlada.....	23
Figura 1-10: Representación esquemática del método de un paso para la obtención de SEF híbridos para liberación controlada.....	24
Figura 2-1: Sistemas de entrega de péptidos y proteínas desarrollados por diferentes técnicas.....	32
Figura 3-1: Representación gráfica del proceso para la formación de la emulsión 1 (W ₁ /O).....	39
Figura 3-2: Representación gráfica de la formación de la emulsión 2 (W ₁ /O/W ₂)	40
Figura 3-3: Representación gráfica del proceso de extracción/evaporación del solvente.	41
Figura 3-4: Representación gráfica del proceso de lavado de las micropartículas obtenidas.	41
Figura 3-5: Representación gráfica del proceso de liofilización para la obtención de las micropartículas poliméricas secas.....	42
Figura 3-6: Morfología de micropartículas poliméricas obtenidas mediante SEM a diferentes magnificaciones. A y D sistemas vacíos, B,E,C y F sistemas cargados con el péptido sintético hidrofílico.	49
Figura 3-7: Distribución de tamaños de micropartículas poliméricas vacías (A) y cargadas (B) usando LD mediante el equipo MasterSizer.....	51
Figura 3-8: Perfiles de liberación del péptido encapsulado en las micropartículas poliméricas.....	56

Figura 4-1: Representación gráfica del proceso para la formación de la emulsión 1 (W_1/O).	63
Figura 4-2: Representación gráfica de la formación de la emulsión 2 ($W_1/O/W_2$).	64
Figura 4-3: Representación gráfica del proceso de evaporación del solvente.	64
Figura 4-4: Representación gráfica del proceso de lavado de los sistemas lipídicos obtenidos.	65
Figura 4-5: Representación gráfica del proceso de liofilización para la obtención de los sistemas lipídicos secas.	65
Figura 4-6: Morfología de partículas sólidas lipídicas obtenidas mediante SEM a diferentes magnificaciones. A y D sistemas vacíos, B,E,C y F sistemas cargados con el péptido sintético hidrofílico.	72
Figura 4-7: Distribuciones de tamaños de partículas sólidas lipídicas vacías (A) y cargadas (B) usando DLS mediante el equipo ZetaSizer	75
Figura 4-8: Análisis esquemático del movimiento del péptido hacia la superficie de la partícula y su posterior expulsión del sistema debido al arreglo cristalino del lípido durante el proceso de evaporación del solvente.	77
Figura 4-9: Propuesta del arreglo superficial de la partícula sólida lipídica cargada con péptido	79
Figura 4-10: Perfiles de liberación del péptido encapsulado a partir de las partículas sólidas lipídicas	81
Figura 5-1: Parámetros importantes de algunos SEF y su comparación con los sistemas híbridos lipopoliméricos	85
Figura 5-2: Representación gráfica de la formación de a emulsión 1 (W_1/O)	89
Figura 5-3: Representación gráfica de la formación de la emulsión 2 ($W_1/O/W_2$)	90
Figura 5-4: Representación gráfica del proceso de extracción/evaporación del solvente.	90
Figura 5-5: Representación gráfica del proceso de lavados de las micropartículas lipopoliméricas obtenidas.	91
Figura 5-6: Representación gráfica del proceso de liofilización para la obtención de las micropartículas lipopoliméricas secas.	92
Figura 5-7: Morfología de micropartículas lipopoliméricas obtenidas mediante SEM a diferentes magnificaciones A y D sistemas vacíos, B,E,C y F sistemas cargados con el péptido sintético hidrofílico.	97
Figura 5-8: Distribuciones de tamaños de micropartículas híbridas lipopoliméricas vacías (A) y cargadas (B) usando LD mediante el equipo MasterSizer.	101
Figura 5-9: Perfiles de liberación del péptido encapsulado en las micropartículas híbridas lipopoliméricas.	106
Figura 6-1: Gráfica comparativa de las características farmacotécnicas estudiadas en función de los sistemas obtenidos	111
Figura 6-2: Gráfica comparativa de los perfiles de liberación obtenidos para cada sistema	112

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Ventajas y desventajas de los SEF desarrollados para el control de liberación de un IFA(19)	7
Tabla 1-2: Descripción de SEF para control de liberación de IFAs.....	8
Tabla 1-3: Listado de algunos péptidos sintéticos aprobados por la FDA.	26
Tabla 1-4: Ventajas y desventajas de usar péptidos como compuestos terapéuticos (45).	28
Tabla 2-1: Sistemas desarrollados para la administración de péptidos en los últimos años.	30
Tabla 3-1: Ventajas y desventajas de las micropartículas poliméricas para la administración de IFAs.	34
Tabla 3-2: Composición de los ensayos realizados para la obtención de las micropartículas poliméricas.	38
Tabla 3-3: Tamaño de partícula obtenido por LD en el equipo MasterSizer.	50
Tabla 3-4: Características farmacotecnicas de las micropartículas poliméricas vacías y cargadas.*Péptido adsorbido: péptido asociado en la superficie con respecto del péptido encapsulado.....	53
Tabla 4-1 Ventajas y desventajas de las partículas sólidas lipídicas	59
Tabla 4-2: Composición de los ensayos realizados para la obtención de los sistemas lipídicos.	62
Tabla 4-3: Tamaño de partícula obtenido por DLS empleando el equipo ZetaSizer.....	75
Tabla 4-4: Características farmacotecnicas de las partículas sólidas lipídicas vacías y cargadas Péptido adsorbido: péptido asociado en la superficie con respecto del péptido encapsulado.....	80
Tabla 5-1: Composición de los ensayos realizados para la obtención de las micropartículas lipopoliméricas.....	88
Tabla 5-2: Datos de tamaño de partícula obtenidos de las lecturas por LD en el equipo Master Sizer	101
Tabla 5-3: Características farmacotecnicas de las micropartículas lipopoliméricas vacías y cargadas Péptido adsorbido: péptido asociado en la superficie con respecto del péptido encapsulado.....	105

Tabla 9-1: Sistemas híbridos lipopoliméricos desarrollados en los últimos años con sus características y aplicaciones.....	115
Tabla 9-2: Aspectos evaluados en ensayos preliminares para la implementación de la metodología, obtención y caracterización de las micropartículas poliméricas	128
Tabla 9-3: Aspectos evaluados en ensayos preliminares para la implementación de la metodología, obtención y caracterización de las partículas sólidas lipídicas.....	129
Tabla 9-4: Aspectos evaluados en ensayos preliminares para la implementación de la metodología, obtención y caracterización de las micropartículas lipopoliméricas.....	130

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
°C	Grado Celsius	°C	Unidad de temperatura

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
μm	Micrometro	m	Unidad de longitud
μL	Microlitro	L	Unidad de volumen

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ADH</i>	Ácido adípico dihidrazida
<i>API</i>	Active Pharmaceutical Ingredient
<i>BCA</i>	Ácido bicinconínico
<i>BN</i>	Bombesina
<i>BSA</i>	Albúmina sérica bovina
<i>CFPE</i>	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-carboxifluoresceina

Abreviatura Término

<i>CO₂</i>	Dióxido de Carbono
<i>Col</i>	Colesterol
<i>DCM</i>	Diclorometano
<i>DI</i>	Desionizada
<i>DL</i>	Difracción Láser
<i>DLS</i>	Dispersión dinámica de luz
<i>DLPC</i>	1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina
<i>DOPC</i>	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
<i>DOTAP</i>	Dioleoil trimetil amonio propano
<i>DOTMA</i>	1,2 di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano
<i>DSPE</i>	1,2 Diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanoalmina
<i>DSPE-PEG2000</i>	1,2 Diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanoalmina-N-(metoxipolietilenglicol)2000
<i>DSPE-PEG2000-Folato</i>	1,2 Diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanoalmina-N-carboxi(polietilenglicol)2000 – folato
<i>E.E</i>	Eficiencia de encapsulación
<i>EGF</i>	Factor de crecimiento epidermal
<i>EPOC</i>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
<i>FA</i>	Ácido fólico
<i>FDA</i>	Food and Drug Administration
<i>F.O</i>	Fase orgánica
<i>F.W</i>	Fase acuosa
<i>GAS</i>	Gas antisolvente

Abreviatura Término

<i>G.O.</i>	Oleato de Glicerido
<i>Gd-DTPA-BC16</i>	Gadolinio-dietilentriamina-penta-ácido acético-bis-tetradecilamida
<i>h</i>	Horas
<i>HA</i>	Ácido hialurónico
<i>HPESO</i>	Polímero hidrolizado de aceite de soya epoxidado
<i>HPMC</i>	Hidroxipropilmetilcelulosa
<i>HZ</i>	Adipohidrazida
<i>IFA</i>	Ingrediente Farmacéutico Activo
<i>IPA</i>	Alcohol isopropílico
<i>KLH</i>	Keyhole limpet hemocyanin
<i>kV</i>	Kilovoltios
<i>LC</i>	Capacidad de carga
<i>M</i>	Molar
<i>mL</i>	Mililitros
<i>MPB</i>	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[4-(p-maleimidofenil)butiramida]
<i>mPEG-S-S-C₁₆</i>	Monometoxi-poli(etilenglicol)-S-S-hexadecil
<i>mRNA</i>	Ácido ribonucleico mensajero
<i>NaCl</i>	Cloruro de sodio
<i>NLC</i>	Transportadores nanoestructurados lipídicos
<i>nm</i>	Nanómetro
<i>PAE</i>	Poli(β -aminoéster)

Abreviatura Término

<i>PBAE-S-S-mPEG</i>	Poli(etilenglicol)metileter injertado con disulfuro poli β -amino-ésteres)
<i>PBS</i>	Buffer Fosfato Salino
<i>PC</i>	Fosfatidil colina
<i>PCL</i>	Policaprolactona
<i>PECF</i>	1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(carboxifluoresceina)
<i>PEG</i>	Polietilenglicol
<i>PEI</i>	Polietilenimina
<i>PGA</i>	Poliácido glicólico
<i>PGDS</i>	Poligliceril-6-diestearato
<i>PGSS</i>	Partículas de una solución de gas saturada
<i>PLA</i>	Poliácido láctico/ácido poliláctico
<i>PLGA</i>	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
<i>PVA</i>	Alcohol polivinílico/Polivinil alcohol
<i>RES</i>	Sistema reticuloendotelial
<i>RESS</i>	Expansión rápida de solución supercrítica
<i>RGD</i>	Tripéptido Arginina-Glicina-Ácido aspártico
<i>SARM</i>	Estafilococos aureus resistente a meticilina
<i>SEF</i>	Sistema de entrega de fármacos
<i>SEM</i>	Microscopia electrónica de barrido
<i>siRNA</i>	Ácido ribonucleico de interferencia pequeño
<i>SLC</i>	Sistemas de liberación controlada
<i>SLN</i>	Nanopartículas sólidas lipídicas
<i>SPC</i>	Fosfatidil colina de soya
<i>SPPS</i>	Síntesis de péptidos en fase sólida

Abreviatura Término

<i>T_g</i>	Temperatura de transición vítrea
<i>VIH</i>	Virus de inmunodeficiencia humana
<i>18:0</i>	Diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-
<i>PEG2000</i>	[metoxi(polietilenglicol)-2000]

Introducción

Los péptidos son moléculas que corresponden a cadenas cortas de aminoácidos, unidos mediante enlaces peptídicos y muchos de ellos se encuentran de manera natural en el cuerpo humano(1). Estas moléculas se encargan de regular gran variedad de los procesos fisiológicos, actuando como señalizadores endocrinos o paracrinicos y en otros casos como neurotransmisores o factores de crecimiento(1,2). De otra parte, a estas moléculas se les ha atribuido actividad biológica como antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antitumorales e incluso para el desarrollo de vacunas y métodos diagnóstico, entre otros (2). Con el propósito de seguir fortaleciendo este campo de la investigación, se ha recurrido a la síntesis orgánica para la obtención y estudio de estas moléculas (3). Esta metodología existe desde hace varios años y en un avance continuo, de tal forma que actualmente se dispone de dos métodos principalmente: la síntesis en solución (1920) y SPPS - síntesis de péptidos en fase sólida (1963)(2). La SPPS se basa en la utilización de un soporte sólido para anclar el primer aminoácido mediante un enlace covalente. A partir de este aminoácido, se van uniendo uno a uno los demás aminoácidos mediante enlaces peptídicos hasta concluir la secuencia deseada y posteriormente el péptido es removido del soporte sólido(4). Mediante este método se simplificó el proceso de purificación durante la síntesis, se incrementó el rendimiento y por tanto se redujo el tiempo requerido para la obtención de los péptidos (3). Con base en esto, se puede decir que la síntesis química (solución y SPPS), se presenta como una muy buena alternativa para la producción a gran escala de péptidos en el rango de 5-50 residuos de aminoácidos, con una diversidad química mucho más amplia que cuando se utiliza tecnologías recombinantes (5).

Los péptidos sintéticos pueden presentar algunas limitaciones como baja biodisponibilidad oral, restringida biodistribución por su hidrofiliidad/hidrofobicidad, baja estabilidad química y metabólica (fácilmente degradados por proteasas y rápida depuración de la circulación sistémica)(4). Sin embargo, estas moléculas presentan ventajas como una alta especificidad, efectividad y a diferencia de los IFA convencionales, son moléculas relativamente seguras, bien toleradas, y generalmente son menos inmunogénicas que los productos recombinantes (3,4). Estas características hacen que los péptidos sintéticos sean considerados como IFAs para tratamiento de enfermedades como cáncer, desordenes por deficiencia de enzimas, desordenes por disfunción proteica, enfermedades genéticas, degenerativas e infecciosas. Actualmente hay aproximadamente 60 medicamentos basados en péptidos aprobados por la FDA, cerca de 140 en ensayos clínicos y aproximadamente 500 en desarrollos pre-clínicos. Por tanto, estas moléculas se han convertido en una buena alternativa como IFA para el desarrollo de novedosos medicamentos en el tratamiento de diversas patologías (2).

En el campo farmacéutico, en los últimos años se ha trabajado en estrategias novedosas e innovadoras que permitan superar las desventajas de los péptidos como IFA, con el fin de mejorar la selectividad y efectividad de terapias ya existentes o desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de diversas patologías tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, infecciones, entre otras. Una de estas aproximaciones son los sistemas particulados de tamaño nano y micro, que han sido propuestos para la administración segura y controlada de péptidos sintéticos (7). Numerosos estudios han mostrado que los sistemas micro y nano particulados protegen a los péptidos de degradación enzimática, prolongando su tiempo de vida y por tanto mejorando su actividad y reduciendo la frecuencia de dosificación (6).

Estos sistemas han mostrado muchas ventajas en comparación con los vehículos de entrega convencionales, entre las que es posible destacar: mejorar la biodisponibilidad de IFA, aumentar el tiempo de vida media en la circulación sistémica, liberar el IFA controladamente y reducir los intervalos de administración, administrar IFA en un sitio específico y así reducir los efectos indeseados, administrar dos o más IFA simultáneamente para generar efectos sinérgicos, entre otros(8).

A partir de esta estrategia se han diseñado diferentes sistemas de entrega y algunos de estos han alcanzado la aprobación, mientras que otros aún se encuentran en ensayos

preclínicos y clínicos (9,10). Los sistemas de entrega que han mostrado de manera general, los mejores resultados como nano/micro transportadores para la entrega de IFA son los liposomas, las partículas poliméricas biodegradables y las partículas sólidas lipídicas (11).

Los liposomas son vesículas lipídicas de tamaño nanoparticular con una membrana cuya estructura es de bicapa conformada de moléculas anfifílicas, normalmente fosfolípidos (12). Las nano/micro partículas poliméricas biodegradables han sido efectivas como vehículos de entrega de IFA de carácter hidrofóbico e hidrofílico, con mayor capacidad de carga que los liposomas (13). Las nano/micropartículas sólidas lipídicas están compuestas por lípidos biodegradables. Estas partículas poseen ventajas de diferentes transportadores ya existentes y mejoran algunos inconvenientes asociados, como la estabilidad física, la protección ante la degradación de los IFA incorporados, la liberación controlada y la tolerabilidad (11,13).

Recientemente se han iniciado trabajos para combinar los atributos de los liposomas, de las partículas sólidas lipídicas y de las partículas poliméricas en un único sistema de entrega denominado nano/micro partículas híbridas lipopoliméricas (16,17).

Las partículas híbridas lipopoliméricas han mostrado ventajas respecto a la utilización de los liposomas, partículas sólidas lipídicas y nano/micro partículas poliméricas de manera individual (13). El componente polimérico tiene un rol doble (protector frente al ataque enzimático y mejorador de la permeabilidad de los IFA a través de membranas epiteliales), el componente lipídico otorga lipofiliidad al sistema, mejorando la interacción con membranas biológicas (18), por tanto pueden ser una gran promesa como vehículo de entrega para varias aplicaciones médicas. Estos sistemas se pueden obtener mediante diferentes metodologías, cuya utilización depende del tipo de sistema a desarrollar, de las propiedades fisicoquímicas de los materiales que se van a utilizar con este propósito y del IFA (13).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente estudio plantea como propósito el diseño, desarrollo y la caracterización de un novedoso sistema híbrido lipopolimérico microparticulado basado en materiales biodegradables, que permita la liberación controlada de un inmunógeno basado en péptidos sintéticos de naturaleza hidrofílica. De otro lado se busca que el sistema desarrollado permita simplificar el esquema de administración, es decir, en una sola administración hacer la entrega de por lo menos dos

dosis (vacuna) en un régimen de 0-30 días. En cuanto a las partículas se busca que tengan un tamaño de partícula menor o igual a 10 μm y un potencial electrocinético (potencial Z) negativo, características que deben presentar las partículas para que sean favorablemente captadas y procesadas por células inmunocompetentes. Adicionalmente, con el desarrollo de esta propuesta, se pretende realizar un aporte en el área de la investigación y desarrollo de novedosos medicamentos para el tratamiento de diversas patologías.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar un sistema microparticular lipopolimérico para la microencapsulación de un péptido sintético modelo de naturaleza hidrofílica.

Objetivos específicos

Desarrollar e implementar la metodología para la obtención de sistemas microparticulares poliméricos, lipídicos e híbridos lipopoliméricos.

Realizar el proceso de microencapsulación de un péptido sintético modelo de naturaleza hidrofílica en cada uno de los sistemas desarrollados.

Caracterizar desde el punto de vista farmacotécnico los sistemas microparticulares desarrollados.

1. Aspectos teóricos

1.1 Sistemas de entrega para la liberación controlada de IFAs

Para que un IFA cumpla su actividad biológica debe ser administrado efectivamente, por esto es necesario diseñar un sistema de entrega apropiado. Esto hace referencia a la diversidad de tecnologías empleadas para el desarrollo de sistemas para la entrega del IFA en el blanco deseado, en donde se dará su liberación y efecto biológico. Teniendo en cuenta lo anterior, un SEF, se define como “Una formulación o un dispositivo que permite la introducción de un IFA en el organismo, mejorando su eficacia y seguridad mediante el control de la velocidad, el tiempo y el lugar de liberación en el cuerpo”(8). El control de la liberación del IFA mediante la utilización de un SEF se constituye en una ciencia donde convergen diferentes disciplinas como Ciencias Farmacéuticas, Médicas e Ingenierías, entre otras. Por tanto, el desarrollo de SEF altamente controlables, que permitan la liberación de una cantidad apropiada de IFA en un blanco específico y en el momento exacto, se ha convertido en un campo de investigación importante, dado que se deben tener en cuenta propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas del IFA y del sistema, el perfil de liberación deseado o el sitio de acción que se quiere alcanzar (8). Los SEF controlados han sido usados con el fin de optimizar la utilización del IFA y al igual que los sistemas convencionales, cuentan con ventajas y desventajas, como las que se reportan en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: Ventajas y desventajas de los SEF desarrollados para el control de liberación de un IFA(19)

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> - Administración controlada de un IFA a una velocidad de liberación deseable. - Mantener concentraciones en un rango terapéutico durante tiempos determinados. - Maximizar la relación dosis-eficacia. - Disminuir la acumulación del IFA en el organismo. - Disminuir efectos secundarios. - Protección del IFA del ambiente biológico, previniendo su degradación. - Minimizar la cantidad de dosis a administrar. 	<ul style="list-style-type: none"> - Riesgo de acumulación del IFA (fármacos de eliminación lenta). - Tecnología de alto costo (materiales), baja reproducibilidad lote a lote. - Proceso de escalamiento.

Un SEF controlado no debe ser altamente sensible a los factores fisiológicos, debe permitir incorporar varios IFA y dosis, tener la habilidad de incrementar o mantener la estabilidad física y química del IFA y finalmente, debe asegurar la máxima eficiencia y seguridad (8).

De otra parte, el desarrollo que se ha tenido en los últimos años en la ciencia de materiales ha permitido disponer de una gran diversidad de ellos para la obtención de SEF micro o nano estructurados, con el propósito de definir claramente el comportamiento de estos sistemas *in vivo*. En la tabla 1-2 se encuentran descritos algunos de los sistemas de entrega desarrollados y actualmente utilizados con mayor frecuencia en diferentes estudios (20,21).

Tabla 1-2: Descripción de SEF para control de liberación de IFAs.

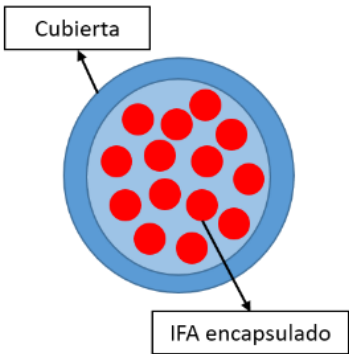
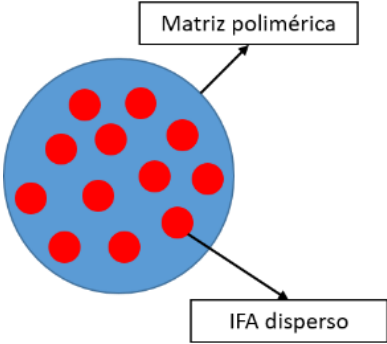
Sistema	Naturaleza	Representación gráfica	Características	Ref.
Sistemas micro/nano particulares	Polimérica	 <p>Micro/Nano capsula</p>	<p>Estructura cubierta-núcleo</p> <p>Micro-nano esferas (matriz monolítica)/micro-nano capsulas(reservorio)</p> <p>Forma regular o irregular (Esférica, tubular u ovalada)</p> <p>Tamaño: nanométrico 1 - 1000 nm, micrométrico 1 - 100 μm</p>	4,17,18
		 <p>Micro/Nano esfera</p>	<p>Sustancia encapsulada: Sólida, líquida o gases.</p> <p>Aplicaciones en industria farmacéutica, agricultura, alimentaria, textil y productos del hogar.</p> <p>Industria Farmacéutica: control de liberación de IFA, propiedades organolépticas, mejorar estabilidad, etc.</p>	

Tabla 1-2. (Continuación)

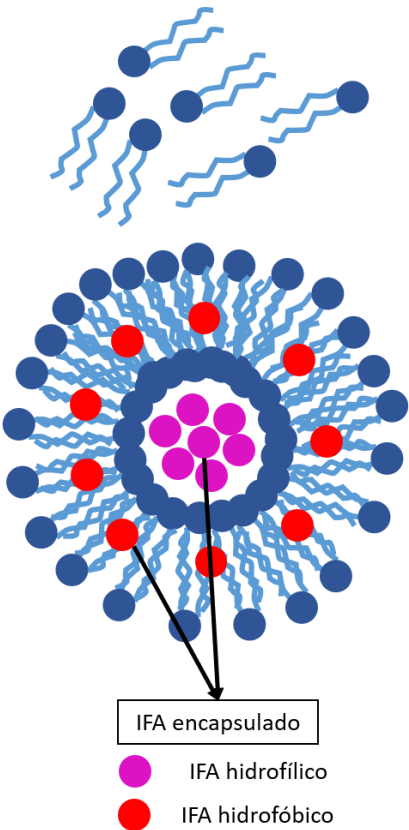
Sistema	Naturaleza	Representación gráfica	Características	Ref.
Sistemas micro/nano particulares	Liposomas	 <p>The diagram illustrates the structure of liposomes. At the top, individual phospholipid molecules are shown with blue heads and wavy tails. Below, a spherical vesicle is formed by a phospholipid bilayer. The interior of the vesicle contains drug molecules: pink circles for hydrophilic drugs and red circles for hydrophobic drugs. A legend at the bottom identifies the components: 'IFA encapsulado' (encapsulated drug), 'IFA hidrofílico' (hydrophilic drug), and 'IFA hidrofóbico' (hydrophobic drug).</p>	<p>Vesículas esféricas provistas de una membrana compuesta por una bicapa de fosfolípidos.</p> <p>Estructura: núcleo hidrofílico rodeado de una o más bicapas de fosfolípidos de naturaleza hidrofílica/hidrofóbica. Sistema reservorio o vesicular.</p> <p>Tamaño: 0,02-10 μm</p> <p>Configuraciones de esferas y cilindros</p> <p>Primer sistema de entrega aprobado para uso clínico.</p> <p>Aplicaciones en control y liberación de IFA.</p> <p>Administración por diferentes vías.</p> <p>Proteger el IFA atrapado del ambiente externo</p> <p>Modificar la biodistribución del IFA</p> <p>Dirigir la entrega mediante la modificación de la bicapa</p> <p>Absorción de manera selectiva por tejidos ricos en células retículo endoteliales</p>	18

Tabla 1-2. (Continuación)

Sistema	Naturaleza	Representación gráfica	Características	Ref.
Sistemas micro/nano particulares	Nanopartículas Sólidas lipídicas (SLN) y Transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC)	<p>The diagram illustrates the structural differences between SLN and NLC. The SLN (top) consists of a matrix of solid lipids (represented by a grid) with dispersed drug molecules (IFA disperso, red circles). The NLC (bottom) consists of a matrix of both solid lipids (red circles) and liquid lipids (yellow wavy shapes) with dispersed drug molecules (IFA disperso, red circles). Labels indicate the components: 'IFA disperso', 'Lípido sólido', 'SLN', 'Lípido líquido', and 'Lípido sólido'.</p>	<p>Dispersiones acuosas coloidales</p> <p>Tamaño: 50-1000nm</p> <p>Las SLN están compuestas de lípidos sólidos a temperatura ambiente de naturaleza biodegradable.</p> <p>Los NLC son una combinación de lípidos sólidos y líquidos para dar lugar a una estructura interna menos organizada, mejorando la capacidad de carga y evitando que el IFA sea expulsado de la matriz lipídica.</p> <p>El IFA puede estar incorporado en la superficie de la partícula o en el núcleo.</p> <p>Combina ventajas de liposomas y emulsiones. Controla de liberación y mejora biodisponibilidad del IFA.</p> <p>Alta estabilidad física y protección de IFA. Administración por diferentes vías. Tratamiento de enfermedades del sistema nervioso, por su capacidad de atravesar barrera hematoencefálica, cáncer, tuberculosis, entre otras.</p>	11,20,21,21,22

Tabla 1-2. (Continuación)

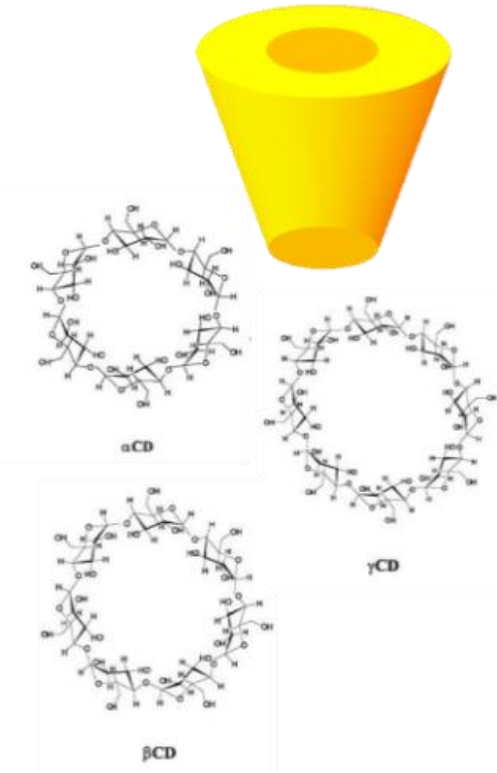
Sistema	Naturaleza	Representación gráfica	Características	Ref.
Sistemas moleculares	Ciclodextrinas	 <p>The diagram illustrates the chemical structures of three types of cyclodextrins: alpha-CD (top left), beta-CD (bottom left), and gamma-CD (middle right). Each structure is shown as a cyclic oligosaccharide with hydroxyl groups extending from the ring. Above these structures is a 3D model of a cyclodextrin molecule, depicted as a yellow truncated cone, representing its characteristic toroidal shape.</p>	<p>Oligosacáridos macrocíclicos unidos por enlaces α-1,4 glicosídicos.</p> <p>Estructura anular, formación de complejos de inclusión: encapsulación a nivel molecular, Interior hidrofóbico, exterior hidrofílico.</p> <p>Encapsular diferentes tipos de IFA, principalmente IFA de naturaleza hidrofóbica en su parte interna.</p> <p>Aplicaciones en terapia tumoral, diagnóstico de enfermedades.</p> <p>Usado para enmascarar olores y sabores, como agente solubilizante en agua del IFA y como modificador de su entrega.</p> <p>Mejora de biodisponibilidad, aumentar el tiempo de circulación, buena capacidad de carga, terapia dirigida, mejora biocompatibilidad, mejora estabilidad del IFA, disminuye la toxicidad</p> <p>Puede causar nefrotoxicidad</p> <p>Puede inducir hemólisis</p>	18

Tabla 1-2. (Continuación)

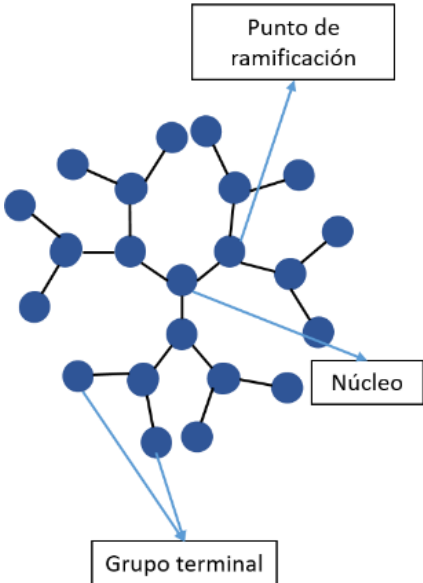
Sistema	Naturaleza	Representación gráfica	Características	Ref.
Sistemas moleculares	Dendrímeros	 <p>El diagrama muestra una estructura dendrítica simétrica radialmente. En el centro hay un 'Núcleo' (un solo punto azul). Desde él se ramifican tres líneas que conectan con tres puntos azules. Cada uno de estos puntos se ramifica nuevamente en tres líneas, cada una conectando con un punto azul, formando un total de nueve puntos en la segunda generación. Este patrón se repite una vez más, resultando en un total de 27 puntos azules en la tercera generación. Las etiquetas 'Punto de ramificación', 'Núcleo' y 'Grupo terminal' están conectadas por flechas azules a sus respectivos elementos en la estructura.</p>	<p>Son moléculas simétricas radialmente, de tamaño nano, con una estructura bien definida, homogénea y monodispersa, consiste en estructuras híper ramificadas. Dependiendo de la naturaleza de los grupos funcionales de las ramas, a medida que aumentan las generaciones se puede modificar la forma, el tamaño y la flexibilidad de la molécula. Las estructuras dendríméricas tienden a adoptar formas globulares.</p>	22
			<p>Los grupos terminal en la superficie pueden ser funcionalizados, con el fin de modificar las propiedades fisicoquímicas y biológicas. Estas estructuras tienen variedad de aplicaciones en el campo biomédico, en terapias antineoplásicas (liberación controlada y dirigida), los conjugados dendrímeros-IFA, muestran una mejora en la solubilidad, reducción de toxicidad sistémica y acumulación selectiva en tumores sólidos.</p>	

Tabla 1-2. (Continuación)

Sistema	Naturaleza	Representación gráfica	Características	Ref.
Sistemas moleculares	Micelas poliméricas		<p>Nanoestructuras autoensambladas formadas a partir de polímeros anfífilicos.</p> <p>Su orientación depende del medio de dispersión.</p> <p>Su estructura consta de un reservorio formado por cadenas de polímeros anfífilicos, si el medio es acuoso, las cadenas de polímero hidrofóbicas se ubicarán al interior de la micela y las cadenas hidrofílicas hacia el medio de dispersión, las micelas se invertirán en un medio de dispersión orgánico.</p> <p>Tamaño: 10-100nm</p> <p>Baja polidispersidad</p> <p>Inhibición de la degradación del IFA</p> <p>Aumento del tiempo de circulación en sangre</p> <p>Entrega dirigida de IFA</p>	4

1.2 Técnicas usadas para la obtención de SEF para liberación controlada

La mayoría de los sistemas para la liberación controlada de IFA pueden ser obtenidos mediante técnicas de encapsulación. La microencapsulación es descrita como un proceso en el que se atrapan sustancias (sólidas, líquidas o gases) en estructuras de tamaño micrométrico, mediante la generación de una cubierta de naturaleza inerte, la cual aísla y protege la sustancia encapsulada del ambiente externo. El proceso de microencapsulación tiene como propósito: proteger las sustancias del ambiente externo, mejorar propiedades organolépticas, controlar la liberación del IFA, obtener un sistema vectorizado, minimizar efectos adversos y tóxicos (27).

Los sistemas de liberación controlada (SLC) consisten en una estructura generalmente conformada por dos partes, un núcleo y una cubierta. Dependiendo las características que se deseen del sistema, se seleccionan los materiales y se considera que en la mayoría de los casos el IFA se encuentra disperso en el núcleo. Existen diferentes técnicas para obtener estos sistemas, pero de manera general se clasifican en métodos químicos y métodos físicos como se describe en la figura 1-1. La elección del método a utilizar depende principalmente de la naturaleza del activo y del tamaño de partícula deseado (21,27).

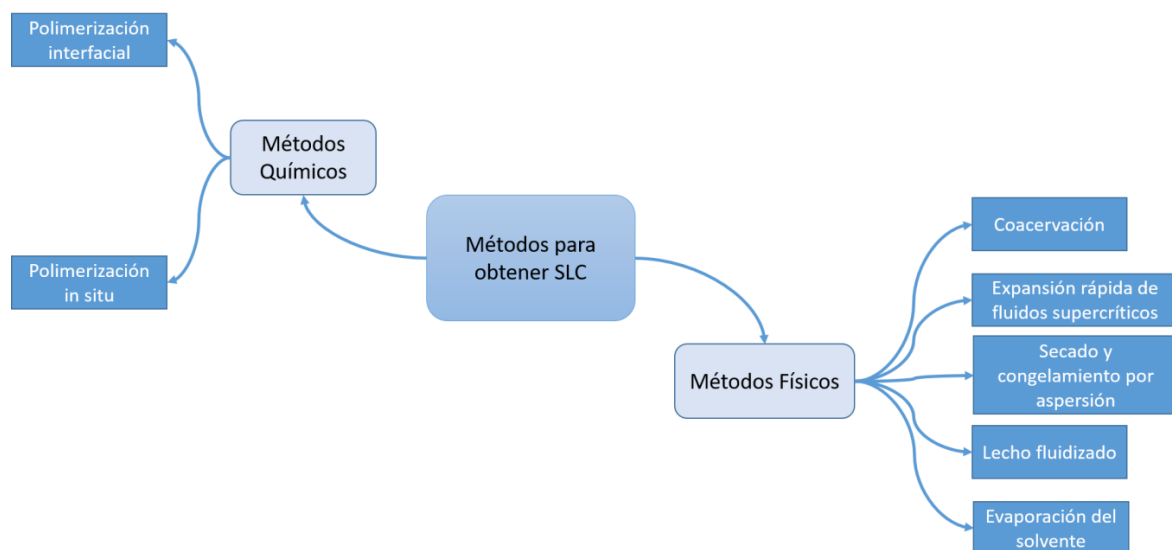


Figura 1-1: Clasificación de los métodos para la obtención de SEF para liberación controlada.

1.2.1 Métodos químicos

- Polimerización entre las fases:** En esta técnica se parte de dos fases inmiscibles entre sí, cada una de las fases contiene monómeros reactivos (hidrofóbicos/hidrofilicos). Estas fases dan lugar a una emulsión generando una interfaz que puede estar estabilizada por un tensioactivo. Como se observa en la figura 1-2, cuando las dos fases entran en contacto se da inicio a una polimerización rápida en la interfaz dando lugar a un producto insoluble en el medio de dispersión formando la cubierta (27–29). Dependiendo de la naturaleza de los monómeros utilizados, se requerirá la adición de iniciadores o catalizadores que inicien la reacción de polimerización. Cabe resaltar que puede haber variantes dependiendo del tipo de molécula a encapsular y su naturaleza, donde será necesario establecer una emulsión simple o una emulsión doble dependiendo el caso. El producto obtenido mediante esta metodología corresponde a la estructura de una cápsula.

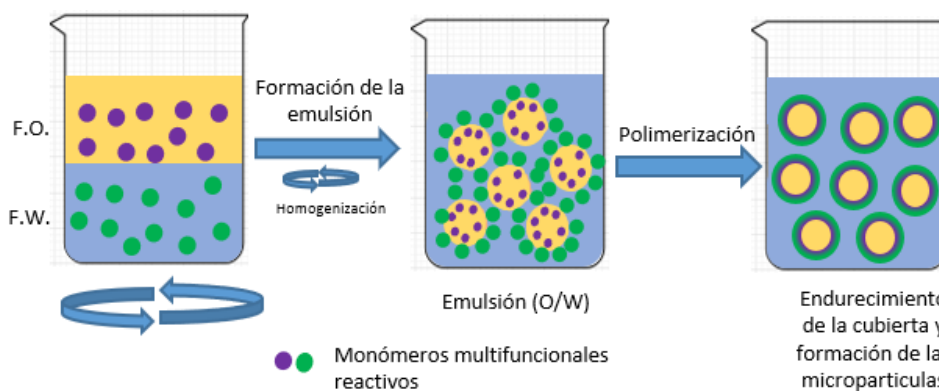


Figura 1-2: Representación esquemática del proceso de polimerización interfacial para obtener SEF, en morado y verde se esquematizan los monómeros multifuncionales reactivos

- Polimerización in situ:** Al igual que en la polimerización entre las fases, en este caso la formación de la cubierta ocurre por la polimerización de los monómeros incluidos como material de partida. Como se observa en la figura 1-3 la polimerización ocurre exclusivamente en la fase continua y sobre la superficie de las gotas de la fase dispersa. Inicialmente se forma un polímero de bajo peso molecular y va creciendo en tamaño, para luego depositarse sobre la superficie de la fase interna o en la interfase del sistema. El producto de esta reacción es insoluble en el medio de dispersión, por tanto, se genera la cubierta de una estructura que corresponde a una capsula (30). Al igual que en la polimerización

entre fases, la metodología puede estar sujeta a modificaciones dependiendo de la naturaleza del material a encapsular, donde será necesario el uso de emulsiones simples o dobles

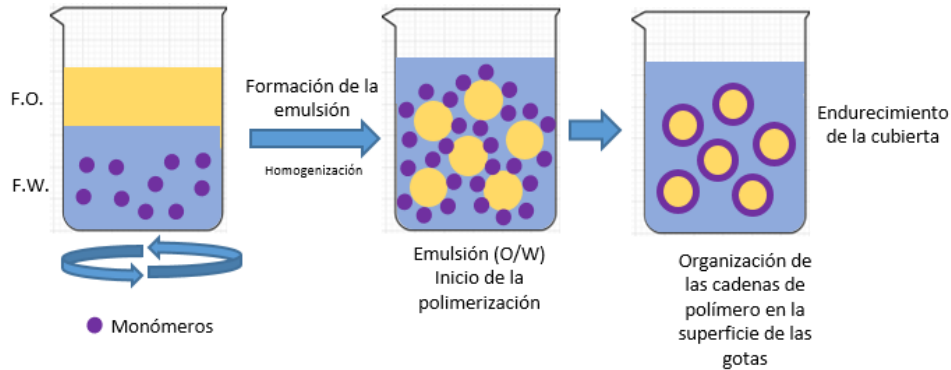


Figura 1-3: Representación esquemática del proceso de polimerización in situ para obtener SEF

1.2.2 Métodos Físicos

- Coacervación:** Este método es definido como un proceso de desolvatación parcial de una solución polimérica homogénea para convertirse en una fase rica en polímero (coacervado) y en una fase pobre en polímero (medio de coacervación). La coacervación se reportó como el primer proceso adaptado a la escala de producción industrial para la obtención de microcápsulas. Actualmente existen dos aproximaciones experimentales para el desarrollo de esta técnica, el método simple y el método complejo, en donde la formación de la microcápsula es igual en ambos casos, lo que varía es la manera en la que se induce la separación de las fases. En la coacervación simple se adiciona un agente de desolvatación para separar las fases, mientras que en la coacervación compleja se realiza una complejación entre dos polímeros de carga opuesta. La coacervación se debe realizar en tres pasos básicos como se muestra en la figura 1-4 (31):

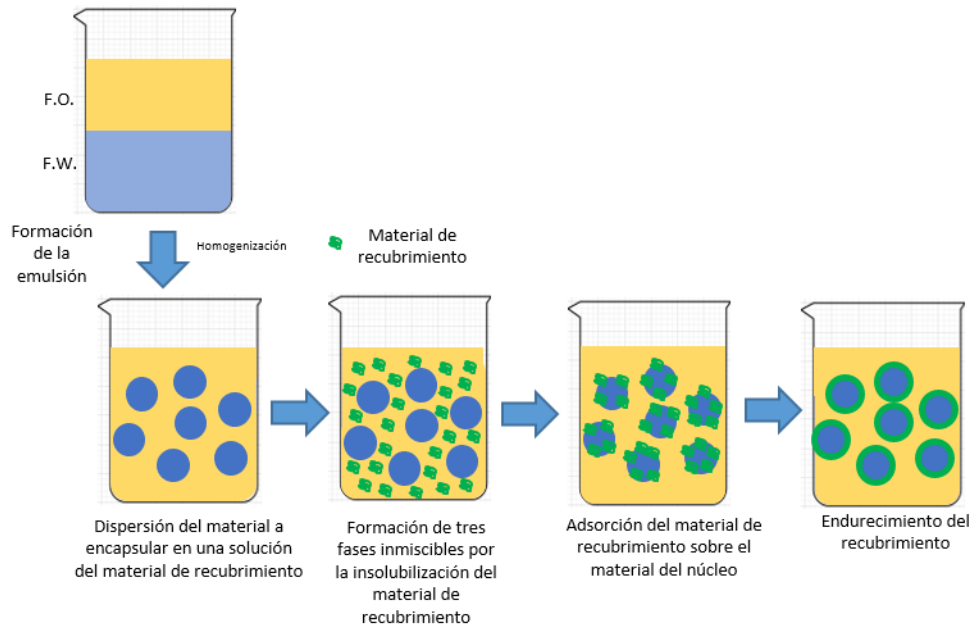


Figura 1-4: Representación esquemática del proceso de coacervación.

- Expansión rápida de fluidos supercríticos:** Los fluidos supercríticos son gases altamente comprimidos que poseen grandes ventajas tanto del estado líquido como del estado gaseoso. El fluido supercrítico más ampliamente usado es el dióxido de carbono (CO_2), seguido de los alcanos y el óxido nitroso. El material de recubrimiento y el IFA se encuentran disueltos en el fluido supercrítico, a condiciones de alta presión luego, la disolución es liberada a presión atmosférica a través de un pequeño agujero, este cambio en la presión causa la desolvatación del material de recubrimiento el cual se encuentra disperso con el IFA y forma una capa de recubrimiento dando lugar a las partículas (Figura 1-5). Esta metodología tiene variantes, estas son, expansión rápida de solución supercrítica (RESS), gas anti solvente (GAS) y partículas de una solución de gas saturada (PGSS) (32).

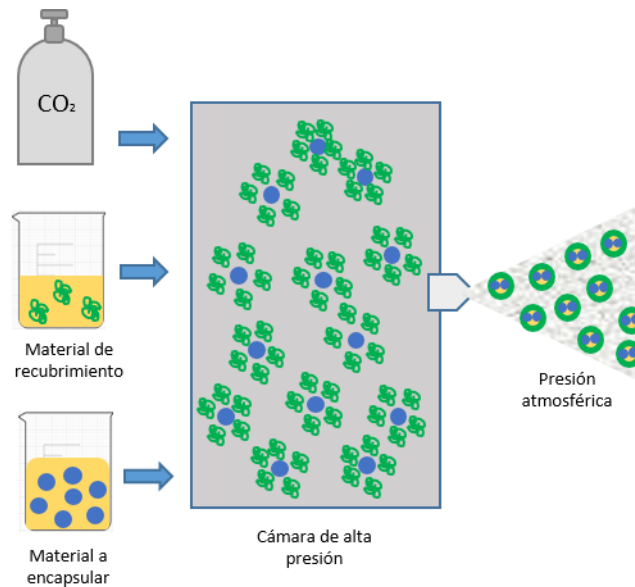


Figura 1-5: Representación gráfica de la técnica expansión por fluidos supercríticos RESS.

- **Secado y congelamiento por aspersión:** Este es un proceso comercial de bajo costo que se usa para la encapsulación de fragancias, aceites y sabores. El IFA (núcleo) está disperso en una solución polimérica de naturaleza orgánica y se asperja en una cámara caliente. El material de recubrimiento (polímero) solidifica sobre el núcleo, a medida que el solvente se evapora las microcápsulas se van formando (Figura 1-6). El congelamiento por aspersión es una variante, que se puede realizar de manera similar, pero lo que se asperja es el material de recubrimiento fundido, en el que el material del núcleo está disperso. En este caso la mezcla fundida se asperja en una corriente de aire frío, dando lugar a las partículas (27,32).

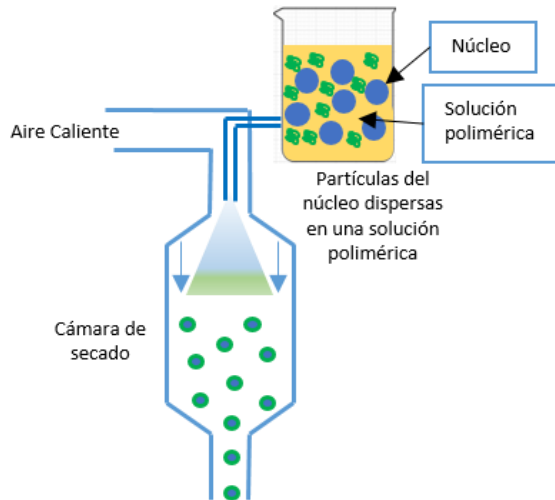


Figura 1-6: Representación esquemática de la técnica secado por aspersión.

- **Lecho fluidizado:** Esta técnica consiste en que el recubrimiento líquido es asperjado sobre las partículas y la rápida evaporación del solvente ayuda a la formación de una capa externa sobre las partículas (Figura 1-7) (33).

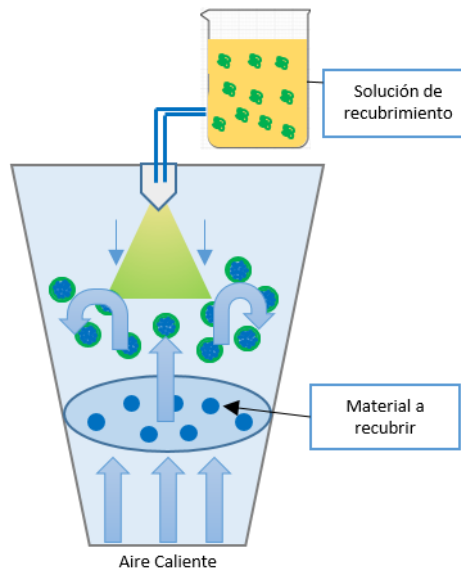


Figura 1-7: Representación esquemática de la técnica lecho fluidizado.

- **Evaporación del solvente:** En este método se parte de dos fases inmiscibles entre sí, una de ellas comprende el núcleo (material de recubrimiento) y la otra en la que el material de recubrimiento es insoluble (fase externa). En primer lugar, el material

de recubrimiento se disuelve en un solvente orgánico volátil que debe ser inmisible en la fase externa. El material a ser encapsulado dependiendo de la naturaleza puede estar disuelto o disperso en la solución del material de recubrimiento, o en la fase acuosa. El material de recubrimiento disperso o disuelto en un solvente orgánico se adiciona sobre la sustancia que actúa como fase externa y se mezcla hasta formar una emulsión. Posteriormente la emulsión se mantiene en agitación y puede ser calentada para dar lugar a la evaporación del solvente orgánico, haciendo que el material de recubrimiento se insolubilice dando lugar a la partícula que tiene encapsulada la sustancia de interés. Existen diferentes variables de este método donde se pueden usar emulsiones dobles o sencillas, sin embargo, el fundamento es el mismo (34).

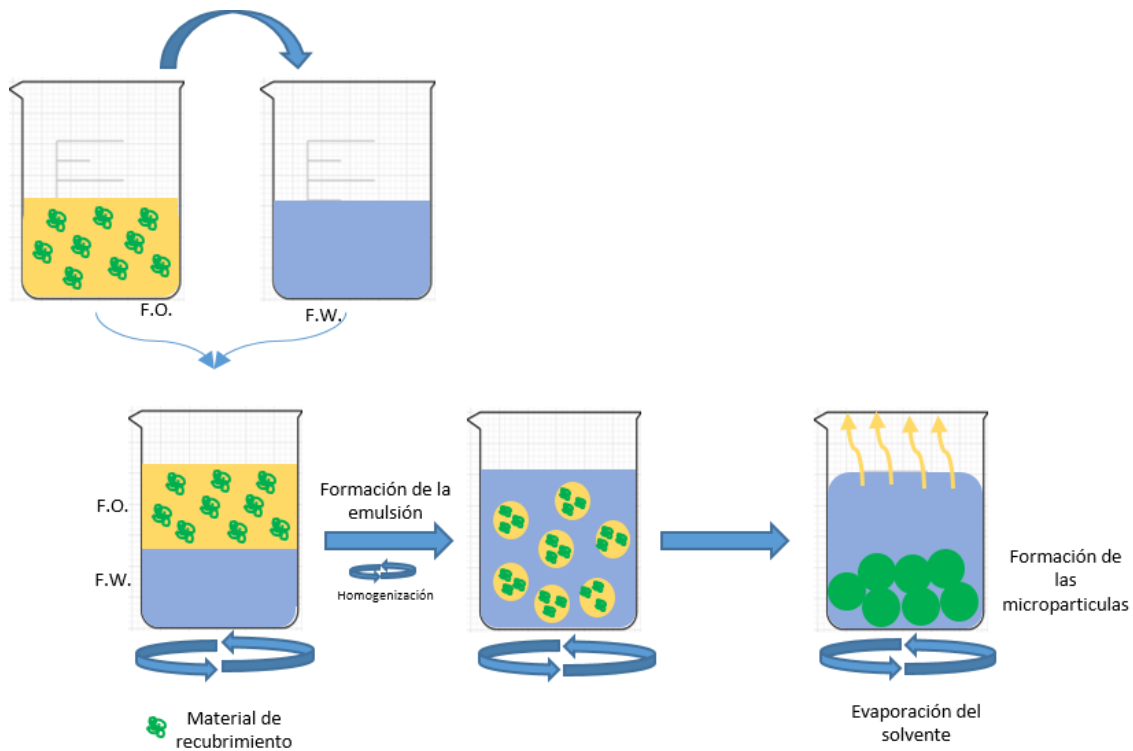


Figura 1-8: Representación esquemática del método de evaporación del solvente.

1.3 SEF híbridos lipopoliméricos para liberación controlada

Los sistemas híbridos lipopoliméricos son la combinación de dos sistemas de entrega, las partículas poliméricas y las partículas sólidas lipídicas o los liposomas, estos han sido desarrollados para aprovechar las ventajas de los dos sistemas en uno solo y además compensar las limitaciones de ambos, ya que se ha encontrado que tiene mayor integridad estructural, buena estabilidad durante el almacenamiento y capacidad de controlar la liberación (35). El término híbrido es usado porque posee las características de ambas partículas (poliméricas y lipídicas). En algunos sistemas el polímero es el encargado de controlar la liberación del IFA y el lípido tiene la función de incrementar tanto la eficiencia de encapsulación como su permeación debido a su alta biocompatibilidad, aumentar también la biodisponibilidad y proteger al sistema particulado para la retención del IFA, la permeación del agua e incluso del metabolismo de primer paso. Estos sistemas tienen el potencial de mejorar la estabilidad física y la biocompatibilidad, por otro lado tienen mayor capacidad para la entrega celular *in vivo* que las partículas poliméricas, los liposomas y las partículas sólidas lipídicas (35). Este tipo de partículas principalmente está formado por tres componentes: 1. Un núcleo polimérico de naturaleza apolar donde se pueden incorporar IFA con baja solubilidad en agua. 2. Una capa lipídica alrededor o disperso en el núcleo que actúa como una cubierta altamente biocompatible y permite promover la retención del IFA en el núcleo, además evita la degradación del polímero pues no permite que el agua entre con facilidad al núcleo y 3. Un polímero hidrofílico alrededor de la cubierta lipídica que ayuda a la estabilización de la partícula aumentando su tiempo de circulación en el organismo. La interacción entre el núcleo polimérico y la cubierta lipídica está dada por interacciones débiles tipo Van der Waals, interacciones electrostáticas u otras interacciones no covalentes, en cambio la interacción entre la cubierta lipídica y el componente polimérico externo si está dada por enlaces covalentes. Por tanto se habla de un sistema robusto para aplicaciones como sistema de entrega de material genético, vacunas y agentes de diagnóstico (13,36).

Actualmente se han desarrollado diferentes tipos de partículas poliméricas/lipídicas que se han realizado bajo el mismo fundamento inicial, lo que varía son los recubrimientos con el fin de lograr encapsular IFAs de diferente naturaleza o intentar mejorar la biodisponibilidad y el tiempo de residencia en el organismo. Entre estos tipos de sistemas podemos encontrar las siguientes variantes(35):

- Partículas de núcleo polimérico y cubierta lipídica
- Partículas poliméricas tipo reservorio y cubierta lipídica-polimérica-lipídica
- Partículas poliméricas con cubierta de bicapa lipídica
- Partículas mixtas lipopoliméricas
- Partículas lipídicas recubiertas con polímero

Para el desarrollo de estos sistemas, un diseño racional y la elección apropiada de los lípidos y los polímeros, permite optimizar las propiedades fisicoquímicas de las partículas híbridas con el fin de superar retos en la entrega de IFA asociados con las partículas lipídicas y poliméricas, entre ellos mejorar la estabilidad y controlar las características de liberación (37).

1.4 Métodos usados para la preparación de SEF híbridos para liberación controlada

La obtención de estos sistemas puede llevarse a cabo mediante dos aproximaciones, estas consisten en, un proceso de dos pasos en el que el núcleo de polímero y el recubrimiento de lípido se producen en diferentes reactores, y luego de obtenerlos se reúnen para la obtención del sistema híbrido y un proceso de un solo paso, en el cual el sistema se prepara en un solo reactor mediante nano/micro precipitación haciendo uso de un método de autoensamblaje (13).

1.4.1 Método de dos pasos

Este método fue el más empleado en el desarrollo inicial de las partículas híbridas, a diferencia del método de un paso, se parte de partículas poliméricas preformadas que luego se mezclan con el material lipídico, en el que al reconstituir el lípido con una suspensión que contenga las partículas poliméricas, el lípido se autoensambla sobre las partículas poliméricas mediante interacciones débiles no covalentes, por tanto, esta aproximación es usada para preparar partículas híbridas con una bicapa o multicapa lipídica (Figura 1-9). Las partículas poliméricas se pueden preparar mediante el método de evaporación del solvente, nano/micro precipitación u homogenización de alta presión. En cuanto al material lipídico, el lípido se disuelve en un solvente orgánico seguido de la evaporación en un rotaevaporador, dando lugar a una película lipídica delgada, que posteriormente será hidratada como se mencionó anteriormente. Si la sustancia que se va

a cargar es miscible o soluble con el polímero en un solvente orgánico o si está conjugada covalentemente a la cadena polimérica, se puede usar un método de emulsión simple, en cambio si la sustancia que se va a cargar es de naturaleza hidrofílica será necesario realizar una doble emulsión (w/o/w) (13,36,38).

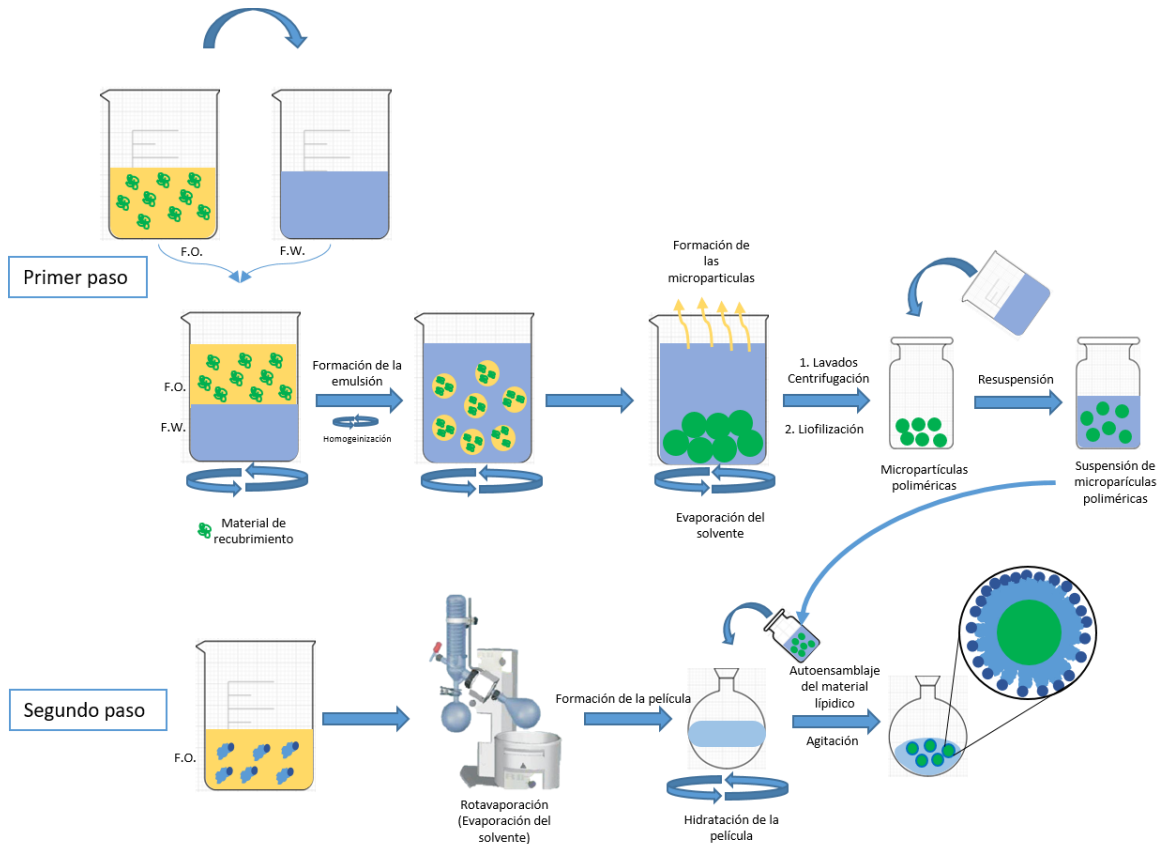


Figura 1-9 :Representación esquemática del método de dos pasos para la obtención de SEF híbridos para liberación controlada.

1.4.2 Método de un paso

Este método fue desarrollado con el fin de tener un proceso más eficiente en términos de tiempo y energía, y funciona como alternativa al método de dos pasos. Como se observa en la figura 1-10, consiste en que tanto el polímero, el IFA a encapsular y el lípido se dispersan en un solvente determinado, luego estos se autoensamblan mediante interacciones hidrofóbicas con el fin de reducir la energía libre del sistema y dan origen a las partículas híbridas. Para el desarrollo de este sistema se hace uso del método de nano/micro precipitación o evaporación del solvente, que son las técnicas que se usan convencionalmente para el desarrollo de partículas poliméricas y lipídicas. Este

procedimiento se puede optimizar al usar una temperatura superior a la temperatura de transición de fase del lípido haciendo que los lípidos se autoensamblen con mayor facilidad. Teniendo en cuenta las características del método la elección del polímero es importante, pues para que se den las interacciones de tipo hidrofóbico, este debe ser anfifílico, como por ejemplo el PLGA (Ácido poli (láctico-co-glicólico) o la PCL (Policaprolactona). Este método ha reportado ciertas ventajas, entre ellas bajos costos de producción, viabilidad en el escalamiento y un comportamiento altamente controlable para la obtención de partículas híbridas (13,36,38).

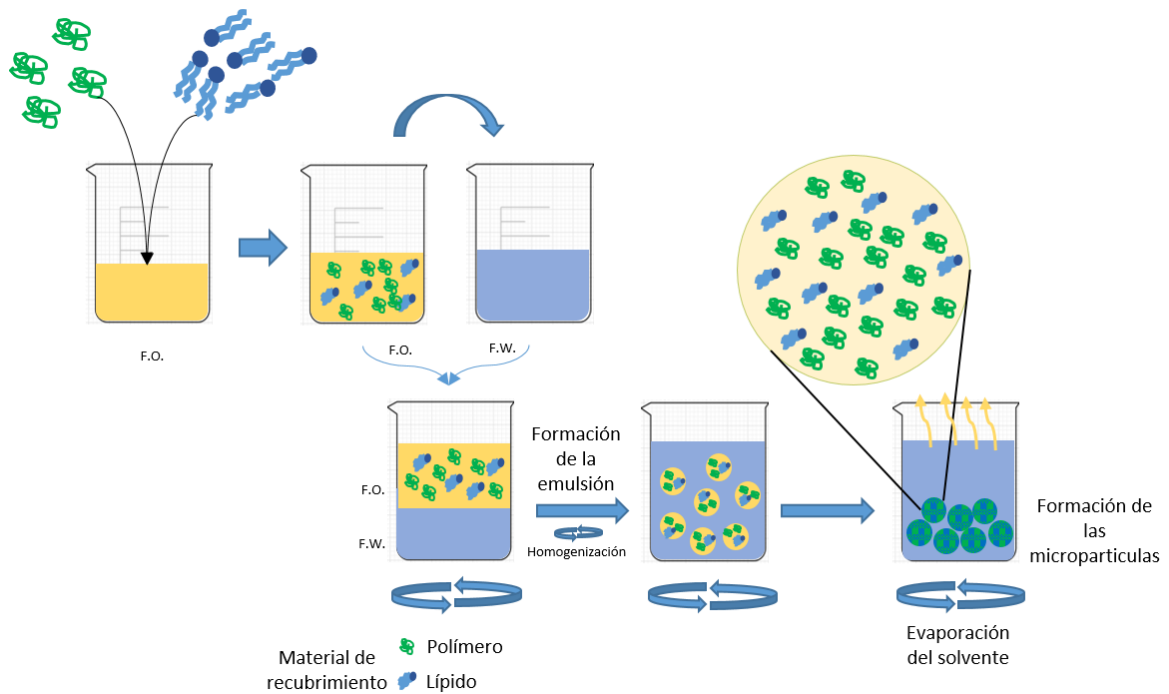


Figura 1-10: Representación esquemática del método de un paso para la obtención de SEF híbridos para liberación controlada.

1.5 Fármaco modelo: Péptido sintético de naturaleza hidrofílica

Los péptidos son macromoléculas esenciales en la vida, dado que cumplen diferentes funciones al interior de las células, como catálisis enzimática, transducción de señales, regulación genética y mantenimiento de un balance entre la supervivencia celular y la muerte celular programada, de hecho se han identificado más de 7000 péptidos que tienen un rol crucial en la fisiología humana (2). De acuerdo con esto y debido a su alta especificidad y potencia, los péptidos se presentan como muy buena alternativa terapéutica en aplicaciones biológicas incluyendo tratamientos, vacunas y diagnóstico (39).

Teniendo en cuenta lo anterior, existe un gran interés en diferentes tipos de péptidos debido a sus potenciales beneficios en el campo de la salud, como lo son las hormonas (insulina, péptido análogo del glucagón), enzimas (lactasa, lipasa, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina), vacunas, antimicrobianos y nutracéuticos (40). Actualmente la producción de péptidos se ha facilitado, pues se ha aumentado el conocimiento y los avances en biotecnología y en síntesis química (41). Los IFA basados en péptidos representan una parte significativa entre los medicamentos que son aprobados para salir al mercado cada año y que actualmente son usados para tratar o aliviar síntomas de muchas enfermedades metabólicas y oncológicas (39). A continuación se presenta un listado en la Tabla 1-3, de algunos de los péptidos sintéticos que se encuentran aprobados por la FDA (2).

Tabla 1-3: Listado de algunos péptidos sintéticos aprobados por la FDA.

Nombre del péptido	Nombre comercial	Indicación terapéutica
Exenatide	Byetta	Diabetes tipo 2
Nesiritide	Natrecor	Vasodilatador, diurético
Goserelina	Zoladex	Cáncer de mama y de próstata
Enfuvirtida	Fuzeon	Tratamiento de VIH
Vancomicina	Alvanco, Vancocin	Tratamiento de colitis
Leuprolide	Eligard, Lupron, Lucrin, Lupride	Cáncer de mama y próstata, tratamiento de endometriosis y Alzheimer
Oxitocina	Pitocin, Syntocinon	Labor de parto
Gramicidina	Neosporina oftálmica, Ocu-spore-G	Lesiones de la piel e infecciones del ojo
Corticotropina	Acthrel, HP Acthar Gel	Alergias, psoriasis, eritema, etc.
Icatibant	Firazyr	Angioedema hereditario
Bivalirudina	Angiomax	Inhibidor directo de trombina
Gramicidina D	Neosporina	Antibiótico
Bacitracina	BACiiM	Antibiótico
Cetrorelix	Cetrotide	Cánceres sensibles a hormonas de la próstata y seno
Pramlintide	Symlin	Diabetes
Lepirudin	Refludan	Anticoagulante
Daptomicina	Cubicina	Infecciones sistémicas causadas por organismos Gram +
Octeotride	Sandostatina	Tumores producidos por la hormona de crecimiento
Thymalfasin	Zadaxin	Tratamiento de Hepatitis B y C
Eptifibatide	Integrilin	Angina, infarto de miocardio

Los péptidos se caracterizan por presentar una estructura que está relacionada con su actividad biológica, por tanto, cualquier alteración en ella, ya sea durante el proceso de producción del medicamento, el transporte, el almacenamiento, o después de la administración, genera una reducción o pérdida de su actividad. Esto pueden ser dados por condiciones ambientales que no son convenientes para el péptido como cambios en el pH, la fuerza iónica, la temperatura, presencia de agentes desnaturizantes, y de actividad enzimática. Algunas de las ventajas y desventajas de estas moléculas a tener presente en el momento de ser incluidas en una formulación, se recopilan en la tabla 1-4 (39,41,42). Por estas razones se hace necesario proteger estas moléculas para evitar su rápida y fácil degradación. Una de las estrategias que se ha planteado con este propósito es el desarrollo de SEF con diferentes diseños estructurales, cada uno con sus propias ventajas y desventajas. La elección del sistema más apropiado para la entrega de los péptidos depende del entendimiento de los factores que impactan la retención del péptido en el sistema, la estabilidad y el perfil de liberación deseado (40). En relación con los sistemas que permiten la encapsulación de péptidos, se han desarrollado principalmente nano/micropartículas poliméricas y lipídicas, las cuales han mostrado un cierto grado de éxito para la entrega apropiada de estas moléculas. Sin embargo, existen varios retos relacionados con la tecnología para el desarrollo de sistemas portadores de péptidos que deben ser superados para obtener un sistema adecuado para la administración de estas moléculas (16).

Estos sistemas han demostrado versatilidad para la formulación, propiedades de liberación controlada, tamaño subcelular y biocompatibilidad con tejidos y células, por tanto, parecen ser una solución prometedora para la administración de péptidos, dado que ofrecen muchas ventajas sobre las formas de administración convencionales y es posible administrarlos por diferentes vías de administración(41).

Una de las promisorias actividades biológicas de los péptidos sintéticos es como potenciales antígenos en el desarrollo de vacunas frente a diferentes enfermedades. (43). SPf66 es un péptido sintético que corresponde al antígeno del primer candidato a vacuna antimalárica, la cual evidenció la capacidad de inducir respuesta inmune celular y humoral contra la malaria, como se reportó en varios ensayos clínicos(44). Esta molécula fue seleccionada como modelo para el desarrollo de este trabajo, teniendo en cuenta su origen sintético, su naturaleza altamente hidrofílica y su actividad biológica como antígeno. Es

necesario tener presente que el objetivo general de este trabajo es desarrollar un sistema para la administración controlada de un antígeno sintético.

Tabla 1-4: Ventajas y desventajas de usar péptidos como compuestos terapéuticos (45).

Ventajas	Desventajas
Varios blancos terapéuticos	Inestabilidad
Buena selectividad	Baja permeación a través de membranas biológicas
Buena potencia	Baja biodisponibilidad vía oral
Buena tolerabilidad	Solubilidad variable
Baja toxicidad	Alto peso molecular
Baja acumulación	A menudo es necesaria administración invasiva
Metabolitos no tóxicos	Posible inmunogenicidad
Bajos costos de manufactura comparado con las proteínas	Tiempo de vida media corto

2. Estado del arte

En los últimos años se han desarrollado novedosos SEF, para la administración de péptidos que permiten superar algunas de las limitaciones que tienen estas moléculas como IFA, baja biodisponibilidad, corto tiempo de vida media, reducida estabilidad, etc. Garantizar la estabilidad de estas moléculas en el SEF sigue siendo uno de los retos más importantes (39), es por esto que el sistema debe contar con ciertos requerimientos al momento de ser desarrollado, los cuales dependerán de la aplicación en particular que se desee, en cuanto a apariencia, estabilidad y funcionalidad. Para esto se deben considerar algunos factores relacionados con el diseño del sistema, como son la selección y compatibilidad entre los materiales, la estabilidad, la molécula a encapsular y la dosis (40). Estos sistemas se han desarrollado para la administración de péptidos por diferentes vías empleando diferentes materiales y técnicas, en la tabla 2-1 (42,46,47) se reporta una revisión muy somera de los sistemas desarrollados para la administración de diferentes péptidos.

Como se mencionó en el marco teórico existen diferentes técnicas para la obtención de estos sistemas y además en los que más se ha trabajado obteniendo resultados promisorios, es en las partículas sólidas lipídicas y las partículas poliméricas. En la figura 2-1 (39), se reporta de manera esquemática que estos dos sistemas seguidos de los liposomas, son los que se han desarrollado por una mayor cantidad de técnicas para encapsular gran variedad de péptidos y algunas proteínas, lo que permite que sean considerados como principales candidatos para la formulación de un nuevo SEF que reúna las propiedades tanto de sistemas lipídicos como de los poliméricos, y pueda ofrecer un sistema más robusto que además permita superar las limitaciones que tiene cada sistema por separado.

Tabla 2-1: Sistemas desarrollados para la administración de péptidos en los últimos años.

Péptido	Sistema de entrega	Vía de administración
Insulina	Microemulsión	Intranasal
Insulina	SLN	Pulmonar
Insulina	Gel basado en PLA-PEG-PLA	Subcutánea
Insulina	Nanovesículas mediante iontoforésis	Transdérmica
Péptido intestinal vasoactivo	Liposomas unilamelares	Inhalatoria
Vapreotide	Microesferas de PEG	Intramuscular
Péptido análogo al glucagón (GLP-1)	Péptido anclado a albumina	Intravenosa
Calcitonina	Péptido conjugado con PEG	Intravenosa
Calcitonina	Gel basado en PEG-PLGA-PEG	Subcutánea
Calcitonina	Micropartículas de β -ciclodextrina-PEG	Pulmonar
Calcitonina	Formulación micelar	Pulmonar
Péptido humano YY	Nanotransportador poroso de silicona	Intravenosa
Antagonista de la hormona luteinizante (LHRH)	Microesferas de PLGA	Subcutánea
PYY	Micropartículas y nanopartículas de silicona porosa	Subcutánea
Leuprolin/Leuprolide	Nanopartículas de quitosan-tioladas	Intranasal
Exendin-4	Micropartículas de PLGA	Pulmonar
Vapreotide	Microesferas de PLGA	Intramuscular
SPf66 antígeno de malaria	Microesferas de PLGA	Subcutáneo

De hecho, el desarrollo de nuevos SEF que tengan ventajas sobre los ya existentes ha sido un tema que se ha venido trabajando en los últimos años. Uno de estos sistemas son los sistemas híbridos lipopoliméricos que muestran características de una partícula polimérica y de una partícula sólida lipídica, el cual ha mostrado que tiene ventajas superiores a los dos sistemas por separado y que se resuelven algunas de las

limitaciones de estos. Como se mencionó anteriormente, existen diferentes metodologías para la obtención de estos sistemas logrando buenos resultados, encapsulando diversos IFA y empleando diferentes materiales poliméricos y lipídicos. Todo lo anteriormente descrito y como se reporta en la tabla 9-1 anexo A, ha permitido que se esté presentando un incremento considerable en la investigación relacionada con el diseño y desarrollo SEF híbridos para la administración de moléculas de diferente naturaleza (36,48).

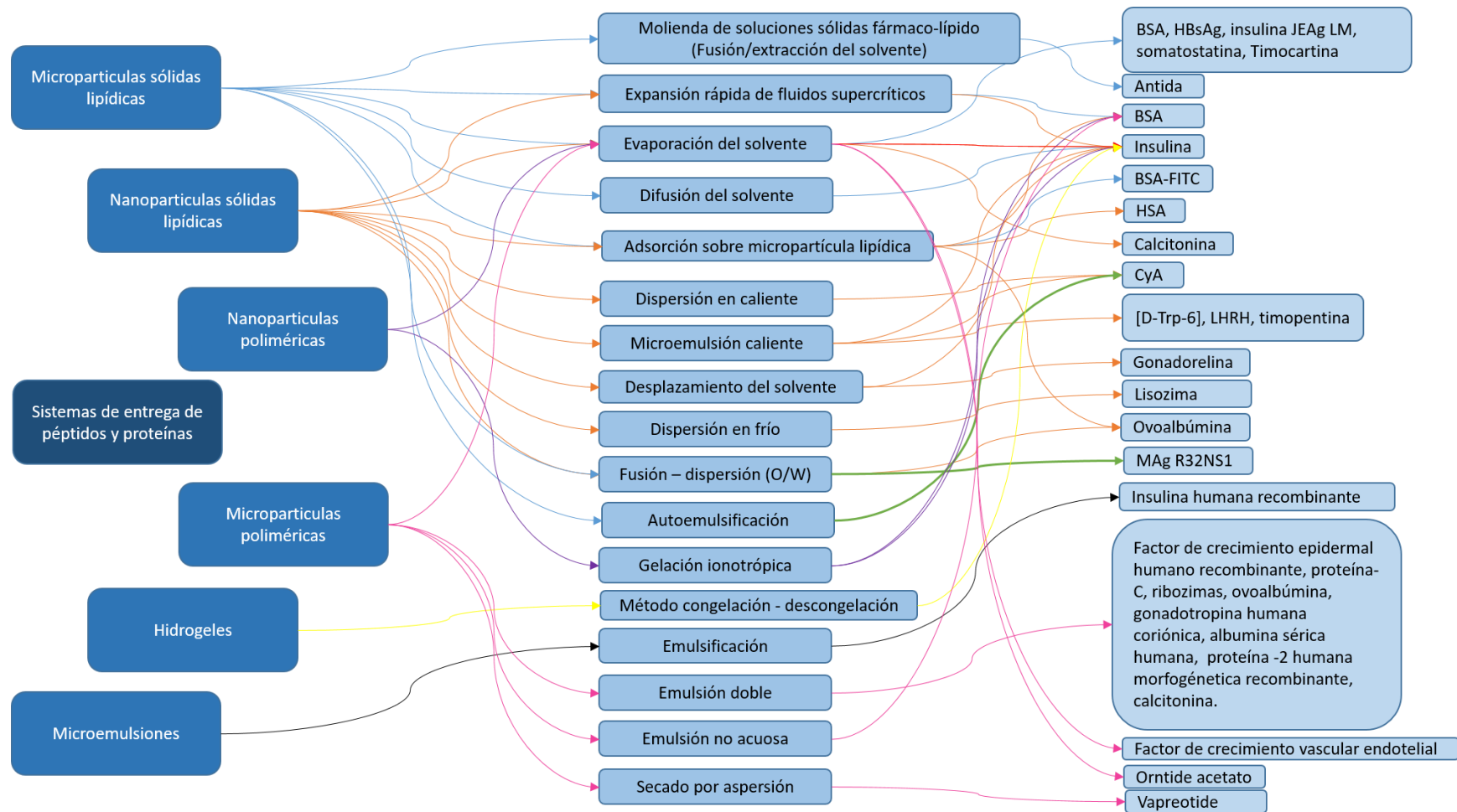


Figura 2-1: Sistemas de entrega de péptidos y proteínas desarrollados por diferentes técnicas.

3. Obtención de sistemas microparticulares poliméricos

3.1 Introducción

En los últimos años el desarrollo de SEF ha sido de vital importancia para la entrega de péptidos y proteínas. Como se ha mencionado a lo largo del documento existen diferentes SEF diseñados para superar las dificultades que poseen los péptidos. Entre estos sistemas de entrega de fármacos, se encuentran las micropartículas poliméricas, estos son transportadores cuyo origen puede ser natural, semisintético o sintético (41). Se caracterizan por ser partículas sólidas en las que el IFA se encuentra disuelto, atrapado, encapsulado, adsorbido o ligado a su superficie. Estos sistemas pueden ser administrados por diferentes vías (intravenosa, intramuscular, subcutánea, peroral, oftálmica e incluso transdérmica, entre otras) (39). Cabe resaltar que al igual que los demás sistemas, las micropartículas poliméricas tienen ventajas y desventajas en referencia a los demás sistemas, tal y como se reportan en la tabla 3-1. Adicionalmente, se considera muy importante tener presente el tipo de polímero utilizado, es decir si se trata de un material biodegradable o no biodegradable (49).

Tabla 3-1: Ventajas y desventajas de las micropartículas poliméricas para la administración de IFAs.

Ventajas	Desventajas
Efecto terapéutico constante y prolongado	Alto costo de materias primas y producción
Reducción en frecuencia de dosificación	Existen diferencias en el perfil de liberación entre formas farmacéuticas
Protección del IFA de degradación enzimática y fotolítica, por lo tanto, se considera una buena opción para la encapsulación de péptidos y proteínas	Pérdida de integridad de la matriz polimérica puede llevar a toxicidad
Entrega controlada, sostenida y dirigida del IFA	Baja reproducibilidad
Absorción del IFA de manera más reproducible	Diversa capacidad de carga de IFAs en micropartículas para administración parenteral
Enmascara sabores y olores desagradables provenientes de los IFAs	Ligeros cambios en la metodología de obtención del sistema pueden afectar la estabilidad de las partículas que se están formando
Evitan efecto del primer paso	La administración por vía parenteral puede causar que las micropartículas interactúen o formen complejos con componentes de la sangre
Pueden ser inyectadas fácilmente en el organismo por su pequeño tamaño y forma esférica.	
Mejoran el tiempo de vida media y por tanto la biodisponibilidad	
Usadas para controlar velocidades de liberación, disminuyendo efectos secundarios o toxicidad, y eliminando el inconveniente de inyecciones repetidas	

Para el desarrollo del presente trabajo, se utilizó el copolímero PLGA 50:50, que como se ha mencionado a lo largo del documento, es un material de naturaleza sintética compuesto de unidades de ácido láctico y de ácido glicólico en proporciones iguales (50). Al igual que el poli-ácido glicólico (PGA) y el poli-ácido láctico (PLA), los copolímeros PLGA, han sido aprobados por las agencias regulatorias a nivel mundial para su uso clínico. Teniendo en cuenta esto, se han desarrollado suturas quirúrgicas absorbibles basadas en PLGA, y estos copolímeros se han constituido en materiales de referencia para el desarrollo de sistemas para liberación controlada de IFAs, específicamente micropartículas (51). Estos materiales han sido ampliamente estudiados por sus características especiales como permitir al sistema la entrega controlada de IFAs incluidos los péptidos y proteínas, por su biocompatibilidad y biodegradación, con toxicidad sistémica mínima y buena fuerza mecánica (52). En 1986, se aprobó el primer producto basado en micropartículas elaboradas con PLGA, Decapeptil® SR, luego de esto se aprobaron más de 15 productos basados en esta tecnología. Al día de hoy, las investigaciones en sistemas microparticulados poliméricos, han recuperado interés y de hecho son considerados como sistemas de entrega muy promisorios para la administración de péptidos terapéuticos, un campo en continuo crecimiento (1,52,53). Por otro lado, dado que las primeras patentes de estos sistemas han expirado, las compañías farmacéuticas han mostrado interés en el desarrollo de novedosos productos genéricos basados en micropartículas elaboradas con PLGA (51).

La liberación de un IFA a partir de las micropartículas de PLGA dispersas en un medio acuoso, se atribuye principalmente a la degradación del copolímero producto de su hidrólisis hasta las unidades monoméricas, los cuales pueden ser metabolizados en el organismo mediante el ciclo de Krebs hasta dióxido de carbono y agua. El tiempo de degradación de las micropartículas poliméricas puede ir de meses a años, y esto dependerá principalmente de características propias del polímero como el peso molecular, la composición química y la cristalinidad, entre otras (50). Por ejemplo los copolímeros que contienen una alta proporción de ácido láctico son menos hidrofílicos, por tanto, absorben menos agua y se degradan más lentamente que aquellos PLGA que contienen alto porcentaje de ácido glicólico (51). De otro lado, el proceso de degradación de las micropartículas elaboradas con PLGA *in vivo* e *in vitro* depende de múltiples factores, como el tamaño, forma y vía de administración (50).

Las micropartículas elaboradas con PLGA han sido usadas en clínica desde hace 30 años, mostrando buenos resultados. En los últimos años se han aprobado productos para su comercialización tales como pasireotide pamoato - Signifor Lar[®], triptorelina pamoato - Triptodur[™], trimamcinolona actonido - Zilretta[®], y exenatide - Bydureon Bcise[®] (54–56) y actualmente se adelantan investigaciones en el desarrollo de sistemas SEF en este campo, para la entrega de péptidos y proteínas que requieren específicamente administración parenteral. Sin embargo, el desarrollo de micropartículas para entrega de péptidos y proteínas no es una tarea fácil, pues hay diversos retos que se deben superar, como el mantener su integridad fisicoquímica y biológica durante el proceso de microencapsulación (52).

Finalmente, en este capítulo se reportan los resultados de la implementación de la metodología basada en la formación de una doble emulsión y posterior extracción/evaporación del solvente orgánico para la encapsulación de un péptido sintético modelo de naturaleza hidrofílica en micropartículas poliméricas elaboradas con PLGA 50:50. El planteamiento inicial fue obtener sistemas microparticulares con un tiempo aproximado de degradación de 25 a 30 días y con un tamaño de partícula inferior a 10 μm . Para la implementación de esta metodología y la caracterización de los sistemas obtenidos fueron realizados una gran cantidad de ensayos preliminares relacionados con la evaluación de varios aspectos: 1) tipo de PLGA, 2) concentración de PLGA, 3) proporción de fases en la formación de la primera emulsión W_1/O , 4) Orden de adición de la fase externa acuosa W_2 para formar la doble emulsión, 5) Concentración del estabilizante en la fase externa acuosa W_2 6) condiciones de los procesos de homogenización y del proceso de evaporación del solvente orgánico, 7) Métodos de evaluación de tamaño de partícula, 8) Condiciones para la eficiencia de encapsulación tal como se puede evidenciar en el anexo B, tabla 9-2.

Como se citó anteriormente en este capítulo se reporta la metodología final para la obtención de los sistemas microparticulares poliméricos conteniendo el péptido sintético modelo microencapsulado y vacíos. De otra parte, se reporta la caracterización de todos los sistemas obtenidos desde el punto de vista farmacotécnico. Cabe resaltar que los resultados obtenidos en esta aproximación experimental fueron usados como fundamento para el posterior desarrollo de los sistemas lipídicos y de los sistemas híbridos lipopoliméricos.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materiales y equipos

- **Obtención de micropartículas poliméricas**

Para la obtención de las micropartículas poliméricas se usó PLGA 50:50 de viscosidad inherente 0,8 dL/g (Lactel, Birmingham Polymers, Inc.), diclorometano Honeywell (Muskegon USA), agua desionizada (D.I) (Sistema de filtración de agua Aqua Nova – Osmosis Inversa, Membrana de filtración (0,22 μm , ϕ 47mm), Polivinilalcohol (PVA) (Mw 31000-50000,98-99% hidrolizado) USA, Alcohol isopropílico Mallinckrodt Chemicals (New Jersey, USA) y el péptido sintético modelo 12-14 kDa.

Para la obtención de los diferentes sistemas se usaron Micropipetas (Select Bioproducts) (20-200 μL y de 100-1000 μL), sonicador (Qsonica sonicators, Q125), homogeneizador de turbina (Micra, Micra D-1 010049), Vórtex (IKA, Vortex 3), placa de agitación multipunto (IKA, RT 10 power), balanza analítica (Ohaus Y PX224), Congelador (ICASA), centrífuga (HERMLE, Z206A), liofilizador (LABCONCO, Lyph-lock 6).

- **Caracterización de las micropartículas poliméricas**

Para la caracterización de los sistemas obtenidos se usaron las siguientes metodologías y equipos: Difracción laser (DL) (Malvern Master Sizer 3000, Reino Unido), microscopía electrónica de barrido (SEM) (Microscopio electrónico JEOL JXA 8230, Japón), Kit de ensayo de proteínas Micro BCA™, lector de microplacas (Expert Plus, Biochrom Ltd), agitador orbital (Select Bioproducts SBS550), Estufa (Mettler, UN55).

3.3 Metodología

3.3.1 Obtención de micropartículas poliméricas

Para la obtención de estos sistemas se siguió la metodología de formación de una doble emulsión – evaporación del solvente, incluyendo algunas modificaciones. Para esto se partió de una solución de polímero (100mg PLGA/mL DCM), de una solución acuosa de

PVA 5%, de una solución acuosa de IPA 2% y en el caso de las micropartículas cargadas de una solución acuosa de péptido modelo (50 mg/mL).

Derivado de los ensayos preliminares reportados en el anexo B tabla 9-2, a continuación se reporta la forma como se obtuvieron tres sistemas microparticulares poliméricos, los cuales consistieron en un sistema vacío (EP1), y dos sistemas cargados con el péptido sintético modelo (EP2 y EP3). La composición de los diferentes sistemas trabajados se relaciona en la tabla 3-2.

Tabla 3-2: Composición de los ensayos realizados para la obtención de las micropartículas poliméricas.

Ensayo	Solución Polímero	Solución Péptido	H ₂ O D.I
EP1	1 mL	0 μ L	200 μ L
EP2	1 mL	200 μ L	0 μ L
EP3	1 mL	200 μ L	0 μ L

El procedimiento se realizó mediante 5 pasos como se reporta a continuación:

- Formación de la emulsión 1 (W_1/O): Como se describe en la figura 3-1, se dispuso de un tubo Falcon de 15mL (Reactor 1) al que se adicionó 1mL de la solución de polímero que se denominó la fase orgánica (O) de la primera emulsión. Sobre esta fase, se dispersó 200 μ L de fase interna acuosa (W_1), que en el caso de las micropartículas vacías fue H₂O D.I. y de solución acuosa del péptido en el caso de las micropartículas cargadas. Esta dispersión se homogenizó mediante ultrasonido durante 1 minuto a una amplitud del 100%.

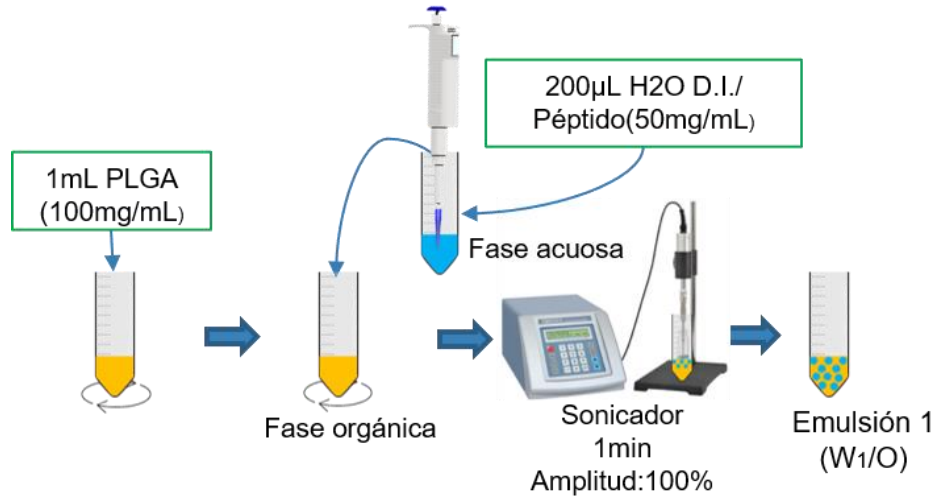


Figura 3-1: Representación gráfica del proceso para la formación de la emulsión 1 (W₁/O)

- **Formación de la emulsión 2 (W₁/O/W₂):** Como es posible observar en la figura 3-2, en el tubo Falcon en donde se encontraba la emulsión 1 (W₁/O), se dispensó 1 mL de solución acuosa de PVA 5% (W₂), se dispersó mediante la utilización de un vórtex durante 15 segundos. A este sistema se realizaron adiciones sucesivas de la solución de PVA 5% hasta completar 10 mL, empleando las mismas condiciones de agitación. Finalmente, para obtener la emulsión 2 (W₁/O/W₂) el sistema se sometió a un proceso de homogenización mediante turbina a 20.000 rpm durante 5 minutos y seguidamente se trasvasó a un recipiente de mayor capacidad para proceder a la extracción/evaporación del solvente orgánico.

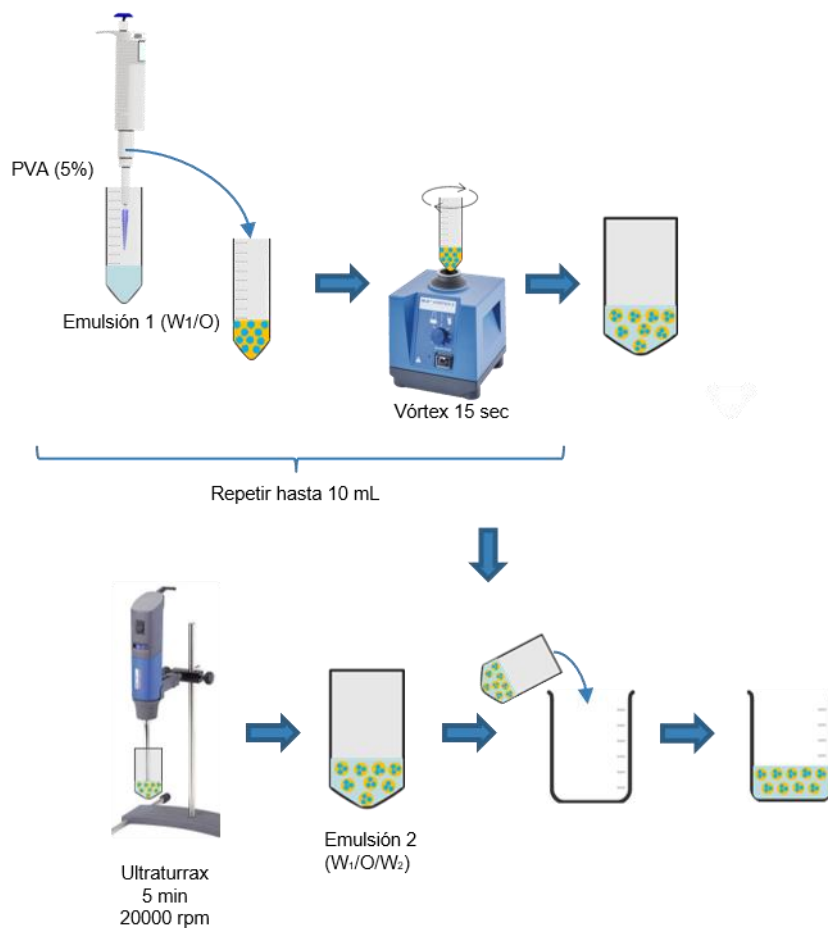


Figura 3-2: Representación gráfica de la formación de la emulsión 2 (W₁/O/W₂)

- **Evaporación del solvente:** Como se observa en la figura 3-3 el sistema (W₁/O/W₂) se dispuso en una placa de agitación magnética para realizar la extracción del solvente orgánico (DCM). Para favorecer su evaporación se adicionó 10 mL de solución acuosa de IPA 2% lentamente. Bajo esta condición se deja el sistema por 1 hora, tiempo determinado en los estudios preliminares para inducir la insolubilización de las micropartículas poliméricas.

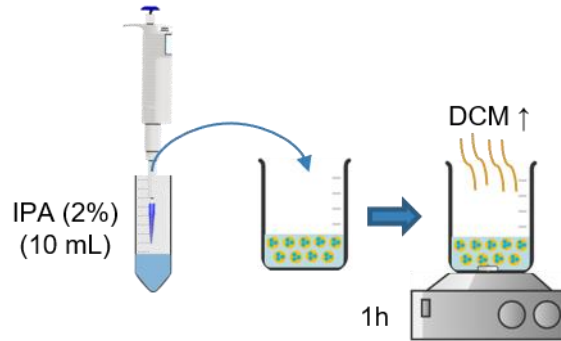


Figura 3-3: Representación gráfica del proceso de extracción/evaporación del solvente.

- Lavados: La suspensión obtenida luego de la evaporación del solvente orgánico, se repartió en dos tubos Falcon de 15mL. Como se ve en la figura 3-4, estos se sometieron a un proceso de centrifugación durante 5 minutos a 6000 rpm, pasado este tiempo, se descartó el sobrenadante y se reemplazó por 10mL de H₂O D.I. en cada tubo y se dispersó nuevamente el sistema. Con el propósito de lavar las micropartículas, este procedimiento se realizó 3 veces y finalmente, los sedimentos se dispersaron en aproximadamente 4 mL de H₂O D.I. y se trasvasaron a un vial de vidrio para ser secados posteriormente mediante liofilización.

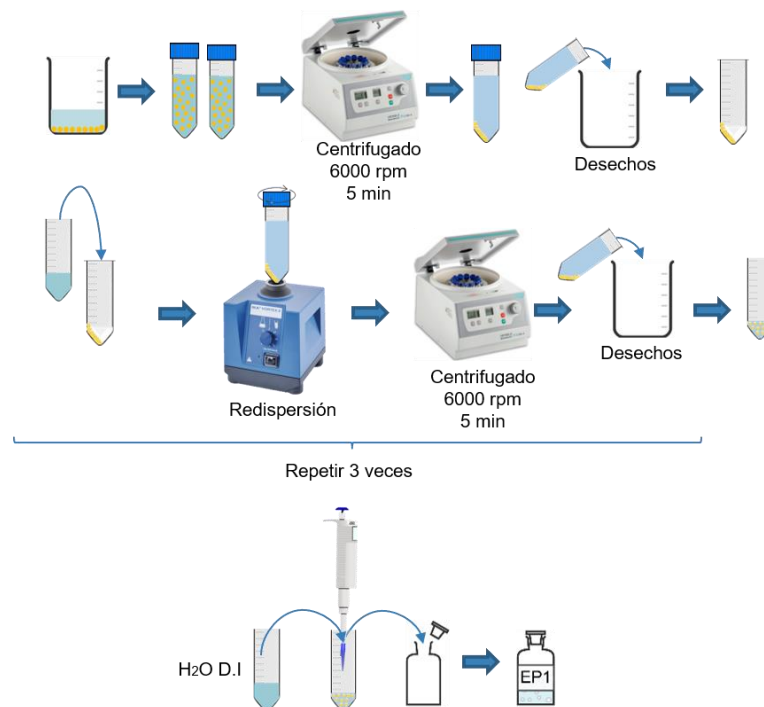


Figura 3-4: Representación gráfica del proceso de lavado de las micropartículas obtenidas.

- Liofilización: Como se describe en la figura 3-5, el vial que contiene las micropartículas en suspensión se llevó a congelación (-20°C) durante la noche y al día siguiente se sometió al proceso de secado mediante liofilización durante 24h.

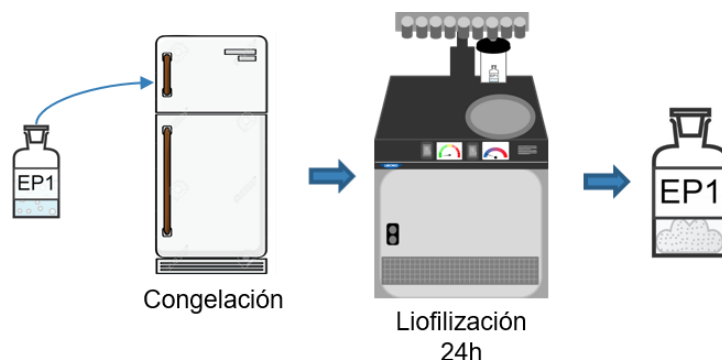


Figura 3-5: Representación gráfica del proceso de liofilización para la obtención de las micropartículas poliméricas secas.

3.3.2 Caracterización de micropartículas poliméricas

A continuación, se reportan las metodologías seguidas para la caracterización de los sistemas obtenidos en términos de la morfología, el tamaño de partícula, capacidad de carga, eficiencia de encapsulación, el potencial electrocinético (potencial zeta) y el perfil de liberación del péptido sintético encapsulado.

- **Morfología:** Para evidenciar la forma de las micropartículas se empleó la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM). Para esto se pesó en un eppendorf de 1,5mL, 1mg de las micropartículas liofilizadas, las cuales se suspendieron en 100 μL de H₂O D.I. y filtrada por una membrana de 0,22 μm . De esta dispersión de micropartículas, se tomó una muestra y se dispuso en el portamuestras o “stub”, se dejó secar al ambiente y se recubrió posteriormente, mediante pulverización catódica con oro. Las imágenes se tomaron en un microscopio electrónico JEOL JXA 8230, a un voltaje de 25 kV, se tomó una imagen panorámica a una magnificación de 1000X, y una imagen más cercana a una magnificación de 5000X. Las imágenes se procesaron directamente en el microscopio mediante el software Gatan Microscopy Suite Digital Micrograph versión 2.32.888.0
- **Tamaño de partícula:** La determinación del tamaño de partícula se realizó mediante la técnica de difracción de luz láser (DL) usando un equipo Master Sizer. Para esta

determinación se pesó en un eppendorf de 1,5mL, 8mg de las micropartículas liofilizadas, las cuales fueron suspendidas en 1mL de H₂O D.I. y filtrada por una membrana de 0,22µm. Esta dispersión de micropartículas se adicionó a un vaso de precipitado con 600mL de agua destilada fresca y se empleó una unidad de dispersión de muestra en vía húmeda, la cual está directamente acoplada al equipo. Se inició el proceso de dispersión y recirculación continua de la muestra hasta alcanzar una obscuración >2%. La medición se llevó a cabo a 25°C haciendo 5 lecturas. El tamaño y la uniformidad de la dispersión, lo determinó directamente el equipo mediante el software Master Sizer 3000 versión 3.62.

- Eficiencia de encapsulación: Esta determinación se realizó de manera directa empleando las micropartículas obtenidas. En primera medida, fue necesario hacer una digestión del polímero, para esta, se pesó 2mg de las micropartículas liofilizadas en un eppendorf de 1,5mL, sobre estas se añadió 1mL de NaOH 0,2N, estas se agitaron en el vórtex durante 15 segundos, se llevaron posteriormente a un agitador orbital durante 1 hora, tiempo establecido para alcanzar la disolución completa del polímero. Pasado este tiempo se ajustó el pH con HCl 2N, hasta obtener un pH cercano a 7.

La determinación de la concentración del péptido sintético se realizó en microplaca de 96 pozos empleando el kit Micro BCA™. Para esto fue necesario realizar una curva de calibración entre 0 y 35 µg/mL empleando una solución del péptido sintético modelo. En la misma microplaca se colocaron alícuotas de la muestra producto de la digestión de las micropartículas y se completó a 100µL con un buffer PBS (Fosfato 0,1M-NaCl (0,15M) pH:7,4). Posteriormente, se preparó el reactivo Micro BCA™ siguiendo el protocolo sugerido en el kit, y se adicionó 100µL de este reactivo en cada pozo. La placa se llevó a incubación a 37°C por 2 horas y pasado este tiempo, se determinó la absorbancia a 590 nm en un lector de placas. Mediante la curva de calibración se interpolaron los datos obtenidos para las muestras, con la ecuación de la curva se cuantificó el contenido de péptido en las micropartículas, y con esa información finalmente se calculó la eficiencia de encapsulación mediante la siguiente fórmula:

$$E. E. = \frac{\text{Cantidad del activo en las partículas}}{\text{Cantidad de activo inicial}} \times 100$$

- Capacidad de carga: Con la información obtenida de la cantidad de activo (péptido sintético modelo) encapsulado, se determinó este parámetro empleando la siguiente relación matemática:

$$\%LC = \frac{\text{Cantidad de activo}}{\text{Cantidad de partículas}} \times 100$$

- Potencial Z: El potencial Z se determinó utilizando el equipo Zeta Sizer Nano ZS, empleando la celda DTS1070. Brevemente, se pesó en un eppendorf de 1,5mL, 1mg de micropartículas liofilizadas, estas se dispersaron en 1mL de agua D.I. filtrada por 0.22 μm , y posteriormente se pasaron a la celda. La medición se llevó a cabo a 25°C. El potencial Z lo determinó el equipo teniendo en cuenta las 3 lecturas realizadas para cada muestra. Los datos fueron procesados mediante el software Zetasizer versión 7.11.
- Perfil de liberación: Para esta determinación se pesaron 10 mg de cada sistema por duplicado, en un eppendorf de 2 mL, estas muestras se suspendieron en 1 mL de Buffer PBS (Fosfato 0,1M-NaCl (0,15M), pH:7,4) preservado con Azida de sodio 0,1%, se pusieron en un agitador orbital en una estufa a 37°C y se mantuvieron en agitación constante. Para determinar el perfil de liberación se realizaron muestreos a la primera hora y a los quince días siguientes durante cinco semanas. Cada vez que se realizaba un muestreo, se centrifugaban las muestras a 6000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se tomó con una micropipeta una muestra de 500 μL del sobrenadante y se llevó a un eppendorf de 500 μL , inmediatamente este volumen fue reemplazado por PBS (Fosfato 0,1M-NaCl 0,15M, pH:7,4) preservado con Azida de sodio 0,1%. Las muestras tomadas fueron llevadas a congelación para su posterior análisis con el kit de ensayo de proteínas Micro BCA™ de manera similar a como se procedió en la metodología para determinar la eficiencia de encapsulación.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Obtención de las micropartículas poliméricas

La obtención de las micropartículas poliméricas se realizó mediante la metodología de formación de una doble emulsión con posterior extracción/evaporación del solvente orgánico. Esta metodología se eligió en función de los resultados obtenidos en trabajos previos realizados por el grupo de investigación (47,57,58). De otra parte, se tuvo en cuenta que la molécula a encapsular era un péptido de naturaleza hidrofílica, por lo que los métodos de emulsión simple o coacervación no eran los más adecuados para obtener los sistemas esperados. Teniendo en cuenta la estabilidad del péptido y con el propósito de conservar su integridad, no se consideró someterlo o exponerlo a temperaturas elevadas como es el caso de las metodologías de secado por aspersión, lecho fluidizado, etc. Específicamente en la metodología seguida, la primera emulsión (W_1/O), estaba compuesta de la fase interna acuosa, que correspondió a una solución del péptido para las micropartículas cargadas o agua desionizada para las micropartículas vacías, mientras que la fase orgánica consistió en una dispersión de PLGA en diclorometano. La primera emulsión se realizó mediante sonicación a las condiciones que se establecieron mediante los ensayos preliminares, en los que se tuvo en cuenta tanto el tiempo de homogenización y la amplitud empleada en el sonicador. De este ensayo se encontró que al trabajar con una amplitud menor al 100% y tiempos inferiores a 1 min, se obtuvieron micropartículas con un tamaño de partícula mayor al esperado y una mayor dispersión. Para la segunda emulsión se usó PVA 5% como estabilizante de la doble emulsión, con el fin de evitar que durante el proceso de evaporación del solvente se diera la formación de agregados o se facilitara la coalescencia y con esto, evitar tamaños de partícula grandes y distribuciones de tamaño amplias. La adición del PVA 5%, se realizó de manera fraccionada y con agitación para inducir la formación de la doble emulsión desde el inicio, dado que, en ensayos previos, se observó que, al adicionarlo totalmente sobre la fase orgánica, se daba una insolubilización del polímero, generando la formación de agregados y no de las micropartículas esperadas. La adición fraccionada da lugar a la formación de la doble emulsión con un bajo volumen de PVA, que posteriormente se diluirá con el resto del PVA adicionado. Las condiciones de formación de la segunda emulsión con el homogeneizador de turbina a alta velocidad se definieron a partir de ensayos previos, donde se observó que al trabajar con menos revoluciones por minuto (10000 rpm), la distribución de tamaño se

veía afectada negativamente. Se sugiere que el PVA se ubica en la superficie de las gotas de la primera emulsión mediante interacciones débiles formando capas multimoleculares y por tanto mantiene íntegra la segunda emulsión mediante un mecanismo de estabilización estérica. De otro lado, se ha reportado en la literatura que al ser clasificado como un hidrocoloide y más puntualmente un polímero de alto peso molecular, al incluirlo en el sistema favorecer un incremento en la viscosidad de la emulsión, haciendo que el sistema presente una mayor estabilidad física (59), lo que podría explicar la elección de aumentar la velocidad de agitación y con esto, la obtención de una distribución de tamaños más uniforme. Seguidamente, el tiempo del proceso de evaporación del solvente orgánico es una etapa clave de este método, dado que la molécula encapsulada es altamente hidrofílica y presenta una tendencia a migrar a la fase acuosa externa, por tanto, si se extiende este proceso por un tiempo muy prolongado, es probable que se generen porosidades o canales en las micropartículas por donde pueda migrar el péptido y por tanto la eficiencia de encapsulación se ve afectada negativamente. Por lo anteriormente descrito se estableció el tiempo para el proceso de evaporación del solvente orgánico en una hora, a diferencia de los tiempos superiores reportados en la literatura para este proceso (60,61). Teniendo en cuenta además la labilidad del péptido, no se decidió trabajar a temperatura superior a la del ambiente para favorecer la evaporación del solvente, ya que a pesar de que disminuiría significativamente el tiempo de este paso, puede llegar a afectar estructural y funcionalmente al péptido encapsulado. Además, tratándose de diclorometano, un solvente con presión de vapor alta y de la pequeña cantidad usada en el proceso, sin embargo, se decidió utilizar una solución de isopropanol al 2% para extraer el DCM y facilitar su evaporación. En este proceso lo que se buscó fue que a medida que el diclorometano se evaporó, el polímero quedó en un medio acuoso, en el cual es insoluble, por tanto, se produce el endurecimiento de las gotas de la emulsión, dando lugar al sistema particulado polimérico deseado.

El proceso de lavado de las micropartículas obtenidas con H₂O D.I., permitió retirar el PVA de la fase externa y el que se encontraba adsorbido sobre las micropartículas. El propósito de realizar estos lavados fue tratar de obtener sistemas microparticulares con una distribución de tamaño más uniforme y con la menor posibilidad de que se formen agregados particulares. De otro lado, se estableció que realizar tres lavados era suficiente

para minimizar el riesgo de facilitar la desorción del péptido que se encontraba en la superficie de las micropartículas y se afectara la eficiencia de encapsulación.

Finalmente, el proceso de liofilización permitió retirar el agua residual del sistema, es decir el agua de las fases acuosas W_1 , W_2 y el agua usada para resuspender el sedimento obtenido de los lavados. Posterior a este proceso se obtuvo un producto seco, el cual tiende a ser mucho más estable que el producto en suspensión y se facilita su manipulación. Una vez obtenidas las micropartículas liofilizadas, se realizó el cálculo del rendimiento, obteniendo rendimientos en el proceso entre el 60% y el 75%.

3.4.2 Caracterización:

- **Morfología:**

El estudio de la morfología de las micropartículas se realizó para los tres sistemas obtenidos. Las micrográficas obtenidas por SEM en dos aumentos (1000X y 5000X) se reportan en la figura 3-6. En ambos casos se observó que la forma de las micropartículas obtenidas es esférica. Específicamente en las imágenes panorámicas (1000X) se observó que se presentaron varios rangos de tamaño, tal como se confirmó en la determinación de tamaño de partícula mediante DL. Adicionalmente, se observó en las micrográficas de las micropartículas cargadas que presentaron la tendencia a aglomerarse más que las micropartículas vacías. En el caso de las micropartículas vacías, se sugiere que se genera una repulsión electrostática mayor, atribuida a que el polímero con el que fueron elaboradas las micropartículas es de carácter negativo por la presencia del grupo carboxilo desprotonado en su estructura (62). Para el caso de las micropartículas cargadas, al tener la presencia del péptido sintético el cual tiene aminoácidos con carga positiva en su cadena lateral, puede interactuar electrostáticamente con el polímero e inducir la neutralización de la carga negativa sobre las micropartículas, reduciendo su repulsión dando lugar al acercamiento y aglomeración. Esta variación en la carga superficial de las micropartículas se evidenció posteriormente con la determinación del potencial electrocinético de las diferentes muestras. De otra parte, en las imágenes de mayor aumento, se observó que la superficie de las micropartículas es lisa, suave y solo se observó alteraciones en la integridad de la superficie (presencia de poros) de algunas micropartículas cargadas. Esto se podría explicar dado que, en el proceso de la formación de las

micropartículas cargadas, específicamente en el momento de la evaporación del solvente orgánico, el péptido de naturaleza hidrofílica que se encontraba en la fase W_1 probablemente presentó la tendencia a difundir a la fase externa acuosa W_2 a través de la matriz polimérica que se estaba formando por la insolubilización del PLGA, dando lugar posiblemente a la formación de los poros. Simultáneamente, es posible observar en las micrografías con magnificación de 5000X, un cambio de tonalidad en la superficie de las micropartículas cargadas, que permitió sugerir la presencia de cavidades internas formadas por las gotas de la fase interna W_1 en la cual estaba disuelto el péptido sintético, distribuidas en la matriz polimérica que formó las micropartículas. Finalmente, este aspecto fue muy relevante para la investigación dado que, la morfología e integridad de las micropartículas está indirectamente relacionada con la manera como se liberó el péptido sintético encapsulado. Por tanto, fue importante tener control sobre estos aspectos de las micropartículas, con el fin de que la liberación dependiera mayoritariamente del tiempo de degradación del material polimérico con el que se elaboraron las micropartículas. Además, el hecho de que las micropartículas se hayan obtenido con una forma definida, esférica y una superficie lisa e íntegra, permitió sugerir en este trabajo y como se reporta en la literatura que las condiciones establecidas del proceso de evaporación del solvente fueron las adecuadas para la obtención de las micropartículas con las características esperadas (51).

- **Tamaño de partícula:**

Como se puede observar en la tabla 3-3 el tamaño de las micropartículas vacías y cargadas se encuentran en un rango entre 3,08 y 5,60 μm . En cuanto a la uniformidad que es una medida de la desviación absoluta de la mediana, un valor menor significa que la distribución es más estrecha. Para las micropartículas vacías la distribución de tamaño fue más uniforme con un valor de 0,331, mientras que para las micropartículas cargadas la distribución fue menos uniforme con valores entre 1,061 y 2,538, debido a la presencia de señales de mayor intensidad entre 20 y 1000 μm , como se observa en la figura 3-8B. Estas señales de mayor tamaño probablemente se atribuyen a la formación de agregados como se evidencio en las imágenes obtenidas en SEM para estos sistemas cargados con el péptido modelo.

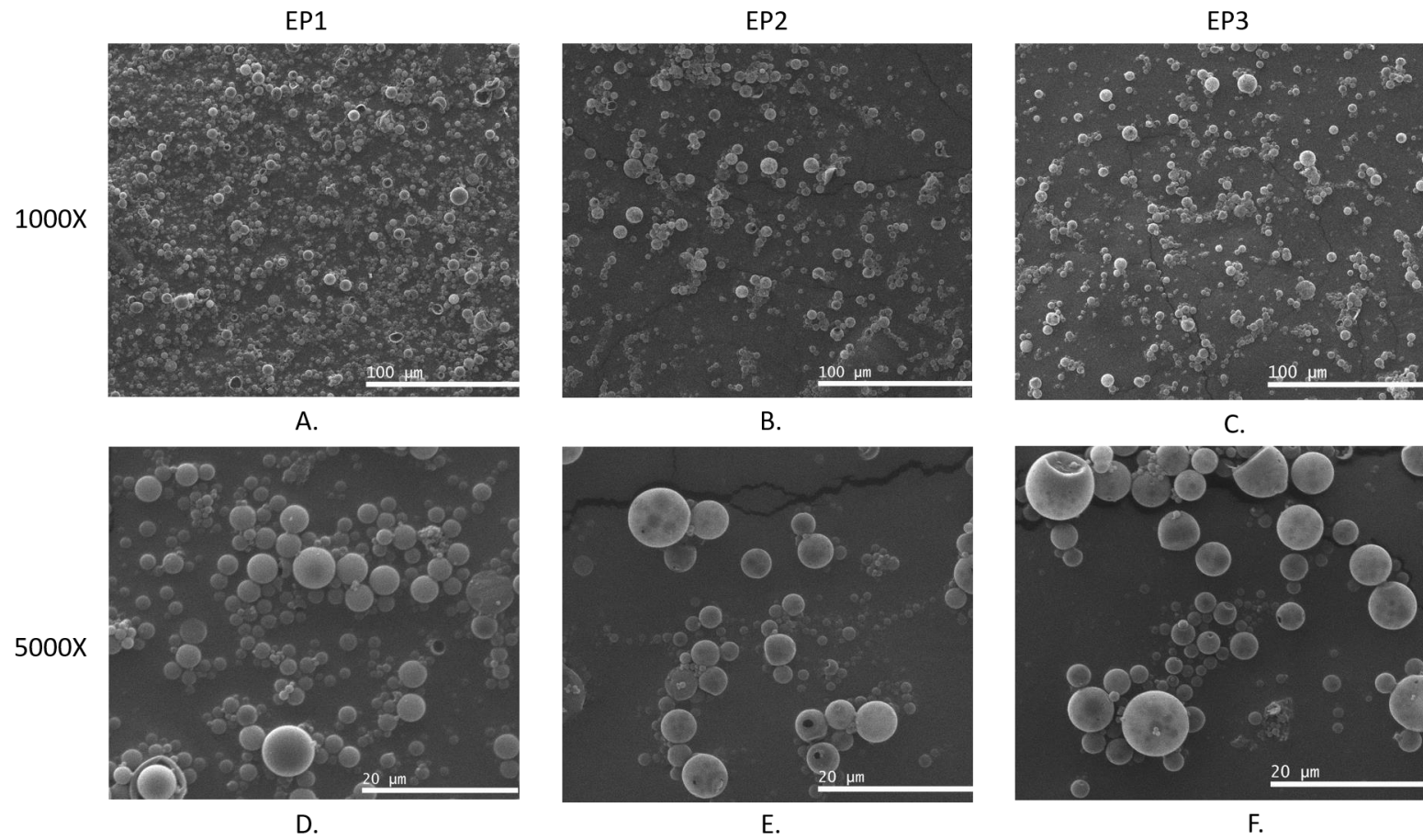


Figura 3-6: Morfología de micropartículas poliméricas obtenidas mediante SEM a diferentes magnificaciones. A y D sistemas vacíos, B,E,C y F sistemas cargados con el péptido sintético hidrofílico.

En cuanto a los parámetros estadísticos como la desviación estándar, es posible observar que en todos los ensayos realizados la desviación estándar entre las repeticiones tomadas es baja, lo cual nos indica que los datos obtenidos para los diferentes sistemas tienden a estar agrupados cerca de la media y por tanto se trataría de datos con un alto nivel de confianza.

Como se puede ver en la figura 3-7 las distribuciones de tamaño de partícula obtenidas, en el caso de las micropartículas vacías (EP1) presentaron una distribución bimodal, en donde se observó una pequeña señal entre 0,8 y 2 μm y una señal mayoritaria entre 2 y 10 μm , resultado congruente con lo observado en las micrográficas de SEM. Para las micropartículas cargadas (EP2 y EP3) la distribución como se citó anteriormente fue menos uniforme, presentando una señal mayoritaria entre 2 y 10 μm , pero con evidencia de una señal de mucho menor intensidad en un rango muy amplio de tamaño entre 20 a 1000 μm . Como se describió anteriormente, la presencia de estas señales de mayor tamaño en la distribución fue atribuido a la formación de agregados favorecida por la reducción del potencial zeta de las micropartículas, ocasionada por la presencia del péptido asociado a la superficie de estos sistemas, lo cual fue evidenciado en las micrográficas obtenidas por SEM. Es importante resaltar que, tanto en las micropartículas vacías como cargadas, la señal mayoritaria en la distribución de tamaño corresponde al 90% en un rango entre 2 y 10 μm , el cual corresponde al tamaño propuesto para el desarrollo de estos sistemas. De otra parte, estos resultados nos permitieron confirmar que las condiciones establecidas y utilizadas de tiempo e intensidad en los procesos de homogenización, fueron las indicados para obtener sistemas microparticulares poliméricos con esta característica de tamaño.

Tabla 3-3: Tamaño de partícula obtenido por LD en el equipo MasterSizer.

Ensayo	Tamaño D[3,2] (μm)	Uniformidad	Desviación estándar
EP1	3,08	0,331	0,0112
EP2	5,60	2,538	0,0806
EP3	4,92	1,061	0,162

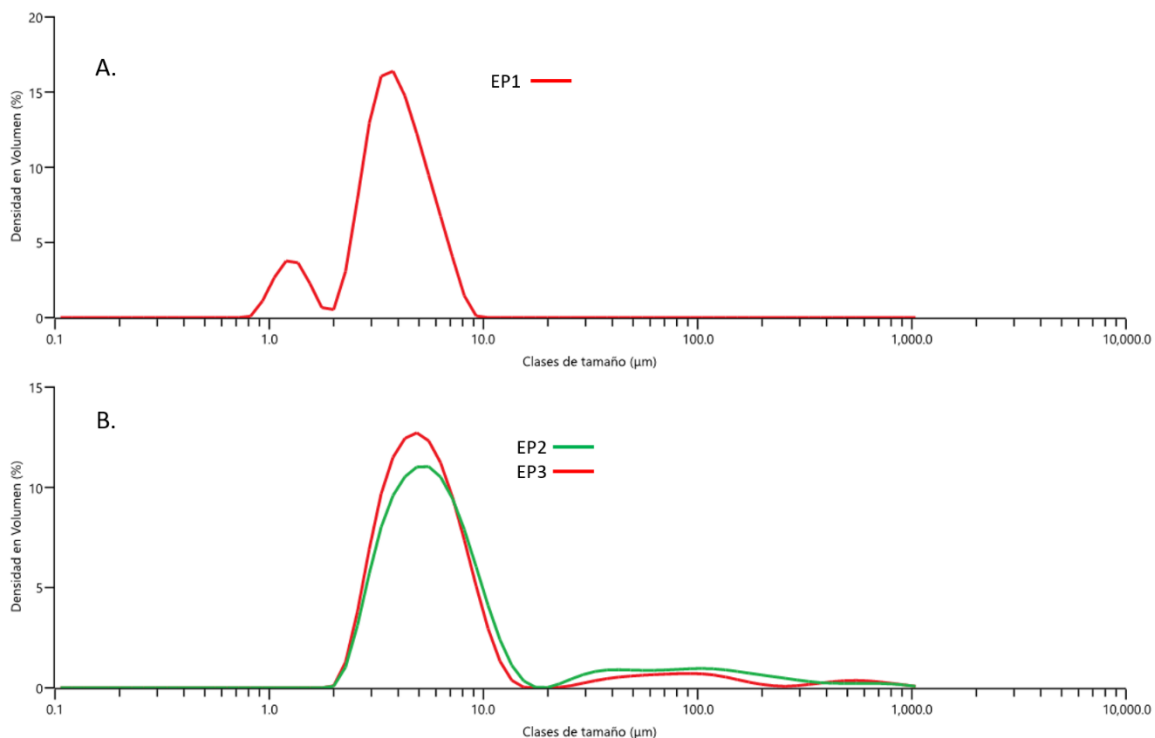


Figura 3-7: Distribución de tamaños de micropartículas poliméricas vacías (A) y cargadas (B) usando LD mediante el equipo MasterSizer.

- **Eficiencia de encapsulación:** Este parámetro es uno de los más relevantes en los sistemas microparticulares desarrollados para la administración de un IFA. Mediante la E.E. se determina la carga de IFA en el sistema, lo que permite establecer la cantidad de sistema que debe ser administrado en función de la dosis efectiva del IFA. La EE es determinada normalmente de manera indirecta, es decir cuantificando la cantidad de IFA no encapsulado. Con el propósito de tener mayor certeza en el parámetro, en este estudio la E.E. se determinó de manera directa, cuantificando la cantidad de péptido modelo presente en una cantidad específica de micropartículas poliméricas. Como se describió en la metodología para cuantificar el péptido encapsulado se empleó una curva de calibración construida con una solución stock del péptido sintético modelo. Como se reporta en la tabla 3-4 la E.E. en los sistemas cargados con el péptido modelo EP2 y EP3 fue de 57,32% y 57,53% respectivamente. Específicamente el péptido adsorbido corresponde al 48,9% y 37,4% del péptido encapsulado para EP2 y EP3 respectivamente. Los resultados obtenidos fueron coherentes con lo reportado en trabajos previos del grupo de investigación(57,58). Adicional a la información reportada en la literatura

(27), se debe tener en cuenta que la eficiencia de encapsulación del péptido modelo en sistemas microparticulares poliméricos obtenidos mediante la metodología de formación de doble emulsión, probablemente fue afectada por diferentes factores, los cuales fueron evaluados en los ensayos preliminares de esta investigación. En este caso en específico, el solvente orgánico usado (DCM), fue elegido dado que el PLGA tiene buena solubilidad en este, su evaporación fue facilitada por la adición de IPA 2% y cuenta con una alta presión de vapor lo que le permite que se evapore con facilidad. Asociado a este proceso se observó que al permitir por mayor tiempo la evaporación del DCM, se evidenció la formación de porosidades en la superficie de las micropartículas. Se sugiere como se citó previamente, que durante este proceso el péptido encapsulado presentó la tendencia a migrar del interior de la matriz polimérica a la fase externa acuosa, dando lugar a la formación de micropartículas porosas, afectando negativamente la eficiencia de encapsulación. Adicionalmente, el proceso de lavado de las micropartículas puede afectar negativamente la eficiencia de encapsulación, ya que puede remover el péptido que se encontraba adsorbido en la superficie de las micropartículas. Finalmente, los resultados obtenidos permitieron establecer las mejores condiciones para la obtención de las micropartículas poliméricas en función del tamaño de partícula y la eficiencia de encapsulación del péptido, con el fin de mantenerlas constantes en el desarrollo de los sistemas posteriores.

Teniendo en cuenta el resultado obtenido en este estudio y los previamente reportados en nuestro grupo, es posible sugerir que la eficiencia de encapsulación promedio del 60%, es apropiada para este para el sistema microparticulador polimérico conteniendo encapsulado el péptido sintético modelo.

- **Capacidad de carga:** A partir de la eficiencia de encapsulación, se realizó la determinación de la capacidad de carga del péptido modelo en el sistema microparticulador polimérico desarrollado, la cual corresponde directamente a la proporción de péptido presente en una cantidad determinada micropartículas. La capacidad de carga determinada en los sistemas microparticulares poliméricos desarrollados fue 5,21% para EP2 y 5,23% para EP4.

- **Potencial Z**

El potencial Z de la dispersión de micropartículas obtenidas se determinó utilizando la metodología de microelectroforésis de láser Doppler. Mediante esta metodología las micropartículas dependiendo de su carga superficial son atraídas por el electrodo con carga opuesta (63). La medida de esta característica propia de las micropartículas, depende de diversos factores, entre ellos, el pH, la fuerza iónica y la concentración, entre otros(64). Por tanto, para realizar esta medición se decidió trabajar con agua desionizada y filtrada a través de una membrana de 0,22 μ m.

El PLGA, material con el cual fueron elaboradas las micropartículas, es un copolímero de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA). El PLGA, contiene en su estructura un ácido carboxílico (65), el cual se encuentra cargado negativamente en el momento en el que se dispersan la micropartículas en agua desionizada. En la tabla 3-4, se reportan los resultados obtenidos en la determinación del potencial zeta en las dispersiones de micropartículas vacías y cargadas con el péptido modelo. El potencial Z en los sistemas evaluados se encontró en un rango entre -18,5 mV y -24,5 mV. Este potencial zeta negativo, contribuyó a una mayor estabilidad física de las dispersiones, pues según literatura, las dispersiones de micropartículas se pueden clasificar de acuerdo al potencial zeta, en altamente inestables ($\pm 0-10$ mV), relativamente estables ($\pm 10-20$ mV) y altamente estables ($\pm 20-30$ mV) (64).

Tabla 3-4: Características farmacotécnicas de las micropartículas poliméricas vacías y cargadas.*Péptido adsorbido: péptido asociado en la superficie con respecto del péptido encapsulado

Ensayo	Eficiencia de encapsulación (%)	Péptido adsorbido(%)* (%)	Capacidad de carga (%)	Potencial Z (mV)
EP1	N.A	N.A	N.A	-24,5
EP2	57,32	48,9	5,21	-19,3
EP3	57,53	37,4	5,23	-18,5

De acuerdo con los resultados reportados en la tabla 3-4, se observó que el potencial Z de las micropartículas cargadas (EP2 y EP3), es ligeramente menos negativo que el de las micropartículas vacías (EP1). Esta característica en las micropartículas cargadas, fue atribuido probablemente al péptido adsorbido en la

superficie de las micropartículas, el cual presenta aminoácidos con cadenas laterales cargadas positivamente que podrían neutralizar parcialmente el potencial zeta negativo atribuido al PLGA lo que afecta su carga superficial, esto se puede observar en las imágenes SEM, donde los ensayos EP4 y EP6 que son los que menor potencial electrocinético muestran, permiten ver reservorios mucho más cercanos a la superficie, más oscuros que en los otros dos ensayos lo que puede confirmar la teoría de la ubicación del péptido en la micropartícula, sin embargo, esto se podrá estudiar con mayor profundidad en el ensayo de liberación mediante posibles efectos burst, donde si el péptido se encuentra en la superficie se observará una liberación rápida en un tiempo inicial, a diferencia de si se encuentra al interior de la matriz polimérica.

- **Perfil de liberación:** Los perfiles de liberación del péptido modelo a partir de diferentes sistemas microparticulares poliméricos se reportan en la figura 3-8. Para este estudio se trabajó el sistema EP1, micropartículas vacías como referencia. Como se puede observar en la figura los perfiles de los sistemas EP2 y EP3 presentaron un comportamiento trifásico durante el periodo de estudio (44 días). Una fase inicial en el día 1 del estudio, que correspondería al péptido adsorbido en las micropartículas y que sería de rápida liberación (efecto burst) (37-49%). Una segunda fase de baja liberación posterior al día 1, hasta el día 30 del estudio. Aproximadamente el 20% del péptido fue liberado en el día 15, seguido de una liberación prácticamente nula hasta el día 30. A partir del día 30 se inició una tercera fase hasta el final del estudio. En esta fase se liberó aproximadamente el 30% del péptido, como consecuencia del tiempo de degradación del polímero. El perfil de los dos sistemas evaluados fue similar, presentado al final del estudio una liberación del péptido modelo entre el 91 y el 99%. La primera liberación asociada con un efecto burst se relaciona con el péptido que quedó adsorbido en la superficie de las micropartículas. Este resultado se relaciona directamente con la medida de potencial zeta donde se logró observar que este parámetro tendía a ser menos negativo en los sistemas cargados posiblemente asociado a la presencia de péptido en la superficie de las micropartículas. La velocidad de liberación en la siguiente fase está relacionada con las propiedades fisicoquímicas del polímero utilizado, por tanto, se evidencia que el polímero tiene un papel importante en el proceso de

liberación del péptido, modulando su liberación en función del tiempo y dando lugar a una liberación sostenida durante un tiempo prolongado. Algunos autores han descrito un patrón de liberación del IFA que consiste en un efecto burst relativamente alto al inicio de la liberación, una fase de latencia y una fase final de liberación principalmente generada por la erosión del polímero(66) aunque también se puede tener el caso en el que el activo se libere en las dos primeras fases dando lugar a un perfil de forma asintótica(67,68). En el tiempo que se dejó el experimento (44 días), se alcanzaron a ver las tres fases del perfil, lo que nos permite pensar que el polímero se erosiona a lo largo de este periodo, tal como se esperaba por el tiempo de degradación reportado en literatura (aproximadamente 30 días)

Es importante denotar que dado que la liberación depende principalmente del polímero, esta se va a dar a medida que el PLGA se degrade mediante una reacción de hidrólisis de los enlaces éster al entrar en contacto con el medio de liberación generando una estructura de poros o canales en la matriz polimérica llenos del medio de liberación lo que hace que el péptido difunda del sistema y sea liberado(69), es decir, inicialmente se habla de una liberación controlada por difusión y posteriormente una liberación controlada mediante la erosión o la degradación del polímero durante la última fase (60). Además, vale la pena mencionar que la velocidad de hidrólisis del PLGA depende específicamente de su peso molecular o viscosidad intrínseca.

Respecto a las diferentes fases de liberación del polímero se ha reportado que en la medida en que el polímero se va hidrolizando, se van generando cadenas de menor peso molecular, teóricamente estas cadenas tendrían una Tg menor, esto podría facilitar la formación de estructuras porosas en los primeros días de la liberación hasta que se da la degradación completa del polímero (68,70).

Además se deben tener en cuenta ciertos parámetros que van a tener una fuerte influencia en el perfil de liberación, entre ellos, la proporción de ácido láctico y ácido glicólico, el peso molecular del polímero y la porosidad de las micropartículas(6). Teniendo en cuenta que en este trabajo no se varió la proporción de ácido láctico y ácido glicólico, el peso molecular del polímero ni la porosidad de las micropartículas no es preciso hacer un análisis respecto a estas variables.

El polímero usado tiene un peso molecular intermedio-alto de aproximadamente 60000 Daltons, esto va de la mano con lo analizado hasta ahora, dado que se puede observar que realmente la liberación inicial está mediada por efectos burst y

los procesos difusivos en los días siguientes no son muy altos debido a la baja porosidad de la micropartícula y a la densidad de la misma lo que explica la meseta en el gráfico de liberación, en cambio en la medida que pasa el tiempo el polímero tiende a erosionarse y será este el mecanismo que se encarga de la liberación de aproximadamente el 60% del activo.

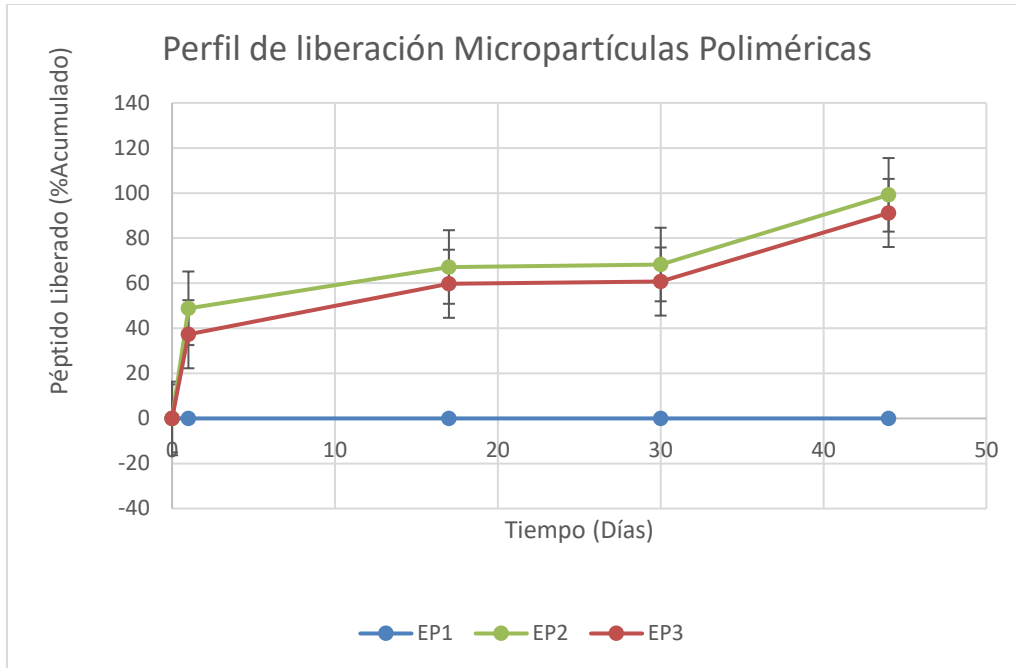


Figura 3-8: Perfiles de liberación del péptido encapsulado en las micropartículas poliméricas

3.5 Conclusiones

- La metodología implementada de formación de una doble emulsión con posterior extracción/evaporación del solvente orgánico, permitió la obtención de micropartículas de PLGA 50:50, de forma esférica, con un tamaño de partícula entre 3,08 y 5,60 μm , con una eficiencia de encapsulación del péptido sintético modelo alrededor del 57%, un potencial Z en un rango entre -18,5 y -24,5 mV y un perfil de liberación durante 44 días.
- Se observó que existen factores que son críticos en la obtención de las micropartículas poliméricas, estos son, las condiciones de homogenización, el tiempo de evaporación del solvente y la manera en la que se adiciona el PVA, con

el fin de obtener una distribución más estrecha, disminuir la porosidad, mejorar rendimientos y la adecuada formación de la segunda emulsión, respectivamente.

- Se cree que el péptido se puede encontrar tanto al interior de la matriz como en su superficie, esto atribuido al análisis de potencial Z dónde fue posible observar un cambio en el potencial de las micropartículas cargadas respecto a las partículas vacías, probablemente por la presencia de péptido adsorbido en su superficie lo que afecta la carga superficial de las micropartículas.

4. Obtención de sistemas particulares lipídicos

4.1 Introducción

En la última década las partículas sólidas lipídicas (SLN) han llamado la atención, pues pueden ser transportadores de fármacos y por tanto se considerarían como una alternativa a las micropartículas poliméricas. Cuentan con la ventaja de que el material del que son elaboradas no es tóxico. Son lípidos sólidos usados comúnmente como excipientes en numerosas formulaciones farmacéuticas (fosfolípidos, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos y sales biliares, entre ellos, triestearina, tripalmitina trilaurina y cetilpalmitato (23,71–74). Las SLN son partículas compuestas de una matriz lipídica en la que el compuesto activo está disuelto o disperso (75). Este sistema puede ser administrado por diferentes vías entre ellas, vía oral, dérmica, parenteral, rectal, ocular y pulmonar (76). De otro lado, también han sido estudiadas como un SEF para la administración de péptidos, proteínas, antígenos, moléculas bioactivas (77–79), antiinflamatorios, anestésicos locales, antibióticos, antineoplásicos, entre otros (75). Al igual que los sistemas poliméricos, este sistema cuenta con ventajas y desventajas (76,77,80–82), las cuales se reportan en la tabla 4-1.

Tabla 4-1 Ventajas y desventajas de las partículas sólidas lipídicas

Ventajas	Desventajas
Entrega dirigida de IFA, mediante funcionalización de la superficie de la partícula	Expulsión del IFA después de la cristalización o solidificación de las partículas
Buena estabilidad fisicoquímica	Agregación entre partículas debido al pequeño tamaño y su gran área superficial
Buena eficiencia de encapsulación (Para IFA's lipofílicos)	Dificultad en su manejo
Incremento de la penetración del IFA en la piel en administraciones tópicas	Alta posibilidad de presentar efecto "burst"
Liberación controlada del IFA debido a la movilidad reducida del fármaco y a la naturaleza hidrofóbica de la matriz que previene la disolución en medio acuoso	Baja eficiencia de encapsulación para fármacos de naturaleza hidrofílica
Protección del IFA encapsulado de agentes químicos y físicos (incluyendo degradación proteolítica, en péptidos)	Posibilidad de cristalización en polimorfos inesperados
Matriz compuesta de lípidos, que no son tóxicos por tanto se disminuye el riesgo de toxicidad aguda y crónica	Cinética de liberación variable
Facilidad de producción a gran escala	
Posibilidad de encapsular IFA's hidrofílicos y lipofílicos (en mayor medida lipofílicos)	
Baja polidispersidad	
Biodegradabilidad y biocompatibilidad	
Bajo costo de los ingredientes	
Facilidad de atravesar barrera hematoencefálica	

Los péptidos terapéuticos pueden ser incorporados o absorbidos en las SLN y posteriormente ser administrados por vía parenteral u otras vías de administración alternativas (oral, nasal y pulmonar). La formulación de péptidos en estos sistemas permite que se mejore la estabilidad del péptido, lo protege de degradación proteolítica y además le confiere al sistema una liberación controlada de las moléculas incorporadas. Algunos

péptidos como la ciclosporina A, insulina, calcitonina y somatostatina han sido incorporados en SLN y se encuentran bajo investigación. Entre las aplicaciones de estos sistemas se pueden mencionar la inmunización de antígenos peptídicos, tratamientos de enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas y terapias para el cáncer (79).

Las partículas sólidas lipídicas se pueden clasificar en tres tipos, Tipo I o modelo de matriz homogénea, Tipo II o modelo de recubrimiento enriquecido en fármaco y el Tipo III o modelo de núcleo enriquecido en fármaco. Esta clasificación depende de la naturaleza y el tipo de lípidos empleados, de la naturaleza química y la estructura del fármaco, de la solubilidad del IFA en el lípido, del tipo y la composición del surfactante, de la temperatura durante la obtención y del método usado (24).

En cuanto a los lípidos usados en el desarrollo de estos sistemas, hay algunos aprobados por la FDA para su uso clínico (fosfatidil colina, ácido esteárico, colesterol y monooleato de glicerol), dado que son inocuos, biocompatibles, biodegradables y de origen natural, lo cual muestra una ventaja respecto a los demás SEF. Para el desarrollo del sistema propuesto en el presente trabajo de investigación se usó como el componente lipídico una mezcla de triglicéridos C₁₂-C₁₈ y ácidos grasos derivados del coco (cocoglicéridos), cuyo componente principal es ácido láurico. De acuerdo a la revisión realizada no se ha usado para el desarrollo de este tipo de sistemas, pues su uso principal es en la producción de supositorios (83).

El uso de lípidos como matriz para SEF, de péptidos y proteínas no ha sido tan investigada, debido a la naturaleza hidrofóbica del material de recubrimiento que puede ser más apropiado para encapsular fármacos lipofílicos que péptidos o proteínas de naturaleza hidrofílica, por tanto esta aproximación experimental se consideró de gran interés en el campo farmacéutico (72,82,84).

Finalmente, en este capítulo se reportan los resultados de la implementación de una metodología basada en la formación de una doble emulsión y posterior extracción/evaporación del solvente orgánico para la encapsulación de un péptido sintético modelo de naturaleza hidrofílica en partículas sólidas lipídicas elaboradas con una mezcla de triglicéridos C₁₂-C₁₈ (Novata® BC PH). El planteamiento inicial para esta aproximación experimental fue obtener sistemas particulados con un tiempo de degradación inferior a un mes y con un tamaño de partícula inferior a 10 µm. Para la implementación de esta

metodología y la caracterización de los sistemas obtenidos fueron realizados una gran cantidad de ensayos preliminares relacionados con la evaluación de varios aspectos: 1) Tipo de lípido, 2) Tipo de estabilizante, 3) Orden de adición de la fase externa acuosa W_2 para formar la doble emulsión, 4) Condiciones del proceso de lavados, 5) Ensayos de redispersión en función del estabilizante usado, 6) Uso de lípidos y fosfolípidos en la fase orgánica (O) en diferentes proporciones, 7) Adición de IPA en el proceso de evaporación del solvente, 8) Volumen de la fase externa acuosa en la formación de la segunda emulsión $W_1/O/W_2$, 9) Condiciones en los procesos de homogenización, 10) Adición de crioprotectores, 11) Tipo de solvente en la fase acuosa W_1 , 12) Condiciones del proceso de evaporación del solvente, 13) Condiciones de la extracción líquido – líquido para la eficiencia de encapsulación, como se puede evidenciar en el Anexo B, tabla 9-3.

Como se citó anteriormente, en este capítulo se reporta la metodología final para la obtención de sistemas sólidos lipídicos conteniendo el péptido sintético modelo encapsulado y vacíos. De otra parte, se reporta, la caracterización de todos los sistemas obtenidos desde el punto de vista farmacotécnico. Cabe resaltar que los resultados obtenidos en esta aproximación experimental fueron usados como fundamento para el posterior desarrollo de los sistemas híbridos lipopoliméricos.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Materiales y equipos:

- **Obtención de partículas sólidas lipídicas:**

Para la obtención de las partículas sólidas lipídicas, se usó una mezcla de triglicéridos C_{12} - C_{18} (Novata® BC PH, BASF), Poloxamer 188 (HÄNDLER), diclorometano Honeywell (Muskegon USA), agua desionizada (D.I) (Sistema de filtración de agua Aqua Nova – Osmosis Inversa (100 G.P.D), Membrana de filtración (0,22 μ m, ϕ 47mm) y el péptido modelo 12-14 kDa.

Para la obtención de los diferentes sistemas se usaron Micropipetas (Select Bioproducts) (20-200 μ L y de 100-1000 μ L), sonicador (Qsonica sonicators, Q125), homogeneizador de turbina (Micra, Micra D-1 010049), Vórtex (IKA, Vortex 3), placa de agitación multipunto (IKA, RT 10 power), balanza analítica (Ohaus YPX224), congelador (ICASA), centrífuga (HERMLE, Z206A), liofilizador (LABCONCO, Lyph-lock 6).

- **Caracterización de las partículas lipídicas:**

Para la caracterización de los sistemas obtenidos se usaron las siguientes metodologías y equipos: Dispersión dinámica de luz (DLS) (Malvern, Z sizer Nano ZS – Malvern, Reino Unido), microscopía electrónica de barrido (SEM) (Microscopio electrónico JEOL JXA 8230, Japón), Kit de ensayo de proteínas Micro BCA [™], lector de microplacas (Expert Plus, Biochrom Ltd.), agitador orbital (Select Bioproducts SBS550) y Estufa (Mettler, UN55).

4.3 Metodología

4.3.1 Obtención de partículas sólidas lipídicas

Para la obtención de estos sistemas se siguió la metodología de formación de una doble emulsión – evaporación del solvente, incluyendo algunas modificaciones. Para esto se partió de una solución de componente lipídico (Mezcla de triglicéridos C₁₂-C₁₈ 100mg/mL DCM), de una solución acuosa de Poloxamer 0,5% y en el caso de las partículas cargadas de una solución acuosa de péptido modelo (50 mg/mL).

Derivado de los ensayos preliminares reportados en el anexo B tabla 9-3, a continuación se reporta la forma como se obtuvieron tres sistemas sólidos lipídicos, los cuales consistían en un sistema vacío (EL1), y dos sistemas cargados con el péptido sintético modelo (EL2 y EL3). El propósito de este ensayo fue verificar la viabilidad de encapsular el péptido sintético modelo en la matriz lipídica seleccionada, mediante la técnica seguida. La composición de los diferentes sistemas trabajados se relaciona en la tabla 4-2.

Tabla 4-2: Composición de los ensayos realizados para la obtención de los sistemas lipídicos.

Ensayo	Solución Lípido	Solución Péptido	H ₂ O D.I
EL1	1 mL	0 µL	200 µL
EL2	1 mL	200 µL	0 µL
EL3	1 mL	200 µL	0 µL

El procedimiento se realizó mediante 5 pasos como se reporta a continuación:

- Formación de la emulsión 1 (W_1/O): Como se describe en la figura 4-1 se dispuso de un tubo Falcon de 15mL (Reactor 1) al que se adicionó 1mL de la solución de lípido que se denominó la fase orgánica (O) de la primera emulsión. Sobre esta fase se dispersó 200 μ L de la fase interna acuosa (W_1), que en el caso de las partículas vacías fue H₂O D.I. y de solución acuosa del péptido en el caso de las partículas cargadas. Esta dispersión se homogenizó mediante ultrasonido durante 30 segundos a una amplitud del 100%.

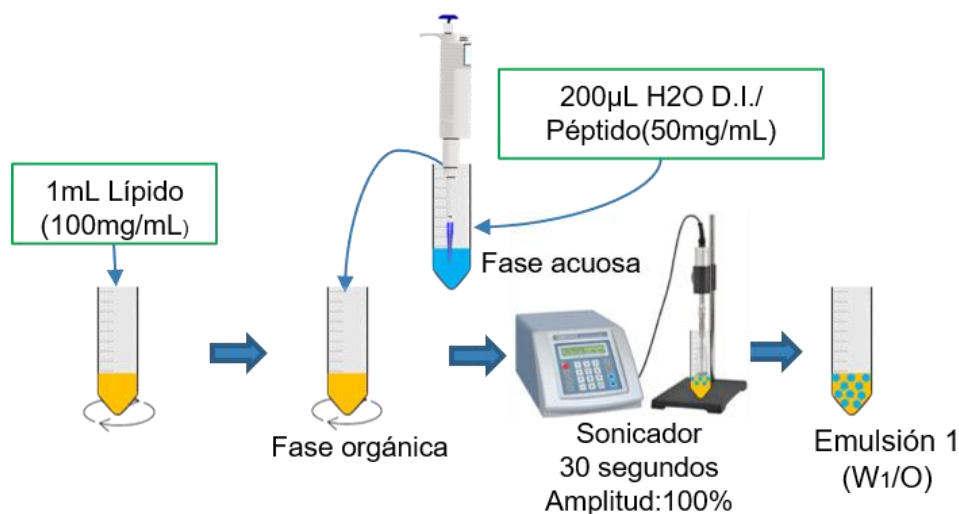


Figura 4-1: Representación gráfica del proceso para la formación de la emulsión 1 (W_1/O).

- Formación de la emulsión 2 ($W_1/O/W_2$): Como es posible observar en la figura 4-2, en un tubo Falcon de 50mL (Reactor 2) se disponen 10mL de Poloxamer 188 (0,5%), sobre este se dispuso la emulsión 1, dando lugar a un flóculo al fondo del reactor 2 recubierto por la solución que contiene al estabilizante. Esta dispersión se sometió a un proceso de homogenización mediante turbina a 20.000 rpm durante 5 minutos y seguidamente se trasvasó a un recipiente de mayor capacidad para proceder a la extracción/evaporación del solvente orgánico.

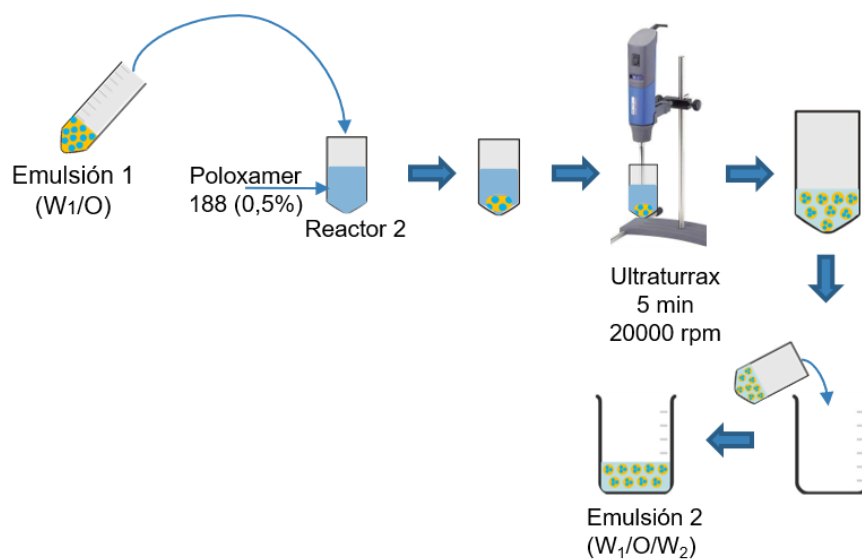


Figura 4-2: Representación gráfica de la formación de la emulsión 2 (W₁/O/W₂)

- **Evaporación del solvente:** Como se observa en la figura 4-3 el sistema (W₁/O/W₂) se dispuso en una placa de agitación magnética a temperatura ambiente para realizar la extracción del solvente orgánico (DCM). Bajo esta condición se deja el sistema por 1 hora, tiempo determinado en los ensayos preliminares para inducir la insolubilización de las partículas sólidas lipídicas causada por la evaporación completa del solvente orgánico.

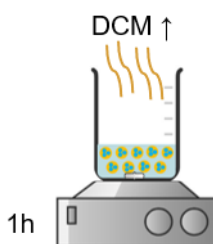


Figura 4-3: Representación gráfica del proceso de evaporación del solvente.

- **Lavados:** La suspensión obtenida luego de la evaporación del solvente orgánico se lleva a un tubo Falcon de 15mL. Como se ve en la figura 4-4, esta suspensión se sometió a un proceso de centrifugación durante 5 minutos a 6000rpm, pasado este tiempo, se evidenció una separación de fases: un pellet de menor densidad acumulado en la parte superior de una fase líquida homogénea. Esta fase líquida se descartó utilizando una pipeta pasteur y el pellet formado fue posteriormente dispersado en aproximadamente 5 mL de H₂O D.I. usando un vórtex y se trasvasó a un vial de vidrio para ser secado posteriormente mediante liofilización.

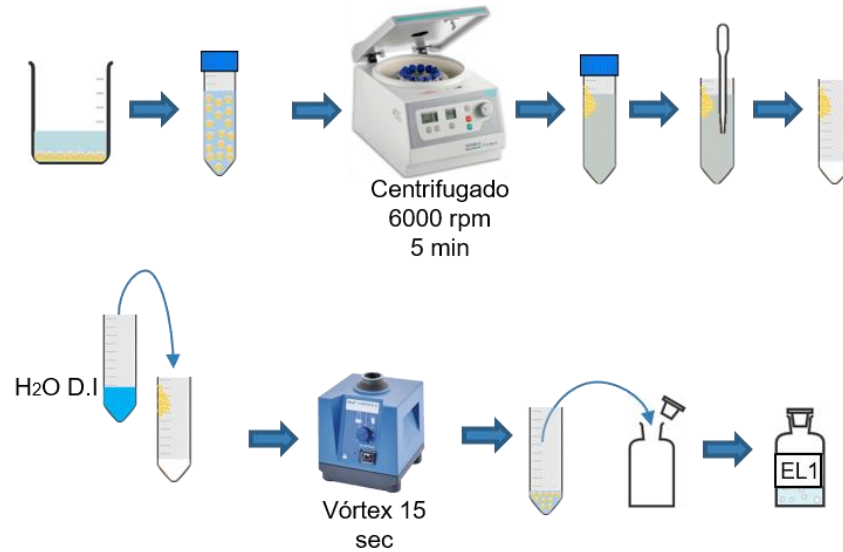


Figura 4-4: Representación gráfica del proceso de lavado de los sistemas lipídicos obtenidos.

- Liofilización: Como se describe en la figura 4-5, el vial que contiene las partículas en suspensión fue llevado a congelación (-20°C) durante la noche y al día siguiente se sometió al proceso de secado mediante liofilización durante 24h.

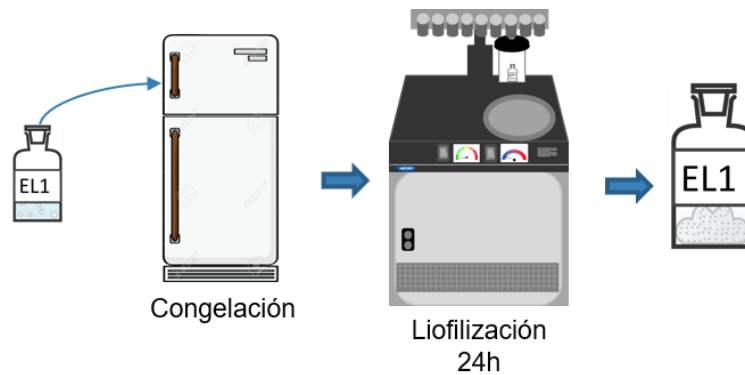


Figura 4-5: Representación gráfica del proceso de liofilización para la obtención de los sistemas lipídicos secas.

4.3.2 Caracterización de las partículas sólidas lipídicas

A continuación, se reportan las metodologías seguidas para la caracterización de los sistemas obtenidos en términos de la morfología, el tamaño de partícula, capacidad de carga, eficiencia de encapsulación, potencial electrocinético (potencial zeta, y el perfil de liberación del péptido sintético encapsulado.

- **Morfología:** Para evidenciar la forma de las partículas se empleó la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM). Para esto se pesó en un eppendorf de 1,5mL, 2mg de las partículas liofilizadas, las cuales se suspendieron en 100µL de H₂O D.I. y filtrada por una membrana de 0,22µm. De esta dispersión de partículas, se tomó una muestra y se dispuso en el portamuestras o “stub”, se dejó secar al ambiente y se recubrió posteriormente mediante pulverización catódica con oro. Las imágenes se toman en un microscopio electrónico JEOL JXA 8230, a un voltaje de 25kV, se tomó una imagen panorámica a una magnificación de 5000X, y una imagen más cercana a una magnificación de 10000X. Las imágenes se procesaron directamente en el microscopio mediante el software Gatan Microscopy Suite Digital Micrograph versión 2.32.888.0
- **Tamaño de partícula:** La determinación del tamaño de partícula se realizó mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) usando un equipo Zeta Sizer Nano ZS. Para esta determinación se pesó en un eppendorf de 1,5mL, 1 mg de las partículas liofilizadas, las cuales fueron suspendidas en 500µL de H₂O D.I. y filtrada por una membrana de 0,22µm. De esta dispersión de partículas se tomó una alícuota y se dispuso en una celda de poliestireno (DTS0012), que tenía previamente 1mL de H₂O D.I. y filtrada por una membrana de 0,22µm. Las medidas se llevaron a cabo con agua como medio dispersante y un ángulo de dispersión de 173°, a una temperatura de 25°C haciendo 3 lecturas. El tamaño y la dispersión (PDI) de las partículas lo determinó directamente el equipo mediante el software Z Sizer versión 7.11.
- **Eficiencia de encapsulación:** Esta determinación se realizó de manera directa empleando las partículas obtenidas. En primera medida, fue necesario hacer una extracción líquido - líquido, con el fin de separar el material de recubrimiento lipídico del péptido, para esta, se pesaron 2mg de las partículas liofilizadas en un eppendorf de 2mL, posteriormente se adicionó 1mL de DCM y se agitaron en el vórtex hasta completa disolución, luego, se adicionó 1mL de H₂O D.I. y se llevó posteriormente a un agitador orbital durante 2 horas tiempo establecido para alcanzar la extracción completa del péptido sintético modelo. Pasado este tiempo de agitación se podían diferenciar dos fases. El eppendorf fue llevado a centrifugación por 3 minutos a 6000 rpm. Posteriormente, con una micropipeta se retiró la fase menos densa (fase acuosa) y se colectó en un eppendorf de 1,5 mL. Se permitió la evaporación del

DCM que se encuentra saturando el agua durante unos minutos, en esta fase se tendrá el péptido que se encontraba encapsulado en las partículas.

La determinación de la concentración del péptido sintético se realizó en microplaca de 96 pozos empleando el kit Micro BCA™. Para esto fue necesario realizar una curva de calibración entre 0 y 35 µg/mL empleando una solución acuosa de péptido sintético modelo. En la misma microplaca se colocaron alícuotas de la fase acuosa obtenida de la extracción líquido – líquido y se completó a 100µL con un buffer PBS (Fosfato 0,1M-NaCl (0,15M) pH=7,4). Posteriormente, se preparó el reactivo Micro BCA™ siguiendo el protocolo sugerido en el kit, y se adicionó 100µL de este reactivo en cada pozo. La placa se lleva a incubación a 37°C por 2 horas y pasado este tiempo se determinó la absorbancia a 590 nm en un lector de placas. Mediante la curva de calibración se interpolaron los datos obtenidos para las muestras se cuantificó el contenido de péptido en las partículas y con esa información finalmente se calculó la eficiencia de encapsulación mediante la siguiente formula:

$$E.E. = \frac{\text{Peso del activo en las partículas}}{\text{Peso de activo inicial}} \times 100$$

- Capacidad de carga: Con la información obtenida de la cantidad de activo (péptido sintético modelo) se determinó este parámetro empleando la siguiente relación matemática:

$$\%LC = \frac{\text{Peso del activo}}{\text{Peso de las partículas}} \times 100$$

- Potencial Z: El potencial Z se determinó utilizando el equipo Zeta Sizer Nano ZS, empleando la celda DTS1070. Brevemente, se pesó en un eppendorf de 1,5mL, 1mg de partículas liofilizadas, estas se dispersaron en 1mL de agua D.I. filtrada por 0,22 µm, y posteriormente se pasaron a la celda. La medición se llevó a cabo a 25°C. El potencial Z lo determina el equipo teniendo en cuenta las 3 lecturas realizadas para cada muestra. Los datos procesados mediante el software Zetasizer versión 7.11.
- Perfil de liberación: Para esta determinación se pesó 10mg de cada sistema por duplicado en un eppendorf de 2 mL, estas muestras se suspendieron en 1 mL de Buffer PBS (Fosfato 0,1M-NaCl (0,15M), pH:7,4) preservado con azida de sodio

0,1%, estas muestras se llevaron a un agitador orbital en una estufa a 37°C y se mantuvieron en agitación constante. Para determinar el perfil de liberación se realizaron muestreos a la primera hora y cada 24h durante dos semanas. Cada vez que se realizaba un muestreo, se centrifugaron las muestras a 6000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se tomó con una jeringa de 1 mL una muestra de 500 µL de la fase líquida homogénea y se lleva a un eppendorf de 500 µL, inmediatamente este volumen es reemplazado por PBS (Fosfato 0,1M-NaCl 0,15M, pH:7,4) preservado con azida de sodio 0,1%. Las muestras tomadas fueron llevadas a congelación para su posterior análisis con el kit de ensayo de proteínas Micro BCA™ de manera similar a como se procedió en la metodología para determinar la eficiencia de encapsulación.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Obtención de partículas lipídicas

Al igual que las partículas poliméricas, la obtención de las partículas sólidas lipídicas se realizó mediante la metodología de formación de una doble emulsión con posterior extracción/evaporación del solvente orgánico, que permite trabajar con el lípido sin necesidad de fundirlo y además es apropiada para la encapsulación de IFA de naturaleza hidrofílica (76), mejorando su eficiencia de encapsulación (85). Actualmente esta metodología ha sido usada para la encapsulación de antígenos, dado que la molécula no se somete a altas temperaturas o estrés físico (86).

Cabe resaltar que factores como la cantidad de material de recubrimiento usado, cantidad de péptido usado para encapsular, tiempo de evaporación del solvente, y el solvente orgánico usado, fueron los mismos usados en la metodología de partículas poliméricas con el fin de hacer los sistemas comparables entre sí, y en función de ensayos preliminares se modificaron variables como el agente estabilizante usado en la formación de la segunda emulsión, la forma de obtención de la segunda emulsión y los tiempos de homogenización. Teniendo en cuenta esto, específicamente en la metodología seguida, la primera emulsión (W_1/O), estaba compuesta de una fase interna acuosa, que correspondió a una solución del péptido para las partículas cargadas o agua desionizada para las partículas vacías, mientras que la fase orgánica consistió en una solución de la mezcla de triglicéridos

(Novata® BC PH) en diclorometano. Al igual que en las partículas poliméricas, la primera emulsión se realizó mediante homogenización con ultrasonido. El tiempo de homogenización para este caso se redujo a la mitad, dado que en ensayos preliminares se obtuvo partículas de tamaño nanométrico manteniendo el tiempo de un minuto, entonces en busca de que las partículas no fueran tan pequeñas y fueran un poco más comparables con las partículas poliméricas se decidió disminuir el tiempo de homogenización en la primera emulsión. Para la formación de la segunda emulsión se usó como estabilizante el Poloxamer 188 (0,5%), el cual es un agente tensioactivo polimérico no iónico que ayuda a estabilizar la emulsión mediante efecto estérico inducido por los segmentos hidrofílicos que se ubican en la interfase hacia la fase acuosa dada su naturaleza anfifílica (85). Se ha reportado que la inclusión de un agente estabilizante de esta naturaleza puede evitar que el péptido encapsulado migre a la fase acuosa externa durante el proceso de obtención de las partículas y con esto, mejorar la eficiencia de encapsulación (86). De otro lado se ha reportado que la presencia del Poloxamer 188 en la superficie de las partículas aumenta su tiempo de circulación en el organismo, previniendo que las partículas sean reconocidas y metabolizadas rápidamente por el sistema retículo endotelial (RES) (22).

Para la formación de la segunda emulsión, la adición de la fase externa o acuosa 2 (W_2), en la cual se encontraba disuelto el agente estabilizante, se realizó de manera diferente a como se describió para obtener las partículas poliméricas. En este caso se adicionó la emulsión 1 (W_1/O) sobre la fase acuosa 2, debido que al hacerlo de manera invertida el material lipídico se insolubilizó rápidamente formando agregados e impidiendo la formación de la doble emulsión apropiadamente. Como consecuencia de lo anteriormente descrito, en este caso la eficiencia de encapsulación del péptido modelo fue prácticamente nula. Teniendo en cuenta que se ha reportado que al emplear un menor volumen de fase acuosa externa en la formación de la doble emulsión podría hacer más uniforme la distribución de tamaño, reducir el PDI y posiblemente incrementar la eficiencia de encapsulación (85), se trabajó con volúmenes menores de fase acuosa 2, pero esto ocasionó que la segunda emulsión fuera de mayor consistencia y difícil manipulación. Teniendo presente todas las dificultades descritas, se consideró que este procedimiento para obtener las partículas lipídicas no era viable y por tal razón se decidió realizar la adición de la emulsión 1 sobre la fase acuosa 2. Siguiendo este orden de adición, se evitó la rápida insolubilización del lípido en forma de agregados y junto con la presencia del poloxamer 188, se favoreció la

formación de un flóculo que posteriormente se dispersó fácilmente durante el proceso de homogenización.

De manera similar a lo observado en el sistema polimérico la etapa de evaporación del solvente es de vital importancia, pues dado que el péptido no es afín por la matriz lipídica, este tenderá a difundir a la fase externa acuosa (78). En este caso se estudió la variable volumen de fase acuosa W_2 , mientras que el tiempo de evaporación se mantuvo constante en concordancia a lo establecido en el sistema polimérico. Durante el proceso de evaporación del solvente, el DCM deja el sistema y puesto que el componente lipídico no es soluble en agua se da lugar a la insolubilización de este y dio lugar a la suspensión de partículas lipídicas en el medio. En comparación con la metodología de las partículas poliméricas, para este sistema no se adicionó IPA (2%), por lo que ya no se hablaría de extracción/evaporación del solvente sino únicamente de evaporación del solvente orgánico. La razón por la cual se decidió retirar este componente del proceso fue por el volumen que este aportaba a la fase acuosa externa (W_2), y su relación con la migración del péptido del sistema a la fase externa explicada previamente.

Al darse la formación de las partículas, el péptido va a tender a migrar hacia la superficie, por lo que se cree que se ubica preferiblemente allí adoptando una estructura tipo II (recubrimiento enriquecido de fármaco) (24). Esto resulta relevante en el proceso de lavado dado que el péptido que se encuentra adsorbido o atrapado en la capa de estabilizante formada en la superficie de la partícula se puede perder en esta etapa. De otro lado, el lípido al ser menos denso que el agua va a tender a formar el pellet en la parte superior del tubo lo que hace que sea complicado el proceso de retirar la fase acuosa homogénea restante y por tanto puede generar pérdidas considerables de las partículas. Teniendo en cuenta lo anterior, se decidió reducir la cantidad de lavados a solo uno, con el fin de retirar el exceso de poloxamer 188 que no se adhirió a la superficie de la partícula.

Finalmente, el paso de liofilización debe considerarse puesto que se ha observado que puede afectar propiedades del producto final. Puede propiciar la formación de aglomerados por la modificación de las propiedades de la capa externa de las partículas. Para evitar esto, se aconseja el uso de crioprotectores como se reporta en la literatura (87). Una vez obtenidas las partículas se realiza el cálculo del rendimiento, obteniendo rendimientos del 22% en el caso de las partículas vacías y del 74,6% en el caso de las partículas cargadas,

esta diferencia se atribuye a la presencia del péptido por dos razones, la primera es que las partículas cargadas tienden a tener un tamaño de partícula mayor, lo que puede hacer que el pellet formado en los lavados sea más firme y por tanto no se dé una pérdida tan grande de las partículas en el sobrenadante y por otro lado, se destaca que el péptido puede actuar como estabilizante al igual que en el sistema polimérico lo que hace que la formación de las partículas se haga de manera más efectiva mejorando su rendimiento.

De otro lado, se sugiere para trabajos posteriores llevar a cabo ensayos de difracción de rayos x que permitan identificar las posibles transformaciones polimórficas que puede sufrir el lípido, ya que como se ha encontrado reportado en literatura los lípidos tienden a tener estructuras cristalinas definidas que se pueden ver afectadas por procesos de disolución o de fusión(78), con el fin de evaluar el efecto de estos polimorfos sobre el comportamiento del sistema desarrollado.

4.4.2 Caracterización:

- **Morfología:**

El estudio de la morfología de las partículas se realizó para los tres sistemas obtenidos. Las micrografías obtenidas por SEM en dos aumentos (5000X y 10000X), de las partículas lipídicas se reportan en la figura 4-6.

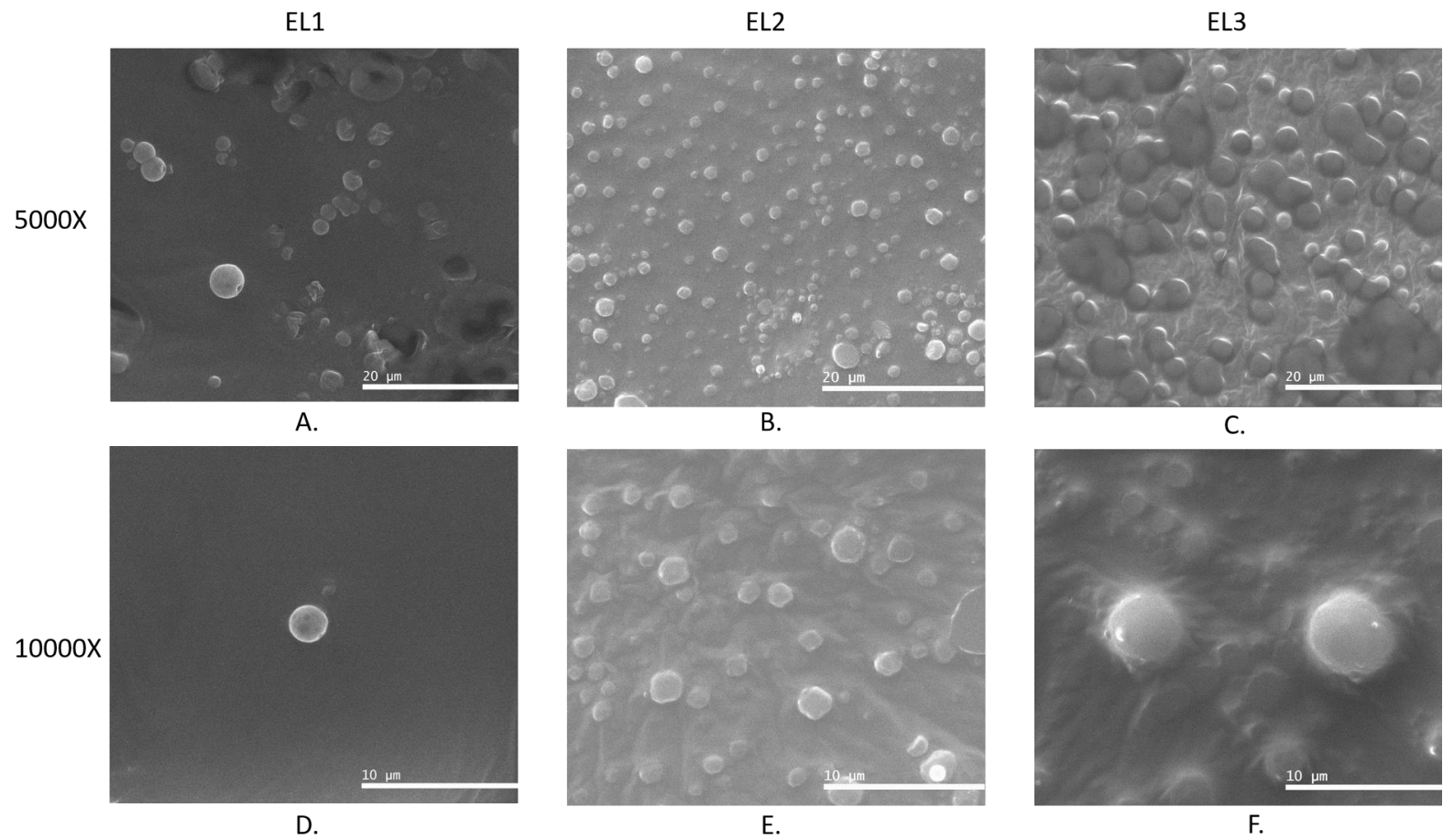


Figura 4-6: Morfología de partículas sólidas lipídicas obtenidas mediante SEM a diferentes magnificaciones. A y D sistemas vacíos, B,E,C y F sistemas cargados con el péptido sintético hidrofílico.

En ambos casos se observó que la forma de las partículas obtenidas tiende a ser esférica y que esta última forma tiende a predominar en las partículas cargadas, es posible ver bordes irregulares, una matriz lipídica densa y sin agregados considerable. En las imágenes panorámicas (5000X) se observaron varios rangos de tamaños, lo cual se confirmó en la determinación de tamaño de partícula mediante DLS. Adicionalmente, se observó en las micrografías de las partículas cargadas una mayor cantidad de partículas a diferencia de las partículas vacías. En el caso de las partículas vacías es posible ver aglomerados e incluso partículas que no se formaron adecuadamente o que se alcanzan a ver colapsadas, esto puede estar relacionado con las dificultades que se encontraron desde el punto de vista metodológico y permitiría decir que su formación no es del todo efectiva. En cuanto a las partículas lipídicas cargadas, las partículas tienden a ser esféricas con bordes un poco irregulares para el ensayo EL2, mientras que en el ensayo EL3 tienden a ser un poco más esféricas (10000X), sin embargo, es importante mencionar que hay una micrografía que llama la atención y es la del ensayo EL3 a 5000X, dado que las partículas tienden a verse achatadas y un poco difusas dado que parece que unas se juntaron con otras. Lo que se presume es que dado que el punto de fusión del material lipídico usado se encuentra alrededor de 33,0-34,5°C, y dado que la técnica SEM usa un haz de electrones que interactúa con la muestra y se tiene un nivel de energía asociado a él, por lo que al dejarlo un tiempo prolongado en contacto con la muestra, puede generar que se inicie un proceso de fusión de las partículas generando este tipo de micrografías, por tanto, se recomienda trabajar con voltajes menores a 25kV, sin embargo, esto puede afectar la calidad de las micrografías en cuanto a nitidez y resolución. En cuanto a la superficie se puede ver de manera general que es lisa, suave y solo se observó ciertas alteraciones en la integridad de la superficie (presencia de poros) de algunas partículas vacías. A diferencia de las partículas poliméricas estas partículas no presentan las cavidades internas que alojan al péptido. El hecho de que la partícula tenga una forma específica, esférica, y una superficie lisa, permitió sugerir que las condiciones establecidas del proceso en general fueron las adecuadas para la obtención de las partículas con las características esperadas (51).

- **Tamaño de partícula:** Como se puede observar en la tabla 4-3 el tamaño de las partículas sólidas lipídicas vacías y cargadas se encuentra en un rango entre 135,8

y 162,9 nm en su gran mayoría, sin embargo, se alcanzan a ver señales correspondientes a tamaños mayores que se encuentran en el rango de micrómetros las cuales pueden estar relacionados con las partículas observadas en las micrografías obtenidas por SEM. En cuanto al índice de polidispersidad (PDI) se encontró que la distribución es uniforme y monomodal dado que sus valores se encuentran entre 0,167 y 0,190 que de acuerdo con la clasificación hecha por Martínez, N, et al. se trataría de una distribución moderadamente polidispersa, sin embargo, al analizar la figura 4-7 que presenta los gráficos de distribución obtenidos es posible observar una señal de mayor intensidad. Al comparar el comportamiento en términos de tamaño de las partículas vacías respecto a las partículas cargadas se pueden observar ligeras diferencias en el tamaño. Las partículas cargadas tienden a aumentar su tamaño, esto se puede atribuir a la inclusión del péptido en el sistema, de otro lado, como se mencionó previamente se cree que el poloxamer se ubica en la superficie de las partículas cumpliendo su función de estabilizante. pero además en el caso de las partículas cargadas, es posible que aloje algunas moléculas de péptido dado su carácter hidrofílico lo que puede hacer más espesa la capa superficial y por tanto aumentando ligeramente su tamaño respecto a las partículas vacías.

Al analizar parámetros estadísticos como la desviación estándar se puede observar que este parámetro es aceptable para todos los casos, sin embargo, cabe notar que para las partículas lipídicas vacías tienden a tener un ligero aumento, esto es posible atribuirlo y relacionarlo con lo observado en SEM, hay partículas que no se ven del todo formadas o colapsadas, lo que puede afectar su tamaño.

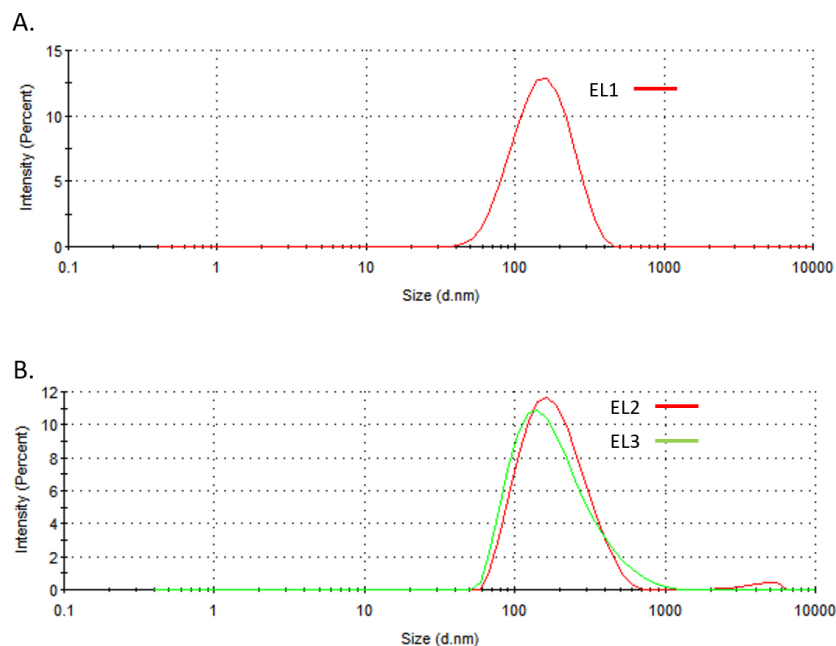


Figura 4-7: Distribuciones de tamaños de partículas sólidas lipídicas vacías (A) y cargadas (B) usando DLS mediante el equipo ZetaSizer

Tabla 4-3: Tamaño de partícula obtenido por DLS empleando el equipo ZetaSizer

Ensayo	Tamaño promedio(nm)	PDI	Desviación Estándar
EL1	135,8	0,167	2,261
EL2	162,9	0,174	0,7550
EL3	154,6	0,190	0,8386

- Eficiencia de encapsulación:** Al igual que en las micropartículas poliméricas, este parámetro es uno de los más relevantes en los sistemas particulares desarrollados para la administración de un IFA. La determinación se realizó de manera directa similar a lo reportado en el sistema polimérico. En el momento de realizar la extracción del péptido encapsulado en la matriz lipídica, fue necesario llevar a cabo una extracción líquido-líquido que permitiera separar el componente lipídico del péptido encapsulado y de esta manera por efecto del coeficiente de reparto, afinidad por las fases se pudiera extraer el péptido encapsulado en las partículas lipídicas. Para esto se usó DCM, como solvente orgánico, pues en este se disuelve fácilmente el material lipídico usado, y agua como solvente acuoso, dado que se tiene encapsulado un péptido de naturaleza hidrofílica. Teniendo en cuenta sus

naturalezas, cada uno migra a una fase distinta y por tanto es posible realizar la extracción del péptido. Al igual que en el caso anterior, se realizó el ensayo del micro ácido bicinconinico, y se analizó mediante métodos espectrométricos, por tanto, para este análisis como se describió en la metodología para cuantificar el péptido encapsulado se empleó una curva de calibración construida con una solución stock del péptido sintético modelo. Como se reporta en la tabla 4-4 la E.E. en los sistemas cargados con el péptido modelo EL2 y EL3 fue de 39,21% y 41,6% respectivamente. Específicamente el péptido adsorbido corresponde al 76,4% y 78,0% del péptido encapsulado para EL2 y EL3 respectivamente.

Como se mencionó en el capítulo anterior, la eficiencia de encapsulación se puede ver afectada por diferentes factores, de los cuales algunos ya fueron explicados previamente, sin embargo, en este sistema es necesario resaltar ciertos aspectos, entre estos, la interacción entre el péptido y el lípido, que se espera sea mínima, puesto que el lípido tiende a tener un carácter hidrofóbico mientras que el péptido es hidrofílico, entonces solamente por su naturaleza química van a tender a repelerse, y en términos más relacionados con el sistema, la matriz va a buscar expulsar el péptido de ella, o el péptido va a querer migrar del sistema a la fase acuosa externa en el momento en que se da la formación de las partículas (21), así es posible que se tenga una partícula con una superficie enriquecida en péptido debido al péptido adsorbido, evidenciándose en el efecto burst (21), que será analizado en el perfil de liberación. Por otro lado, desde el punto de vista metodológico para la obtención del sistema se procuró establecer las condiciones necesarias para mejorar la eficiencia de encapsulación, desde el volumen usado en la fase acuosa 2 (F.W₂), la cantidad de lavados realizados y con esto lograr una mejor eficiencia de encapsulación, todo esto, en función de que el lípido no es afín por el péptido lo que puede hacer que en los diversos pasos empleados para la obtención del sistema se pierda afectando la eficiencia de encapsulación(21), por esto, se cree que no es uno de los sistemas de elección a la hora de encapsular moléculas de naturaleza hidrofílica. El lípido que se está usando para la formación de la matriz está compuesto por ácidos grasos derivados del coco, puede contener cadenas de ácidos grasos C₁₂-C₁₈ por tanto al momento de evaluar su estructura cristalina, se cree que su comportamiento será diferente al de un lípido donde solo se tenga un tipo de ácido graso pues allí las cadenas pueden tener una

organización más uniforme que impida la encapsulación del péptido, a diferencia de una mezcla de cadenas que pueden dar lugar a un arreglo cristalino irregular lo que posiblemente puede dejar espacios donde el péptido se pueda encapsular y no sea del todo expulsado a causa de los arreglos cristalinos del lípido. Con el propósito de mejorar la eficiencia de encapsulación y la estabilidad del sistema se realizó la adición de SPC (Lipoid S-100) adicional a los ensayos reportados, sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos, pues la teoría que se plantea es que sirve como un “transportador” del péptido hacia la fase acuosa externa, lo que hace que se tenga una superficie rica en péptido y se pueda expulsar fácilmente de la matriz durante el proceso de evaporación del solvente o lavados posteriores (Figura 4-8), un comportamiento similar se puede dar en ausencia de la SPC ya que el péptido puede migrar de la matriz lipídica tal como se ha mencionado a lo largo del capítulo, sin embargo, se recomienda seguir con investigaciones en torno a esta estrategia con el fin de mejorar la eficiencia de encapsulación de este tipo de moléculas. Teniendo en cuenta esto, en este caso hay muchos más factores que están en contra de la encapsulación del péptido, lo que explica una eficiencia de encapsulación baja respecto a la obtenida en el sistema polimérico.

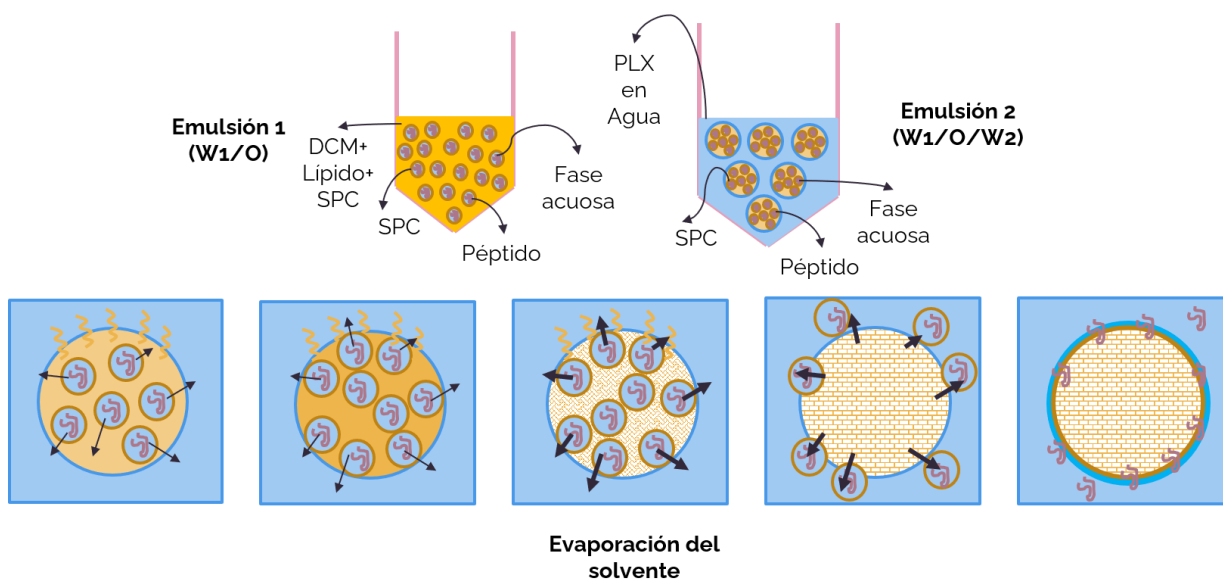


Figura 4-8: Análisis esquemático del movimiento del péptido hacia la superficie de la partícula y su posterior expulsión del sistema debido al arreglo cristalino del lípido durante el proceso de evaporación del solvente.

- **Capacidad de carga:** A partir de la eficiencia de encapsulación, se realizó la determinación de la capacidad de carga del péptido modelo en el sistema sólido lipídico desarrollado. La capacidad de carga está definida por diferentes factores, entre ellos, la composición de la matriz, la solubilidad del IFA en el lípido, la miscibilidad del fármaco y el lípido, la estructura química y física de la matriz lipídica y el estado polimórfico del material lipídico (21). La capacidad de carga determinada en los sistemas desarrollados fue de 2,4% para EL2 y 2,6% para EL3 casi la mitad de lo obtenido en las micropartículas poliméricas, dado que el péptido no es afín con la matriz lipídica, por tanto, no permite que se cargue una gran cantidad de este en la matriz.
- **Potencial Z:** Para la determinación del potencial electrostático de las partículas se trabajó la misma metodología aplicada en las micropartículas poliméricas, usando agua desionizada y filtrada a través de una membrana de 0,22 μm de tal forma que la medición no se viera afectado por la fuerza iónica del medio ni otras partículas presentes en este.

En la tabla 4-4 se listan los resultados obtenidos de las mediciones realizadas a los ensayos de partículas sólidas lipídicas, en las que se determinó un potencial Z negativo, en un rango entre -15,5mV y -29,9mV para las partículas vacías y cargadas respectivamente. Este potencial, contribuye a mejorar la estabilidad física en especial para las partículas vacías, ya que según literatura se podría encontrar en la clasificación de altamente estable ($\pm 20-30\text{mV}$) (64), sin embargo, el potencial Z en las partículas cargadas tiende a ser mucho más bajo y por tanto estaría clasificado como relativamente estable ($\pm 10-20\text{mV}$). El hecho de tener una carga superficial puede ayudar en temas de estabilidad y por tanto evitar la formación de aglomerados entre las partículas. Esta diferencia de potenciales entre las partículas al igual que en el caso anterior tiende a ser dada por la presencia del péptido que como se mencionó a estas condiciones tiende a expresar una carga positiva por las cadenas laterales que se pueden ionizar, en este caso, la diferencia se ve mucho más marcada y esto se atribuye a que el péptido puede estar atrapado en la superficie de la partícula, interactuando con los grupos funcionales del material lipídico cargados negativamente, lo que puede modificar las características superficiales de la partícula, entre ellas, el potencial Z.

La carga de las partículas podría estar dada principalmente por el material de recubrimiento el cual es un lípido compuesto de una mezcla de triglicéridos C_{12} - C_{18} , su estructura química general consiste en tres cadenas de ácidos grasos esterificadas con glicerol, como es bien sabido, los enlaces tipo éster tienden a ser lábiles y se pueden hidrolizar en medios acuosos, por tanto al poner la emulsión en contacto con la fase acuosa 2 es posible que se dé una hidrólisis parcial de los enlaces éster que se encuentren más hacia la superficie de la partícula, dando lugar a ácidos grasos libres que pueden aportar carga negativa al sistema (88), la cual puede ser neutralizada por la presencia del péptido, como se mencionó anteriormente. En este caso, el agente estabilizante no juega un papel importante por interacción electrostática, sin embargo, ayudaría a estabilizar las partículas de manera estérica. De hecho, se propone que si bien el estabilizante se espera rodee la partícula, en este caso, debido a la estructura particular del poloxamer 188, la cual es una estructura tribloque, con dos bloques hidrofílicos a los extremos y uno hidrofóbico en el medio (89), puede dejar espacios entre cadena y cadena lo cual va a permitir que quede disponible la carga aportada por los ácidos grasos libres producto de la hidrólisis grupos funcionales del lípido del triglicérido (88), tal como se puede apreciar en la figura 4-9.

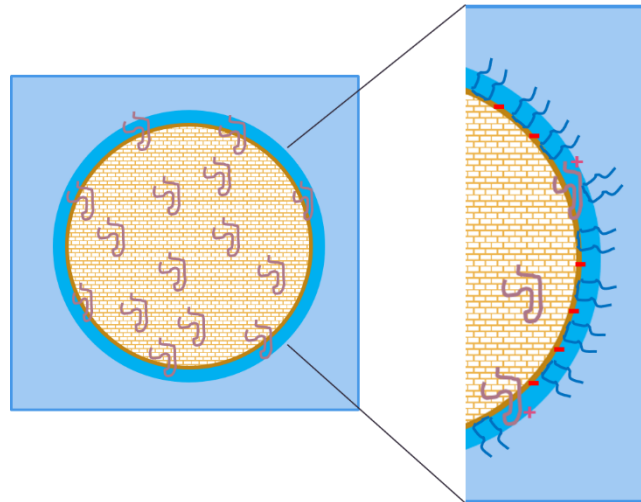


Figura 4-9: Propuesta del arreglo superficial de la partícula sólida lipídica cargada con péptido

Tabla 4-4: Características farmacotecnicas de las partículas sólidas lipídicas vacías y cargadas Péptido adsorbido: péptido asociado en la superficie con respecto del péptido encapsulado

Ensayo	Eficiencia de encapsulación (%)	Péptido adsorbido (%)	Capacidad de carga (%)	Potencial Z (mV)
EL1	N.A	N.A	N.A	-29,9
EL2	39,21	76,4	2,4	-15,5
EL3	41,60	78,0	2,6	-18,4

- Perfil de liberación:** Los perfiles de liberación del péptido modelo a partir de los diferentes sistemas particulares sólidos lipídicos se reportan en la figura 4-10. Como se puede observar en la figura el sistema EL1 de partículas vacías se trabajó como referencia, mientras que los perfiles de los sistemas EL2 y EL3 presentaron un comportamiento bifásico durante el periodo de estudio (11 días). Una fase inicial en el día 1 del estudio, que corresponde a la liberación del péptido adsorbido en las partículas y que sería de rápida liberación (Efecto burst) (76-78%). Una segunda fase de liberación constante posterior al día 1 hasta el día 6 del estudio donde ya se habría liberado casi la totalidad del péptido encapsulado. El perfil de los dos sistemas evaluados fue muy similar. La liberación del péptido a partir de estos sistemas es relativamente rápida respecto al comportamiento observado en las micropartículas poliméricas. Esta información nos permite inferir que a pesar de que se tiene péptido asociado en la superficie de las partículas, en concordancia con lo observado en los resultados del potencial Z, este corresponde a más de la mitad del péptido encapsulado en las partículas. Esta rápida liberación se atribuye también a una característica especial del lípido y es su punto de fusión que se encuentra entre 33,0°C y 34,5°C. Dado que el perfil de liberación se desarrolló a 37°C, el lípido se encontrará fundido, dando lugar a una emulsión, lo que permite que el péptido difunda más fácilmente al medio acuoso externo. La liberación de una sustancia hidrofílica como lo es el péptido usado en este caso, a partir de una matriz compuesta de un material lipofílico como lo es el triglicérido usado va a depender de diversos factores, entre ellos la composición de la matriz, las propiedades del fármaco incorporado (solubilidad en el lípido y en el medio acuoso, peso molecular, interacciones con la matriz), la presencia de surfactantes y el método de preparación (21); en cuanto a la composición de la matriz y las

propiedades del péptido, se tiene que el péptido no es muy afín por la matriz lipídica por lo que se esperaría que al ponerse en un medio acuoso este migre al medio, lo cual se ve facilitado por la fusión del lípido, además, como se tiene una capa discontinua de estabilizante que permite una interacción con el agua, por tanto la liberación del péptido dependerá de la difusión del péptido desde la matriz fundida hasta el medio acuoso externo. También es importante resaltar que el péptido liberado después del primer día corresponde a la mínima cantidad de péptido que quedó atrapado en la matriz lipídica en el momento en que se formó la primera, la segunda emulsión y se realizó el proceso de evaporación del solvente. Respecto al método de obtención usado para las partículas, como se mencionó en la sección de eficiencia de encapsulación, se espera que las gotículas de la primera emulsión vayan migrando lentamente hacia la superficie por la naturaleza hidrofílica del péptido, lo que va a hacer que parte del péptido migre a la fase externa acuosa, otra parte quede atrapada en la superficie y otra parte quede en la matriz, y que con base a esto se tenga una distribución gradual desde la superficie de la matriz al núcleo de la misma, lo cual se puede comprobar con el comportamiento en el perfil de liberación.

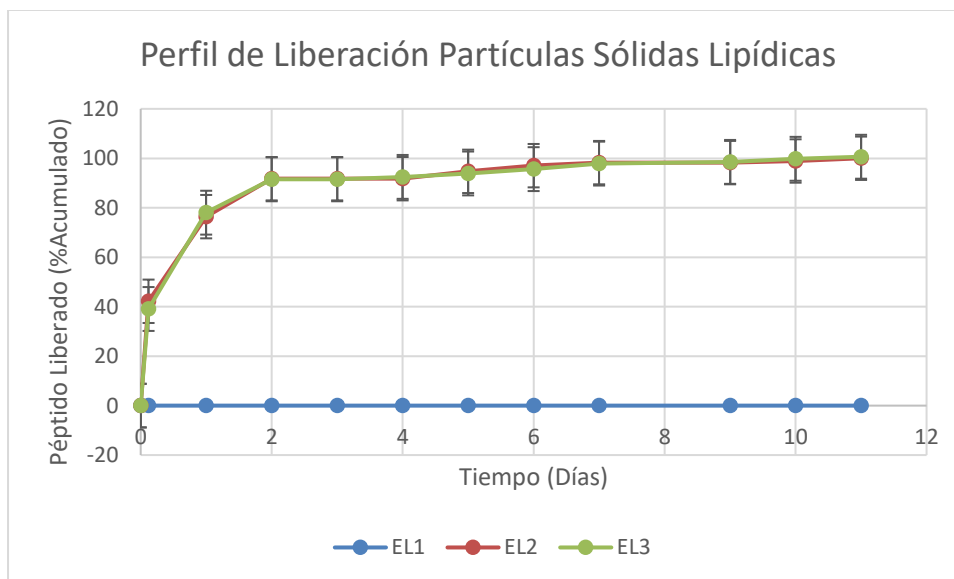


Figura 4-10: Perfiles de liberación del péptido encapsulado a partir de las partículas sólidas lipídicas

4.5 Conclusiones

- La metodología de formación de una doble emulsión con posterior evaporación del solvente permite formar partículas sólidas lipídicas vacías y cargadas con forma esférica, con una superficie lisa con tamaños en el rango nanométrico (135,8-162,9 nm) con una distribución uniforme, con una eficiencia de encapsulación baja (40,3%) respecto al sistema polimérico y un potencial Z negativo entre -15,5 y -29,9 mV para las partículas cargadas y vacías respectivamente y con una liberación rápida en los primeros cuatro días.
- Al igual que en el sistema polimérico, las condiciones de homogenización, el estabilizante y la adición de este al sistema, el tiempo que está en contacto el sistema con la fase acuosa, el volumen de fase acuosa externa y los lavados son variables que se deben tener en cuenta para obtener un sistema con una distribución uniforme y con una eficiencia de encapsulación de acuerdo con la aproximación experimental desarrollada, teniendo en cuenta la naturaleza de la matriz y del péptido.
- La distribución del péptido en la matriz se sugiere es de una cubierta enriquecida, con alguna cantidad de péptido ubicado hacia el interior de la matriz, esto hace que se den modificaciones superficiales respecto a las partículas vacías como el potencial electrocinético, además resulta importante conocer cómo se ubica el agente estabilizante sobre la matriz y con esto su aporte al control de la liberación del activo.

5. Obtención de sistemas microparticulares híbridos lipopoliméricos

5.1 Introducción

Como se ha mencionado a lo largo del documento los SEF han sido de gran interés en los últimos años (13), debido a esto, se han encontrado diversas aplicaciones incluyendo los sistemas de liberación controlada(36). Estos sistemas presentan diferentes ventajas que ya han sido discutidas previamente, entre estos sistemas, los liposomas, las partículas sólidas lipídicas y las micropartículas poliméricas han sido los más estudiados y los más exitosos hasta la fecha (13,36,90).

Actualmente, existe un gran interés en aprovechar simultáneamente las características de dos SEF (liposomas/partículas poliméricas) o (partículas sólidas lipídicas/partículas poliméricas). Estos sistemas han sido denominados de diferentes formas, entre ellas, partículas híbridas lípido- polímero, partículas recubiertas con lípido, transportadores híbridos polímero- lípido, lipómeros (90), lipobridos(91) y partículas lipopoliméricas. El término híbrido es usado dado que posee las características de ambos sistemas(35).

Los sistemas híbridos se caracterizan por tener en su estructura principalmente tres componentes. Un núcleo polimérico de naturaleza hidrofóbica que permite encapsular fármacos de baja solubilidad en agua y modular su liberación. Una cubierta lipídica que rodea el núcleo polimérico, lo que permite una alta biocompatibilidad, una interacción y reconocimiento por membranas celulares (células inmunocompetentes), que posteriormente van a inducir la respuesta inmune y una barrera que mantiene el fármaco en el núcleo que puede evitar que se presente el metabolismo de primer paso (35). Y por último, un polímero de naturaleza hidrofílica ubicado alrededor de la cubierta lipídica que ayuda a mejorar la estabilidad de la partícula y a su vez incrementar el tiempo de circulación en el organismo (13,35,36,38,92). Una de las maneras de clasificar estos

sistemas es en híbridos naturales o híbridos sintéticos, dependiendo del origen del material polimérico que conforma el núcleo (18,93).

La forma en la que se ensamblan cada uno de los componentes es principalmente mediante interacciones tipo Van der Waals, electrostáticas o fuerzas de tipo no covalente, sin embargo, el polímero hidrofílico que recubre a la partícula puede estar unido mediante enlaces covalentes a la cubierta lipídica (13,92) En el presente trabajo se desarrolló un sistema lipopolimérico con una estructura diferente a citado previamente, dado que se buscó una matriz compuesta por una mezcla física del material polimérico (PLGA) y el material lipídico (Novata® BC PH) rodeado por un estabilizante (Poloxamer 188) que se une a la matriz mediante interacciones débiles.

En diferentes estudios se ha logrado mostrar que la combinación de dos SEF presenta una serie de ventajas y excluye limitaciones de cada uno de los sistemas por separado (13,18,92). Por tanto, es posible obtener sistemas con una buena integridad estructural, de liberación controlada, biocompatibles, estables y de alta biodisponibilidad (35,36,94). De acuerdo a lo anterior, se cree que este es un sistema prometedor, con múltiples aplicaciones y con potencial éxito no solo en estudios *in vitro* sino *in vivo* (38,93).

Como se ha mencionado a lo largo del documento las partículas lipopoliméricas tienen ventajas sobre otros SEF de tamaño micrónico y submicrónico lo que hace que sean de gran importancia en el campo farmacéutico. Esto es posible evidenciarlo mediante algunos parámetros característicos de estos sistemas reportados en la figura 5-1.



Figura 5-1: Parámetros importantes de algunos SEF y su comparación con los sistemas híbridos lipopoliméricos

Entre las ventajas más importantes de las partículas lipopoliméricas se tienen:

- Características como, biodegradabilidad, estabilidad mecánica, alta área superficial específica, superficie modificada con ligandos que permiten dirigir la terapia(95), encapsulación de fármacos de diferente naturaleza (90).
- La cubierta lipídica ofrece características de biocompatibilidad dado que es similar a la estructura de las membranas celulares(38), además facilita la adsorción de compuestos hidrofílicos y algunos fármacos hidrofóbicos.
- Diversos investigadores han reportado que la eficiencia de encapsulación es mejorada para fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos y agentes biológicos comparado con otros SEF(90,96–98).
- El núcleo polimérico sirve como estructura base que provee estabilidad mecánica, morfología controlada, biodegradabilidad, distribuciones de tamaños estrechas y área superficial específica alta(90).
- La optimización del núcleo polimérico y la cubierta lipídica puede resultar en perfiles de liberación sostenida que puede ser ajustada dependiendo lo que se desee(99).

- Estos sistemas muestran estabilidad en el almacenamiento y en circulación sistémica durante periodos prolongados de tiempo(90).
- Es posible obtener partículas de tamaño nanométrico lo que las posiciona como un SEF que permite dirigir terapias a nivel intracelular y también pueden ser usados como adyuvantes para vacunas(90).

Finalmente, en este capítulo se reportan los resultados de la implementación de la metodología basada en la formación de una doble emulsión y posterior extracción/evaporación del solvente orgánico para la encapsulación de un péptido sintético modelo de naturaleza hidrofílica en micropartículas híbridas lipopoliméricas elaboradas con PLGA 50:50 y una mezcla de triglicéridos C₁₂-C₁₈. Con base en los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, se planteó obtener un sistema híbrido que presentara un tamaño de partícula inferior o igual a 10 µm y una liberación del péptido modelo encapsulado en un tiempo intermedio entre los obtenidos para el sistema polimérico y el sistema lipídico. Para la implementación de esta metodología y la caracterización de los sistemas obtenidos fueron realizados una gran cantidad de ensayos preliminares relacionados con la evaluación de varios aspectos: 1) Agente estabilizante utilizado en la F.W₂, 2) Condiciones de los procesos de homogenización, 3) Proporción polímero-lípido y 4) Orden de adición de la fase externa acuosa W₂ para formar la doble emulsión, como se puede evidenciar en el anexo B, Tabla 9-4.

Como se citó anteriormente en este capítulo se reporta la metodología final para la obtención de los sistemas microparticuladores híbridos lipopoliméricos conteniendo el péptido sintético modelo microencapsulado y sistemas vacíos. De otra parte, se reporta la caracterización de todos los sistemas obtenidos desde el punto de vista farmacotécnico. Cabe resaltar que la metodología implementada para este sistema fue planteada en función de la información obtenida en el desarrollo de las metodologías para la obtención de las micropartículas poliméricas y las partículas sólidas lipídicas.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Reactivos y equipos

- **Obtención de micropartículas lipopoliméricas:**

Para la obtención de las micropartículas lipopoliméricas se usó PLGA 50:50 de viscosidad inherente 0,8 dL/g (Lactel, Birmingham Polymers, Inc.), mezcla de triglicéridos C₁₂-C₁₈ (Novata® BC PH, BASF Ludwigshafen, Alemania), diclorometano Honeywell (Muskegon USA), agua desionizada (D.I.) (Sistema de filtración de agua Aqua Nova – Osmosis Inversa, membrana de filtración (0,22 μm, φ47mm), Polivinilalcohol (PVA) (Mw 31000-50000, 98-99% hidrolizado) USA) y el péptido sintético modelo 12-14kDa.

Para la obtención de los diferentes sistemas se usaron Micropipetas (Select Bioproducts) (20-200μL y de 100-1000μL), sonicador (Qsonica sonicators, Q125), y un homogeneizador de turbina (Micra, Micra D-1 010049), Vórtex (IKA, Vortex 3), placa de agitación multipunto (IKA, RT 10 power), balanza analítica (Ohaus Y PX224), Congelador (ICASA, Congelador Junior), centrífuga (HERMLE, Z206A), , liofilizador (LABCONCO, Lyph-lock 6).

- **Caracterización de las micropartículas lipopoliméricas:**

Para la caracterización de los sistemas obtenidos se usaron las siguientes metodologías y equipos: Difracción laser (DL) (Malvern Master Sizer 3000, Reino Unido), microscopía electrónica de barrido (SEM) (Microscopio electrónico JEOL JXA 8230, Japón), Kit de ensayo de proteínas Micro BCA™, lector de microplacas (Expert Plus, Biochrom Ltd), agitador orbital (Select Bioproducts SBS550), Estufa (Mettler, UN55).

5.3 Metodología

5.3.1 Obtención de micropartículas lipopoliméricas

Para la obtención de estos sistemas se siguió la metodología de formación de una doble emulsión – evaporación del solvente, incluyendo algunas modificaciones. Para esto se partió de una solución de polímero (100mg PLGA/mL DCM), de una solución de lípido (Mezcla de triglicéridos C₁₂-C₁₈ 100 mg/mL DCM), una solución acuosa de PVA 5% y en el

caso de las micropartículas cargadas de una solución acuosa de péptido modelo (50 mg/mL).

Derivado de los ensayos preliminares a continuación se reporta la forma como se obtuvieron tres sistemas microparticulares lipopoliméricos, los cuales consistieron en un sistema vacío (ELP1), y dos sistemas cargados con el péptido sintético modelo (ELP2 y ELP3). La composición de los diferentes sistemas trabajados se reporta en la tabla 5-1.

Tabla 5-1: Composición de los ensayos realizados para la obtención de las micropartículas lipopoliméricas.

Ensayo	Solución Polímero	Solución Lípido	Solución Péptido	H ₂ O D.I
ELP1	900µL	100µL	0 µL	200 µL
ELP2	900µL	100µL	200 µL	0 µL
ELP3	900µL	100µL	200 µL	0 µL

El procedimiento se realizó mediante 5 pasos como se reporta a continuación:

- Formación de la emulsión 1 (W₁/O): Como se describe en la figura 5-2, se realizó una mezcla de los materiales de recubrimiento, para esto se tomaron 900µL de la solución de polímero y se llevaron a un eppendorf, sobre este se adicionaron 100 µL de la solución de lípido y se realizó una agitación para la incorporación de los dos materiales. Posteriormente se dispuso de un tubo Falcon de 15mL (Reactor 1) al que se adiciona la mezcla de los materiales de recubrimiento que se denominó la fase orgánica (O) de la primera emulsión. Sobre esta fase, se dispersó 200µL de la fase interna acuosa (W₁), que en el caso de las micropartículas vacías fue H₂O D.I. y de solución acuosa del péptido en el caso de las micropartículas cargadas. Esta dispersión se homogenizó mediante ultrasonido durante 1 minuto a una amplitud del 100%.

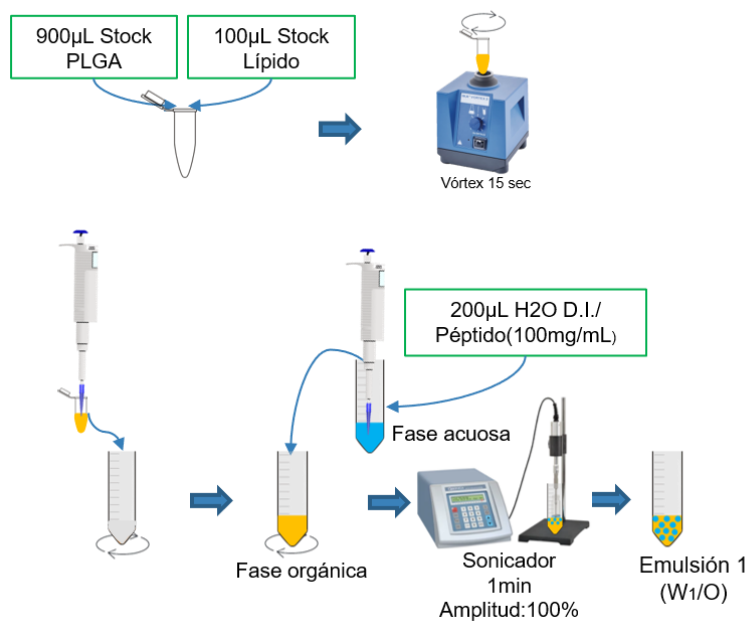


Figura 5-2: Representación gráfica de la formación de a emulsión 1 (W₁/O)

- Formación de la emulsión 2 (W₁/O/W₂): Como es posible observar en la figura 5-3, en el tubo Falcón en donde se encontraba la emulsión 1 (W₁/O), se dispensó 1 mL de solución acuosa de PVA 5% (W₂), se dispersó mediante la utilización de un vórtex durante 15 segundos. A este sistema se realizaron adiciones sucesivas de la solución de PVA 5% hasta completar 10 mL, empleando las mismas condiciones de agitación. Finalmente, para obtener la emulsión 2 (W₁/O/W₂) el sistema se sometió a un proceso de homogenización mediante turbina a 20.000 rpm durante 5 minutos y seguidamente se trasvasó a un recipiente de mayor capacidad para proceder a la extracción/evaporación del solvente orgánico.

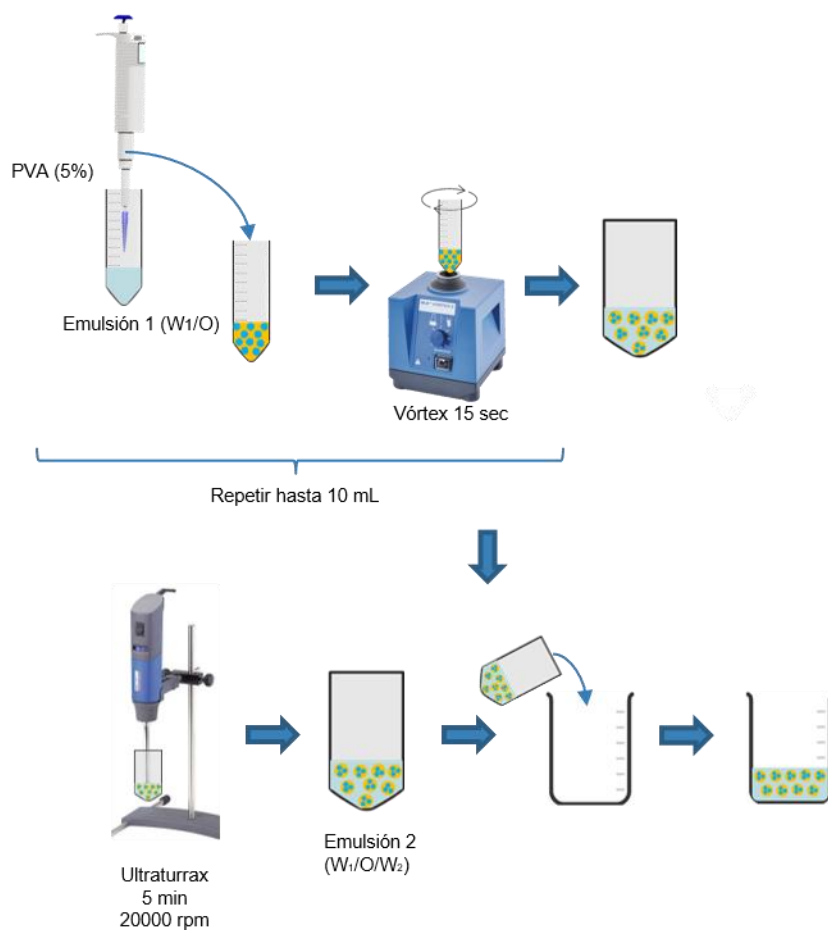


Figura 5-3: Representación gráfica de la formación de la emulsión 2 (W₁/O/W₂)

- Evaporación del solvente: Como se observa en la figura 5-4 el sistema (W₁/O/W₂) se dispuso en una placa de agitación magnética para realizar la extracción del solvente orgánico (DCM). Bajo esta condición se deja el sistema por 1 hora, tiempo determinado de las metodologías desarrolladas para los demás sistemas para inducir la insolubilización de las micropartículas lipopoliméricas.

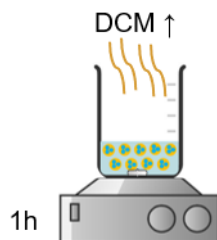


Figura 5-4: Representación gráfica del proceso de extracción/evaporación del solvente.

- Lavados: La suspensión obtenida luego de la evaporación del solvente orgánico, se llevó a un tubo Falcon de 15mL. Como se ve en la figura 5-5, este se sometió a un proceso de centrifugación durante 5 minutos a 6000rpm, pasado este tiempo, se descartó el sobrenadante y se reemplazó por 10mL de H₂O D.I. en cada tubo y se dispersó nuevamente el sistema. Con el propósito de lavar las micropartículas, este procedimiento se realizó 3 veces y finalmente los sedimentos se dispersaron en aproximadamente 4mL de H₂O D.I. y se trasvasaron a un vial de vidrio para ser secados posteriormente mediante liofilización.

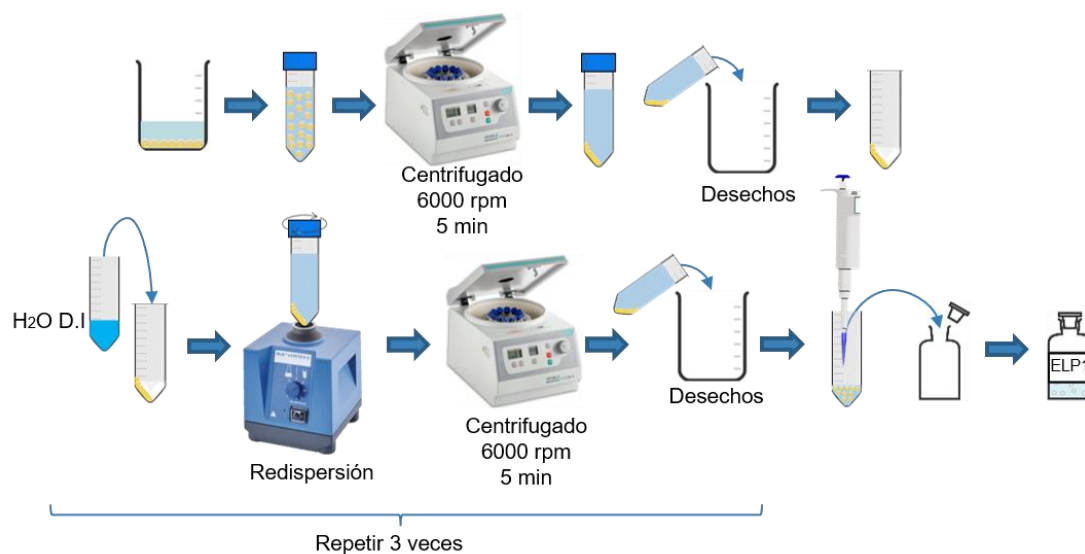


Figura 5-5: Representación gráfica del proceso de lavados de las micropartículas lipopoliméricas obtenidas.

- Liofilización: Como se describe en la figura 5-6, el vial que contiene las micropartículas en suspensión se llevó a congelación (-20°C) durante la noche y al día siguiente se sometió al proceso de secado mediante liofilización durante 24h.

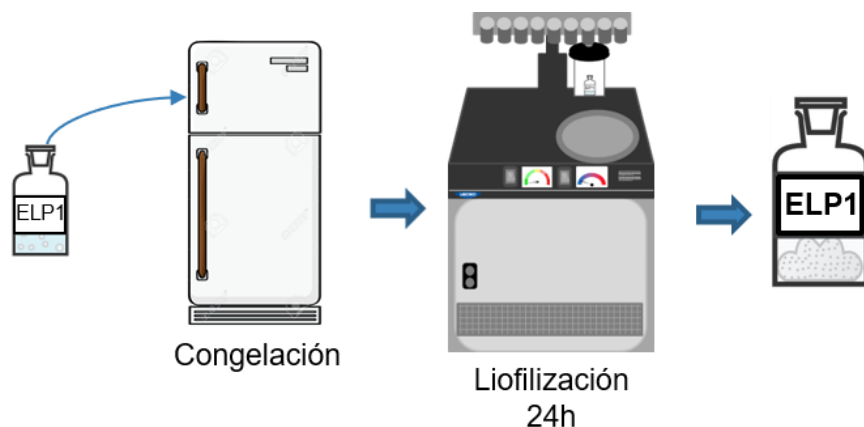


Figura 5-6: Representación gráfica del proceso de liofilización para la obtención de las micropartículas lipopoliméricas secas.

5.3.2 Caracterización de micropartículas híbridas lipopoliméricas

A continuación, se reportan las metodologías seguidas para la caracterización de los sistemas obtenidos en términos de la morfología, el tamaño de partícula, la capacidad de carga, eficiencia de encapsulación, el potencial electrocinético (potencial zeta), y el perfil de liberación del péptido sintético encapsulado.

- **Morfología:** Para evidenciar la forma de las micropartículas se empleó la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM). Para esto se pesó en un eppendorf de 1,5mL, 2mg de las micropartículas liofilizadas, las cuales se suspendieron en 200 μ L de H₂O D.I. y filtrada por una membrana de 0,22 μ m. De esta dispersión de micropartículas, se tomó una muestra y se dispuso en el portamuestras o “stub”, se dejó secar al ambiente y se recubrió posteriormente, mediante pulverización catódica con oro. Las imágenes se tomaron en un microscopio electrónico JEOL JXA 8230, a un voltaje de 25kV, se tomó una imagen panorámica a una magnificación de 1000X, y una imagen más cercana a una magnificación de 5000x. Las imágenes se procesaron directamente en el microscopio mediante el software Gatan Microscopy Suite Digital Micrograph versión 2.32.888.0
- **Tamaño de partícula:** La determinación del tamaño de partícula se realizó mediante la técnica difracción de luz láser (DL) usando un equipo Master Sizer. Para esta determinación se pesó en un eppendorf de 1,5mL, 8mg de las micropartículas

líoofilizadas, las cuales fueron suspendidas en 1mL de H₂O D.I. y filtrada por una membrana de 0,22 μ m. Esta dispersión de micropartículas se adicionó a un vaso de precipitado con 600mL con agua destilada fresca y se empleó una unidad de dispersión de muestra en vía húmeda, la cual está directamente acoplada al equipo. Se inició el proceso de dispersión y recirculación continua de la muestra hasta alcanzar una obscuración >2%. La medición se llevó a cabo a 25°C haciendo 5 lecturas. El tamaño y la uniformidad de la dispersión, lo determinó directamente el equipo mediante el software Master Sizer 3000 versión 3.62.

- Eficiencia de encapsulación: Esta determinación se realizó de manera directa empleando las micropartículas obtenidas. En primera medida, fue necesario hacer una extracción líquido - líquido, con el fin de separar el material de recubrimiento polimérico y lipídico del péptido, para esta, se pesó 2mg de las micropartículas líoofilizadas en un eppendorf de 2 mL, sobre estas se añadió 1 mL de DCM, estas se agitaron en el vórtex hasta completa disolución, luego, se adicionó 1 mL de H₂O D.I. y se dispuso en el agitador orbital durante 2 horas. Al finalizar este tiempo de agitación se obtuvo una solución compuesta por dos fases la cual se llevó a centrifugar por 3 minutos a 6000 rpm. Con una micropipeta se retiró la fase superior (fase acuosa) y se colectó en un eppendorf de 1,5 mL. Se permitió la evaporación del DCM que se encuentra saturando el agua durante unos minutos, en esta fase se tendrá el péptido que se encontraba encapsulado en las micropartículas. La determinación del péptido modelo encapsulado se realizó en microplaca de 96 pozos empleando el kit Micro BCA™. Para esto fue necesario realizar una curva de calibración de 0 a 35 μ g/mL empleando una solución del péptido sintético modelo. En la misma microplaca se colocaron alícuotas de la muestra producto de la extracción líquido-líquido de las micropartículas y se completó a 100 μ L con un buffer PBS (Fosfato 0,1M-NaCl (0,15M) pH=7,4). Posteriormente, se preparó el reactivo Micro BCA™ siguiendo el protocolo sugerido por el kit, y se adicionó 100 μ L de este reactivo en cada pozo. La placa se llevó a incubación a 37°C por 2 horas y pasado este tiempo, se determinó la absorbancia a 590nm en un lector de placas. Mediante la curva de calibración se interpolaron los datos obtenidos para las muestras, con la ecuación de la curva se cuantificó el contenido de péptido en las micropartículas, y con esa información finalmente se calculó la eficiencia de encapsulación mediante la siguiente formula:

$$E.E. = \frac{\text{Cantidad del activo en las partículas}}{\text{Cantidad de activo inicial}} \times 100$$

- Capacidad de carga: Con la información obtenida de la cantidad de activo (péptido sintético modelo) encapsulado, se determinó este parámetro empleando la siguiente relación matemática:

$$\%LC = \frac{\text{Cantidad de activo}}{\text{Cantidad de partículas}} \times 100$$

- Potencial Z: El potencial Z se determinó utilizando el equipo Zeta Sizer Nano ZS, empleando la celda DTS1070. Brevemente, se pesó en un eppendorf de 1,5mL, 1mg de micropartículas liofilizadas, estas se dispersaron en 1mL de agua D.I. y filtrada por 0,22µm, y posteriormente se pasaron a la celda. La medición se llevó a cabo a 25°C. El potencial Z lo determinó el equipo teniendo en cuenta las 3 lecturas realizadas para cada muestra. Los datos fueron procesados mediante el software Zetasizer versión 7.11.
- Perfil de liberación: Para este ensayo se seleccionaron los tres sistemas ELP1 (vacío) y los sistemas cargados con el péptido modelo ELP2 y ELP3. Para esta determinación se pesó 10 mg de cada sistema por duplicado, en un eppendorf de 2mL, estas muestras se suspendieron en 1 mL de Buffer PBS (Fosfato 0,1M-NaCl (0,15M), pH:7,4) preservado con azida de sodio 0,1%, se pusieron en un agitador orbital en una estufa a 37°C y se mantuvieron en agitación constante. Para determinar el perfil de liberación se realizaron muestreos a la primera hora y a las 24 horas durante los primeros diez días posteriormente se hacen muestreos cada tercer día y finalmente un muestreo semanal. Cada vez que se realizaba un muestreo, se centrifugaban las muestras a 6000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se tomó con una micropipeta una muestra de 500µL del sobrenadante y se llevó a un eppendorf de 500µL, inmediatamente este volumen fue reemplazado por PBS (Fosfato 0,1M-NaCl (0,15M), pH:7,4) preservado con azida de sodio 0,1%. Las muestras tomadas fueron llevadas a congelación para su posterior análisis con el kit de ensayo de proteínas Micro BCA™ de manera similar

a como se procedió en la metodología para determinar la eficiencia de encapsulación.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Obtención de micropartículas lipopoliméricas

En concordancia con los demás sistemas desarrollados, las micropartículas híbridas lipopoliméricas se obtuvieron mediante la metodología de formación de una doble emulsión con posterior extracción/evaporación del solvente orgánico. Se tenía como información de partida las metodologías desarrolladas previamente para el sistema polimérico y para el sistema sólido lipídico, adicionalmente se realizaron ensayos previos que permitieran plantear qué metodología era la más apropiada para este caso. Para esto, la F.W₁ de la primera emulsión (W₁/O) se constituía de una solución de péptido en el caso de las micropartículas cargadas o agua desionizada para las micropartículas vacías. La F.O. se trabajó inicialmente en proporción 50:50 de material lipídico (Mezcla de triglicéridos C₁₂-C₁₈) y material polimérico (PLGA) en diclorometano; posteriormente la proporción de componente polimérico y componente lipídico fue variada con el fin de determinar la proporción de materiales más adecuada para obtener un sistema con las mejores propiedades. Las proporciones trabajadas fueron (70:30, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 y 10:90), de esto se logró observar que a medida que aumenta la concentración de polímero también aumenta la eficiencia de encapsulación. Algo que también se logró ver en los diferentes sistemas estudiados es que las proporciones trabajadas en las que se tenía la mayor cantidad de lípido se formaban micropartículas poliméricas y partículas sólidas lipídicas por separado, lo que se evita al adicionar una mayor proporción de polímero. Con base a estos resultados, se decidió trabajar con una mayor proporción de polímero, con lo que se pudo concluir que al trabajar con la proporción 10:90 se obtenían mejores eficiencias de encapsulación sin afectar las demás características de las micropartículas (tamaño, potencial Z, morfología.). Al igual que las micropartículas poliméricas y las partículas lipídicas la homogenización de la primera emulsión se llevó a cabo mediante ultrasonido bajo las mismas condiciones usadas para las micropartículas poliméricas con el fin de preservar un tamaño comparable entre los sistemas usados en función del componente usado en mayor proporción.

De manera simultánea a los ensayos mencionados previamente se realizaron ensayos usando cada una de las metodologías antes desarrolladas para la obtención de los sistemas poliméricos y los sistemas sólidos lipídicos. En estos ensayos se observó que al usar Poloxamer 188 como estabilizante en la F.W₂ se determinó que no era adecuado para el desarrollo del sistema. Esto se puede atribuir posiblemente a la naturaleza hidrofílica característica de esta molécula lo cual genera una interacción negativa con el polímero (insolubilización). Para la segunda emulsión se utilizó PVA al 5% como estabilizante, pues como se mencionó anteriormente cuando se utilizó el Poloxamer 188 no se evidenció buenos resultados al entrar en interacción con el polímero. Al igual que en las micropartículas poliméricas la adición del estabilizante se realizó fraccionadamente según lo estudiado en su respectivo capítulo. Respecto al uso de IPA (2%) en la F.W₂ se decidió no agregarlo a la formulación dado que en el sistema sólido lipídico se concluyó que al trabajar con un volumen de fase acuosa externa de menor volumen se podría mejorar la eficiencia de encapsulación ya que se evita la migración del péptido a la fase acuosa externa. (11). Los demás pasos de homogenización, evaporación del solvente y lavados se realizaron de manera similar, como se estudió en el sistema polimérico.

5.4.2 Caracterización

- **Morfología:**

El estudio de la morfología de las micropartículas lipopoliméricas se realizó para los tres sistemas obtenidos. Las micrografías obtenidas por SEM en dos aumentos (1000X y 5000X) se reportan en la figura 5-7.

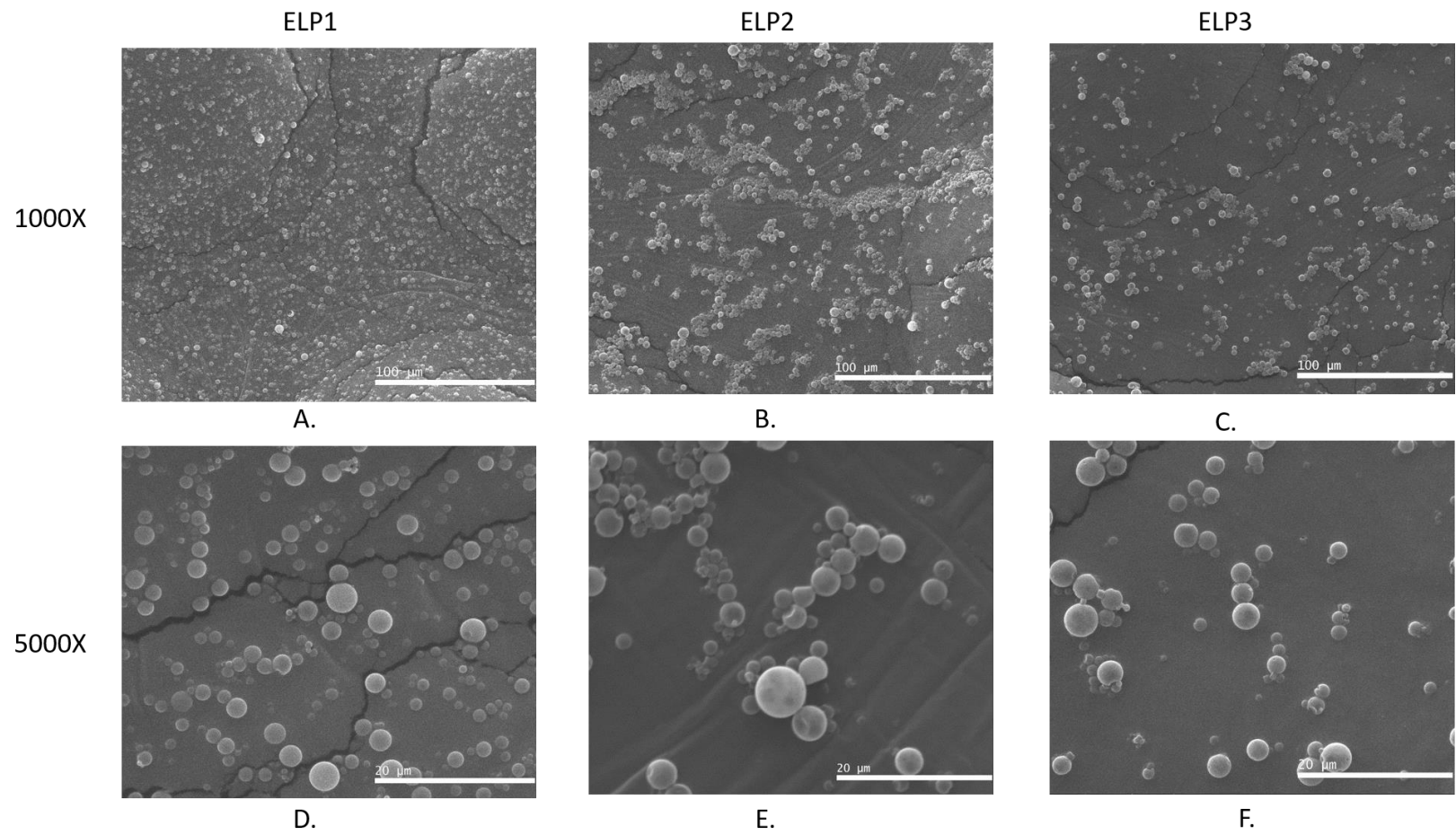


Figura 5-7: Morfología de micropartículas lipopoliméricas obtenidas mediante SEM a diferentes magnificaciones A y D sistemas vacíos, B,E,C y F sistemas cargados con el péptido sintético hidrofílico.

En ambos casos se observó que la forma de las micropartículas obtenidas es esférica y similar a la morfología observada en las micropartículas poliméricas tanto cargadas como vacías reportadas en la figura 3-6. Específicamente en las imágenes panorámicas (1000X) se observó que se presentaron varios rangos de tamaño predominando uno en específico, tal como se confirmó posteriormente en la determinación de tamaño de partícula mediante DL. Adicionalmente, se observó en las micrografías de las micropartículas cargadas que tendían a aglomerarse más que las micropartículas vacías, comportamiento similar al de las micropartículas poliméricas.

De otra parte, en las imágenes de mayor aumento se observó que la superficie de las micropartículas es lisa y suave, sin embargo, hay algunas micropartículas que presentan alteraciones en la integridad de la superficie (presencia de poros) de algunas micropartículas cargadas. También es posible observar un cambio en la tonalidad de las micropartículas las cuales se podrían atribuir a las cavidades internas de la micropartícula que alojan al péptido encapsulado. Es importante resaltar que el cambio en la tonalidad de estas micropartículas difiere de las presentadas en las micropartículas poliméricas, en este caso tienden a ser menos definidas y esto podría deberse a la presencia del lípido en la matriz. Además, a diferencia de las micropartículas poliméricas no es una característica en común para todas las micropartículas que se alcanzan a observar en la micrografía. Finalmente, este aspecto fue de relevancia para la investigación dado que la morfología e integridad de las micropartículas lipopoliméricas está indirectamente relacionada con la manera como se liberó el péptido sintético encapsulado. Por tanto, fue importante tener control sobre estos aspectos, con el fin de que la liberación dependiera mayoritariamente de la degradación de los materiales de recubrimiento. Además, el hecho de que las micropartículas se hayan obtenido con una forma definida, esférica y una superficie lisa e integra, permitió sugerir en este trabajo y como se reporta en la literatura que las condiciones establecidas del proceso de evaporación del solvente fueron las adecuadas para la obtención de las micropartículas con las características esperadas.

Respecto al comportamiento de las micropartículas en conjunto, se mantiene la característica de las micropartículas poliméricas de que las partículas cargadas se aglomeran más que las micropartículas vacías, esto era un comportamiento que

podía darse debido a que se está trabajando con el mismo estabilizante y polímero en una proporción alta respecto al lípido, por tanto, el comportamiento superficial será muy similar al estudiado en las micropartículas poliméricas, el cual se profundizará con mayor detalle en el apartado de potencial Z.

- **Tamaño de partícula:**

Como se puede observar en la tabla 5-2 el tamaño de las micropartículas vacías y cargadas se encuentran en un rango entre 3,23 y 3,93 μm . Al analizar las gráficas de distribuciones de tamaño reportadas en la Figura 5-9 se puede determinar que para las micropartículas vacías la distribución tiende a ser amplia y polidispersa con un valor de uniformidad de 2,715, sin embargo, para el caso de las micropartículas cargadas se tiene que la distribución mejora en gran medida dando lugar a una distribución más uniforme con tendencia monomodal cuya uniformidad se encontró entre 0,280-0,299 sin embargo, se evidencian algunos señales por debajo de 100 μm como se observa en la figura 5-9B. Estas señales de mayor tamaño probablemente se atribuyen a la formación de agregados como se evidenció en las imágenes obtenidas en SEM para estos sistemas cargados con el péptido modelo. En cuanto a la desviación estándar como parámetro estadístico, es posible observar que para todos los ensayos es baja, lo cual nos indica que los datos obtenidos para los diferentes sistemas tienden a estar agrupados cerca de la media y por tanto se trataría de datos con un alto nivel de confianza.

Como se puede ver en la figura 5-8 las distribuciones de tamaño de partícula obtenidas, en el caso de las micropartículas vacías (ELP1) presentaron una distribución multimodal, en donde se observó una pequeña señal entre 0,8 y 2 μm , una señal mayoritaria entre 2 y 10 μm y otras señales de menor intensidad en un rango muy amplio de tamaño entre 20 y 110 μm . Como se describió anteriormente, la presencia de estas señales de mayor tamaño en la distribución, lo cual fue evidenciado en las micrográficas obtenidas por SEM, fue atribuido a la formación de agregados favorecida por la reducción del potencial zeta de las micropartículas, ocasionada por la presencia del péptido asociado a la superficie de estos sistemas. Es importante resaltar que, tanto en las micropartículas vacías como cargadas, la señal mayoritaria en la distribución de tamaño corresponde al 90% en un rango entre 2 y 10 μm , el cual corresponde al tamaño propuesto para el desarrollo de estos sistemas. De otra parte, estos resultados nos permitieron confirmar que las

condiciones establecidas y utilizadas de tiempo e intensidad en los procesos de homogenización, fueron los indicados para obtener sistemas microparticulares lipopoliméricos con esta característica de tamaño.

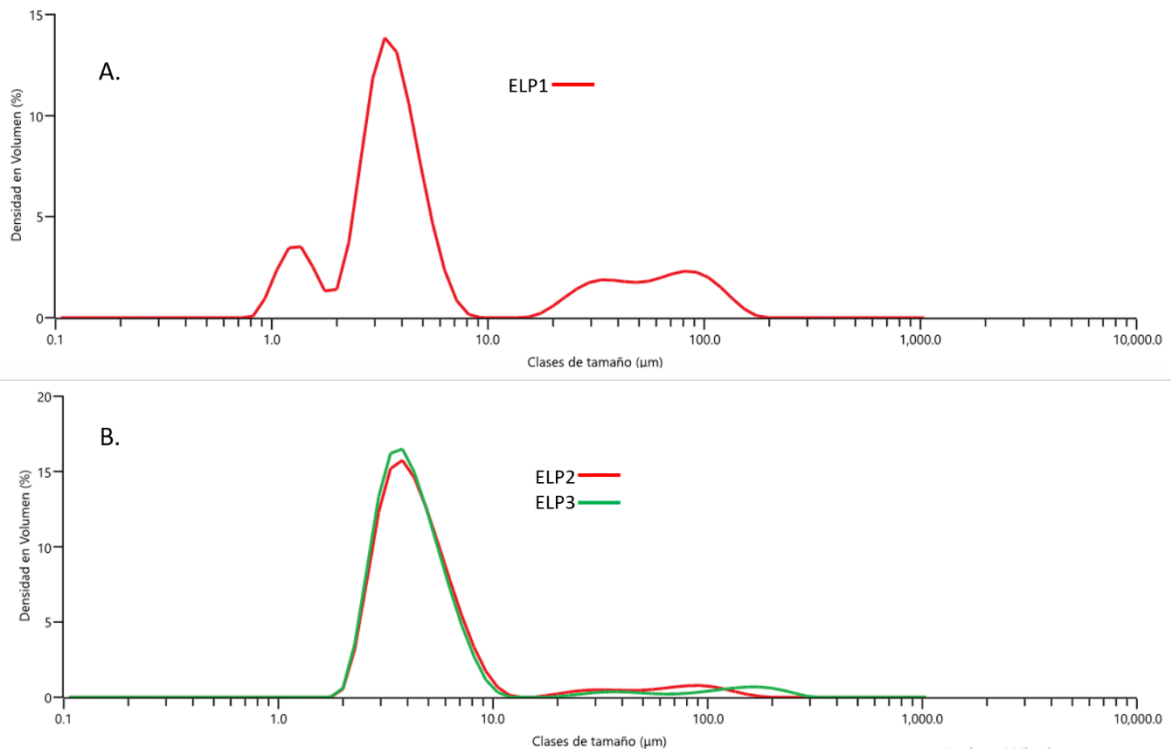


Figura 5-8: Distribuciones de tamaños de micropartículas híbridas lipopoliméricas vacías (A) y cargadas (B) usando LD mediante el equipo MasterSizer.

Tabla 5-2: Datos de tamaño de partícula obtenidos de las lecturas por LD en el equipo Master Sizer

Ensayo	Tamaño D[3,2](μm)	Uniformidad	Desviación estándar
ELP1	3,22	2,715	0,154
ELP2	3,93	0,299	0,140
ELP3	3,84	0,280	0,126

- Eficiencia de encapsulación:** Como se mencionó en el sistema polimérico este parámetro es uno de los más relevantes en los sistemas microparticulares desarrollados. De manera similar a los demás sistemas desarrollados, la E.E. se determinó de manera directa con el propósito de tener mayor certeza en el parámetro. Como se describió en la metodología para cuantificar el péptido encapsulado se empleó una curva de calibración construida con una solución stock del péptido sintético modelo. Como se reporta en la tabla 5-3 la E.E. en los sistemas cargados con el péptido modelo ELP2 y ELP3 fue de 42,6% y 43,7% respectivamente. Específicamente el péptido adsorbido corresponde al 36,4% y

34,1% del péptido encapsulado para ELP2 y ELP3 respectivamente. Los resultados obtenidos fueron coherentes respecto a lo esperado en base a lo obtenido para los sistemas poliméricos y sólidos lipídicos. Análogo a los casos anteriores es importante conocer la incorporación del péptido en el sistema, se trabajaron las mismas cantidades de material de recubrimiento y de péptido que en los sistemas previos. En este caso como se tenían dos componentes en el material de recubrimiento la digestión del polímero no sería suficiente para extraer al péptido del sistema, por tanto, teniendo en cuenta que el polímero es soluble en DCM al igual que el lípido, se decidió optar por la metodología empleada para determinar la EE en las partículas sólidas lipídicas, que consistía en una extracción líquido – líquido del péptido encapsulado. Así de esta forma, se obtiene una fase acuosa que contiene el péptido encapsulado en las micropartículas, esta muestra fue analizada mediante el ensayo de micro ácido bicinoninico. Los resultados hasta ahora nos permitieron observar en los sistemas lipopoliméricos, características intermedias entre el sistema polimérico y el sistema lipídico, específicamente en la eficiencia de encapsulación, en la cual se presentó mayor valor para las micropartículas poliméricas, seguida de las micropartículas lipopoliméricas y por último una encapsulación más baja en las partículas sólidas lipídicas. Es posible sugerir que esto puede deberse a la interacción del péptido a encapsular y la hidrofobicidad de la F.O. asociada a cada sistema. Al utilizar un 10% de lípido en la F.O., la matriz se tiende a volver más hidrofóbica por la presencia del lípido que aumenta el componente apolar, por tanto, el péptido va a ser un poco menos afín por el sistema lo que hace que se disminuya el valor de eficiencia de encapsulación a comparación a cuando se tiene un 100% de polímero(11). En este caso se debe tener en cuenta los comportamientos de los sistemas poliméricos y lipídicos por separado, se cree que se tendría una suma de factores que pueden venir afectando esta característica, entre ellos, la solubilidad tanto del polímero como del lípido en el solvente orgánico, la miscibilidad del solvente orgánico en agua, la concentración de ambos materiales de recubrimiento usados, la proporción de la fase dispersa y la fase continua, la velocidad de remoción del solvente orgánico y la solubilidad del péptido en la fase continua. En este caso se siguió trabajando con diclorometano como solvente orgánico, ya que tanto el polímero como el lípido son solubles en él, además es capaz de difundir en la fase acuosa lo que lo hace apto para la

metodología empleada. En cuanto a la cantidad y proporción usada de los materiales de recubrimiento se mantuvo con respecto a la utilizada en la obtención los sistemas anteriores, la diferencia reside en la proporción de polímero y de lípido, determinado que al usar una menor cantidad de lípido se encontró una eficiencia de encapsulación mejor. Esto porque en cierta forma la matriz sería menos apolar y un poco más afín por el péptido a diferencia de si se trabaja con una proporción elevada de lípidos. En cuanto a la proporción de la fase continua, esta se disminuyó respecto a la usada en la metodología de los sistemas poliméricos, dado que no se agregó alcohol isopropílico, esto tomado de la metodología de las partículas sólidas lipídicas, pues se comprobó que no era necesario para que el DCM difundiera y se evaporara en los tiempos establecidos, sin embargo, este tiempo de evaporación se estableció en función de estudios previos del grupo. Para posteriores desarrollos será necesario verificarlo como una variable adicional y además cuantificar el contenido de DCM en el producto final mediante una técnica analítica como la cromatografía de gases. Esto permite que haya un menor volumen de fase acuosa externa y por tanto es posible que se mitigue la migración del péptido a la fase acuosa mientras se da la evaporación del solvente. Como se ha venido discutiendo la interacción entre el polímero/lípido con el péptido no resulta ser la mejor, pues en este caso solo podría interactuar con los segmentos polares que aportan los materiales de recubrimiento, sin embargo, la matriz tiende a tener una naturaleza predominantemente hidrofóbica lo que afecta la afinidad entre el péptido y la matriz usada. Por tanto, el péptido este preferirá migrar a la fase externa acuosa que quedarse alojado en la matriz híbrida lo que hace que disminuya la eficiencia de encapsulación respecto a las micropartículas poliméricas.

- **Capacidad de carga:** De manera similar a lo realizado en los sistemas anteriores, la capacidad de carga del péptido modelo en el sistema lipopolimérico desarrollado se realizó a partir de los datos obtenidos de la eficiencia de encapsulación, con el fin de determinar la proporción de péptido en una cantidad determinada de micropartículas. La capacidad de carga determinada en los sistemas microparticulares poliméricos desarrollados fue de 3,88% para ELP2 y 3,97% para ELP3. Estos valores son intermedios a los encontrados en los dos sistemas desarrollados anteriormente, sin embargo, es más cercano al obtenido para las micropartículas poliméricas y es congruente ya que el 90% de la matriz está compuesto por polímero. Dado que se incluyó un componente lipídico la matriz va

a ser más hidrofóbica, lo cual puede contribuir a disminuir la capacidad de carga de una molécula hidrofílica, como lo es el péptido modelo utilizado en este caso.

- **Potencial Z:** La medida de potencial Z se llevó a cabo teniendo en cuenta las mismas consideraciones que para los sistemas anteriores. En este caso el material de recubrimiento consta de una mezcla de PLGA con triglicéridos C₁₂-C₁₈, por tanto, en base a los resultados obtenidos en los sistemas por separado y a los grupos funcionales presentes en cada uno de los materiales, se espera que el potencial Z tenga valores negativos principalmente atribuidos al PLGA que se propone se ubique hacia la interfase con la fase acuosa externa, mientras que al interior de la micropartícula se cree se ubican los triglicéridos correspondientes al componente lipídico. En la tabla 5-3 se pueden observar los resultados obtenidos de las mediciones realizadas para las micropartículas híbridas vacías y cargadas, tal como se esperaba se tiene un potencial Z negativo, el cual se encuentra en un rango entre -20,0 mV y -26,1 mV, el cual es bastante similar a los valores obtenidos para las micropartículas poliméricas y es apenas lógico dado que el mayor porcentaje de material de recubrimiento corresponde al material polimérico. Estos valores permiten pensar que se puede dar una estabilidad a nivel coloidal por medio de repulsión de cargas, teniendo en cuenta la clasificación estudiada en el capítulo de las micropartículas poliméricas, por tanto, se obtendría un sistema entre relativamente estable y altamente estable en el caso de las micropartículas vacías. Al igual que en los casos anteriores se observó una disminución del potencial electrocinético en las micropartículas cargadas, lo cual como se ha venido analizando a lo largo del documento es atribuido al péptido que se encuentra cerca asociado o adsorbido en la superficie de las micropartículas. En este caso la disminución es bastante similar a la vista en el caso de las micropartículas poliméricas, pero totalmente distante a las partículas sólidas lipídicas en las que se esperaba se tuviera gran cantidad de péptido asociado a la superficie de las partículas. En este caso, lo que se propone es que se presenta una estructura matricial en la que hay una distribución del péptido hidrofílico en la cual tiende a ubicarse en la superficie de la matriz, ya que como se mencionó antes se propone que el núcleo esté compuesto principalmente de lípidos que son poco afines por el péptido, además de la posible migración hacia la fase acuosa externa de la molécula encapsulada (36).

Tabla 5-3: Características farmacotecnicas de las micropartículas lipopoliméricas vacías y cargadas Péptido adsorbido: péptido asociado en la superficie con respecto del péptido encapsulado

Ensayo	Eficiencia de encapsulación (%)	Péptido adsorbido (%)	Capacidad de carga (%)	Potencial Z (mV)
ELP1	N.A	N.A	N.A	-26,1
ELP2	42,68	36,44	3,88	-20,8
ELP3	43,70	34,10	3,97	-20,0

- Perfil de liberación:** Los perfiles de liberación obtenidos a partir de las micropartículas híbridas lipopoliméricas se reportan en la figura 5-9. Como se puede observar en la figura los perfiles de los sistemas ELP2 y ELP3 presentaron un comportamiento trifásico durante el periodo de estudio (26 días). Una fase inicial en el día 1 del estudio, que correspondería al péptido adsorbido en las micropartículas y que sería de rápida liberación (efecto burst) (36-34%). Una segunda fase de liberación creciente y lenta posterior al día 1, hasta el día 9 del estudio (60%). A partir del día 9 se inició una tercera fase hasta el final del estudio. En esta fase se liberó aproximadamente el 40% del péptido, como consecuencia de la degradación de los materiales de recubrimiento empleados. El perfil de los dos sistemas evaluados fue similar, presentando al final del estudio una liberación del péptido modelo entre el 99,6% y el 100%. Para este estudio se utilizó el sistema ELP1, micropartículas vacías como sistema de referencia. La primera liberación asociada con un efecto burst se relaciona con el péptido que quedó adsorbido en la superficie de las micropartículas comportamiento similar al de las micropartículas poliméricas. Este resultado se relaciona con la medida de potencial Z donde se observó que este parámetro tendía a ser menos negativo en los sistemas cargados posiblemente por la carga que aporta el péptido al sistema. Posterior a la liberación inicial se tiene una liberación que tiende a aumentar en función del tiempo, similar al comportamiento obtenido en las partículas sólidas lipídicas, esto podría explicarse por la forma en la que se organiza el péptido en la partícula, se cree que al ser la partícula un poco más hidrófoba que las partículas poliméricas, el péptido va a tender a quedarse cerca de la superficie de la partícula lo que hace que su liberación sea mucho más rápida, a diferencia de las partículas poliméricas.

Además, como se tiene el lípido como parte de la matriz de la micropartícula, se cree que en consideración de su punto de fusión va a hacer que el péptido difunda más fácilmente a diferencia de cuando la liberación solo está dada por la hidrólisis de la matriz polimérica, esta ayudará a que la liberación sea más prolongada en el tiempo.

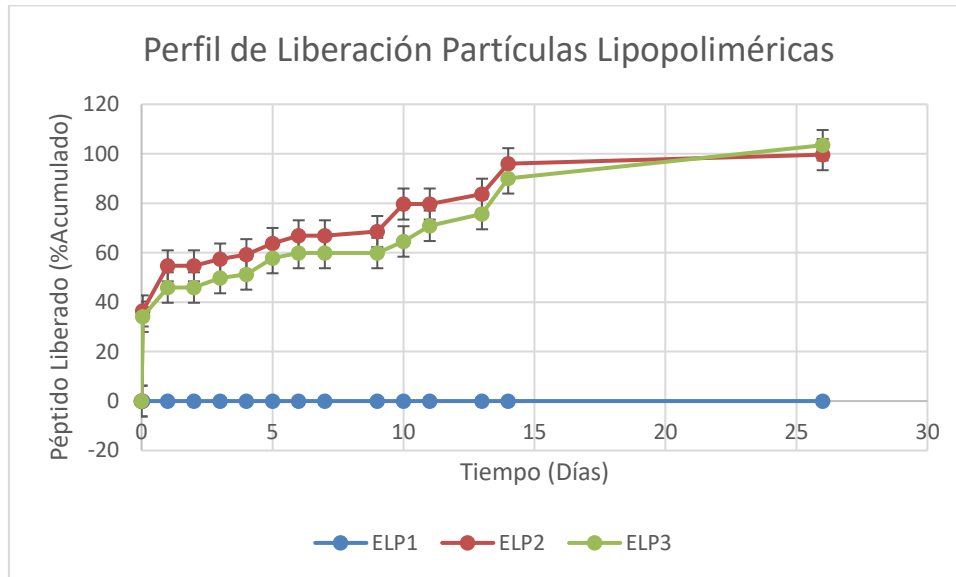


Figura 5-9: Perfiles de liberación del péptido encapsulado en las micropartículas híbridas lipopoliméricas

5.5 Conclusiones

- Las micropartículas obtenidas presentaron forma esférica, superficie lisa e íntegra, con tamaños de partícula entre 3,22-3,93 μm , una distribución que tiende a ser monomodal con una uniformidad entre 0,280 y 2,715, con una eficiencia de encapsulación del péptido sintético modelo alrededor de 43,2%, un potencial Z negativo entre -20,0 y -26,1 mV y un perfil de liberación durante 25 días trifásico.
- En este sistema la proporción 90:10 usada del componente polimérico y lipídico es la que muestra mejores resultados en cuanto a la eficiencia de encapsulación, por tanto, definir esta proporción de los componentes es de vital importancia para el sistema.

- Dado que el material de recubrimiento usado en mayor proporción fue el PLGA, la mayoría de las condiciones aplicadas en el desarrollo de las micropartículas lipopoliméricas derivaron de la metodología obtenida para la obtención de las micropartículas poliméricas por lo que se cree que dependiendo del material de recubrimiento se podrán emplear unas condiciones definidas de acuerdo a las características propias del material de recubrimiento .

6. Comparación entre los diferentes sistemas microparticulares desarrollados

Con el fin de establecer un análisis comparativo de los tres sistemas desarrollados, se planteó una prueba MANOVA, prueba estadística que permite analizar la relación entre varias variables respuesta, verificar efectos significativos de las variables, las interacciones y el grado de asociación de las variables estudiadas. Esta prueba se usó con el fin de analizar la relación entre diferentes variables respuesta (tamaño, potencial Z y eficiencia de encapsulación) de diferentes factores (micropartículas poliméricas, partículas lipídicas y micropartículas lipopoliméricas) como un estudio preliminar, teniendo en cuenta la cantidad limitada de ensayos. A partir de este análisis se logró determinar que los tres sistemas muestran diferencias significativas entre sí para las diferentes variables respuestas estudiadas, sin embargo, resulta muy generalizado dado que no permite saber qué variables específicas son las responsables de estas diferencias. Por tanto, se decidió realizar una prueba ANOVA, en donde se evaluaron los tres factores con cada variable respuesta por separado, con el fin de estudiar si al menos existía una variable que no tuviera diferencias en los diferentes sistemas. De esta prueba se obtuvo que el potencial Z es una variable que no muestra diferencias entre los tres sistemas a diferencia del tamaño y de la eficiencia de encapsulación. Con el fin de ver esto de una manera más gráfica se decidió reportar estos resultados mediante una gráfica de cajas que permitiera ver el comportamiento de los tres sistemas en función de las variables respuestas (Figura 6-1), obteniendo de esta forma una correlación con lo encontrado tanto en el análisis de MANOVA inicial y de ANOVA. Esta gráfica nos permite tener un vistazo general de los sistemas en función de las características farmacotécnicas estudiadas, para los tres casos se ven diferencias entre los sistemas, sin embargo, en las dos variables respuesta que son más significativas es en el tamaño y en la eficiencia de

encapsulación. Algo que vale la pena destacar de esta gráfica, es el comportamiento de las micropartículas lipopoliméricas que por lo menos para efectos del tamaño y de la eficiencia de encapsulación muestra un comportamiento intermedio, sin embargo, para el caso de la eficiencia de encapsulación el comportamiento tiende a ser más parecido a las partículas lipídicas y esto está relacionado con la hidrofobicidad de las partículas, dado que al incorporar el lípido la matriz va a ser menos afín por el polímero lo que afecta su eficiencia de encapsulación como se mencionó previamente.

En cuanto a los perfiles de liberación se realizó un análisis por separado, con el fin de evaluar en tres puntos específicos el comportamiento de los tres sistemas. Con base en esto se decidió hacer tanto un análisis MANOVA como un análisis ANOVA con el fin de establecer las posibles diferencias entre los tres sistemas. A partir de las aproximaciones anteriores se encontró que en el día 1, un tiempo de liberación inicial, no se ven diferencias significativas, pero en el día 6 y el día 11 ya todos los sistemas muestran un comportamiento diferente. Esto también se analizó gráficamente mediante diagramas de cajas (Figura 6-2), de los que se puede observar y concluir que el comportamiento de las micropartículas lipopoliméricas es intermedio en cuanto a la liberación del activo.

Por tanto, se resalta que el sistema desarrollado presenta propiedades tanto de las micropartículas poliméricas como de las partículas lipídicas, lo cual permite sugerir que se puede mejorar su desempeño *in vivo*, tiempo de residencia y liberación del fármaco. Estas propiedades deben ser estudiadas a mayor profundidad en investigaciones futuras.

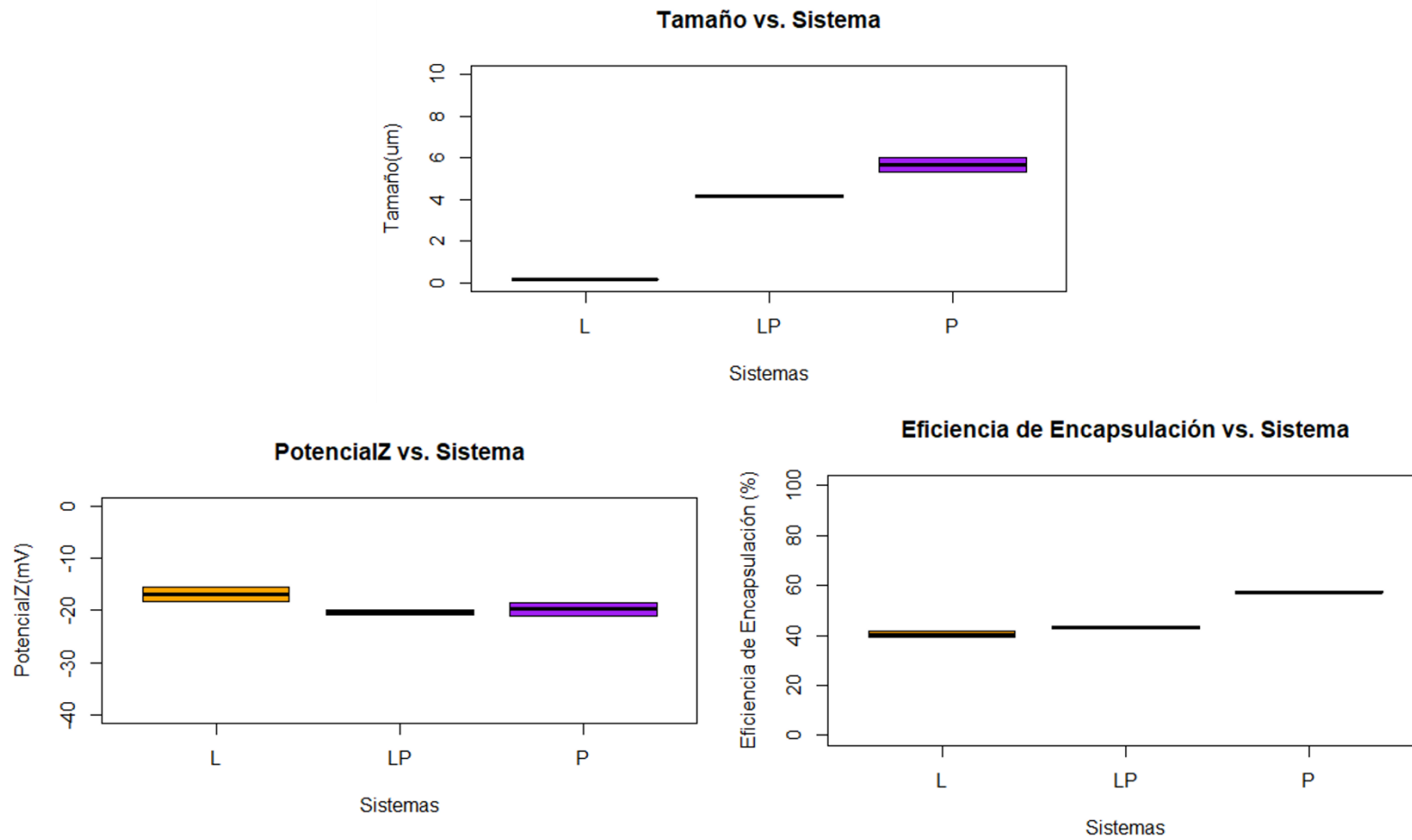


Figura 6-1: Gráfica comparativa de las características farmacotecnicas estudiadas en función de los sistemas obtenidos

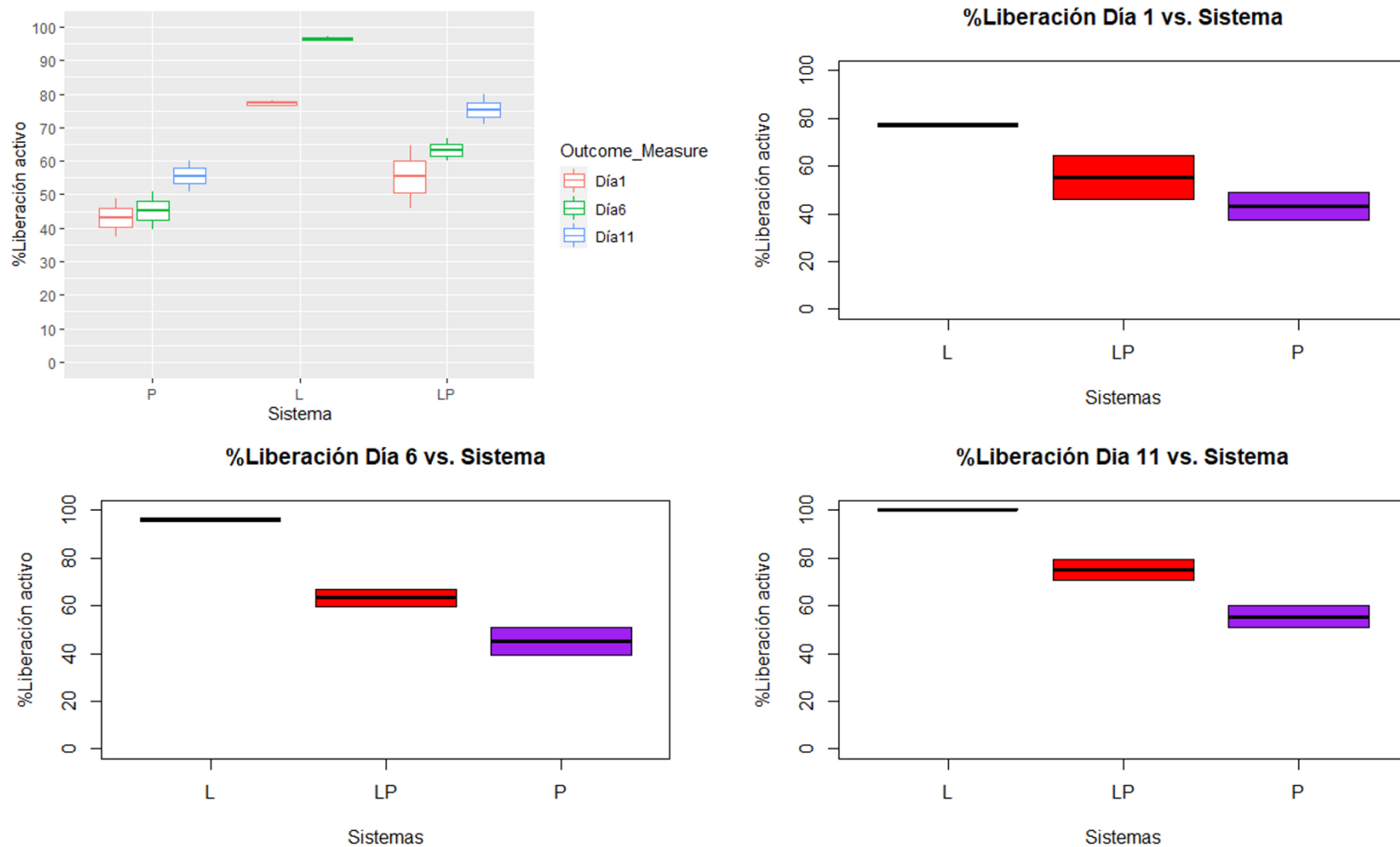


Figura 6-2: Gráfica comparativa de los perfiles de liberación obtenidos para cada sistema

7. Conclusiones

- Se logró obtener un sistema microparticulado lipopolimérico que permite encapsular un péptido sintético modelo de naturaleza hidrofílica mediante una metodología de formación de doble emulsión y posterior evaporación del solvente, con eficiencias de encapsulación de alrededor del 43%, tamaños entre 3,22 y 3-93 μm , forma esférica y superficie suave íntegra, con un potencial zeta negativo que ayuda a estabilizar el sistema.
- El desarrollo de una metodología para un sistema específico tiene sus particularidades, es importante tener en cuenta la naturaleza tanto del material de recubrimiento como del fármaco a encapsular, dado que sus interacciones, afinidades y características fisicoquímicas influenciarán en el comportamiento de los diferentes materiales a lo largo de la obtención de un SEF como los obtenidos en este trabajo.
- En un sistema híbrido lipopolimérico no siempre se obtiene una mejora de los sistemas poliméricos y lipídicos, en el caso de moléculas hidrofílicas como el péptido modelo trabajado, la eficiencia de encapsulación no se mejoró dada la naturaleza hidrofóbica de la matriz.
- Respecto a las características farmacotécnicas, se observó que el comportamiento del sistema tiende a ser intermedio entre las micropartículas poliméricas (Tamaño y morfología) y las partículas sólidas lipídicas (E.E y Perfil de liberación).

8. Recomendaciones

- Para lograr una mejora en la eficiencia de encapsulación de las micropartículas híbridas lipopoliméricas se podría hacer una modificación del péptido acoplándolo mediante enlaces covalentes a una molécula más apolar que no afecte su actividad, o también se puede probar la formación de complejos con SPC que mediante interacciones electrostáticas y Van der Waals, hagan que la molécula sea más afín con la matriz. De esta manera sería posible incorporar una cantidad mayor de péptido en el sistema y con esto evaluar su comportamiento.
- Se recomienda partir de un material de recubrimiento en el que el polímero y el lípido se encuentren enlazados covalentemente en diferentes proporciones para utilizarlos considerando las propiedades de una sola molécula y con esto evitar la formación de los sistemas por separado.
- Se recomienda trabajar con metodologías analíticas más sensibles y con menor variación que la espectrometría dado que por errores asociados a esta los datos pueden cambiar de una manera indeseada.
- Se recomienda hacer ensayos in vivo con los sistemas desarrollados con el fin de evaluar mejoras en otros parámetros como la biodisponibilidad y el tiempo de residencia en el organismo.
- Se recomiendan como estudios adicionales la verificación de la integridad de la molécula desde sus propiedades fisicoquímicas como de su integridad biológica mediante diferentes metodologías analíticas.
- Se recomienda buscar una metodología que permita conocer la cantidad de estabilizante adsorbida en la superficie de las micropartículas formadas.

9. Anexos

9.1 Anexo A: Estado del arte de los sistemas híbridos lipopoliméricos desarrollados por diferentes metodologías en los últimos años y sus aplicaciones

Tabla 9-1: Sistemas híbridos lipopoliméricos desarrollados en los últimos años con sus características y aplicaciones

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Doble emulsión evaporación del solvente	Lisozima	PCL	SPC/Tripalm itato de Glicerilo	58,04-2009 nm	5,81-60,32	-	(100)
Doble emulsión evaporación del solvente	Lisozima	PLGA	Trilaurina, tripalmitina, tibeheneato, captex 300, ácido caprilico, monoestearato de glicerol	12,17-24,15 µm	12,61 - 62,67	-	(101)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Sonicación	Erlotinib	PCL	Fosfatidilcolina de soya hidrogenada/ 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000]	159,6-173,0 nm	18,1-66,4	Cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado	(99)
Difusión de solvente modificada por una emulsificación espontánea (SESD)	Rapamicina/Propolis	PLGA	DOPC, DOTAP, DOPC:DOTAP, DOPC:DOTAP:DSPE-PEG	174-224 nm	57-84	Stent liberador de fármacos	(102)
Nano precipitación	Rapamicina	PLGA	DSPE-PEG2000-Mal, DSPE-PEG2000	129,1 nm	63,70	Hemangioma	(103)
Doble emulsión evaporación del solvente	Zidovudina	Gelatina	Ácido esteárico, Gliceril beheneato	526-715 nm	52,7-89,5	VIH	(104)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Emulsión evaporación del solvente	Proteína de fusión recombinante CTH522	PLGA/Quitosano-Glicol	bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDA), Trealosa-6,6'-dibeheneato (TDB)	220-227,5 nm	41.5 ± 6.8	Vacuna para administración por mucosa	(105)
Diálisis	Doxorrubicina	PAE(-ss-mPEG)-g-Col	PEG-DSPE	88,7-136,1 nm	50,2-55,4	Cáncer	(106)
Gelación iónica	Luteína	Quitosano/Alginato de Sodio	Ácido oleico	40-160nm	-	Retinopatía, degeneración macular	(107)
Nano precipitación	Ácido fólico/Quercetina	PLGA	Lecitina de soya, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)]	136.11 ± 12.4 y 176 ± 34.65 nm	78,23	Cáncer de mama	(108)
Doble emulsión evaporación del solvente	siRNA	PLGA	DOTAP, lipoid 5	180-250nm	50-90	EPOC	(109)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Doble emulsión evaporación del solvente	Budesonida	PLGA	DOTAP	150nm	36	EPOC	(110)
Nano precipitación	Rifampicina	Gantrez®A N-119	Monoestearato de glicerilo	300-400 nm	52,6-95,2	Tuberculosis	(111)
Nano precipitación	Metotrexato	PLGA	Fosfatidilcolina de soya	176-308 nm	76,7-82,4	Cáncer	(112)
Nano precipitación/Emulsión simple	Colesterol	PLGA	Colesterol	190-330 nm	N/A	Enfermedad de Huntington	(113)
Nano precipitación-autoensamblaje	Enoxaparina	Quitosano	Mono oleato de glicerilo	295,9-306,1 nm	84,76 - 85,42	Desordenes vasculares	(37)
Doble emulsión evaporación del solvente	Hidrocloruro de Gemcitabina	PLGA	SPC,DSPE-PEG	237 nm	45,20	Cáncer	(114)
Nano precipitación	Cisplatino, Curcumina	PLGA	DSPE-PEG,colesterol	91,6-163,4 nm	81,5-89,5	Cáncer cervical	(115)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Evaporación del solvente	Cisplatino	PLA	Triglicérido caprilico/Caprico, lecitina	141,2 nm	>80	Carcinoma de ovario	(116)
Nano precipitación-autoensamblaje	Bupivacaina	PLGA	Lecitina, DSPE-PEG 2000	175 nm	89,20	Analgesia	(117)
Nano precipitación	Ácido salvanólico o B, Panax notoginse nosido	PLGA	Lecitina de soya, DSPE-PEG 2000-NH2-RGD	100-200 nm	89,1-91,2	Isquemia aguda de miocardio	(118)
Nano precipitación	Docetaxel, Resveratrol	PLA-PEG	Ácido esteárico	150,5-191,5 nm	88,3-94,1	Cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado	(119)
Emulsión evaporación del solvente	Gefitinib	PLGA	Ácido fólico-PEG-DSPE, DLPC	150nm	90,8-92,3	Carcinoma nasofaríngeo avanzado	(120)
Nanoprecipitación	Afatinib	PLGA	Colesterol-PEG-SS-Transferrina, lecitina	103.5 ± 4.1 nm	90	Cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado	(121)
Sonicación/Evaporación del solvente	Erlotinib, bevacizumab	PCL	SPC, HA-ADH-PEG	100-120 nm	80,8-85,3	Cáncer de pulmón avanzado	(122)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Homogenización caliente a alta presión, ultrasonificación	Vancomicina	Eudragit RS100	Gliceril tripalmitato	202,5-250,9 nm	27,8-69,3	Infecciones bacterianas	(123)
Emulsión evaporación del solvente	RNAi	PEI	Tripalmitina, trioleína, DSPC, DSPE-PEG, DSPE-PEG-maleimida, DSPE-PEG-EGF	108-125nm	-	Cáncer	(124)
Emulsión evaporación del solvente	Metotrexato	PLGA	ácido esteárico-octarginina-ácido fólico, PC de huevo	100-150nm	-	Artritis reumatoidea	(125)
Doble emulsión evaporación del solvente	siRNA	PLGA	Lipidoide L5	210 nm	93.3 ± 5.7	Artritis reumatoidea	(126)
Secado por aspersión	Leuprolide	PLGA	Gliceril tribeheneato, gliceril triestearato, SPC	4-10 µm	67,8-100	Cáncer de próstata avanzado	(127)
Nanoprecipitación	Doxorubicina, Sorafenib	PLGA	MAL-PEG-DSPE, SP de huevo	116,8-126.3 nm	68,3-91,6	Carcinoma hepatocelular	(128)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Nanoprecipitación	Metotrexato	PCL	Phospholipon S100-L-fucosa, D-manosa, and D-galactosa	102,5-154,5 nm	81,1-89,62	Cáncer de mama	(91)
Nanoprecipitación	Curcumina	PLGA, Vitamina B12-Quitosa, poli(N-(2-hidroxipropil) metacrilamida)	DSPE-PEG, SPC	70,2-135,1 nm	-	Cáncer	(129)
Doble emulsión evaporación del solvente	Insulina	PLGA, PEG	Lecitina de soya, trimiristina	240nm	50	Diabetes	(130)
Emulsión-Ultrasonificación	Dapsona	HPMC	Gliceril monoesterato, isopropil miristato	277 nm	75,81	Acné	(131)
Emulsión evaporación del solvente	Carbamazepina	Quitosa	Ácido esteárico, gliceril monoestearato	78.88-790nm	62.66 - 88.31	Epilepsia	(132)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Nanoprecipitación	Doxorubicina	PLGA	Lecitina	178-197 nm	-	Cáncer	(133)
Nanoprecipitación	Doxorubicina	PLGA	Lecitina, DSPE-PEG 2000	173-208 nm	17,8-59,8	Cáncer de mama	(134)
Nanoprecipitación	mRNA	PLGA,PLA	DOPE, DMG-PEG2000, colesterol, lípido TT3	100-250 nm	80-90	Vacunas, cáncer, terapia de reemplazo de proteínas y edición del genoma	(135)
Emulsión evaporación del solvente	Astaxantina	mPEG-PLA	DMPC	90,76-132,28 nm	~50	Ototoxicidad generada por quimioterapia	(136)
Emulsión evaporación del solvente	Docetaxel, fingolimod	PLGA	PC,18:0 PEG2000 PE, Colesterol	88,4-141,5 nm	10-70	Cáncer de próstata metastásico	(137)
Nanoprecipitación	β -Sitosterol	PLGA	DSPE-PEG2000	181,5 nm	94,42	Hepatoprotección	(138)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Emulsión evaporación del solvente	JQ1, Disulfiram, Ingenol-3-angelato,p rotratin,pa nobinostat	PLGA	Colesterol butirato, DOTAP	164,6-219,3 nm	21,1-93,3	VIH	(139)
Emulsión evaporación del solvente	Metotrexato, Aceclofenac	PCL	DSPE-PEG (2000)-NH ₂ , Gelucire 48/16, phospholipid S100, Fucosa	150 nm	85-90	Cáncer de mama	(140)
Emulsión evaporación del solvente	Lidocaína	Quitosano	DLPC,colesterol,DSPE-PEG2000,HA	88,6 nm	85,20	Anestesia local	(141)
Nanoprecipitación	Cabazitaxel	PLGA	BN-PEG-DSPE, DSPE-PEG	184,9 nm	89,6-90,3	Cáncer de próstata	(142)
Doble emulsión evaporación del solvente	miR-21, pemetrexed	PCL,PLGA	L-alfa-fosfatidilcolina:trimiristina	91,3-216,0 nm	14,5-82,1	Glioblastoma multiforme	(143)
Nanoprecipitación	Doxorubicina, ácido gálico	PCL	NH ₂ -PEG3400-DSPE, HA, Lecitina	131,2-165,7 nm	84,7-88,9	Leucemia mieloide aguda	(144)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Nanoprecipitación	Carboplatino, paclitaxel	PCL	FA-PEG-HZ-GO, lecitina de soya	121,3-171,3 nm	80,9-84,2	Cáncer cervical	(145)
Nanoprecipitación	Salinomicina	PLGA	DSPE-PEG2000-Mal, lecitina de soya	95 nm	63	Osteosarcoma	(146)
Nanoprecipitación	isoliquiritigenina	PLGA	DSPE-PEG2000-Mal-iRGD, lecitina de soya	137,2nm	90,40	Cáncer de mama	(147)
Gelación iónica	Cisplatino	Quitosano	Lipoid S75	181-218nm	83,2-89,4	Cáncer	(148)
Emulsión difusión del solvente, secado por aspersión	Insulina	PLGA, Eudragit® FS 30D	Oleato de sodio	213 nm-5µm	94,60	Diabetes	(149)
Nanoprecipitación	Rodamina 6G, paclitaxel	PLGA	Gadolinio-PEG-DSPE	65-110 nm	-	Cáncer	(150)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Nanoprecipitación	Doxorubicina	PLGA, mPEG-S-S-C	Lecitina, Gd-DTPA-BC16, DSPE-PEG2000-Folato	122,6nm	76,30	Diagnóstico y tratamiento de cáncer	(151)
Nanoprecipitación	Salinomicina	PLGA	Lecitina de soya, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG-Mal, CFPE	123,2-135,6 nm	55,4-59,2	Cáncer de mama	(152)
Diálisis	Doxorubicina, triptolide	PLGA, mPEG-S-S-C16	Lecitina de soya	108-120 nm	58,3-80,2	Cáncer	(153)
Nanoprecipitación	Doxorubicina	PBAE-ss-mPEG	DSPE-mPEG	95,3-130,7 nm	40,2-79,4	Cáncer	(154)
Doble emulsión evaporación del solvente	BSA	PLGA	Colesterol, DOTAP, DSPE-PEG2000-NH2	144 nm	80-96	-	(155)
Doble emulsión evaporación del solvente, método de dos pasos	KLH	PLGA	DOTAP, DOPC, CHEMS, DOPE, DSPE-PEG2000, NBD PE	120,1-127,5 nm	-	Vacuna	(156)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Nanoprecipitación	Docetaxel	PLGA	DSPE-PEG2000	25nm	-	Cáncer	(157)
Doble emulsión evaporación del solvente, método de dos pasos	KLH	PLGA	DOTAP, DSPE-PEG 2000-Nicotina	232-260 nm	-	Adicción a nicotina	(158)
Emulsión evaporación del solvente	Etravirina, azidotimidina, BSA, Ovalbumina, plásmido EGFP	PLGA	DOPC, MPB	115,7-1000nm	1,23-90,3	-	(159)
Emulsión evaporación del solvente	Salinomicina	PLGA	DSPE-PEG-Mal, PEG-P, C, Col	125,6-139,9 nm	74,2-76,3	Cáncer de próstata	(160)
Doble emulsión evaporación del solvente	Isoniazida, Ciprofloxacino	PLGA	Lecitina de soya, DSPE-PEG2000	111,81-172,23 nm	63,64 - 68,49	Tuberculosis (161)	(161)
Nanoprecipitación	Silimarina	Quitosano	DSPE-PEG2000	125,8-286,5nm	97,05 - 97,39	Enfermedad del hígado graso no alcohólico	(162)

Método	Molécula Activa	Polímero	Lípido	Tamaño de partícula	E.E %	Aplicación	Ref.
Doble emulsión evaporación del solvente	mRNA	PLGA	DOTMA	217,5-322,2 nm	87,0-92,8	Vacunas	(163)
Emulsión evaporación del solvente	Paclitaxel	Mal-PEG2000-NHS	lecitina	180-195 nm	83,18 - 86,04	Cáncer	(164)
Nanoprecipitación	Rutina	PLGA	Lecitina, SPC	203-272,5nm	64,32 - 74,23	Alzheimer	(165)
Nanoprecipitación/Autoensamblaje	Docetaxel, curcumina	PLGA	Lecitina, DSPE-PEG	169,6 nm	81,9-89,8	Cáncer de próstata	(166)
Emulsión evaporación del solvente	Hidrocloruro de Vardenafil	Gantrez®A N-119	PGDS, gliceril triestearato	622,5 nm	62,80	Disfunción eréctil	(167)
Doble emulsión evaporación del solvente	Ácido fusídico	Quitosano	Gellucire®, alcohol cetílico	310,56 nm	78,56	Infecciones por SARM	(168)

9.2 Anexo B: Aspectos evaluados en ensayos preliminares para la obtención de los SEF desarrollados

Tabla 9-2: Aspectos evaluados en ensayos preliminares para la implementación de la metodología, obtención y caracterización de las micropartículas poliméricas

Aspecto evaluado	
Tipo de PLGA	50:50;75:25
Concentración de PLGA (F.O)	25%,50%,100%
Proporción de fases en la formación de la primera emulsión W ₁ /O	10:1, 10:2
Forma de adición del estabilizante (W ₂)	Adición total, Adición 3mL y luego 7mL, Adición de 1mL en 1mL.
Concentración del estabilizante (W ₂)	5%, 2,5%, 1%
Tiempo de homogenización en Ultrasonido	30s, 60s
Amplitud en ultrasonido	60%, 100%
Velocidad de homogenización en Ultraturrax	10000 rpm, 20000 rpm
Tiempo de evaporación del solvente	60 min, 90 min
Equipo usado para la determinación de tamaño	Master Sizer 3000, Zeta Sizer Nano Zs
Momento de análisis del tamaño de partícula	Recién obtenidas (Final evaporación), Antes de congelar para liofilizar y liofilizadas
Eficiencia de encapsulación	Tiempo de digestión del polímero, Ajuste del pH y curva de calibración

Tabla 9-3: Aspectos evaluados en ensayos preliminares para la implementación de la metodología, obtención y caracterización de las partículas sólidas lipídicas.

Aspecto evaluado	
Tipo de lípido	Novata BD PH, Novata B PH, Novata BC PH
Uso de lípidos y fosfolípidos en la F.O	Novata BD PH: Lipoid S100 (9:1), (7:3), (5:5)
Tipo de solvente en la fase acuosa W ₁	Agua D.I. y Buffer PBS (Fosfato 0,1M-NaCl 0,15M, pH:7,4)
Tipo de estabilizante y concentración	PVA(2,5%,5%), Poloxamer (1%;0,5%,0,25%), Sin estabilizante (Agua)
Volumen de la fase externa acuosa W ₂	10mL, 15 mL, 4mL
Orden de adición de la fase externa acuosa W ₂	De 1 mL en un 1mL, verter la emulsión 1 (W ₁ /O) en el poloxamer
Adición de IPA	(10mL, 5mL, 0mL)
Condiciones del proceso de lavado	Cincrotrones, filtración al vacío, centrifuga (Cantidad de lavados 1, 2 ,3)
Tiempo de homogenización en Ultrasonido	60 s,30 s
Tiempo de homogenización en Ultraturrax	5 min, 2:30 min
Condiciones del proceso de evaporación del solvente	Agitación magnética y uso de centrivap
Adición de crioprotectores	Fructosa y Maltosa
Condiciones eficiencia de encapsulación	Proporción de fases acuosa y orgánica para la extracción líquido – líquido,

Tabla 9-4: Aspectos evaluados en ensayos preliminares para la implementación de la metodología, obtención y caracterización de las micropartículas lipopoliméricas

Aspecto evaluado	
Estabilizante usado en la fase externa acuosa W_2	PVA (5%) y Poloxamer (0,5%)
Orden de adición de la fase externa acuosa W_2	De 1 mL en un 1mL, verter la emulsión 1 (W_1/O) en el poloxamer
Tiempo de homogenización en ultrasonido	60 s, 30 s
Proporción Polímero – Lípido	(7:3),(5:5),(3:7),(6:4),(2:8),(1:9)

10. Bibliografía

1. Lau JL, Dunn MK. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2018;26(10):2700–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>
2. Sachdeva S. Peptides as ‘ Drugs ’: The Journey so Far. *Int J Pept Res Ther*. 2016;(May).
3. Peptides C. Derek N. Woolfson 1,2 1 2. 2009;94(1):118–27.
4. Grant GA. *Synthetic peptides : a user’s guide*. 2nd ed. Grant GA, editor. New York: Oxford Univesity Press; 2002.
5. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M. *Synthetic therapeutic peptides : science and market*. 2010;15(January).
6. Zhang J, Desale SS, Bronich TK. Polymer-based vehicles for therapeutic peptide delivery. *Ther Deliv*. 2015;6(11):1279–96.
7. Couvreur P, Puisieux F. Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev*. 1993;10(2–3):141–62.
8. Bruschi M. Modification of drug release. *Strateg to Modify Drug Release from Pharm Syst*. 2015;15–28.
9. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. *Nanoparticles in Medicine : Therapeutic Applications and Developments*. 2008;83(5):761–9.
10. Davis ME, Chen ZG, Shin DM. Nanoparticle therapeutics : an emerging treatment modality for cancer. 2008;7(SEPTEmBER):771–82.
11. Devrim B, Kara A, Vural İ, Bozkır A. Lysozyme-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: preparation, characterization and colloidal stability evaluation. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016;42(11):1865–76.
12. Zhang L, Granick S. How to Stabilize Phospholipid Liposomes (Using Nanoparticles). 2006;0–4.
13. Zhang L, Zhang LF. *Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles: Synthesis,*

- Characterization and Applications. *Nano Life*. 2010;01(01n02):163–73.
14. Garud A, Singh D, Garud N. Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications. *Int Curr Pharm J*. 2012;1(11):384–93.
 15. Ansari MJ, Anwer MK, Jamil S, Al-Shdefat R, Ali BE, Ahmad MM, et al. Enhanced oral bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles: pharmacokinetic bioavailability of insulin-loaded solid lipid nanoparticles in diabetic rats. *Drug Deliv [Internet]*. 2016;23(6):1972–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/10717544.2015.1039666>
 16. Chan JM, Zhang L, Yuet KP, Liao G, Rhee J, Langer R, et al. Biomaterials PLGA – lecithin – PEG core – shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials [Internet]*. 2009;30(8):1627–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.013>
 17. Thevenot J, Troutier A, David L, Delair T, Pascal B. Steric Stabilization of Lipid / Polymer Particle Assemblies by Poly (ethylene glycol) -Lipids. 2007;3651–60.
 18. Grigoras AG. Polymer-lipid hybrid systems used as carriers for insulin delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med [Internet]*. 2017;13(8):2425–37. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.08.005>
 19. Walton HF. General considerations. *Ligand Exch Chromatogr*. 2018;7–30.
 20. Ito Y. Drug delivery systems. *Photochemistry for Biomedical Applications: From Device Fabrication to Diagnosis and Therapy*. 2018. 231–275 p.
 21. Nastruzzi C. Lipospheres in drug targets and delivery. 2005.
 22. Manjunath K, Reddy JS, Venkateswarlu V. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods Find Exp Clin Pharmacol [Internet]*. 2005;27(2):127. Available from: http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=6&p_RefId=876286&p_IsPs=N
 23. Matougui N, Boge L, Groo AC, Umerska A, Ringstad L, Bysell H, et al. Lipid-based nanoformulations for peptide delivery. *Int J Pharm [Internet]*. 2016;502(1–2):80–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.019>
 24. Shukla T, Upmanyu N, Pandey SP, Gosh D. Chapter 1. Lipid nanocarriers [Internet]. *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*. Elsevier Inc.; 2018. 1–48 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813687-4.00001-3>
 25. Rawal SU, Patel MM. Chapter 2. Lipid nanoparticulate systems: Modern versatile drug carriers [Internet]. *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*. Elsevier Inc.; 2018. 49–138 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813687-4.00002-5>

26. Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, Milani M, Nasrabadi HT, Joo SW, et al. Dendrimers: Synthesis, applications, and properties. Vol. 9, *Nanoscale Research Letters*. Springer New York LLC; 2014. p. 1–10.
27. Jyothi NVN, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul*. 2010;27(3):187–97.
28. Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release. *Int J Pharm*. 2004;282(1–2):1–18.
29. Zhang F, Fan J bing, Wang S. Interfacial Polymerization: From Chemistry to Functional Materials. *Angew Chemie - Int Ed*. 2020;59(49):21840–56.
30. Kwak H-S. *Nano- and Microencapsulation*. 2014.
31. JONG; H. G. BDHRK. Coacervation (Partial miscibility in colloid systems). (Preliminary Communication). 1929; Available from: <https://www.dwc.knaw.nl/DL/publications/PU00015781.pdf>
32. Ghosh SK. Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective. *Funct Coatings By Polym Microencapsul*. 2006;1–28.
33. Zuidam NJ, Nedović VA. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. *Encapsulation Technol Act Food Ingredients Food Process*. 2010;1–400.
34. Freitas S, Merkle HP, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release [Internet]*. 2005 Feb;102(2):313–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365904004845>
35. Hallan SS, Kaur P, Kaur V, Mishra N, Vaidya B. Lipid polymer hybrid as emerging tool in nanocarriers for oral drug delivery. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol*. 2016;44(1):334–49.
36. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *Eur J Pharm Biopharm [Internet]*. 2013;85(3 PART A):427–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.002>
37. Dong W, Wang X, Liu C, Zhang X, Zhang X, Chen X, et al. Chitosan based polymer-lipid hybrid nanoparticles for oral delivery of enoxaparin. *Int J Pharm [Internet]*. 2018;547(1–2):499–505. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.076>

38. Sengel-Turk CT, Gumustas M, Uslu B, Ozkan SA. A novel approach for drug targeting: Core-shell type lipid-polymer hybrid nanocarriers. Core-shell type lipid-polymer hybrid nanocarriers. [Internet]. Design of Nanostructures for Theranostics Applications. Elsevier Inc.; 2018. 69–107 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813669-0.00003-8>
39. Jain A, Jain A, Gulbake A, Shilpi S, Hurkat P, Jain SK. Peptide and Protein Delivery Using New Drug Delivery Systems. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2013;30(4):293–329.
40. McClements DJ. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. Adv Colloid Interface Sci [Internet]. 2018;253(2017):1–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.02.002>
41. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2006;2(2):53–65.
42. Kovalainen M, Mönkäre J, Riikonen J, Pesonen U, Vlasova M, Salonen J. Novel Delivery Systems for Improving the Clinical Use of Peptides. 2015;(July):541–61.
43. Patarroyo ME, Romero P, Torres ML, Clavijo P, Moreno A, Martínez A, et al. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. Nature. 1988;328(6131):629–32.
44. Lozano JM, Patarroyo ME. A rational strategy for a malarial vaccine development. Microbes Infect. 2007;9(6):751–60.
45. McClements DJ. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. Adv Colloid Interface Sci [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2020 Mar 20];253:1–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868617305171>
46. Bolhassani A. Improvements in chemical carriers of proteins and peptides. 2019;43:437–52.
47. Gasco AR. Biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for malaria synthetic peptide SPf66. 2001;19:4445–51.
48. Dave V, Tak K, Sohgaurya A, Gupta A, Sadhu V. Lipid-polymer hybrid nanoparticles : Synthesis strategies and biomedical applications. J Microbiol Methods [Internet]. 2019;160(March):130–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.017>
49. Samad A, Tariq M, Alam MI, Akhter MS. Microsphere: A novel drug delivery system.

- Colloids Drug Deliv. 2016;11(4):455–78.
50. Acar H, Ting JM, Srivastava S, LaBelle JL, Tirrell M V. Molecular engineering solutions for therapeutic peptide delivery. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2017;46(21):6553–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7CS00536A>
 51. Blasi P. Poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles: an overview. *J Pharm Investig* [Internet]. 2019;49(4):337–46. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40005-019-00453-z>
 52. Hajavi J, Ebrahimian M, Sankian M, Khakzad MR, Hashemi M. Optimization of PLGA formulation containing protein or peptide-based antigen: Recent advances. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2018;106(9):2540–51.
 53. Qi F, Wu J, Li H, Ma G. Recent research and development of PLGA/PLA microspheres/nanoparticles: A review in scientific and industrial aspects. *Front Chem Sci Eng*. 2019;13(1):14–27.
 54. Schoubben A, Ricci M, Giovagnoli S. Meeting the unmet: from traditional to cutting-edge techniques for poly lactide and poly lactide-co-glycolide microparticle manufacturing. *J Pharm Investig* [Internet]. 2019;49(4):381–404. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40005-019-00446-y>
 55. Zhong H, Chan G, Hu Y, Hu H, Ouyang D. A comprehensive map of FDA-approved pharmaceutical products. *Pharmaceutics*. 2018;10(4):1–19.
 56. Jain A, Kunduru KR, Basu A, Mizrahi B, Domb AJ, Khan W. Injectable formulations of poly(lactic acid) and its copolymers in clinical use. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016;107:213–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.07.002>
 57. Igartua M, Hernández RM, Rosas JE, Patarroyo ME, Pedraz JL. γ -Irradiation effects on biopharmaceutical properties of PLGA microspheres loaded with SPf66 synthetic vaccine. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2020 Jan 23];69(2):519–26. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641107004201?via%3Dihub>
 58. Carcaboso A., Hernández R., Igartua M, Rosas J., Patarroyo M., Pedraz J. Potent, long lasting systemic antibody levels and mixed Th1/Th2 immune response after nasal immunization with malaria antigen loaded PLGA microparticles. *Vaccine* [Internet]. 2004 Mar 29 [cited 2020 Jan 23];22(11–12):1423–32. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X03007679?via%3Dihub>
 59. 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;22(3):231–41.
60. D'Souza SS, Faraj JA, DeLuca PP. A Model-dependent Approach to Correlate Accelerated With Real-Time Release From Biodegradable Microspheres. *AAPS PharmSciTech*. 2005;6(4):553–64.
 61. Martinez NY, Andrade PF, Durán N, Cavalitto S. Development of double emulsion nanoparticles for the encapsulation of bovine serum albumin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2017;158:190–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.033>
 62. Agrawal A, Rellegadla S, Jain S. Biomedical applications of PLGA particles [Internet]. *Materials for Biomedical Engineering: Nanomaterials-based Drug Delivery*. Elsevier Inc.; 2019. 87–129 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816913-1.00004-0>
 63. Note T. Measuring Zeta Potential – Laser Doppler Electrophoresis. *Malvern Guid*. 2015;1–2.
 64. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release* [Internet]. 2016 Aug 10 [cited 2020 Apr 7];235:337–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365916303832?via%3Dihub>
 65. Agrawal A, Rellegadla S, Jain S. Biomedical applications of PLGA particles. *Mater Biomed Eng* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2020 Mar 20];87–129. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128169131000040>
 66. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release*. 2008;125(3):193–209.
 67. Saez, Vivian; Hernández, José R; Peniche C. Microspheres as delivery systems for the controlled release of peptides and proteins. *Biotechnol Apl*. 2007;24(2):108–16.
 68. Busatto C, Pessoa J, Helbling I, Luna J, Estenoz D. Effect of particle size, polydispersity and polymer degradation on progesterone release from PLGA microparticles: Experimental and mathematical modeling. *Int J Pharm* [Internet]. 2018;536(1):360–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.006>
 69. Giteau A, Venier-julienne MC, Benoit JP. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles ? 2008;350:14–26.

70. 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* [Internet]. 2011;415(1–2):34–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>
71. Gohla S, Ma K, Mu RH. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. 2000;50.
72. Gallarate M, Battaglia L, Peira E, Trotta M. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles prepared through coacervation technique. *Int J Chem Eng*. 2011;2011.
73. Battaglia L, Trotta M, Gallarate M, Carlotti ME, Zara GP, Bargoni A. Solid lipid nanoparticles formed by solvent-in-water emulsion-diffusion technique: Development and influence on insulin stability. *J Microencapsul*. 2007;24(7):672–84.
74. Bakliwal A, Bedse S, Talele S, Chaudhari G. LIOSPHERES: A NOVEL APPROACH FOR DRUG DELIVERY. *Int J Res Pharm Nano Sci*. 2015;4(5):298–306.
75. Cortesi R, Esposito E, Luca G, Nastruzzi C. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials*. 2002;23(11):2283–94.
76. Patil P, Harak K, Saudagar R. Solid Lipid Nanoparticles : A Review. 2019;9(3):525–30.
77. Mishra H, Mishra D, Mishra PK, Nahar M, Dubey V, Jain NK. Evaluation of solid lipid nanoparticles as carriers for delivery of hepatitis b surface antigen for vaccination using subcutaneous route. *J Pharm Pharm Sci*. 2010;13(4):495–509.
78. Reithmeier H, Herrmann J, Göpferich A. Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin. *Int J Pharm*. 2001;218(1–2):133–43.
79. KH R, SA S, SN D. Solid lipid nanoparticles- A review. *Int J Appl Pharm*. 2013;5(2):8–18.
80. Patel MR, San Martin-Gonzalez MF. Characterization of ergocalciferol loaded solid lipid nanoparticles. *J Food Sci*. 2012;77(1):8–13.
81. Prombutara P, Kulwatthanasal Y, Supaka N, Sramala I, Chareonpornwattana S. Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. *Food Control* [Internet]. 2012;24(1–2):184–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.025>
82. Pinho S. Viability of the microencapsulation of a casein hydrolysate in lipid microparticles of cupuacu butter and stearic acid. *Int J Food Stud*. 2013;2(1):48–59.

-
83. Health N and. Novata® BD PH: Product data sheet [Internet]. [cited 2020 Apr 16]. Available from: [https://e-applications.basf-ag.de/data/basf-pcan/pds2/pds2-web.nsf/CA7971BA2D4E244AC12573B100597C04/\\$File/NOVATA_r__BD_PH_E.pdf](https://e-applications.basf-ag.de/data/basf-pcan/pds2/pds2-web.nsf/CA7971BA2D4E244AC12573B100597C04/$File/NOVATA_r__BD_PH_E.pdf)
 84. Reithmeier H, Herrmann J, Gopferich A. Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. 2001;73:339–50.
 85. Qi C, Chen Y, Huang J, Jin Q. Preparation and characterization of catalase-loaded solid lipid nanoparticles based on soybean phosphatidylcholine. 2012;(February 2011):787–93.
 86. Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(6):478–90.
 87. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012;64(SUPPL.):83–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.021>
 88. Gordillo-Galeano A, Ponce A, Mora-Huertas CE. Surface structural characteristics of some colloidal lipid systems used in pharmaceuticals. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2021;62(January):102345. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102345>
 89. Alexandridis P, Holzwarth JF, Hatton TA. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules.* 1994;27(9):2414–25.
 90. Mandal B, Bhattacharjee H, Mittal N, Sah H, Balabathula P, Thoma LA, et al. Core – shell-type lipid – polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2013;9(4):474–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2012.11.010>
 91. Garg NK, Singh B, Kushwah V, Tyagi RK, Sharma R, Jain S, et al. The ligand (s) anchored lipobrid nanoconstruct mediated delivery of methotrexate: An effective approach in breast cancer therapeutics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2016;12(7):2043–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.05.008>
 92. Mukherjee A, Waters AK, Kalyan P, Achrol AS, Kesari S, Yenugonda VM. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next generation drug delivery platform: State of the art, emerging technologies, and perspectives. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:1937–52.
 93. Chaudhary Z, Ahmed N, .ur.Rehman A, Khan GM. Lipid polymer hybrid carrier

- systems for cancer targeting: A review. *Int J Polym Mater Polym Biomater* [Internet]. 2018;67(2):86–100. Available from: <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1300900>
94. Garg NK, Tandel N, Jadon RS, Tyagi RK, Katare OP. Lipid–polymer hybrid nanocarrier-mediated cancer therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today* [Internet]. 2018;23(9):1610–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.05.033>
 95. Beija M, Salvayre R, Viguerie NL, Marty J. Colloidal systems for drug delivery : from design to therapy. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2012;30(9):485–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.04.008>
 96. Wong HL, Rauth AM, Bendayan R, Manias JL, Ramaswamy M, Liu Z, et al. Research Paper A New Polymer Y Lipid Hybrid Nanoparticle System Increases Cytotoxicity of Doxorubicin Against Multidrug-Resistant Human Breast Cancer Cells. 2006;23(7):1574–85.
 97. Wong HL, Bendayan R, Mike A, Yu X. Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer. 2006;116:275–84.
 98. Li Y, Lun H, Shuhendler AJ, Rauth AM, Yu X. Molecular interactions , internal structure and drug release kinetics of rationally developed polymer – lipid hybrid nanoparticles. 2008;128:60–70.
 99. Mandal B, Mittal NK, Balabathula P, Thoma LA, Wood GC. Development and in vitro evaluation of core-shell type lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2016;81:162–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.021>
 100. Devrim B, Kara A, Vural İ, Bozkır A. Lysozyme-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: preparation, characterization and colloidal stability evaluation. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016;42(11):1865–76.
 101. Wu C, Baldursdottir S, Yang M, Mu H. Lipid and PLGA hybrid microparticles as carriers for protein delivery. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2018;43:65–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.09.006>
 102. Bose RJC, Lee SH, Park H. Lipid polymer hybrid nanospheres encapsulating antiproliferative agents for stent applications. *J Ind Eng Chem* [Internet]. 2016;36:284–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.02.015>
 103. Li H, Teng Y, Sun J, Liu J. Inhibition of hemangioma growth using polymer–lipid hybrid nanoparticles for delivery of rapamycin. *Biomed Pharmacother* [Internet].

- 2017;95:875–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.035>
104. K.S. J, Snigdha SS, Kalarikkal N, Pothen LA, Thomas S. Gelatin modified lipid nanoparticles for anti- viral drug delivery. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2017;207:24–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.07.002>
 105. Rose F, Wern JE, Gavins F, Andersen P, Follmann F, Foged C. A strong adjuvant based on glycol-chitosan-coated lipid-polymer hybrid nanoparticles potentiates mucosal immune responses against the recombinant *Chlamydia trachomatis* fusion antigen CTH522. *J Control Release* [Internet]. 2018;271(December 2017):88–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.003>
 106. Li J, Ma YJ, Wang Y, Chen BZ, Guo XD, Zhang CY. Dual redox/pH-responsive hybrid polymer-lipid composites: Synthesis, preparation, characterization and application in drug delivery with enhanced therapeutic efficacy. *Chem Eng J* [Internet]. 2018;341(November 2017):450–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.02.055>
 107. Toragall V, Jayapala N, Vallikannan B. Chitosan-oleic acid-sodium alginate a hybrid nanocarrier as an efficient delivery system for enhancement of lutein stability and bioavailability. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;150:578–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.104>
 108. Patel G, Thakur NS, Kushwah V, Patil MD, Nile SH, Jain S, et al. Mycophenolate co-administration with quercetin via lipid-polymer hybrid nanoparticles for enhanced breast cancer management. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2020;24:102147. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102147>
 109. Thanki K, van Eetvelde D, Geyer A, Fraire J, Hendrix R, Van Eygen H, et al. Mechanistic profiling of the release kinetics of siRNA from lipidoid-polymer hybrid nanoparticles in vitro and in vivo after pulmonary administration. *J Control Release* [Internet]. 2019;310(August):82–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.004>
 110. Leng D, Thanki K, Fattal E, Foged C, Yang M. Engineering of budesonide-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles using a quality-by-design approach. *Int J Pharm* [Internet]. 2018;548(2):740–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.094>
 111. Bachhav SS, Dighe VD, Kotak D, Devarajan P V. Rifampicin Lipid-Polymer hybrid nanoparticles (LIPOMER) for enhanced Peyer's patch uptake. *Int J Pharm* [Internet]. 2017;532(1):612–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.040>
 112. Tahir N, Madni A, Balasubramanian V, Rehman M, Correia A, Kashif PM, et al. Development and optimization of methotrexate-loaded lipid-polymer hybrid

- nanoparticles for controlled drug delivery applications. *Int J Pharm* [Internet]. 2017;533(1):156–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.061>
113. Belletti D, Grabrucker AM, Pederzoli F, Menerath I, Vandelli MA, Tosi G, et al. Hybrid nanoparticles as a new technological approach to enhance the delivery of cholesterol into the brain. *Int J Pharm*. 2018;543(1–2):300–10.
114. Yalcin TE, Ilbasimis-Tamer S, Takka S. Development and characterization of gemcitabine hydrochloride loaded lipid polymer hybrid nanoparticles (LPHNs) using central composite design. *Int J Pharm* [Internet]. 2018;548(1):255–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.063>
115. Li C, Ge X, Wang L. Construction and comparison of different nanocarriers for co-delivery of cisplatin and curcumin: A synergistic combination nanotherapy for cervical cancer. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017;86(27):628–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.042>
116. Zhang Y, Zhang P, Zhu T. Ovarian carcinoma biological nanotherapy: Comparison of the advantages and drawbacks of lipid, polymeric, and hybrid nanoparticles for cisplatin delivery. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019;109(1):475–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.158>
117. Ma P, Li T, Xing H, Wang S, Sun Y, Sheng X, et al. Local anesthetic effects of bupivacaine loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017;89(October 2011):689–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.175>
118. Qiu J, Cai G, Liu X, Ma D. $\alpha\beta3$ integrin receptor specific peptide modified, salvianolic acid B and panax notoginsenoside loaded nanomedicine for the combination therapy of acute myocardial ischemia. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2017;96(89):1418–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.086>
119. Song Z, Shi Y, Han Q, Dai G. Endothelial growth factor receptor-targeted and reactive oxygen species-responsive lung cancer therapy by docetaxel and resveratrol encapsulated lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018;105(28):18–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.095>
120. Yugui F, Wang H, Sun D, Zhang X. Nasopharyngeal cancer combination chemoradiation therapy based on folic acid modified, gefitinib and yttrium 90 co-loaded, core-shell structured lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Biomed Pharmacother*. 2019;114(27):0–6.
121. Wang J, Su G, Yin X, Luo J, Gu R, Wang S, et al. Non-small cell lung cancer-

- targeted, redox-sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of a second-generation irreversible epidermal growth factor inhibitor—Afatinib: In vitro and in vivo evaluation. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019;120(September):109493. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109493>
122. Pang J, Xing H, Sun Y, Feng S, Wang S. Non-small cell lung cancer combination therapy: Hyaluronic acid modified, epidermal growth factor receptor targeted, pH sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib plus bevacizumab. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020;125(December 2019):109861. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109861>
123. Seedat N, Kalhapure RS, Mocktar C, Vepuri S, Jadhav M, Soliman M, et al. Co-encapsulation of multi-lipids and polymers enhances the performance of vancomycin in lipid-polymer hybrid nanoparticles: In vitro and in silico studies. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2016;61:616–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.053>
124. Xue HY, Tran N, Wong HL. A biodistribution study of solid lipid-polyethyleneimine hybrid nanocarrier for cancer RNAi therapy. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2016;108:68–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.08.014>
125. Zhao J, Zhang X, Sun X, Zhao M, Yu C, Lee RJ, et al. Dual-functional lipid polymeric hybrid pH-responsive nanoparticles decorated with cell penetrating peptide and folate for therapy against rheumatoid arthritis. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2018;130(June):39–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.06.020>
126. Jansen MAA, Klausen LH, Thanki K, Lyngsø J, Skov Pedersen J, Franzyk H, et al. Lipidoid-polymer hybrid nanoparticles loaded with TNF siRNA suppress inflammation after intra-articular administration in a murine experimental arthritis model. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2019;142(November 2018):38–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.009>
127. Wu C, Luo X, Baldursdottir SG, Yang M, Sun X, Mu H. In vivo evaluation of solid lipid microparticles and hybrid polymer-lipid microparticles for sustained delivery of leuprolide. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2019;142(July):315–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.07.010>
128. Zhang J, Hu J, Chan HF, Skibba M, Liang G, Chen M. iRGD decorated lipid-polymer hybrid nanoparticles for targeted co-delivery of doxorubicin and sorafenib to enhance anti-hepatocellular carcinoma efficacy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2016;12(5):1303–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.017>
129. Liu Y, Jiang Z, Hou X, Xie X, Shi J, Shen J, et al. Functional lipid polymeric

- nanoparticles for oral drug delivery: Rapid mucus penetration and improved cell entry and cellular transport. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2019;21:102075. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102075>
130. Boushra M, Tous S, Fetih G, Xue HY, Wong HL. Development of bi-polymer lipid hybrid nanocarrier (BLN) to improve the entrapment and stability of insulin for efficient oral delivery. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2019;49(July 2018):632–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.007>
 131. Meraj Anjum M, Kanoujia J, Parashar P, Arya M, K. Yadav A, A. Saraf S. Evaluation of a Polymer-Lipid-Polymer System Utilising Hybrid Nanoparticles of Dapsone as a Novel Antiacne Agent. *Curr Drug ther.* 2016;11(2):86–100.
 132. Arya RKK, Juyal V. Polymer -Lipid Hybrid Nanoparticles for Brain Targeting Through Intranasal Delivery. *J Drug Deliv Ther.* 2017;7(4):129–36.
 133. Tahir N, Madni A, Kashif PM, Rehman M, Raza A, Khan MI, et al. Formulation and compatibility assessment of PLGA/lecithin based lipid-polymer hybrid nanoparticles containing doxorubicin. *Acta Pol Pharm - Drug Res.* 2017;74(5):1563–72.
 134. Tahir N, Madni A, Correia A, Rehman M, Balasubramanian V, Khan MM, et al. Lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic doxorubicin for breast cancer therapy. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:4961–74.
 135. Zhao W, Zhang C, Li B, Zhang X, Luo X, Zeng C, et al. Lipid Polymer Hybrid Nanomaterials for mRNA Delivery. *Cell Mol Bioeng.* 2018;11(5):397–406.
 136. Gu J, Chen Y, Tong L, Wang X, Yu D, Wu H. Astaxanthin-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles (ATX-LPN): Assessment of potential otoprotective effects. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2020;18(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00600-x>
 137. Wang Q, Alshaker H, Böhler T, Srivats S, Chao Y, Cooper C, et al. Core shell lipid-polymer hybrid nanoparticles with combined docetaxel and molecular targeted therapy for the treatment of metastatic prostate cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–8.
 138. Abdou EM, Fayed MAA, Helal D, Ahmed KA. Assessment of the hepatoprotective effect of developed lipid-polymer hybrid nanoparticles (LPHNPs) encapsulating naturally extracted β -Sitosterol against CCl₄ induced hepatotoxicity in rats. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-56320-2>
 139. Cao S, Slack SD, Levy CN, Hughes SM, Jiang Y, Yogodzinski C, et al. Hybrid nanocarriers incorporating mechanistically distinct drugs for lymphatic CD4 + T cell activation and HIV-1 latency reversal. *Sci Adv.* 2019;5(3):1–13.

-
140. Garg NK, Tyagi RK, Sharma G, Jain A, Singh B, Jain S, et al. Functionalized Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles Mediated Codelivery of Methotrexate and Aceclofenac: A Synergistic Effect in Breast Cancer with Improved Pharmacokinetics Attributes. *Mol Pharm*. 2017;14(6):1883–97.
 141. Wang J, Zhang L, Chi H, Wang S. An alternative choice of lidocaine-loaded liposomes: lidocaine-loaded lipid–polymer hybrid nanoparticles for local anesthetic therapy. *Drug Deliv*. 2016;23(4):1254–60.
 142. Chen W, Guo M, Wang S. Anti prostate cancer using PEGylated bombesin containing, cabazitaxel loading nano-sized drug delivery system. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016;42(12):1968–76.
 143. Küçükürkmen B, Devrim B, Saka OM, Yılmaz Ş, Arsoy T, Bozkir A. Co-delivery of pemetrexed and miR-21 antisense oligonucleotide by lipid-polymer hybrid nanoparticles and effects on glioblastoma cells. *Drug Dev Ind Pharm*. 2017;43(1):12–21.
 144. Shao Y, Luo W, Guo Q, Li X, Zhang Q, Li J. In vitro and in vivo effect of hyaluronic acid modified, doxorubicin and gallic acid co-delivered lipid-polymeric hybrid nano-system for leukemia therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:2043–55.
 145. Wang J. Combination treatment of cervical cancer using folate-decorated, pH-sensitive, carboplatin and paclitaxel co-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:823–32.
 146. Yu Z, Chen F, Qi X, Dong Y, Zhang Y, Ge Z, et al. Epidermal growth factor receptor aptamer-conjugated polymer-lipid hybrid nanoparticles enhance salinomycin delivery to osteosarcoma and cancer stem cells. *Exp Ther Med*. 2018;15(2):1247–56.
 147. Gao F, Zhang J, Fu C, Xie X, Peng F, You J, et al. iRGD-modified lipid–polymer hybrid nanoparticles loaded with isoliquiritigenin to enhance anti-breast cancer effect and tumor-targeting ability. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:4147–62.
 148. Khan MM, Madni A, Torchilin V, Filipczak N, Pan J, Tahir N, et al. Lipid-chitosan hybrid nanoparticles for controlled delivery of cisplatin. *Drug Deliv [Internet]*. 2019;26(1):765–72. Available from: <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1642420>
 149. Sun S, Liang N, Yamamoto H, Kawashima Y, Cui F, Yan P. pH-sensitive poly(lactide-co-glycolide) nanoparticle Composite Microcapsules for Oral Delivery of Insulin. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:3489–98.
 150. Tng DJH, Song P, Lin G, Soehartono AM, Yang G, Yang C, et al. Synthesis and characterization of multifunctional hybrid-polymeric nanoparticles for drug delivery

- and multimodal imaging of cancer. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:5771–86.
151. Wu B, Lu ST, Deng K, Yu H, Cui C, Zhang Y, et al. MRI-guided targeting delivery of doxorubicin with reduction-responsive lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:6871–82.
 152. Li J, Xu W, Yuan X, Chen H, Song H, Wang B, et al. Polymer-lipid hybrid anti-HER 2 nanoparticles for targeted salinomycin delivery to HER 2-positive breast cancer stem cells and cancer cells. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:6909–21.
 153. Wu B, Lu ST, Zhang LJ, Zhuo RX, Xu HB, Huang SW. Codelivery of doxorubicin and triptolide with reduction-sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for in vitro and in vivo synergistic cancer treatment. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:1853–62.
 154. Men W, Zhu P, Dong S, Liu W, Zhou K, Bai Y, et al. Fabrication of dual pH/redox-responsive lipid-polymer hybrid nanoparticles for anticancer drug delivery and controlled release. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:8001–11.
 155. Hu Y, Hoerle R, Ehrich M, Zhang C. Engineering the lipid layer of lipid-PLGA hybrid nanoparticles for enhanced in vitro cellular uptake and improved stability. *Acta Biomater* [Internet]. 2015 Dec;28(1):149–59. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706115301252>
 156. Hu Y, Zhao Z, Ehrich M, Fuhrman K, Zhang C. In vitro controlled release of antigen in dendritic cells using pH-sensitive liposome-polymeric hybrid nanoparticles. *Polymer (Guildf)*. 2015;80:171–9.
 157. Dehaini D, Fang RH, Luk BT, Pang Z, Hu CMJ, Kroll A V., et al. Ultra-small lipid-polymer hybrid nanoparticles for tumor-penetrating drug delivery. *Nanoscale*. 2016;8(30):14411–9.
 158. Hu Y, Smith D, Frazier E, Hoerle R, Ehrich M, Zhang C. The next-generation nicotine vaccine: a novel and potent hybrid nanoparticle-based nicotine vaccine. *Biomaterials* [Internet]. 2016 Nov;106(12):228–39. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296121630415X>
 159. Golan-Paz S, Frizzell H, Woodrow KA. Cross-Platform Comparison of Therapeutic Delivery from Multilamellar Lipid-Coated Polymer Nanoparticles. *Macromol Biosci* [Internet]. 2019 Apr 27;19(4):1800362. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mabi.201800362>
 160. Wei J, Sun J, Liu Y. Enhanced targeting of prostate cancer-initiating cells by salinomycin-encapsulated lipid-PLGA nanoparticles linked with CD44 antibodies. *Oncol Lett*. 2019;17(4):4024–33.
 161. Bhardwaj A, Mehta S, Yadav S, Singh SK, Grobler A, Goyal AK, et al. Pulmonary

- delivery of antitubercular drugs using spray-dried lipid–polymer hybrid nanoparticles. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 2016;44(6):1544–55.
162. Liang J, Liu Y, Liu J, Li Z, Fan Q, Jiang Z, et al. Chitosan-functionalized lipid-polymer hybrid nanoparticles for oral delivery of silymarin and enhanced lipid-lowering effect in NAFLD. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2018;16(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0391-9>
163. Yasar H, Biehl A, De Rossi C, Koch M, Murgia X, Loretz B, et al. Kinetics of mRNA delivery and protein translation in dendritic cells using lipid-coated PLGA nanoparticles. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2018;16(1):1–19. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0401-y>
164. Jin Z, Lv Y, Cao H, Yao J, Zhou J, He W, et al. Core-shell nanocarriers with high paclitaxel loading for passive and active targeting. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016;(February):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27559>
165. Ishak RAH, Mostafa NM, Kamel AO. Stealth lipid polymer hybrid nanoparticles loaded with rutin for effective brain delivery – comparative study with the gold standard (Tween 80): Optimization, characterization and biodistribution. *Drug Deliv* [Internet]. 2017;24(1):1874–90. Available from: <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1410263>
166. Yan J, Wang Y, Zhang X, Liu S, Tian C, Wang H. Targeted nanomedicine for prostate cancer therapy: docetaxel and curcumin co-encapsulated lipid–polymer hybrid nanoparticles for the enhanced anti-tumor activity in vitro and in vivo. *Drug Deliv.* 2016;23(5):1757–62.
167. Tawfik MA, Tadros MI, Mohamed MI. Lipomers (Lipid-polymer Hybrid Particles) of Vardenafil Hydrochloride: a Promising Dual Platform for Modifying the Drug Release Rate and Enhancing Its Oral Bioavailability. *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(8):3650–60.
168. Thakur K, Sharma G, Singh B, Chhibber S, Katare OP. Nano-engineered lipid-polymer hybrid nanoparticles of fusidic acid: an investigative study on dermatokinetics profile and MRSA-infected burn wound model. *Drug Deliv Transl Res.* 2019;9(4):748–63.